

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5161777号  
(P5161777)

(45) 発行日 平成25年3月13日(2013.3.13)

(24) 登録日 平成24年12月21日(2012.12.21)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09	(2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A
C 07 K 16/40	(2006.01) C 07 K 16/40
C 12 N 5/10	(2006.01) C 12 N 5/00 1 O 2
A 61 K 39/395	(2006.01) A 61 K 39/395 P
A 61 P 9/00	(2006.01) A 61 P 9/00

請求項の数 23 (全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-530231 (P2008-530231)	(73) 特許権者 398005777
(86) (22) 出願日	平成18年9月6日(2006.9.6)	アムジェン フレモント インク。
(65) 公表番号	特表2009-506791 (P2009-506791A)	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
(43) 公表日	平成21年2月19日(2009.2.19)	555 フレモント カイザー ドライヴ
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/035096	6701
(87) 國際公開番号	W02007/040912	(73) 特許権者 506181531
(87) 國際公開日	平成19年4月12日(2007.4.12)	ファイザー インコーポレイティッド
審査請求日	平成21年8月19日(2009.8.19)	アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー
(31) 優先権主張番号	60/715,292	ヨーク イースト 42番 ストリート
(32) 優先日	平成17年9月7日(2005.9.7)	235
(33) 優先権主張国	米国(US)	(74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志
微生物の受託番号	ATCC PTA-6864	(74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊
微生物の受託番号	ATCC PTA-6865	
微生物の受託番号	ATCC PTA-6808	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アクチビン受容体様キナーゼ-1に対するヒトモノクローナル抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

SEQ ID NO: 6の重鎖可変ドメインのCDR1、CDR2およびCDR3と、SEQ ID NO: 8の軽鎖可変ドメインのCDR1、CDR2およびCDR3とを含む、ALK-1に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項2】

前記抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが、それぞれ以下の配列：

SEQ ID NO: 6および8；

SEQ ID NO: 6および127；

SEQ ID NO: 104および8；

SEQ ID NO: 104および127；または

ATCCアクセス番号PTA-6864において寄託された大腸菌クローニングにおいて見いだされるプラスミドインサートのヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>H</sub>アミノ酸配列、およびATCCアクセス番号PTA-6865において寄託された大腸菌クローニングにおいて見いだされるプラスミドインサートのヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>L</sub>アミノ酸配列を含む、請求項1記載の抗体または抗原結合部分。

## 【請求項3】

SEQ ID NO: 6を含む重鎖と、SEQ ID NO: 8を含む軽鎖とを含む、ALK-1に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

## 【請求項4】

10

20

SEQ ID NO: 2の重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 4の軽鎖アミノ酸配列とを含む、モノクローナル抗体。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 6の重鎖可変ドメインとSEQ ID NO: 8の軽鎖可変ドメインとを含む、請求項3記載の抗体または抗原結合部分。

【請求項 6】

IgG1またはIgG2分子である、請求項3または5記載のモノクローナル抗体。

【請求項 7】

以下からなる群より選択される少なくとも1つの特性を有する、請求項1記載の抗体または抗原結合部分 :

- a) 表面プラズモン共鳴によって測定した場合に結合力値5 nMまたはそれ未満で靈長類ALK-1の細胞外ドメインに結合すること ;
- b) 表面プラズモン共鳴によって測定した場合に結合力値250 pMまたはそれ未満でヒトALK-1の細胞外ドメインに結合すること ;
- c) 表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、ヒトALK-1に関して $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ またはそれより小さいオフ・レート(off rate)( $k_{off}$ )を有すること ;
- d) フローサイトメトリーによって測定した場合に $K_D$  50 nMまたはそれ未満で靈長類ALK-1に結合すること ;
- e) 1.5より大きい $K_D$ (齧歯類) /  $K_D$ (靈長類)を有すること ;
- f) ALK-1の下流の特異的標的遺伝子Id1のアップリギュレーションの阻害によって測定した場合に150 nMまたはそれ未満の $IC_{50}$ を有すること ;
- g) ウエスタンプロッティングによって決定したSmad1リン酸化の阻害によって測定した場合に150 nMまたはそれ未満の $IC_{50}$ を有すること ;
- h) ヒトCD-31シグナルアッセイのIHC分析によって決定した場合に、ヒト黒色腫M24met腫瘍細胞が皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生を、対照試料と比較して少なくとも40%阻害すること ;
- i) ヒトCD-31シグナルアッセイのIHC分析によって決定した場合に、コラーゲンが皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生を、対照試料と比較して少なくとも50%阻害すること ;
- j) 1.12.1 ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; および1.12.1(rWT)からなる群より選択される抗体と、ALK-1に対する結合に関して競合すること ;
- k) 1.12.1 ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; および1.12.1(rWT)からなる群より選択される抗体とALK-1に対する結合に関して交叉競合すること ;
- l) 1.12.1 ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; および1.12.1(rWT)からなる群より選択される抗体とALK-1の同じエピトープに結合すること ;
- m) 1.12.1 ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; および1.12.1(rWT)からなる群より選択される抗体と実質的に同じ $K_D$ でALK-1に結合すること ; ならびに
- n) 1.12.1 ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; および1.12.1(rWT)からなる群より選択される抗体と実質的に同じ $k_{off}$ でALK-1に結合すること。

【請求項 8】

SEQ ID NO: 6または104とアミノ酸配列が少なくとも90%同一である $V_H$ ドメインを含む、請求項1記載の抗体または抗原結合部分。

【請求項 9】

SEQ ID NO: 8または127とアミノ酸配列が少なくとも90%同一である $V_L$ ドメインを含む、請求項1記載の抗体または抗原結合部分。

【請求項 10】

以下からなる群より選択される、請求項1記載の抗体または抗原結合部分 :

- a) SEQ ID NO: 6において記載される $V_H$ ドメイン、またはSEQ ID NO: 6とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なる $V_H$ ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であ

10

20

30

40

50

るV<sub>H</sub>ドメイン、およびSEQ ID NO: 8において記載されるV<sub>L</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 8とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>L</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>L</sub>ドメイン、を含む抗体またはその一部；

b) SEQ ID NO: 104において記載されるV<sub>H</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 104とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>H</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>H</sub>ドメイン、およびSEQ ID NO: 127において記載されるV<sub>L</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 127とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>L</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>L</sub>ドメイン、を含む抗体またはその一部；  
10

c) SEQ ID NO: 6において記載されるV<sub>H</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 6とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>H</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>H</sub>ドメイン、およびSEQ ID NO: 127において記載されるV<sub>L</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 127とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>L</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>L</sub>ドメイン、を含む抗体またはその一部；ならびに

d) SEQ ID NO: 104において記載されるV<sub>H</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 104とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>H</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>H</sub>ドメイン、およびSEQ ID NO: 8において記載されるV<sub>L</sub>ドメイン、またはSEQ ID NO: 8とは少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によって異なるV<sub>L</sub>ドメインであって、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一であるV<sub>L</sub>ドメイン、を含む抗体またはその一部。  
20

#### 【請求項11】

抗体または抗原結合部分がヒトV<sub>H</sub> 4-31遺伝子を利用する重鎖を含む、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換がヒトV<sub>H</sub> 4-31遺伝子において起こり、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一である、請求項1記載の抗体または抗原結合部分。  
30

#### 【請求項12】

抗体または抗原結合部分がヒトV<sub>K</sub> A27遺伝子を利用する軽鎖を含む、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換がヒトV<sub>K</sub> A27遺伝子において起こり、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する該配列が非置換配列とアミノ酸配列において少なくとも90%同一である、請求項1記載の抗体または抗原結合部分。

#### 【請求項13】

IgG、IgM、IgE、IgA、もしくはIgD分子である、またはそれらに由来する、請求項1～3、5および7～10のいずれか一項記載の抗体。

#### 【請求項14】

誘導体化された、または他の分子に連結された、請求項1～13のいずれか一項記載の抗体または抗原結合部分。  
40

#### 【請求項15】

前記分子がペプチドまたはタンパク質である、請求項14記載の抗体または抗原結合部分。  
。

#### 【請求項16】

請求項1～13のいずれか一項記載の抗体の重鎖もしくはその抗原結合部分、軽鎖もしくはその抗原結合部分、または両方をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸分子。

#### 【請求項17】

SEQ ID NO: 1、3、5、7、95、101、103、126、128、または129のヌクレオチド配列を含む、請求項16記載の単離核酸分子。  
50

**【請求項 18】**

ATCCアクセッション番号PTA-6808において寄託されているハイブリドーマ。

**【請求項 19】**

請求項18記載のハイブリドーマによって產生された抗体、該產生された抗体と同じアミノ酸配列を有する抗体、またはその抗原結合部分。

**【請求項 20】**

以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の抗体または抗原結合部分：

- a) SEQ ID NO: 2;
- b) SEQ ID NO: 4;
- c) SEQ ID NO: 6;
- d) SEQ ID NO: 8;
- e) SEQ ID NO: 100;
- f) SEQ ID NO: 102;
- g) SEQ ID NO: 104;
- h) SEQ ID NO: 127;

10

i) ATCCアクセッション番号PTA-6864において寄託された大腸菌クローンにおいて見いだされるプラスミドインサートのヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>H</sub>アミノ酸配列；および

j) ATCCアクセッション番号PTA-6865において寄託された大腸菌クローンにおいて見いだされるプラスミドインサートのヌクレオチド配列によってコードされるV<sub>L</sub>アミノ酸配列。

20

**【請求項 21】**

以下からなる群より選択される重鎖アミノ酸配列および軽鎖アミノ酸配列を含む、請求項20記載の抗体または抗原結合部分：

- a) SEQ ID NO: 2の重鎖アミノ酸配列およびSEQ ID NO: 102の軽鎖アミノ酸配列；
- b) SEQ ID NO: 100の重鎖アミノ酸配列およびSEQ ID NO: 4の軽鎖アミノ酸配列；ならびに
- c) SEQ ID NO: 100の重鎖アミノ酸配列およびSEQ ID NO: 102の軽鎖アミノ酸配列。

**【請求項 22】**

30

請求項1～15および19～21のいずれか一項記載の抗体または抗原結合部分と、生理的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

**【請求項 23】**

請求項1～15および19～21のいずれか一項記載の抗体または抗原結合部分を含む、哺乳動物において血管新生を阻害するための組成物。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】****発明の分野**

本発明は、アクチビン受容体様キナーゼ-1(ALK-1)の細胞外ドメイン(ECD)に結合するヒトモノクローナル抗体およびその抗原結合部分に関する。本発明はまた、そのような抗体および抗原結合部分をコードする核酸分子、ヒト抗ALK-1抗体および抗原結合部分を作製する方法、これらの抗体および抗原結合部分を含む組成物、ならびに抗体、抗原結合部分、および組成物を用いる方法にも関する。

40

**【0002】**

なお、本出願は、35 U.S.C. § 119(e)の下で、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、2005年9月7日に提出された米国特許仮出願第60/715,292号からの優先権を主張する。

**【背景技術】****【0003】**

50

## 発明の背景

ALK-1は、トランスフォーミング増殖因子 受容体1型(TGF- $\beta$ -1)のI型細胞表面受容体である。ヒトALK-1は、アミノ酸503個のポリペプチドであり、これには、シグナル配列(アミノ酸：1～21位)、N-末端細胞外TGF- $\beta$ -1リガンド結合ドメイン、またはECD(アミノ酸22～118位)、1回膜貫通ドメイン(アミノ酸119～141位)、調節グリシン／セリンリッチ(GS)ドメイン(アミノ酸：142～202位)、およびC-末端セリン-トレオニンキナーゼドメイン(202～492位)が含まれる。Attisano et al. Cell, 1993, vol. 75, pp. 671-680において開示されるヒトALK-1のアミノ酸配列には、172位でセリンが含まれる(Genbank記録L17075)が、米国特許第6,316,217号は、172位でトレオニンを有するヒトALK-1のアミノ酸配列(Genbank記録NM\_000020)を請求している。Attisanoらにおいて開示される完全長のヒトALK-1をコードするACVRL1遺伝子は、Invitrogen Inc.からクローンID 10H21048として市販されている。ALK-1は、他のI型受容体(ALK-2からALK-7まで)と60～80%の全体的な相同意性を共有するが、ALK-1のECDは、他のALKファミリーメンバーのECDと顕著に異なっている。たとえば、ヒトにおいてALK-2のECDのみがALK-1のECDに関連している(約25%アミノ酸同一性を有する)。米国特許第6,316,217号；ten Dijke et al. Oncogene, 1993, vol. 8, pp. 2879-2887；Attisano et al. Cell, 1993, vol. 75, pp. 671-680。

### 【0004】

一般的にTGF- $\beta$ スーパーファミリーリガンドは、2つのタイプ(IおよびII)のセリン／トレオニンキナーゼのヘテロ多量体受容体複合体に結合することによって、その生物活性を発揮する。II型受容体は、リガンド結合の際にI型受容体をリン酸化する構成的に活性なキナーゼである。次に、活性化されたI型キナーゼが様々なSmadを含む下流のシグナル伝達分子をリン酸化して、これが核へと転位して転写反応が起こる。Heldin et al. Nature, 1997, vol. 390, pp. 465-471。ALK-1の場合、本発明者らは、Smad1が特異的にリン酸化されて核に転位して、そこでそれはSmad1反応性遺伝子Id1およびEphB2の発現を直接調節する。

### 【0005】

ALK-1は、内皮細胞および胎盤または脳のような他の高度に脈管形成された組織において高度にかつ選択的に発現されている。本発明者らは、AffymetrixプロファイリングおよびリアルタイムRT-PCRによって、内皮細胞におけるALK-1の発現が、その共受容体であるアクチビンII型およびエンドグリン、そのリガンドTGF- $\beta$ -1、またはALK-5の発現をはるかに超えることを示した。ALK-1における変異は、遺伝性出血性毛細管拡張症(HHT)に関連しており、血管の発達または修復の制御におけるALK-1の重大な役割を示唆している。Abdalla et al. J. Med. Genet., 2003, vol. 40, pp. 494-502；Sadick et al. Hematology/The Hematology J., 2005, vol. 90, 818-828。さらに、ALK-1ノックアウトマウスに関する独立した2つの研究は、血管新生の際のALK-1機能に関する重要なインピボでの証拠を提供する。Oh et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, vol. 97, pp. 2626-2631；Ureness et al. Nature Genetics, 2000, vol. 26, pp. 328-331。

### 【0006】

血管新生は、既存の血管および／または循環中の内皮幹細胞からの新しい血管の形成を伴う生理的プロセスである。これは成長および発達と共に創傷治癒における正常なプロセスである。しかし、これはまた、休眠状態から悪性状態への腫瘍の移行における根本的な段階でもある。Hanahan and Folkman, "Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis," Cell, 86(3):353-364, 1996；Carmeliet, "Angiogenesis in Health and Disease," Nature Medicine, 9(6):653-660, 2003；Berger and Benjamin, "Tumorigenesis and the Angiogenic Switch," Nature Reviews, 3:401-410, 2003。癌のような疾患では、体は、平衡のとれた血管新生を維持する能力を失う。新しい血管は疾患組織に栄養を与え、正常な組織を破壊し、いくつかの癌の場合、新しい血管は、腫瘍細胞を循環中に逃れさせて他の臓器に留まらせうる(腫瘍の転移)。モノクローナル抗体(mAb)を含む血管新生阻害剤は、腫瘍の成長を遮断または遅らせるためにこの異常なプロセスに対して向けられる非常に有望なクラスの薬物である。

10

20

30

40

50

## 【0007】

固形腫瘍の成長および転移における役割のほかに、血管新生成分を有する他の顕著な状態は、たとえば関節炎、乾癬、血管新生性加齢性黄斑変性および糖尿病性網膜症である。Bonnet et al. "Osteoarthritis, Angiogenesis and Inflammation," *Rheumatology*, 2005, vol. 44, pp. 7-16; Creamer et al. "Angiogenesis in psoriasis," *Angiogenesis*, 2002, vol. 5, pp. 231-236; Clavel et al. "Recent data on the role for angiogenesis in rheumatoid arthritis," *Joint Bone Spine*, 2003, vol. 70, pp. 321-326; Anand arajah et al. "Pathogenesis of psoriatic arthritis," *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2004, vol. 16, pp. 338-343; Ng et al. "Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration," *Can. J. Ophthalmol.*, 2005, vol. 40, pp. 352-368; Witmer et al. "Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease," *Progress in Retinal & Eye Research*, 2003, vol. 22, p p. 1-29; Adamis et al. "Angiogenesis and ophthalmic disease," *Angiogenesis*, 1999, vol. 3, pp. 9-14.

10

## 【0008】

抗血管新生治療は本質的に慢性的であると予想される。したがって、ALK-1のような高度に選択性的な内皮細胞機能を有する標的は、副作用に起因する摩耗を低減するために好ましい。さらに、ALK-1 ECDが他のALKファミリーメンバーのECDとは顕著に異なることを考慮すると、ヒトALK-1 ECDに対して作製されたmAbは、ALK-1を選択的に標的とする予想される。これらの検討に基づいて、II型受容体との二量体形成を阻害して、したがってSmad1リン酸化および下流の転写反応を遮断する可能性がある、ALK-1細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体は、非常に望ましい。

20

## 【0009】

R&D Systems, Inc.は、精製NSO-由来組換え型ヒトALK-1細胞外ドメインによって免疫したマウスから得られたB細胞とマウス骨髄腫との融合に起因するハイブリドーマによって產生されたモノクローナル抗ヒトALK-1抗体(カタログ番号MAB370)を製造および販売している。本発明者らは、この抗体がALK-1とTGF- $\beta$ -1との相互作用を中和せず、Smad1リン酸化を排除しないことを示した。キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)(米国特許第6,692,925号)に共役させたALK-1の細胞内膜近接領域の一部(アミノ酸145~166位)に対応する合成ペプチドに対して、およびリーディング配列を除く全ALK-1細胞外ドメイン(Lux et al., *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 9984-9992)に対するウサギ血清が作製されている。Abdallaら(Human Mol. Gen., 2000, vol. 9, pp. 1227-1237)は、組換え型ワクシニアウイルス構築物を用いてALK-1に対するポリクローナル抗体の生成を報告している。R&D Systems, Inc.は、精製NSO-由来組換え型ヒトALK-1細胞外ドメインによって免疫したヤギにおいて產生されたポリクローナル抗ヒトALK-1抗体(カタログ番号AF370)を製造および販売している。

30

## 【0010】

今まで、ALK-1のECDに対する完全なヒトモノクローナル抗体は報告されておらず、ALK-1/TGF- $\beta$ -1/Smad1シグナル伝達経路の排除におけるALK-1のECDに対するいかなるモノクローナル抗体の有効性も証明されていない。

40

## 【発明の開示】

## 【0011】

発明の概要

本発明は、靈長類ALK-1に結合する、好ましくは靈長類ALK-1のECDに結合する、より好ましくはヒトALK-1のECDに結合する、単離された中和性の抗ALK-1モノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。好ましい態様において、中和抗体は完全なヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分である。

## 【0012】

もう1つの局面において、本発明は、ALK-1/TGF- $\beta$ -1/Smad1シグナル伝達経路を排除する抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分である。好ましい態様において、抗体は完全なヒ

50

トモノクローナル抗体またはその抗原結合部分である。

**【0013】**

もう1つの局面において、本発明は、TGF- $\beta$ -1刺激血管新生のアンタゴニストである、抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分である。好ましい態様において、抗体は、完全なヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分である。

**【0014】**

もう1つの局面において、本発明は、TGF- $\beta$ -1刺激腫瘍血管新生のアンタゴニストである、完全な抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分である。

**【0015】**

もう1つの局面において、本発明は、TGF- $\beta$ -1刺激血管新生のアンタゴニストである、認容性の良好な注射用の完全なヒト抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分である。

10

**【0016】**

もう1つの局面において、本発明は、ALK-1の下流の特異的標的遺伝子Id1のアップレギュレーションを阻害する、抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分である。好ましい態様において、抗体は、完全なヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分である。

**【0017】**

もう1つの局面において、本発明は、以下に記述されるようないくつかの機能的特性の少なくとも1つに関して記述される、抗ALK-1モノクローナル抗体またはその抗原結合部分である。

**【0018】**

20

たとえば、1つの態様において、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、結合力値1  $\mu$ Mまたはそれ未満で靈長類ALK-1の細胞外ドメインに結合する。さらなる態様において、抗体またはその一部は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、100 nM未満、5 nM未満、1 nM未満、500 pM未満、100 pM未満、50 pM未満、20 pM未満、10 pM未満、または1 pM未満の結合力値で靈長類ALK-1の細胞外ドメインに結合する。特定の態様において、結合力値は0.1 pM~1  $\mu$ Mである。他の態様において、結合力値は1 pM~100 nMである。他の態様において、結合力値は1 pM~5 nMである。他の態様において、結合力値は1 pM~100 pMである。他の態様において、結合力値は1 pM~500 pMである。他の態様において、結合力の値は1 pM~100 pMである。他の態様において、結合力は1 pM~10 pMである。

**【0019】**

30

もう1つの態様において、抗体またはその抗原結合部分は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、結合力値100 nMまたはそれ未満でヒトALK-1の細胞外ドメインに結合する。さらなる態様において、抗体またはその一部は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、10 nM未満、5 nM未満、1 nM未満、500 pM未満、100 pM未満、50 pM未満、20 pM未満、10 pM未満、または1 pM未満の結合力値でヒトALK-1の細胞外ドメインに結合する。特定の態様において、結合力値は1 pM~100 nMである。他の態様において、結合力値は、1 pM~5 nMである。他の態様において、結合力値は、1 pM~500 pMである。他の態様において、結合力値は、1 pM~100 pMである。他の態様において、結合力は1 pM~10 pMである。

**【0020】**

40

もう1つの態様において、抗体またはその一部は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合にヒトALK-1に関して $5 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$ またはそれより小さいオフレート( $k_{off}$ )を有する。たとえば、特定の態様において、抗体またはその一部は、ヒトALK-1に関して $10^{-3}$  s $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4}$  s $^{-1}$ 未満、 $10^{-4}$  s $^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5}$  s $^{-1}$ 未満、 $10^{-5}$  s $^{-1}$ 未満、または $5 \times 10^{-6}$  s $^{-1}$ 未満の $k_{off}$ を有する。他の態様において、 $k_{off}$ は、 $10^{-6}$  s $^{-1}$ ~ $10^{-4}$  s $^{-1}$ である。他の態様において、 $k_{off}$ は、 $10^{-6}$  s $^{-1}$ ~ $5 \times 10^{-5}$  s $^{-1}$ である。

**【0021】**

もう1つの態様において、抗体またはその一部は、靈長類ALK-1に対して $K_D$  1000 nMまたはそれ未満で結合する。さらなる態様において、抗体またはその一部は、表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、ヒトALK-1に対して500 nM未満、100 nM未満、50 nM未満、

50

20 nM未満、10 nM未満、または1 nM未満のK<sub>D</sub>で結合する。特定の態様において、K<sub>D</sub>は1 μM～100 nMである。他の態様において、K<sub>D</sub>は100 nM～10 nMである。他の態様において、K<sub>D</sub>は50 nM～0.1 nMである。そのようなK<sub>D</sub>値は、ELISA、RIA、フローサイトメトリー、またはBIACORE(商標)のような表面プラズモン共鳴のような、当業者に公知の任意の技術によって測定することができる。

#### 【0022】

もう1つの態様において、抗体またはその一部は、齧歯類ALK-1(K<sub>D</sub>(R))に対するより靈長類ALK-1(K<sub>D</sub>(P))に対してより大きい結合親和性を有する。1つの態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部分は、1.5より大きいまたはそれに等しいK<sub>D</sub>(R)/K<sub>D</sub>(P)を有する。10さらなる態様において、本発明の抗体または抗原結合部分は、2より大きいもしくは2に等しい、3より大きいもしくは3に等しい、5より大きいもしくは5に等しい、10より大きいもしくは10に等しい、20より大きいもしくは20に等しい、50より大きいもしくは50に等しい、100より大きいもしくは100に等しい、200より大きいもしくは200に等しい、500より大きいもしくは500に等しい、または1000より大きいもしくは1000に等しいK<sub>D</sub>(R)/K<sub>D</sub>(P)を有する。靈長類ALK-1および齧歯類ALK-1の双方に関するそのようなK<sub>D</sub>値は、フローサイトメトリー、ELISA、RIA、またはBIACORE(商標)のような表面プラズモン共鳴のような当業者に公知の任意の技術によって測定することができる。

#### 【0023】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、ALK-1の下流の特異的標的遺伝子Id1のアップレギュレーションの阻害能によって測定した場合に500 nMまたはそれ未満のIC<sub>50</sub>を有する。20さらなる態様において、IC<sub>50</sub>は300 nM未満、200 nM未満、150 nM未満、100 nM未満、50 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、または1 nM未満である。特定の態様において、IC<sub>50</sub>は1 nM～500 nMである。他の態様において、IC<sub>50</sub>は5 nM～200 nMである。他の態様において、IC<sub>50</sub>は10 nM～100 nMである。

#### 【0024】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、Odyssey赤外線イメージングシステムを用いてウェスタンプロットティングによって決定したSmad1リン酸化の阻害能によって測定した場合に、250 nMまたはそれより低いIC<sub>50</sub>を有する。30さらなる態様において、IC<sub>50</sub>は、200 nM未満、150 nM未満、100 nM未満、50 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、または1 nM未満である。特定の態様において、IC<sub>50</sub>は、1 nM～250 nMである。他の態様において、IC<sub>50</sub>は、5 nM～200 nMである。他の態様において、IC<sub>50</sub>は10 nM～100 nMである。

#### 【0025】

もう1つの態様において、ALK-1抗体またはその一部は、ヒトCD-31シグナルアッセイのIHC分析によって決定した場合に、ヒト黒色腫M24met腫瘍細胞が皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生を、対照試料と比較して少なくとも40%阻害する。40さらなる態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、ヒト黒色腫M24met腫瘍細胞が皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生を、対照試料と比較して少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、または少なくとも60%阻害する。

#### 【0026】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、ヒト黒色腫M24met腫瘍細胞が皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生の阻害能によって測定した場合に、500 nMまたはそれ未満のEC<sub>50</sub>を有する。50さらなる態様において、該EC<sub>50</sub>は、400 nM未満、300 nM未満、200 nM未満、150 nM未満、100 nM未満、50 nM未満、25 nM未満、または5 nM未満である。特定の態様において、EC<sub>50</sub>は5 nM～500 nMである。他の態様において、IC<sub>50</sub>は25 nM～300 nMである。他の態様において、IC<sub>50</sub>は50 nM～150 nMである。

#### 【0027】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、ヒトCD-31シグナルアッセイ50

のIHC分析によって決定した場合に、コラーゲンプラスヒト大血管内皮細胞の混合物が皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生を、対照試料と比較して少なくとも25%阻害する。さらなる態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、コラーゲンが皮内に移植されたヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおけるヒト血管新生を、対照試料と比較して少なくとも50%阻害する。さらなる態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、対照と比較して少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%阻害する。

## 【0028】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M291/D19A) ; 1.12.1(M291) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1からなる群より選択される抗体と、ALK-1に対する結合に関して競合する。10

## 【0029】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M291/D19A) ; 1.12.1(M291) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1からなる群より選択される抗体と、ALK-1に対する結合に関して交叉競合する。20

## 【0030】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M291/D19A) ; 1.12.1(M291) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1からなる群より選択される抗体と同じALK-1のエピトープに結合する。20

## 【0031】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M291/D19A) ; 1.12.1(M291) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; 5.59.1からなる群より選択される抗体と実質的に同じ $K_D$ でALK-1に結合する。30

## 【0032】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M291/D19A) ; 1.12.1(M291) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1からなる群より選択される抗体と実質的に同じ $k_{off}$ でALK-1に結合する。

## 【0033】

本発明のさらなる局面は、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有し、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; または104のいずれか1つとアミノ酸配列が少なくとも90%同一である $V_H$ ドメインを含む抗体またはその抗原結合部分である。1つの態様において、該 $V_H$ ドメインは、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; または104のいずれか1つに対してアミノ酸配列が少なくとも91%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%同一である。40

## 【0034】

さらなる態様において、抗体またはその一部は、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有し、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; もしくは104のいずれかである、または少なくとも1つ50

の保存的アミノ酸置換を有することによってSEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; もしくは104のいずれか1つとは異なるV<sub>H</sub>ドメインを含む。たとえば、V<sub>H</sub>ドメインは、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; または104のいずれか1つと、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換によって異なりうる。さらなる態様において、これらの保存的アミノ酸置換のいかなるものもCDR1、CDR2、および／またはCDR3領域において起こりうる。

### 【 0 0 3 5 】

本発明のさらなる局面は、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有し、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; または127のいずれか1つに対してアミノ酸配列が少なくとも90%同一であるV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその抗原結合部分である。1つの態様において、該V<sub>L</sub>ドメインは、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; または127のいずれか1つに対してアミノ酸配列が少なくとも91%、少なくとも93%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、または100%同一である。

### 【 0 0 3 6 】

さらなる態様において、抗体またはその一部は、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有し、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; もしくは127のいずれか1つである、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有することにより、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; もしくは127のいずれか1つと異なるV<sub>L</sub>ドメインを含む。たとえばV<sub>L</sub>ドメインは、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; または127のいずれか1つと、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換によって異なりうる。さらなる態様において、これらの保存的アミノ酸置換は、CDR1、CDR2、および／またはCDR3領域において起こりうる。

### 【 0 0 3 7 】

本発明のもう1つの局面は、V<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインがそれぞれ、以下のモノクローナル抗体 : 1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1のいずれか1つのV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインに対してアミノ酸配列が少なくとも90%同一である、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有する抗体またはその抗原結合部分である。たとえば、V<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインはそれぞれ、モノクローナル抗体1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1のいずれか1つのV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインに対してアミノ酸配列が少なくとも91%、93%、95%、97%、99%、または100%同一である。

### 【 0 0 3 8 】

本発明のもう1つの局面は、以下からなる群より選択されるモノクローナル抗体またはその抗原結合部分である：a)SEQ ID NO: 6において記載されるV<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 8において記載されるV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部；b)SEQ ID NO: 10において記載されるV<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 12において記載されるV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部；c)SEQ ID NO: 14において記載されるV<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 16において記載されるV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部；d)SEQ ID NO: 18において記載されるV<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 20において記載されるV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部；e)SEQ ID NO: 22において記載されるV<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 24において記載されるV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部；f)SEQ ID NO: 26において記載されるV<sub>L</sub>

10

20

30

40

50

<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 28において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; g)SEQ ID NO: 30において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 32において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; h)SEQ ID NO: 34において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 36において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; i)SEQ ID NO: 38において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 40において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; j)SEQ ID NO: 42において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 44において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; k)SEQ ID NO: 46において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 48において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; l)SEQ ID NO: 50において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 52において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; m)SEQ ID NO: 54において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 56において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; n)SEQ ID NO: 58において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 60において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; o)SEQ ID NO: 62において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 64において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; p)SEQ ID NO: 66において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 68において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; q)SEQ ID NO: 70において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 72において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; r)SEQ ID NO: 74において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 76において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; s)SEQ ID NO: 78において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 80において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; t)SEQ ID NO: 82において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 84において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; u)SEQ ID NO: 86において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 88において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; v)SEQ ID NO: 90において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 92において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; w)SEQ ID NO: 104において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 127において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; x)SEQ ID NO: 6において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 127において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部 ; ならびにy)SEQ ID NO: 104において記載される<sub>H</sub>ドメインおよびSEQ ID NO: 8において記載される<sub>L</sub>ドメインを含む抗体またはその一部。

## 【 0 0 3 9 】

30

さらなる態様において、群a)~v)において先に記述した抗体またはその一部のいずれかに關して、<sub>H</sub>および/または<sub>L</sub>ドメインは、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換により、その中で引用された特異的配列番号とは異なりうる。たとえば、<sub>H</sub>および/または<sub>L</sub>ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換によって、引用された配列番号と異なりうる。さらなる態様において、これらの保存的アミノ酸置換のいずれも、CDR1、CDR2、および/またはCDR3領域において起こりうる。

## 【 0 0 4 0 】

30

もう1つの態様において、本発明は、<sub>H</sub>ドメインが、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; もしくは104のいずれか1つから独立して選択される、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によってSEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; もしくは104のいずれか1つとは異なる配列であり、および<sub>L</sub>ドメインが、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; もしくは127のいずれか1つから独立して選択される、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によってSEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; もしくは127とは異なる配列である、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。たとえば、<sub>H</sub>および<sub>L</sub>ドメインはそれぞれ、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換によってそれ

40

50

それ、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; または104およびSEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; または127とは異なりうる。

#### 【 0 0 4 1 】

さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; もしくは104のいずれか1つ、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によってSEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; もしくは104とは異なる配列において見いだされる重鎖CDR1、CDR2、またはCDR3配列から独立して選択される <sup>10</sup>  $V_H$  CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。たとえば、 $V_H$  CDR1、CDR2、およびCDR3は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換によって、SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; または104のいずれかのCDR1、CDR2、およびCDR3とはそれぞれ異なりうる。

#### 【 0 0 4 2 】

さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; もしくは127のいずれか1つ、または少なくとも1つの保存的アミノ酸置換によってSEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; もしくは127とは異なる配列において見いだされる軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3配列から独立して選択される <sup>20</sup>  $V_L$  CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。たとえば、 $V_L$  CDR1、CDR2、およびCDR3は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換によってSEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; または127のいずれかのCDR1、CDR2、およびCDR3とはそれぞれ異なりうる。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明はさらに、モノクローナル抗体1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1のいずれか1つにおいて見いだされる $V_H$ および $V_L$  CDR1、 $V_H$ および $V_L$  CDR2、ならびに $V_H$ および $V_L$  CDR3を含む、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。 <sup>30</sup>

#### 【 0 0 4 4 】

本発明はさらに、ヒト $V_H$  4-31、 $V_H$  3-11、 $V_H$  3-15、 $V_H$  3-33、 $V_H$  4-61、または $V_H$  4-59遺伝子を利用する重鎖を含む、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。いくつかの態様において、重鎖は、ヒト $V_H$  3-33遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 3B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-61遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 3-3遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 3B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 3B遺伝子；ヒト $V_H$  4-59遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 3-11遺伝子、ヒトD 3-22遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 6B遺伝子；ヒト $V_H$  3-15遺伝子、ヒトD 3-22遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 4-23遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 2-2遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 5B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 6B遺伝子；ヒト $V_H$  3-15遺伝子、ヒトD 1-1遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 6B遺 <sup>40</sup>  
伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 2-2遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 5B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 6B遺伝子；ヒト $V_H$  3-15遺伝子、ヒトD 1-1遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 4B遺伝子；ヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒトJ<sub>H</sub> 6B遺 <sup>50</sup>  
伝子

伝子；ヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 3-10遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子；またはヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 6-6遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子を利用する。

#### 【0045】

本発明はさらに、ヒト $V_K$  A27、 $V_K$  A2、 $V_K$  A1、 $V_K$  A3、 $V_K$  B3、 $V_K$  B2、 $V_K$  L1、または $V_K$  L2遺伝子を利用する軽鎖を含む、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。いくつかの態様において、軽鎖は、 $V_K$  L1遺伝子およびヒト $J_K$  4遺伝子；ヒト $V_K$  A27遺伝子およびヒト $J_K$  5遺伝子またはヒト $J_K$  4遺伝子；ヒト $V_K$  B3遺伝子およびヒト $J_K$  1遺伝子；ヒト $V_K$  L2遺伝子およびヒト $J_K$  3遺伝子；ヒト $V_K$  A2遺伝子およびヒト $J_K$  1遺伝子；ヒト $V_K$  A3遺伝子およびヒト $J_K$  4遺伝子；ヒト $V_K$  A1遺伝子およびヒト $J_K$  1遺伝子；ヒト $V_K$  B2遺伝子およびヒト $J_K$  4遺伝子；またはヒト $V_K$  A2遺伝子およびヒト $J_K$  1遺伝子を利用する。  
10

#### 【0046】

本発明はさらに、モノクローナル抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；および5.59.1のいずれか1つにおいて見いだされる重鎖および／または軽鎖FR1、FR2、FR3、またはFR4アミノ酸配列の1つまたは複数を含む、既に記述された機能的特性の少なくとも1つを有するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。

#### 【0047】

本発明はさらに、a)SEQ ID NO: 2およびSEQ ID NO: 4；b)SEQ ID NO: 2およびSEQ ID N  
0: 102；c)SEQ ID NO: 100およびSEQ ID NO: 4；ならびにd)SEQ ID NO: 100およびSEQ ID  
NO: 102において記載されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体を提供する。  
20

#### 【0048】

本発明のさらなる態様は、IgG、IgM、IgE、IgA、もしくはIgD分子である既に記述された任意の抗体、またはそれに由来する抗体である。たとえば、抗体はIgG<sub>1</sub>またはIgG<sub>2</sub>となりうる。

#### 【0049】

もう1つの態様は、Fab断片、 $F(ab')断片、Fv断片、一本鎖Fv断片、一本鎖 $V_H$ 断片、一本鎖 $V_L$ 断片、ヒト化抗体、キメラ抗体、または二重特異的抗体である、先に記述された任意の抗体またはその抗原結合部分を提供する。  
30$

#### 【0050】

さらなる態様は、既に記述された任意の抗体またはその一部と、少なくとも1つのさらなる分子実体とを含む誘導体化抗体またはその抗原結合部分である。たとえば、少なくとも1つのさらなる分子実体は、もう1つの抗体(たとえば、二重特異的抗体または二重特異性抗体(diabody))、検出物質、標識、細胞障害物質、薬剤、および／または抗体もしくは抗体の一部ともう1つの分子との会合を媒介することができるタンパク質またはペプチド(ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグのような)となりうる。たとえば、本発明の抗体またはその抗原結合部分がそれによって誘導体化される可能性がある有用な検出物質には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリン、ランタニドリン等を含む蛍光化合物が含まれる。抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等のような検出にとって有用な酵素によっても標識することができる。さらなる態様において、本発明の抗体またはその一部はまた、ビオチンによって、または二次レポーターによって認識される既定のポリペプチドエピトープ(たとえば、ロイシンジッパー配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)によって標識することができる。本発明のなおさらなる態様において、任意の抗体またはその一部はまた、ポリエチレングリコール(PEG)、メチルもしくはエチル基、または炭水化物基のような化学基によって誘導体化することができる。  
40  
50

**【 0 0 5 1 】**

いくつかの態様において、本明細書において開示される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分は、固相支持体に付着される。

**【 0 0 5 2 】**

いくつかの態様において、本発明の任意の抗ALK-1抗体の重鎖のC-末端リジンは切断される。本発明の様々な態様において、抗ALK-1抗体の重鎖および軽鎖には、任意でシグナル配列が含まれてもよい。

**【 0 0 5 3 】**

本発明はまた、先に記述した任意の抗体またはその抗原結合部分と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

10

**【 0 0 5 4 】**

もう1つの態様において、本発明は、本明細書において記述される任意の抗体またはその抗原結合部分をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸分子に関する。1つの特定の態様において、単離核酸分子は、その配列が重鎖をコードする、SEQ ID NO: 1において記載されるヌクレオチド配列を含む。もう1つの特定の態様において、単離核酸分子は、その配列が軽鎖をコードする、SEQ ID NO: 3において記載されるヌクレオチド配列を含む。

**【 0 0 5 5 】**

もう1つの特定の態様において、単離核酸分子は、ATCCアクセション番号PTA-6864として寄託されているクローンのcDNA配列のオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを含む。もう1つの特定の態様において、単離核酸分子は、ATCCアクセション番号PTA-6865として寄託されているクローンのcDNA配列のオープンリーディングフレームを含むポリヌクレオチドを含む。

20

**【 0 0 5 6 】**

もう1つの特定の態様において、単離核酸分子は、そのそれぞれの配列が重鎖をコードするSEQ ID NO: 95または128において記載されるヌクレオチド配列を含む。もう1つの特定の態様において、単離核酸分子は、その配列が軽鎖をコードするSEQ ID NO: 101において記載のヌクレオチド配列を含む。

**【 0 0 5 7 】**

本発明はさらに、核酸分子に機能的に連結した発現制御配列を任意で含む、本明細書に記述の任意の核酸分子を含むベクターに関する。

30

**【 0 0 5 8 】**

もう1つの態様は、本明細書において記述される任意のベクターを含む、または本明細書において記述される任意の核酸分子を含む宿主細胞を提供する。本発明はまた、本明細書において記述される任意の抗体もしくはその抗原結合部分を產生する、または任意の抗体もしくはその抗原結合部分の重鎖もしくは軽鎖を產生する単離細胞株を提供する。

**【 0 0 5 9 】**

もう1つの態様において、本発明は、適した条件下で本明細書において記述される任意の宿主細胞または細胞株を培養する段階、および抗体またはその抗原結合部分を回収する段階を含む、抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分を產生するための方法に関する。

40

**【 0 0 6 0 】**

本発明はまた、核酸を発現する、本明細書において記述される任意の核酸を含む、非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物に関する。

**【 0 0 6 1 】**

本発明は、さらに、本明細書において記述される非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物から抗体を単離する段階を含む、ALK-1に結合する抗体またはその抗原結合部分を単離するための方法を提供する。

**【 0 0 6 2 】**

もう1つの態様において、本発明は、ATCCアクセション番号PTA-6808として寄託されるハイブリドーマに関する。

50

**【 0 0 6 3 】**

本発明はまた、Id1を発現する細胞の第一の試料を物質に接触させる段階、およびId1発現が阻害されるか否かを決定する段階を含む、物質が、ALK-1の下流の特異的標的遺伝子Id1のアップレギュレーションを阻害するか否かを決定するための方法であって、物質に接触させた第一の細胞試料におけるId1発現のレベルが対照細胞試料と比較して低減すれば、該物質がId1発現を阻害することが示される方法を提供する。本発明はさらに、物質が、ALK-1の細胞外ドメインに結合する抗体である方法を提供する。

**【 0 0 6 4 】**

本発明はまた、本明細書に記述の任意の抗体もしくはその抗原結合部分または任意の薬学的組成物を哺乳動物に投与する段階を含む、それを必要とする哺乳動物における異常な細胞成長を処置するための方法を提供する。本発明はさらに、核酸分子を発現させる適した条件下で本明細書に記述の任意の核酸分子の有効量を哺乳動物に投与する段階を含む、ALK-1に結合する抗体またはその抗原結合部分によって、それを必要とする哺乳動物における異常な細胞成長を処置するための方法を提供する。もう1つの態様において、異常な細胞成長を処置する方法はさらに、異常な細胞成長を処置するために共に有効である、抗腫瘍物質、抗血管新生物質、シグナル伝達阻害剤、および抗増殖剤から選択される1つまたは複数の物質の量を投与する段階をさらに含む。特定の態様において、異常な細胞成長は癌様である。

**【 0 0 6 5 】**

本発明はまた、SEQ ID NO: 93のアミノ酸配列を有する単離されたカニクイザルALK-1タンパク質を提供する。本発明はさらに、SEQ ID NO: 93のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする単離核酸分子を提供する。本発明はさらに、SEQ ID NO: 94の単離核酸分子を提供する。

**【 0 0 6 6 】****発明の詳細な説明****定義および一般技術**

本明細書において特に明記していなければ、本発明と結びつけて用いられる科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するであろう。さらに、本文がそうではないことを必要としている場合を除き、单数形には複数形が含まれ、複数形には单数形が含まれるであろう。一般的に、本明細書において記述される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションと結びつけて用いられる命名法は、当技術分野において周知であり、一般的に用いられる。

**【 0 0 6 7 】**

本発明の方法および技術は一般的に、特に明記していなければ、当技術分野において周知の通常の方法に従って行われ、ならびに本明細書を通して引用および考察されている様々な一般的なおよびより特異的な参考文献において記述されているように行われる。たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook J. & Russell D.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000) ; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology : A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002) ; Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998) ; およびColigan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003) を参照されたい。酵素反応および精製技術は、当技術分野において一般的に行われるようにならば、本明細書において記述されるように製造元の説明書に従って行われる。本明細書において記述される分析化学、合成有機化学、ならびに医薬化学に結びつけて用いられる命名法、ならびにそれらに関する実験技法および技術は、当技術分野において周知であり、一般的に用いられる。

**【 0 0 6 8 】**

10

20

30

40

50

以下の用語は、特に明記していなければ、以下の意味を有すると理解されるであろう。

【0069】

本明細書において用いられるように、「ALK-1」という用語は、哺乳動物のアクチビン受容体様キナーゼ-1を指す。ALK-1という用語には、標準的な組換え体発現法によって調製することができる組換え型ALK-1およびALK-1の組換え型キメラ型が含まれると意図される。

【0070】

本明細書において用いられるように、頭字語「mAb」はモノクローナル抗体を指す。

【0071】

本明細書において用いられるように、番号によって参照される抗体は、同じ番号のハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体(mAb)である。たとえば、モノクローナル抗体1.12.1は、ハイブリドーマ1.12.1から得られる。

10

【0072】

1.12.1は、ハイブリドーマから単離されたmAb 1.12.1変種を指す。

【0073】

1.12.1(rWT)は、組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0074】

1.12.1(M291/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異(重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換され、軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換される)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

20

【0075】

1.12.1(M291)は、重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換された特異的な1つのアミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0076】

1.12.1(D19A)は、軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換された特異的な1つのアミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0077】

本明細書において用いられるように、「異常な細胞成長」は、特に明記していなければ、正常な調節メカニズムとは無関係である細胞成長(たとえば、接触阻害の喪失)を指す。

【0078】

30

本明細書において用いられるように、「隣接する」という用語は、介在するヌクレオチドを有しない、互いに直接付着しているヌクレオチド配列を指すために用いられる。例として、ペントヌクレオチド5'-AAAAA-3'は、5'-AAAAATTT-3'または5'-TTTAAAAA-3'のように接続している場合に、トリヌクレオチド5'-TTT-3'に隣接しているが、2つが5'-AAAAACT TT-3'のように接続している場合には隣接していない。

【0079】

「作用物質」という用語は、本明細書において化学化合物、化学化合物の混合物、生体高分子、または生物材料で作製された抽出物を意味するために用いられる。

【0080】

本明細書において用いられるように、疾患、障害、または状態を「緩和する」とは、疾患、障害、または状態の症状の重症度を低減させることを意味する。これには、処置の方法の前、または処置の方法の非存在下でこれらの同じパラメータと比較した場合に、患者における腫瘍の大きさ、成長および/または質量、転移の程度または進行等に影響を及ぼすことが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

40

【0081】

本明細書において用いられるように、頭字語「Id1」は、ALK-1の下流の特異的標的遺伝子であって、血管新生にとって重要であるId1遺伝子を指す。Id1遺伝子は、天然に存在する血管新生抑制物質であるタンパク質、トロンボスポンジン(TSP-1)の産生を停止させることによって、特定の癌における血管新生経路を制御すると報告されている。たとえば、黒色腫、乳癌、頭頸部癌、脳癌、子宮頸癌、前立腺癌、膵臓癌および精巣癌において高度

50

に発現されているId1遺伝子によって、TSP-1の発現の減少および腫瘍血管形成の増加が起こることが報告されている。Volpert, Olga V. et al, "Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1," *Cancer Cell*, Dec. 2002, Vol. 2, pp. 473-483。

#### 【0082】

本明細書において用いられるように、「Smad」という用語は、線虫からヒトに及ぶ種の範囲において見いだされるSmadドメインタンパク質を指す。これらの高度に保存されたタンパク質は、DNAに接触するN-末端MH1ドメインを含み、C-末端MH2ドメインから短いリンカーフィールドによって離れており、後者はフォークヘッド関連(FHA)ドメインと顕著な類似性を示す。FHAおよびSmad(MH2)ドメインは、グリークキー位相で2つのシートにおいて11個の鎖のサンドイッチからなる共通の構造を共有する。Smadタンパク質は、細胞表面の受容体Ser/Thrタンパク質キナーゼから核へのTGF- $\beta$ /アクチビン/BMP-2/4サイトカインによるシグナル伝達を媒介する。Smadタンパク質は、3つの機能的クラスに分けられる：そのそれぞれがリガンド特異的シグナル伝達経路に関係するSmad1、-2、-3、-5、および-8を含む受容体調節Smad(R-Smads)；シグナル伝達に関するためにR-Smadと相互作用するSmad4を含む共媒介性Smad(co-Smad)；ならびにR-SmadとCo-Smadの活性化を遮断して、それによってシグナル伝達経路を負に調節するSmad-6および-7を含む阻害性Smad(I-Smads)。

#### 【0083】

本明細書において用いられるように、「TGF- $\beta$ 」という用語は、細胞の成長および分化を調節する多機能サイトカインファミリー(TGF- $\beta$ 1-5)を構成するトランスフォーミング増殖因子- $\beta$ を指す。トランスフォーミング増殖因子(TGF)は、天然に存在する特徴付けがなされた多くの増殖因子の1つである。これは、重度の複合免疫不全を有する「SCID」マウスにおいて重大な役割を果たす。多くの細胞がTGF- $\beta$ を合成し、本質的に全ての細胞がこのペプチドに対する特異的受容体を有する。TGF- $\beta$ は、他の多くのペプチド増殖因子の作用を調節して、その効果の正または負の方向を決定する。TGF- $\beta$ は、上皮細胞において成長阻害効果を有する腫瘍抑制性サイトカインである。TGF- $\beta$ はまた、上皮-間葉遷移を誘発することによって、腫瘍のプロモーターとしても作用する可能性がある。TGF- $\beta$ は、細胞周期進行に関係するいくつかのタンパク質を不活化して、それによってそれらを細胞周期のG1期に停止させることによって、上皮細胞に及ぼすその成長阻害効果を発揮する。タンパク質は、ジスルフィド連結ホモ二量体として機能する。その配列は、いくつかのC-末端システイン残基の存在を特徴として、それは、結び目様の位相で整列した互いにかみあつたジスルフィド連結を形成する。類似の「シスチン結び目」の整列は、電位により開くCa<sup>2+</sup>チャンネルに結合するいくつかの酵素阻害剤およびニューロトキシンの構造において認められているが、正確な位相は異なる。TGF- $\beta$ 遺伝子は、異なるように発現され、このことは、様々なTGF- $\beta$ 種がインビボで明確な生理的役割を有する可能性があることを示唆している。

#### 【0084】

本明細書において用いられるように、「TGF- $\beta$ 1」という用語は、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$ 受容体1型を指し、これは前駆体タンパク質のC-末端からタンパク質分解切断によって誘導されたアミノ酸残基112個のペプチドである。成体マウス組織におけるTGF- $\beta$ 1 mRNAレベルを調べると、脾臓、肺、および胎盤において発現が優勢であることを示している。TGF- $\beta$ は病理的プロセスにおいて重要な役割を果たすと考えられている。

#### 【0085】

本明細書において用いられるように、「SCID」という用語は、重度の複合免疫不全症を有するマウスを指す。

#### 【0086】

本明細書において用いられるように、「HUVEC」という用語は、ヒト臍帯血内皮細胞を指す。

#### 【0087】

本明細書において用いられるように、「アミノ酸」は、以下の表において示されるよう

10

20

30

40

50

に、その完全な名称によって、それに対応する三文字コードによって、またはそれに対応する一文字コードによって表される：

<u>完全な名称</u>	<u>三文字コード</u>	<u>一文字コード</u>	
アスパラギン酸	Asp	D	
グルタミン酸	Glu	E	
リジン	Lys	K	
アルギニン	Arg	R	
ヒスチジン	His	H	
チロシン	Tyr	Y	10
システイン	Cys	C	
アスパラギン	Asn	N	
グルタミン	Gln	Q	
セリン	Ser	S	
トレオニン	Thr	T	
グリシン	Gly	G	
アラニン	Ala	A	
バリン	Val	V	20
ロイシン	Leu	L	
イソロイシン	Ile	I	
メチオニン	Met	M	
プロリン	Pro	P	
フェニルアラニン	Phe	F	
トリプトファン	Trp	W	

#### 【 0 0 8 8 】

本明細書において用いられるように、通常アミノ酸20個およびその省略形は通常の用途に従う。参照により本明細書に組み入れられるImmunology--A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))を参照されたい。

#### 【 0 0 8 9 】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学特性(たとえば、電荷または疎水性)を有する側鎖R基を有するもう1つのアミノ酸残基によって置換されている置換である。一般的に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないであろう。2つまたはそれより多いアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なる場合、%配列同一性または類似性の程度は、置換の保存的特性を修正するために上向きに調節してもよい。この調節を作製するための手段は当業者に周知である。たとえば、Pearson, Methods Mol. Biol. 243:307-31 (1994)を参照されたい。

#### 【 0 0 9 0 】

類似の化学特性を有する側鎖を有するアミノ酸の群の例には、1)脂肪族側鎖；グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；2)脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；3)アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4)芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン；5)塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン；6)酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸；ならびに7)硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニンが含まれる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸塩-アスパラギン酸塩、およびアスパラギン-グルタミンである。

10

20

30

40

50

## 【0091】

または、保存的置換は、参照により本明細書に組み入れられるGonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992)において開示されるPAM250対数尤度行列において正の値を有する任意の変化である。「中等度に保存的」な置換は、PAM250対数尤度行列において負でない値を有する任意の変化である。

## 【0092】

特定の態様において、抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分に対するアミノ酸置換は、以下の置換である：(1)タンパク質分解に対する感受性を低減させる、(2)酸化に対する感受性を低減させる、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる、および(4)そのような類似体の他の物理化学的または機能的特性を付与または変化させるがなおもALK-1に対する特異的結合を保持する。類似体には、通常に存在するペプチド配列に対する様々な置換が含まれる。たとえば、1つまたは多数のアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換を、通常に存在する配列において、たとえば分子間接触を形成するドメイン外のポリペプチドの部分において行ってもよい。アミノ酸置換はまた、ポリペプチドの活性を改善しうる分子間接触を形成するドメインにおいて行うことができる。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造特徴を実質的に変化させてはならない；たとえばアミノ酸の置換は、親配列において起こる免疫グロブリン結合ドメインを構成する逆平行 -シートを変化させてはならない、または親配列の特徴を示す他のタイプの二次構造を破壊してはならない。一般的に、グリシンおよびプロリンは、逆平行 -シートにおいて用いられないであろう。当技術分野において認識されるポリペプチド二次構造および三次構造の例は、参照により本明細書に組み入れられる、*Proteins. Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)) ; *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)) ; およびThornton et al., *Nature* 354:105 (1991)において記述される。

10

20

## 【0093】

配列同一性とも呼ばれるポリペプチドに関する配列類似性は、典型的に配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む、様々な置換、欠失、および他の改変に割付された類似性の測定を用いて類似の配列をマッチさせる。たとえば、GCGは、異なる種の生物からの相同なポリペプチドのような近縁のポリペプチドの間、または野生型タンパク質とそのムテインとの間の配列相同性または配列同一性を決定するためにデフォルトパラメータと共に用いることができる「Gap」および「Bestfit」のようなプログラムを含む。たとえば、GCGバージョン6.1を参照されたい。ポリペプチド配列はまた、GCGバージョン6.1におけるプログラムであるデフォルトまたは推奨パラメータを用いるFASTAを用いて比較することができる。FASTA(たとえば、FASTA2およびFASTA3)は、問い合わせ配列と検索配列との間の最善のオーバーラップ領域のアライメントおよび%配列同一性を提供する(Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990) ; Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000))。異なる生物からの多数の配列を含むデータベースと本発明の配列とを比較した場合のもう1つの好ましいアルゴリズムは、デフォルトパラメータを用いるコンピュータープログラムBLAST、特にblastpまたはblastnである。たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) ; Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997)を参照されたい。

30

40

## 【0094】

相同性に関して比較されるポリペプチド配列の長さは一般的に、アミノ酸残基少なくとも約16個、通常少なくとも約20残基、より通常少なくとも約24残基、典型的に少なくとも約28残基、および好ましくは約35残基より多いであろう。多数の異なる生物からの配列を含むデータベースを検索する場合、アミノ酸配列を比較することが好ましい。本明細書において用いられるように「類似体」という用語は、推定される天然に存在するアミノ酸配列の一部と実質的な同一性を有するアミノ酸少なくとも25個のセグメントを含み、天然に

50

存在するポリペプチドの特性の少なくとも1つを有するポリペプチドを指す。典型的に、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に関して保存的アミノ酸置換(または付加もしくは欠失)を含む。典型的に類似体は、長さがアミノ酸少なくとも20個であり、好ましくは長さがアミノ酸少なくとも50個またはそれより長く、しばしば完全長の天然に存在するポリペプチドと同じ長さとなりうる。

#### 【0095】

ペプチド類似体は一般的に、鋳型ペプチドと類似の特性を有する非ペプチド薬として薬学産業において用いられる。これらのタイプの非ペプチド化合物は「ペプチドの模倣体」または「ペプチド模倣体」と呼ばれる。参考により本明細書に組み入れられる、Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); および Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)。そのような化合物はしばしば、コンピューター化分子モデリングの助けを借りて開発される。10

#### 【0096】

治療的に有用なペプチドと構造的に類似であるペプチド模倣体を、同等の治療的または予防的效果を產生するために用いてもよい。一般的に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体のような典型的なポリペプチド(すなわち、生化学特性または薬理活性を有するポリペプチド)と構造的に類似であるが、当技術分野において周知の方法によって、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-(シスおよびトランス)、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-、およびCH<sub>2</sub>SO-からなる群より選択される連結によって任意で置換された1つまたは複数のペプチド連結を有する。コンセンサス配列の1つまたは複数のアミノ酸の、同じタイプのD-アミノ酸(たとえば、L-リジンの代わりにD-リジン)との系統的な置換を用いて、より安定なペプチドを生成してもよい。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列変化を含む拘束されたペプチドを、当技術分野で公知の方法によって(参考により本明細書に組み入れられる、Rizo and Giersch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992))、たとえばペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を加えることによって、作製してもよい。20

#### 【0097】

無傷の「抗体」または「免疫グロブリン」(Ig)は、ジスルフィド結合によって互いに連結された少なくとも2つの重(H)鎖(約50~70 kDa)と2つの軽(L)鎖(約25 kDa)を含む。軽鎖には2つのタイプのみが存在する: および 。ヒトにおいて、それらは類似であるが、1つのタイプのみがそれぞれの抗体に存在する。重鎖はμ、γ、δ、ε、またはαとして分類され、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを定義する。一般的に、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))(全ての目的に関してその全内容物が参考により本明細書に組み入れられる)を参照されたい。好ましい態様において、抗体はIgGであり、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブタイプである。より好ましい態様において、抗ALK-1抗体はサブクラスIgG2である。30

#### 【0098】

それぞれの重鎖は重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)と重鎖定常領域(C<sub>H</sub>)とを含む。重鎖定常領域は3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を含む。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメインC<sub>L</sub>を含む。軽鎖および重鎖に関して、可変および定常領域は約12個またはそれより多いアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖にはまた約3個またはそれより多いアミノ酸の「D」領域が含まれる。V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域はさらに、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれるより保存された領域がその間に介在する、「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる超可変領域に細分されうる。それぞれのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>は、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで整列する、3つのCDRおよび4つのFRで構成される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。それぞれのドメインに対するアミノ酸の割付は、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 and 1991))、またはChothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。4050

## 【0099】

それぞれの重鎖／軽鎖対( $V_H$ および $V_L$ )の可変ドメインは、抗原と相互作用する抗体結合部位を形成する。このように、無傷のIgG抗体は、たとえば2つの結合部位を有する。二機能または二重特異的抗体を例外として、2つの結合部位は同じである。抗体の定常領域は、宿主組織または免疫系の様々な細胞(たとえば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む要因に対する免疫グロブリンの結合を媒介する可能性がある。

## 【0100】

抗体は、そのC領域(少数のC領域)の生物学的有効性を維持しながら、あらゆる可能性がある病原体(多くのV領域)を認識するために十分な抗原結合多様性を有しなければならない。Ig遺伝子は、それによって多くのV領域を少数のC領域と共に用いることができる遺伝子セグメントから無作為にスプライシングされる。 $IgH$  および 鎮をコードする遺伝子セグメントは、異なる3つの染色体において見いだされている。B細胞発達の際に、リコンビナーゼ酵素はDNAからイントロンおよびいくつかのエキソンを除去して、セグメントを機能的Ig遺伝子にスプライシングする。

10

## 【0101】

哺乳動物におけるIg遺伝子セグメントは、「可変」(V)、「多様性」(D)、「接合」(J)、および「定常」(C)エキソンの群に整列される。V ( $V_K$ )セグメントはそれぞれ、鎖V領域の最初の2つのCDRおよび3つのFR、プラスCDR3の少数の残基をコードする。J ( $J_K$ )セグメントはそれぞれ、CDR3の残りおよび第4のFRをコードする。C ( $C_K$ )は 軽鎖の完全なC領域をコードする。ヒト 鎮をコードするDNAには、機能的V ( $V_K$ )セグメント約40個、J

20

( $J_K$ )セグメント5個、およびC ( $C_K$ )遺伝子セグメント1個と共に、終止コドンを含むいくつかの遺伝子セグメント(「偽遺伝子」)が含まれる。ヒト 鎮DNAは、機能的V (V )セグメント約30個およびJ (J )の機能的な組4個およびC (C )セグメントを含む。特定のJ (J )は、全て同じC ( $C_K$ )と対を形成するJ ( $J_K$ )とは異なり、常にその対応するC (C )と対を形成する。ヒトH鎖に関するDNAには、機能的 $V_H$ セグメント約50個、 $D_H$ セグメント30個、および $J_H$ セグメント6個が含まれる。重鎖可変ドメインの最初の2個のCDRおよび3個のFRは、 $V_H$ によってコードされる。CDR3は $V_H$ の少数のヌクレオチド、 $D_H$ の全て、および $J_H$ の一部によってコードされるが、FR4は、 $J_H$ 遺伝子セグメントの残りによってコードされる。同様に、B細胞によって発現される順に整列した、それぞれの重鎖ドメインおよびそれぞれのアイソタイプの膜領域に関するDNAにおいて個々の遺伝子セグメントが存在する。

30

## 【0102】

「ポリペプチド」という用語は、本来のまたは人工のタンパク質、タンパク質断片、およびタンパク質配列のポリペプチド類似体を含む。ポリペプチドは単量体であっても多量体であってもよい。

## 【0103】

「単離タンパク質」、「単離ポリペプチド」、または「単離抗体」という用語は、その起源または誘導体化源によって、(1)その本来の状態においてそれに伴う天然に会合する成分に会合していない、(2)同じ種の他のタンパク質を含まない、(3)異なる種からの細胞によって発現される、または(4)天然に存在しない、タンパク質、ポリペプチド、または抗体である。このように、化学合成される、またはそれが天然に起源を有する細胞とは異なる細胞系において合成されるポリペプチドは、その天然に会合する成分から「単離」されるであろう。タンパク質はまた、当技術分野で周知のタンパク質精製技術を用いて、単離することによって天然に会合する成分を実質的に含まないようにしてよい。

40

## 【0104】

単離された抗体の例には、ALK-1を用いてアフィニティ精製されている抗ALK-1抗体、またはインピトロで細胞株によって合成されている抗ALK-1抗体が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

## 【0105】

タンパク質またはポリペプチドは、試料の少なくとも約60～75%が1つの種のポリペプ

50

チドを示す場合、「実質的に純粋」、「実質的に均一」、または「実質的に精製」されている。ポリペプチドまたはタンパク質は単量体または多量体であってもよい。実質的に純粋なポリペプチドまたはタンパク質は、典型的にタンパク質試料の約50%、60%、70%、80%、または90%を含みえて、より通常約95%、好ましくは99%より多く純粋となりうる。タンパク質の純度または均一性は、タンパク質試料のポリアクリルアミドゲル電気泳動の後に、当技術分野で周知の染料によるゲルの染色により单一のポリペプチドバンドを可視化することのような当技術分野で周知の多くの手段によって示されてもよい。特定の目的に関して、HPLCまたは精製の技術分野において周知の他の手段を用いることによって、より高い解像度を提供してもよい。

## 【0106】

10

本明細書において用いられるように「ポリペプチド断片」という用語は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列は天然に存在する配列における対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。いくつかの態様において、断片は長さがアミノ酸少なくとも5、6、8、または10個である。他の態様において、断片は、長さがアミノ酸少なくとも14個、少なくとも20個、少なくとも50個、少なくとも70、80、90、100、150、または200個である。

## 【0107】

20

本明細書において用いられるように、「類似体」または「ポリペプチド類似体」という用語は、いくつかの参照アミノ酸配列と実質的な同一性を有し、参照アミノ酸配列と実質的に同じ機能または活性を有するセグメントを含むポリペプチドを指す。典型的に、ポリペプチド類似体は、参照配列に関して保存的アミノ酸置換(または挿入もしくは欠失)を含む。類似体は長さがアミノ酸少なくとも20もしくは25個となりえて、または長さがアミノ酸少なくとも50、60、70、80、90、100、150、もしくは200個もしくはそれより長くなりえて、しばしば完全長のポリペプチドと同じ長さとなりうる。本発明のいくつかの態様には、生殖系列アミノ酸配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17個の置換を有するポリペプチド断片またはポリペプチド類似体抗体が含まれる。抗体または免疫グロブリン分子の断片または類似体は、本明細書の教示に従って当業者によって容易に調製されうる。

## 【0108】

30

本明細書において用いられるように、抗体の「抗原結合部分」(または単純に「抗体部分」)は、抗原(たとえば、ALK-1またはALK-1のECD)に対して特異的結合能を保持する抗体の1つまたは複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長の抗体の断片によって行われることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例には、(i)V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>およびC<sub>H</sub>1ドメインからなる一価断片であるFab断片、(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結した2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')<sub>2</sub>断片、(iii)V<sub>H</sub>およびC<sub>H</sub>1ドメインからなるFd断片、(iv)抗体の1つの腕のV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインからなるFv断片、(v)V<sub>H</sub>ドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341 : 544-546)、および(vi)単離された相補性決定領域(CDR)。さらに、Fv断片の2つのドメインV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>は、異なる遺伝子によってコードされているが、それらは、組換え法を用いて、それによってV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>領域が対を形成して一価の分子(一本鎖Fv(scFv)として知られる)を形成する単一のタンパク質鎖としてそれらを作製することができる合成リンカーによって連結することができる;たとえばBird et al. Science 242:423- 426 (1988)およびHuston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)を参照されたい。そのような一本鎖抗体も同様に、抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれると意図される。二重特異性抗体のような他の型の一本鎖抗体も同様に含まれる。二重特異性抗体は、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが1つのポリペプチド鎖において発現される二価の二重特異的抗体であるが、同じ鎖における2つのドメインの間の対形成を許容するには短すぎるリンカーを用いて、それによってドメインをもう1つの鎖の相補性ドメインと対を形成させ、2つの抗原結合部位を作製する二価の二重特異的抗体である(たとえば、Holliger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993); Poljak et al. Structure 2:1121-1123 (1990))。

40

50

94)を参照されたい)。

#### 【0109】

なおさらに、抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体の一部と、1つまたは複数の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合または非共有結合会合によって形成されたより大きい免疫接着分子の一部であってもよい。そのような免疫接着分子の例には、4量体scFv分子を作製するためにストレプトアビジンコア領域を用いること(Kipriyanov et al. Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101 (1995))、ならびに二価およびビオチン化scFv分子を作製するためにシステイン残基、マーカーペプチド、およびC-末端ポリヒスチジンタグを用いること(Kipriyanov et al. Mol. Immunol. 31 :1047-1058 (1994))が含まれる。他の例には、抗体からの1つまたは複数のCDRが、ALK-1またはALK-1のECDのような関心対象抗原に特異的に結合するイムノアドヘシンにするために共有結合または非共有結合のいずれかによって分子に組み入れられる場合が含まれる。そのような態様において、CDRは、より大きいポリペプチド鎖の一部として組み入れられてもよく、もう1つのポリペプチド鎖に共有結合されてもよく、または非共有結合によって組み入れられてもよい。

#### 【0110】

FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片のような抗体部分は、抗体全体のそれぞれ、パパインまたはペプシン消化のような通常の技術を用いて抗体全体から調製することができる。その上、抗体、抗体の一部および免疫接着分子は、本明細書において記述されるように標準的な組換えDNA技術を用いて得ることができる。

#### 【0111】

本明細書において用いられるように、「ヒト抗体」という用語は、可変および定常ドメイン配列がヒト配列である任意の抗体を意味する。この用語は、ヒト遺伝子に由来するが、たとえば可能性がある免疫原性を減少させるため、親和性を増加させるため、望ましくない折り畳み等を引き起こす可能性があるシステインを消失させる等のために変化している配列を有する抗体が含まれる。この用語はまた、ヒト細胞の典型ではないグリコシル化を付与する可能性がある非ヒト細胞において組換えによって産生されたそのような抗体を含む。これらの抗体は、以下に記述されるように多様な方法で調製されてもよい。

#### 【0112】

本明細書において用いられるように、「中和抗体」、「阻害性抗体」、またはアンタゴニスト抗体という用語は、ALK-1/TGF- $\beta$ -1/Smad1シグナル伝達経路を阻害する抗体を意味する。好ましい態様において、抗体はALK-1/TGF- $\beta$ -1/Smad1シグナル伝達経路を少なくとも約20%、好ましくは40%、より好ましくは60%、さらにより好ましくは80%、またはさらにより好ましくは85%阻害する。ヒト抗ALK-1抗体の中和または阻害能は、たとえば実施例12において示されるように、ALK-1の下流の特異的標的遺伝子Id1のアップレギュレーションの阻害能；実施例13において示されるようにLI-COR BiosciencesからのOdyssey赤外線イメージングシステムを用いるウェスタンプロッティングによって決定したSmad1リン酸化の阻害能によって決定してもよい。

#### 【0113】

本明細書において用いられるように、「キメラ抗体」という用語は、2つまたはそれより多い異なる抗体からの領域を含む抗体を意味する。たとえば、キメラ抗体のCDRsの1つまたは複数は、ヒト抗ALK-1抗体に由来しうる。もう1つの例において、CDRsの全ては、ヒト抗ALK-1抗体に由来しうる。もう1つの例において、1つより多いヒト抗ALK-1抗体からのCDRをキメラ抗体において組み合わせることができる。たとえば、キメラ抗体は、第一のヒト抗ALK-1抗体の軽鎖からのCDR1、第二のヒト抗ALK-1抗体の軽鎖からのCDR2、および第三のヒト抗ALK-1抗体の軽鎖からのCDR3を含んでもよく、重鎖からのCDRsは1つまたは複数の他の抗ALK-1抗体に由来してもよい。さらに、フレームワーク領域は、そこから1つもしくは複数のCDRが得られる抗ALK-1抗体の1つ、または1つもしくは複数の異なるヒト抗体に由来してもよい。その上、本明細書において既に考察したように、キメラ抗体には、1つより多い種の生殖系列配列に由来する部分を含む抗体が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0114】

いくつかの態様において、本発明のキメラ抗体はヒト化抗ALK-1抗体である。本発明のヒト化抗ALK-1抗体は、1つまたは複数のフレームワーク領域のアミノ酸配列および／または本発明の1つまたは複数のヒト抗ALK-1抗体の定常領域の少なくとも一部からのアミノ酸配列を含み、非ヒト抗ALK-1抗体に由来する配列、たとえばCDR配列をさらに含む。

## 【0115】

本明細書において用いられるように、「ELISA」という用語は、酵素結合イムノソルベントアッセイを指す。このアッセイは、当業者に周知である。このアッセイの例は、Vaughan, T.J. et al., *Nature Biotech.* 14:309-314 (1996)と共に、本出願の実施例2において見いだされうる。

10

## 【0116】

本明細書において用いられるように、「表面プラズモン共鳴」という用語は、たとえば BIACORE(商標)システム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を用いてバイオセンサーマトリクス内でのタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムで生体特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。さらなる記述に関しては、Jonsson et al., *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson et al., *Biotechniques* 11 :620-627 (1991); Jonsson et al., *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); および Johnsson et al., *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991)を参照されたい。

## 【0117】

「親和性」という用語は、抗原と抗体との間の誘因力の測定を指す。抗原に対する抗体の固有の誘引性は、典型的に、特定の抗体-抗原相互作用の結合親和性平衡定数( $K_D$ )として表記される。抗体は、 $K_D$ が 1 mM、好ましくは 100 nMである場合に抗原に特異的に結合すると言われる。 $K_D$ 結合親和性定数は、たとえば実施例7および8において考察されるようにBIACORE(商標)システムを用いて表面プラズモン共鳴によって測定されうる。

20

## 【0118】

「 $k_{off}$ 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。 $k_{off}$ 解離速度定数は表面プラズモン共鳴によって、たとえば実施例7および8において考察されるようにBIACOREシステムを用いて測定されうる。

## 【0119】

「結合力」という用語は、抗体の親和性および価数の双方に基づいてその抗原と抗体の機能的な複合強度を指す。本明細書において用いられるように、この用語は、免疫グロブリン上の多数の抗原結合部位の結果として起こる親和性の増加を記述する。

30

## 【0120】

本明細書において用いられるように、「分子選択性」という用語は、他の抗原に関する場合より大きい、特異的抗原に対する抗体の結合親和性を指す。たとえば、本発明の抗体は、ALK-2からALK-7に対するよりALK-1に対して選択的となりえて、このことはALK-1に対する抗体の結合親和性が、ALK-2からALK-7に対するより少なくとも2倍大きい、たとえば4倍、10倍、50倍、または100倍またはそれより大きいことを意味する。そのような結合親和性は、当業者に公知の標準的な技術を用いて測定することができる。

## 【0121】

40

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリンもしくはT-細胞受容体に対して特異的に結合することができる、またはそうでなければ分子と相互作用することができる任意のタンパク質決定基が含まれる。エピトープ決定基は一般的にアミノ酸、炭水化物、または糖側鎖のような分子の化学活性表面基からなり、一般的に特異的3次元構造特徴と共に特異的荷電特徴を有する。エピトープは、「直線状」または「コンフォメーションナル」であってもよい。直線状のエピトープの場合、タンパク質と相互作用分子(抗体のような)との相互作用点は全て、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に起こる。コンフォメーションナルエピトープでは、相互作用点は互いに分離されるタンパク質上でアミノ酸残基を超えて起こる。抗原上の望ましいエピトープが決定されると、たとえば本発明において記述される技術を用いて、そのエピトープに対する抗体を作製することが可能となる。ま

50

たは、薬物発見プロセスの間、抗体の作製および特徴付けは、望ましいエピトープに関する情報を解明する可能性がある。この情報から、次に同じエピトープに対する結合に関して抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。これを達成するためのアプローチは、互いに競合的に結合する抗体、すなわち抗原に対する結合に関して競合する抗体を発見するための交叉競合試験を行うことである。その交叉競合に基づいて抗体を「ビニング」するためのハイスループットプロセスは、国際特許出願WO 03/48731において記述されている。

#### 【0122】

本明細書において用いられるように、「ビニング」という用語は、その抗原結合特徴に基づいて抗体を群分けする方法を指す。ビンの割付は、調べた抗体の全てに関して観察された結合パターンがどれほど異なるかに基づいていくぶん任意である。したがって、ビンは、必ずしも他の手段によって決定されたエピトープと相関せず、エピトープを定義するために用いてはならない。10

#### 【0123】

本明細書において抗体に関して用いられるように、「競合する」という用語は、第一の抗体またはその抗原結合部分が、第二の抗体またはその抗原結合部分と抗原に対する結合に関して競合して、第一の抗体とその同源のエピトープとの結合が、第二の抗体の非存在下での第一の抗体の結合と比較して第二の抗体の存在下で検出可能に減少することを意味する。もう1つの、そのエピトープに対する第二の抗体の結合がまた第一の抗体の存在下で検出可能に減少する場合も、当てはまりうるが必ずしもその必要はない。すなわち、第一の抗体は、そのそれぞれのエピトープに対する第一の抗体の結合をその第二の抗体が阻害することなく、そのエピトープに対する第二の抗体の結合を阻害することができる。しかし、それぞれの抗体が、他の抗体のその同源のエピトープまたはリガンドとの結合を、同じ、より大きい、またはより小さい程度に検出可能に阻害する場合、抗体は、そのそれぞれのエピトープの結合に関して互いに「交叉競合する」と言われる。競合するおよび交叉競合する抗体はいずれも本発明に含まれる。そのような競合または交叉競合が起こるメカニズム(たとえば、立体妨害、コンフォメーションの変化、または共通のエピトープもしくはその一部に対する結合等)によらず、当業者は、本明細書において提供された教示に基づいて、そのような競合および/または交叉競合抗体が含まれること、および本明細書に開示の方法にとって有用となりうることを認識するであろう。30

#### 【0124】

本明細書において参照されるように「ポリヌクレオチド」という用語は、いずれかのタイプのヌクレオチドのリボヌクレオチド、デオキシヌクレオチド、または改変型のいずれかである、長さが少なくとも10塩基のヌクレオチドの多量体型を意味する。この用語には、一本鎖型および二本鎖型が含まれる。

#### 【0125】

本明細書において用いられるように「単離ポリヌクレオチド」という用語は、その起源のために、「単離ポリヌクレオチド」が(1)「単離ポリヌクレオチド」が天然において見いだされるポリヌクレオチドの全てまたは一部と会合していない、(2)それに対して天然において連結していないポリヌクレオチドに機能的に連結している、または(3)より大きい配列の一部として天然において存在しない、ゲノム、cDNA、または合成起源のポリヌクレオチド、またはそのいくつかの組み合わせを意味する。40

#### 【0126】

本明細書において用いられるように、「天然に存在するヌクレオチド」という用語には、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドが含まれる。本明細書において用いられるように「改変ヌクレオチド」という用語には、改変または置換糖基等を有するヌクレオチドが含まれる。本明細書において言及される「オリゴヌクレオチド連結」という用語は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート、ホスホロアミデート等のようなオリゴヌクレオチド連結が含まれる。たとえば、その開示が参考により本明細書50

に組み入れられる、LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986) ; Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984) ; Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988) ; Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991) ; Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)) ; 米国特許第5,151,510号 ; Uhlmann and Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990)を参照されたい。オリゴヌクレオチドには、望ましければ検出のための標識が含まれうる。

#### 【 0 1 2 7 】

「機能的に連結した」配列には、関心対象遺伝子と隣接している発現制御配列と、関心対象遺伝子を制御するためにトランスで作用する、または離れた距離で作用する発現制御配列の双方が含まれる。10

#### 【 0 1 2 8 】

本明細書において用いられるように、「発現制御配列」という用語は、それに対してそれらがライゲーションしているコード配列の発現およびプロセシングを行うために必要であるポリヌクレオチド配列を意味する。発現制御配列には、適当な転写開始、終了、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルのような効率的なRNAプロセシングシグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳の効率を増強する配列(すなわち、コザックコンセンサス配列)；タンパク質の安定性を増強する配列；および望ましければタンパク質分泌を増強する配列が含まれる。そのような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なる；原核生物では、そのような制御配列には一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終了配列が含まれる；真核生物では、一般的にそのような制御配列には、プロモーターおよび転写終止配列が含まれる。「制御配列」という用語には、少なくともその存在が発現およびプロセシングにとって必須である全ての成分が含まれると意図され、同様にその存在が都合がよいさらなる成分、たとえばリーダー配列および融合パートナー配列が含まれうる。20

#### 【 0 1 2 9 】

本明細書において用いられるように、「ベクター」という用語は、それに連結しているもう1つの核酸を輸送することができる核酸分子を意味する。いくつかの態様において、ベクターはプラスミド、すなわちその中にさらなるDNAセグメントがライゲーションされる可能性があるDNAの環状の二本鎖片である。いくつかの態様において、ベクターは、さらなるDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲーションされてもよいウイルスベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、その中にそれらが導入されている宿主細胞において自律複製を行うことができる(たとえば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他の態様において、ベクター(たとえば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノムに組み入れることができ、それによって宿主ゲノムに沿って複製される。その上、特定のベクターは、それらが機能的に連結される遺伝子の発現を指示することができる。そのようなベクターは、本明細書において「組換え発現ベクター」(または単純に「発現ベクター」と呼ばれる)。

#### 【 0 1 3 0 】

本明細書において用いられるように、「組換え型宿主細胞」(または単純に「宿主細胞」)という用語は、組換え型発現ベクターが導入されている細胞を意味する。「組換え型宿主細胞」および「宿主細胞」は、特定の被験者のみならず、そのような細胞の子孫を意味すると理解すべきである。変異または環境的影響によりその後の世代に特定の変化が起こる可能性があることから、そのような子孫は、実際には親細胞と同一ではない可能性があるが、それでもなお本明細書において用いられるように「宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。

#### 【 0 1 3 1 】

本明細書において用いられるように、「生殖系列」という用語は、それらが生殖系列細胞によって親から子孫に伝わる抗体遺伝子および遺伝子セグメントのヌクレオチド配列お40

およびアミノ酸配列を指す。この生殖系列配列は、B細胞成熟の過程において組換えおよび超変異事象によって変化している成熟B細胞における抗体をコードするヌクレオチド配列とは区別される。特定の生殖系列を「利用する」抗体は、その生殖系列ヌクレオチド配列またはそれが明記するアミノ酸配列と最も厳密に整列するヌクレオチドまたはアミノ酸配列を有する。そのような抗体はしばしば、生殖系列配列と比較して変異している。

#### 【0132】

核酸配列の文脈における「%配列同一性」という用語は、最大に一致するように整列させた場合に同じである2つの配列における残基を意味する。配列同一性比較の長さは、又クレオチド少なくとも約9個の枝、通常少なくとも約18ヌクレオチド、より通常少なくとも約24ヌクレオチド、典型的に少なくとも約28ヌクレオチド、より典型的に少なくとも約32ヌクレオチド、および好ましくは少なくとも約36、48、またはそれより多くのヌクレオチドであってもよい。ヌクレオチド配列同一性を測定するために用いることができる、当技術分野において公知の多数の異なるアルゴリズムが存在する。たとえば、ポリヌクレオチド配列は、Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsinにおけるプログラムである、FASTA、Gap、またはBestfitを用いて比較することができる。たとえばプログラムFASTA2およびFASTA3が含まれるFASTAは、アラインメントを提供して、問い合わせ配列と検索配列との間の最善のオーバーラップ領域の%配列同一性を提供する(参照により本明細書に組み入れられる、Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998))、特に明記していなければ、特定のプログラムまたはアルゴリズムに関するデフォルトパラメータを用いる。たとえば、核酸配列間の%配列同一性は、そのデフォルトパラメータ(ワードサイズ6およびスコア行列に関するNOPAM因子)によるFASTAを用いて、または参照により本明細書に組み入れられるGCG Version 6.1において提供されるデフォルトパラメータによるGapを用いて決定することができる。

#### 【0133】

ヌクレオチド配列に対する参照は、特に明記していなければその相補体を含む。このように、特定の配列を有する核酸に対する参照は、その相補的配列と共にその相補鎖を含むと理解すべきである。

#### 【0134】

核酸またはその断片を参照する場合、「実質的な類似性」または「実質的な配列類似性」という用語は、もう1つの核酸(またはその相補鎖)と適当なヌクレオチド挿入または欠失と共に最適に整列させた場合に、先に考察したようにFASTA、BLAST、またはGapのような配列同一性の任意の周知のアルゴリズムによって測定した場合に、ヌクレオチド塩基の少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、およびより好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%においてヌクレオチド配列同一性が存在することを意味する。

#### 【0135】

アミノ酸配列の文脈において、「%配列同一性」という用語は、最大に対応するように整列させた場合に同じである2つの配列における残基を意味する。配列同一性比較の長さは、アミノ酸少なくとも約5個の範囲、通常アミノ酸少なくとも20個、より通常アミノ酸少なくとも約30個、典型的にアミノ酸少なくとも約50個、より典型的にアミノ酸少なくとも約100個、およびさらにより典型的にアミノ酸約150個、200個またはそれより多い範囲に対してであってもよい。アミノ酸配列同一性を測定するために用いることができる当技術分野において公知の多数の異なるアルゴリズムが存在する。たとえば、アミノ酸配列は、Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsinにおけるプログラムである、FASTA、Gap、またはBestfitを用いて比較することができる。

#### 【0136】

ポリペプチドに応用する場合、「実質的な同一性」または「実質的な類似性」という用

10

20

30

40

50

語は、2つのアミノ酸配列が、プログラムGAPまたはBESTFITのようなプログラムによってプログラムによって供給されるようなデフォルトギャップ加重を用いて最適に整列した場合に、少なくとも70%、75%、または80%の配列同一性を共有する、好ましくは少なくとも90%、または95%配列同一性、およびより好ましくは少なくとも97%、98%、または99%配列同一性を共有することを意味する。特定の態様において、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる。

#### 【0137】

シグナルペプチド、リーダーペプチドとも呼ばれる「シグナル配列」という用語は、タンパク質を分泌させることができる(細胞膜を通して)タンパク質のN末端でアミノ酸約15~30個のセグメントを指す。シグナル配列は、タンパク質が分泌される際に除去される。

10

#### 【0138】

本明細書において用いられるように、「標識」または「標識された」という用語は、抗体にもう1つの分子が取り込まれていることを指す。1つの態様において、標識は検出マークターであり、たとえば放射標識アミノ酸の取り込み、または印をつけられたアビジン(たとえば、光学法または比色法によって検出されうる蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン)によって検出されうるビオチニル部分のポリペプチドへの付着である。もう1つの態様において、標識またはマーカーは、治療的、たとえば薬物共役体または毒素となりうる。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が当技術分野において公知であり、用いてもよい。ポリペプチドの標識の例には、以下が含まれるがこれらに限定されるわけではない: 放射性同位元素または放射性核種(たとえば、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I)、蛍光標識(たとえば、FITC、ローダミン、ランタニド、リン)、酵素標識(たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカー、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される既定のポリペプチドエピトープ(たとえば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)、ガドリニウムキレートのような磁気物質、百日咳毒素のような毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロミド、エメチン、マイトイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチニン、ビンプラスチニン、コルヒチニン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにその類似体または相同体。いくつかの態様において、標識は、可能性がある立体障害を低減するために、様々な長さのスペーサーアームによって付着する。

20

#### 【0139】

「靈長類」という用語は、手および足の洗練された発達、短い口吻および大きい脳を特徴とする、類人および原猿が含まれるサル目の哺乳動物を指す。哺乳動物綱靈長類には、ヒト、無尾猿、有尾猿、および原猿、または下等靈長類が含まれる。

30

#### 【0140】

「治療的有効量」は、処置される障害の症状の1つまたは複数をある程度軽減するであろう、投与される治療物質の量を指す。癌の治療を参照して、治療的有効量は、以下の効果の少なくとも1つを有する量を指す: 腫瘍の大きさを低減させる; 腫瘍の転移を阻害する(すなわち、ある程度遅らせる、好ましくは停止させる); 腫瘍の成長をある程度阻害する(すなわち、ある程度遅らせる、好ましくは停止させる); および癌に関連する1つまたは複数の症状をある程度軽減する(または、好ましくは消失させる)こと。

40

#### 【0141】

「処置する」、「処置している」、および「処置」は、生物学的障害および/またはその付随の症状を緩和または廃止する方法を指す。癌に関して、これらの用語は単純に、癌に罹患した個体の余命が増加すること、または疾患の症状の1つもしくは複数が低減されることを意味する。

#### 【0142】

50

「接触させる」ことは、本発明の抗体またはその抗原結合部分と標的ALK-1またはそのエピトープとを、抗体がALK-1の生物活性に影響を及ぼしうるように一緒にすることを指す。そのような「接触させること」は、「インビトロ」で、すなわち試験管、ペトリ皿等において行うことができる。試験管において、接触は、抗体もしくはその抗原結合部分のみおよびALK-1もしくはそのエピトープのみを含んでもよく、またはそれは細胞全体を含んでもよい。細胞はまた、細胞培養皿において維持または成長させてもよく、その環境において抗体またはその抗原結合部分と接触させてもよい。この状況において、特定の抗体またはその抗原結合部分がALK-1関連障害に影響を及ぼす能力、すなわち抗体のIC<sub>50</sub>は、より複雑な生きている生物についてインビオで抗体を用いることを試みる前に決定することができる。生物外の細胞に関して、抗体またはその抗原結合部分をALK-1に接触させるための多数の方法が存在し、当業者に周知である。

10

#### 【0143】

「FACS」という頭字語は、蛍光活性化細胞ソーティングを指す。FACSという頭字語およびフローサイトメトリーは、互換的に用いられる。蛍光標識によって、細胞構造および機能を調べることが可能となる。最も広く用いられている応用である免疫蛍光は、フルオレセインおよびフィコエリスリンのような蛍光色素に共役した抗体によって細胞を染色する段階を必然的に伴う。この方法はしばしば、細胞表面上の分子を標識するために用いられるが、抗体を細胞質における標的に向けることができる。直接免疫蛍光において、分子に対する抗体は蛍光色素に直接共役されて、一段階で細胞を染色する。間接免疫蛍光の場合、一次抗体は標識されず、第一の抗体に対して特異的な二次の蛍光共役抗体を加える。

20

#### 【0144】

##### 抗ALK-1抗体

本発明は、靈長類ALK-1、好ましくは靈長類ALK-1のECD、より好ましくはヒトALK-1のEC Dに結合する単離された中和抗ALK-1モノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。好ましい態様において、本発明は、完全なヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分である単離中和抗体に関する。好ましくは、ヒト抗体は、ALK-2～ALK-7に対するよりALK-1に対して大きい親和性を有する組換え型ヒト抗ALK-1抗体である。いくつかの態様において、ヒト抗ALK-1抗体は、非ヒトransジェニック動物、たとえばtransジェニック動物がヒト抗体を産生するようにそのゲノムがヒト免疫グロブリン遺伝子を含む齧歯類を免疫することによって産生される。本発明の様々な局面は、そのような抗体および抗原結合部分ならびにその薬学的組成物に関すると共に、そのような抗体および抗原結合部分を作製するための核酸、組換え型発現ベクター、および宿主細胞に関する。インビトロまたはインビオでALK-1/TGF- $\beta$ -1/Smad1シグナル伝達経路を排除ために、またはALK-1を検出するために、本発明の抗体および抗原結合部分を作製する方法も同様に本発明に含まれる。

30

#### 【0145】

本発明の抗ALK-1抗体は、ヒトもしくはヒト軽鎖またはそれに由来するアミノ酸配列を含みうる。軽鎖を含むいくつかの態様において、軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)は、ヒトA27、A2、A1、A3、B3、B2、L1またはL2 V<sub>K</sub>遺伝子を利用する。いくつかの態様において、軽鎖は、V<sub>K</sub> L1遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 4遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> A27遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 5遺伝子またはヒトJ<sub>K</sub> 4遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> B3遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 1遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> L2遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 3遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> A2遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 1遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> A3遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 4遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> A1遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 1遺伝子；ヒトV<sub>K</sub> B2遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 4遺伝子；またはヒトV<sub>K</sub> A2遺伝子およびヒトJ<sub>K</sub> 1遺伝子を利用する。

40

#### 【0146】

いくつかの態様において、抗ALK-1抗体のV<sub>L</sub>は、生殖系列V<sub>K</sub>アミノ酸配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または挿入(付加)を含む。いくつかの態様において、抗ALK-1抗体のV<sub>L</sub>は、生殖系列V<sub>K</sub>アミノ酸配列と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、生殖系列からの置換の1つまたは複数は、軽鎖のCDR領域に存在する。いくつかの態様において、生

50

殖系列と比較して $V_k$ アミノ酸置換は、たとえば図7において示されるように、本明細書において提供される抗体の $V_L$ の任意の1つまたは複数において見いだされる生殖系列と比較した置換と同じ位置の1つまたは複数において起こる。いくつかの態様において、アミノ酸変化は、同じ位置の1つまたは複数で起こるが、参照抗体とは異なる置換を必然的に伴う。

#### 【0147】

いくつかの態様において、生殖系列と比較したアミノ酸置換は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；および5.59.1の $V_L$ のいずれかにおいて生殖系列からの置換と同じ位置の1つまたは複数で起こるが、置換は参照抗体におけるアミノ酸と比較してそのような位置で保存的アミノ酸置換を表す可能性がある。たとえば、これらの抗体の1つにおける特定の位置が生殖系列と比較して変化して、グルタメートである場合、その位置でアスパルテートを代わりに用いてもよい。同様に、例示の抗体における生殖系列と比較してアミノ酸置換がセリンである場合、その位置でセリンの代わりにトレオニンを保存的に置換してもよい。保存的アミノ酸置換は先に考察したとおりである。10

#### 【0148】

いくつかの態様において、抗ALK-1抗体は、SEQ ID NO: 4の軽鎖アミノ酸配列を含む。他の態様において、軽鎖は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；および5.59.1の軽鎖アミノ酸配列を含む。20

#### 【0149】

いくつかの態様において、ヒト抗ALK-1抗体の軽鎖は、抗体 1.12.1(SEQ ID NO: 8)；1.11.1(SEQ ID NO: 12)；1.13.1(SEQ ID NO: 16)；1.14.1(SEQ ID NO: 20)；1.151.1(SEQ ID NO: 24)；1.162.1(SEQ ID NO: 28)；1.183.1(SEQ ID NO: 32)；1.8.1(SEQ ID NO: 36)；1.9.1(SEQ ID NO: 40)；4.10.1(SEQ ID NO: 44)；4.24.1(SEQ ID NO: 48)；4.38.1(SEQ ID NO: 52)；4.58.1(SEQ ID NO: 56)；4.62.1(SEQ ID NO: 60)；4.68.1(SEQ ID NO: 64)；4.72.1(SEQ ID NO: 68)；5.13.1(SEQ ID NO: 72)；5.34.1(SEQ ID NO: 76)；5.53.1(SEQ ID NO: 80)；5.56.1(SEQ ID NO: 84)；5.57.1(SEQ ID NO: 88)；もしくは5.59.1(SEQ ID NO: 92)の $V_L$ アミノ酸配列、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15個までの保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列、および／または全体で3個までの非保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。他の態様において、ヒト抗ALK-1抗体の軽鎖は、抗体1.27.1；1.29.1または1.31.1の $V_L$ アミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、軽鎖は、前述の抗体の任意の1つのCDR1の始まりからCDR3の末端までのアミノ酸配列を含む。30

#### 【0150】

いくつかの態様において、軽鎖は、1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；もしくは5.59.1から選択される2つもしくはそれより多いモノクローナル抗体の軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域からそれぞれ独立して選択されるCDR1、CDR2、およびCDR3領域、または3個未満もしくは2個未満の保存的アミノ酸置換、および／または全体で3つもしくはそれより少ない非保存的アミノ酸置換をそれが有する該CDR領域のアミノ酸配列を含んでもよい。40

#### 【0151】

特定の態様において、抗ALK-1抗体の軽鎖は、1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；50

4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; もしくは5.59.1から選択される抗体の軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3領域、または3個未満もしくは2個未満の保存的アミノ酸置換、および／または全体で3つもしくはそれより少ない非保存的アミノ酸置換をそれぞれが有する該CDR領域のアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 1 5 2 】

いくつかの態様において、重鎖に関して、可変ドメイン( $V_H$ )は、ヒト $V_H$  4-31、 $V_H$  3-11、 $V_H$  3-15、 $V_H$  3-33、 $V_H$  4-61、または $V_H$  4-59遺伝子を利用する。いくつかの態様において、抗ALK-1抗体の $V_H$ 配列は、生殖系列 $V_H$ アミノ酸配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、または挿入(付加)、集合的に「変異」を含む。いくつかの態様において、重鎖の可変ドメインは、生殖系列 $V_H$ アミノ酸配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11個の変異を含む。いくつかの態様において、変異は、生殖系列アミノ酸配列と比較して非保存的置換である。いくつかの態様において、変異は重鎖のCDR領域において起こる。いくつかの態様において、重鎖は、ヒト $V_H$  3-33遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒト $J_H$  3B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒト $J_H$  4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-61遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒト $J_H$  4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 3-3遺伝子、およびヒト $J_H$  3B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、およびヒト $J_H$  3B遺伝子；ヒト $V_H$  4-59遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒト $J_H$  4B遺伝子；ヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 3-22遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子；ヒト $V_H$  3-15遺伝子、ヒトD 3-22遺伝子、およびヒト $J_H$  4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 5-12遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 4-23遺伝子、およびヒト $J_H$  4B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、ヒトD 2-2遺伝子、およびヒト $J_H$  5B遺伝子；ヒト $V_H$  4-31遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子；ヒト $V_H$  3-15遺伝子、ヒトD 1-1遺伝子、およびヒト $J_H$  4B遺伝子；ヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 6-19遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子；ヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 3-10遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子；またはヒト $V_H$  3-11遺伝子、ヒトD 6-6遺伝子、およびヒト $J_H$  6B遺伝子を利用する。  
10

#### 【 0 1 5 3 】

いくつかの態様において、アミノ酸置換は、抗体1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; または5.59.1の $V_H$ の任意の1つまたは複数における生殖系列からの置換と同じ位置の1つまたは複数で起こる。他の態様において、アミノ酸変化は、同じ位置の1つまたは複数で起こるが、参照抗体とは異なる置換を必然的に伴う。  
30

#### 【 0 1 5 4 】

いくつかの態様において、重鎖は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む。他の態様において、重鎖は抗体1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; または5.59.1の重鎖アミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗体1.12.1(SEQ ID NO: 6) ; 1.11.1(SEQ ID NO: 10) ; 1.13.1(SEQ ID NO: 14) ; 1.14.1(SEQ ID NO: 18) ; 1.151.1(SEQ ID NO: 22) ; 1.162.1(SEQ ID NO: 26) ; 1.183.1(SEQ ID NO: 30) ; 1.8.1(SEQ ID NO: 34) ; 1.9.1(SEQ ID NO: 38) ; 4.10.1(SEQ ID NO: 42) ; 4.24.1(SEQ ID NO: 46) ; 4.38.1(SEQ ID NO: 50) ; 4.58.1(SEQ ID NO: 54) ; 4.62.1(SEQ ID NO: 58) ; 4.68.1(SEQ ID NO: 62) ; 4.72.1(SEQ ID NO: 66) ; 5.13.1(SEQ ID NO: 70) ; 5.34.1(SEQ ID NO: 74) ; 5.53.1(SEQ ID NO: 78) ; 5.56.1(SEQ ID NO: 82) ; 5.57.1(SEQ ID NO: 86) ; もしくは5.59.1(SEQ ID NO: 90)の $V_H$ アミノ酸配列、または1、2、3、4、6、8、9、10、もしくは11個までの保存的アミノ酸置換、および／または全体で3個までの非保存的アミノ酸置換を有する $V_H$ アミノ酸配列を含む。他の態様において、重鎖は、抗体1.27.1 ; 1.29.1 ; または1.31.1の $V_H$ アミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、重鎖は、前述の抗体の任意の1つのCDR1の開始からCDR3の終わりまでのアミノ酸配列を  
40  
50

含む。

**【 0 1 5 5 】**

いくつかの態様において、重鎖は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；もしくは5.59.1の重鎖CDR1、CDR2およびCDR3、または8個未満、6個未満、4個未満、もしくは3個未満の保存的アミノ酸置換、および／または全体で3個もしくはそれより少ない非保存的アミノ酸置換をそれぞれが有する該CDR領域を含む。

**【 0 1 5 6 】**

いくつかの態様において、重鎖CDR領域は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；または5.59.1から選択される2つまたはそれより多い抗体のCDR領域から独立して選択される。もう1つの態様において、抗体は、先に開示された軽鎖および先に開示された重鎖を含む。さらなる態様において、軽鎖CDRおよび重鎖CDRは同じ抗体に由来する。

**【 0 1 5 7 】**

様々な態様において、抗ALK-1抗体は、完全長の重鎖および完全長の軽鎖アミノ酸配列、 $V_H$ および $V_L$ アミノ酸配列、重鎖CDR1、CDR2、およびCDR3ならびに軽鎖CDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列、または本明細書において提供される抗ALK-1抗体のCDR1の始まりからCDR3の終わりまでの重鎖アミノ酸配列およびCDR1の始まりからCDR3の終わりまでの軽鎖アミノ酸配列を有する。

**【 0 1 5 8 】**

作製してもよい1つのタイプのアミノ酸置換は、抗体における1つまたは複数のシステインを変化させることであり、これはアラニンまたはセリンのような、しかしこれらに限定されないもう1つの残基に対して化学的に反応性であってもよい。1つの態様において、非模範的システインの置換が存在する。置換は、抗体の可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域において、または定常ドメインにおいて行ってもよい。いくつかの態様において、システインは模範的である。

**【 0 1 5 9 】**

作製してもよいもう1つのタイプのアミノ酸置換は、抗体における可能性があるタンパク質分解部位を除去することである。そのような部位は、抗体の可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域において、または定常ドメインにおいて起こってもよい。システイン残基の置換およびタンパク質分解部位の除去は、抗原産物における不均一性のリスクを減少させて、その均一性を増加する可能性がある。もう1つのタイプのアミノ酸置換は、1つまたは双方の残基を変化させることによって、可能性がある脱アミド部位を形成するアスパラギン-グリシン対を消失させることである。

**【 0 1 6 0 】**

いくつかの態様において、本発明の抗ALK-1抗体の重鎖のC-末端リジンは切断される。本発明の様々な態様において、抗ALK-1抗体の重鎖および軽鎖には、任意でシグナル配列が含まれてもよい。

**【 0 1 6 1 】**

1つの局面において、本発明は、阻害性のヒト抗ALK-1モノクローナル抗体25個およびそれらを產生するハイブリドーマ細胞株を提供する。特定の態様において、本発明の抗体は、1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；および5.59.1と明示されるIgGである。好ましい態様において、ヒト抗ALK-1抗体は、抗体1.12.1、1.12.1(M29I/D19A)、1.12.1(M29I)、1.12.1(D19A)、1.27.1、1

10

20

30

40

50

.14.1、1.162.1、1.31.1、4.62.1、または4.72.1である。

**【0162】**

抗体は、直線状(一次)配列または構造的(二次)配列の領域として抗原上の表面露出エピトープを認識する。機能的なエピトープの景観を定義するため、および本発明によって例示される抗ALK-1抗体のエピトープ排他性を決定するためBIAコアを用いた。

**【0163】**

表1は、本発明の抗ALK-1抗体の1.12.1抗体変種および可変ドメイン含有部分の完全長の重鎖および軽鎖をコードする核酸、ならびに対応する推定アミノ酸配列の配列同定子(SEQ ID NO)の一覧である。

**【0164】**

(表1)

配列同定子(SEQ ID NO)								
抗体	完全長				Vドメイン含有部分			
	重鎖		軽鎖		重鎖		軽鎖	
	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質	DNA	タンパク質
1.11.1					9	10	11	12
1.12.1(M29I/D19A)	1	2	3	4	5	6	7	8
1.12.1	95	100	101	102	103	104	126	127
1.12.1(rWT)	128	100	101	102	129	104	126	127
1.13.1					13	14	15	16
1.14.1					17	18	19	20
1.151.1					21	22	23	24
1.162.1					25	26	27	28
1.183.1					29	30	31	32
1.8.1					33	34	35	36
1.9.1					37	38	39	40
4.10.1					41	42	43	44
4.24.1					45	46	47	48
4.38.1					49	50	51	52
4.58.1					53	54	55	56
4.62.1					57	58	59	60
4.68.1					61	62	63	64
4.72.1					65	66	67	68
5.13.1					69	70	71	72
5.34.1					73	74	75	76
5.53.1					77	78	79	80
5.56.1					81	82	83	84
5.57.1					85	86	87	88
5.59.1					89	90	91	92

**【0165】**

1.12.1(M29I/D19A)は、実施例4において記述されるように、29位のメチオニンがイソロイシンに置換される重鎖における特異的ーアミノ酸変異、および19位のアスパラギン酸がアラニンに置換されている軽鎖における特異的ーアミノ酸変異を含む抗ALK-1抗体を指す

10

20

30

40

50

。

**【 0 1 6 6 】**

1.12.1は、ハイブリドーマから単離されたmAb 1.12.1変種を指す。

**【 0 1 6 7 】**

1.12.1(rWT)は、実施例3において記述される組換え型mAbとして発現されたmAb 1.12.1変種を指す。

**【 0 1 6 8 】**

本発明はさらに、1つまたは複数のアミノ酸改変を含む、上記の特定のヒト抗ALK-1抗体の重鎖および／または軽鎖変種を提供する。変種を明示するために、最初の文字は天然に存在する抗体鎖のアミノ酸に関する一文字記号であり、番号はアミノ酸の位置を指し(1位はFR1のN-末端アミノ酸である)、2番目の文字は変種アミノ酸の一文字記号である。10

**【 0 1 6 9 】**

なおさらなる態様において、本発明には、上記のヒト抗ALK-1抗体の任意に対して80%より高い、85%より高い、90%より高い、95%より高い、96%より高い、97%より高い、98%より高い、または99%より高い配列同一性を有する可変ドメインアミノ酸配列を含む抗体が含まれる。

**【 0 1 7 0 】**

**抗ALK-1抗体のクラスおよびサブクラス**

抗ALK-1抗体のクラスおよびサブクラスは、当技術分野において公知の任意の方法によって決定してもよい。一般的に、抗体のクラスおよびサブクラスは、特定のクラスおよびサブクラスの抗体に対して特異的である抗体を用いて決定してもよい。そのような抗体は市販されている。クラスおよびサブクラスはELISA、ウェスタンプロットと共に他の技術によって決定されうる。または、クラスおよびサブクラスは、抗体の重鎖および／または軽鎖の定常ドメインの全てまたは一部をシーケンシングする段階、そのアミノ酸配列を、様々なクラスおよびサブクラスの免疫グロブリンの公知のアミノ酸配列と比較する段階、ならびに抗体のクラスおよびサブクラスを決定する段階によって決定してもよい。20

**【 0 1 7 1 】**

先に記述されたように得られた抗ALK-1抗体のクラスは互いにスイッチさせてもよい。本発明の1つの局面において、 $V_L$ または $V_H$ をコードする核酸分子は、それに $C_L$ または $C_H$ をコードする核酸配列が含まれないように、当技術分野において周知の方法を用いて単離される。 "Antibody Engineering" (Kontermann & Dubel, Eds., Springer-Verlag, Berlin (2001))。次に、 $V_L$ または $V_H$ をコードする核酸分子を異なるクラスの免疫グロブリン分子からの $C_L$ または $C_H$ をコードする核酸配列とそれぞれ、機能的に連結させる。これは、先に記述したように $C_L$ または $C_H$ 鎖を含むベクターまたは核酸分子を用いて行ってもよい。たとえば、当初IgMであった抗ALK-1抗体は、IgGにクラススイッチしてもよい。さらに、クラススイッチを用いて1つのIgGサブクラスをもう1つのサブクラスに、たとえばIgG1からIgG2に変換してもよい。所望のアイソタイプを含む本発明の抗体を產生するための好ましい方法は、抗ALK-1抗体の重鎖をコードする核酸分子、および抗ALK-1抗体の軽鎖をコードする核酸分子を単離する段階、重鎖の可変ドメインを得る段階、重鎖の可変ドメインを所望のアイソタイプの重鎖の定常ドメインとライゲーションする段階、細胞において軽鎖およびライゲーションした重鎖を発現させる段階、ならびに所望のアイソタイプの抗ALK-1抗体を回収する段階を含む。30

**【 0 1 7 2 】**

いくつかの態様において、抗ALK-1抗体はモノクローナル抗体である。抗ALK-1抗体はIgG、IgM、IgE、IgA、またはIgD分子となりうる。好ましい態様において、抗ALK-1抗体はIgGであってIgG1、IgG2、IgG3、IgG4サブクラスである。もう1つの好ましい態様において、抗体はサブクラスIgG2である。40

**【 0 1 7 3 】**

**抗ALK-1抗体によって認識されるALK-1エピトープの同定**

本発明は、ALK-1に結合して、(a)1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M291/D19A)；

10

30

40

50

1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; および5.59.1から選択される抗体；(b) SEQ ID NO: 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90 ; または104のいずれか1つにおけるV<sub>H</sub>ドメインのアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含む抗体、(c)SEQ ID NO: 8 ; 12 ; 16 ; 20 ; 24 ; 28 ; 32 ; 36 ; 40 ; 44 ; 48 ; 52 ; 56 ; 60 ; 64 ; 68 ; 72 ; 76 ; 80 ; 84 ; 88 ; 92 ; または127のいずれか1つにおけるV<sub>L</sub>ドメインのアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む抗体、および(d)(b)において定義される重鎖可変ドメインと(c)において定義される軽鎖可変ドメインの双方を含む抗体、と同じエピトープに競合する、交叉競合する、および／または結合するヒト抗ALK-1モノクローナル抗体を提供する。10

#### 【 0 1 7 4 】

当技術分野において公知の方法を用いて、抗体が、抗ALK-1抗体との結合に関して同じエピトープに結合するまたは交叉競合するか否かを決定することができる。1つの態様において、本発明の抗ALK-1抗体を飽和条件でALK-1に結合させて、試験抗体のALK-1に対する結合能を測定する。試験抗体が参照抗ALK-1抗体と同時にALK-1に結合することができれば、試験抗体は、参照抗ALK-1抗体とは異なるエピトープに結合する。しかし、試験抗体がALK-1に同時に結合することができない場合、試験抗体は、同じエピトープ、重なり合うエピトープ、または本発明の抗ALK-1抗体によって結合されるエピトープの近位に存在するエピトープに結合する。この実験は、ELISA、RIA、BIACORE(商標)、またはフローサイトメトリーを用いて行うことができる。抗ALK-1抗体がもう1つの抗ALK-1抗体と交叉競合するか否かを調べるために、先に記述した競合法を2つの方向で用いてもよく、すなわち公知の抗体が試験抗体を遮断するか否かおよびその逆であるか否かを決定してもよい。好ましい態様において、実験はBIACORE(商標)を用いて行われる。20

#### 【 0 1 7 5 】

##### ALK-1に対する抗ALK-1抗体の結合親和性

抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分のALK-1に対する結合親和性( $K_D$ )および解離速度定数( $k_{off}$ )は、当技術分野において公知の方法によって決定することができる。結合親和性は、ELISA、RIA、フローサイトメトリー、またはBIACORE(商標)のような表面プラズモン共鳴によって測定することができる。解離速度定数は表面プラズモン共鳴によって測定することができる。好ましくは結合親和性および解離速度定数は表面プラズモン共鳴によって測定される。より好ましくは結合親和性および解離速度定数は、BIACORE(商標)を用いて測定される。当技術分野において公知の方法を用いて抗体が抗ALK-1抗体と実質的に同じ $K_D$ を有するか否かを決定することができる。 $K_D$ および $k_{off}$ を決定するそのような方法は、最初のスクリーニング段階と共にその後の最適化段階の際に用いることができる。30

#### 【 0 1 7 6 】

##### 抗ALK-1抗体によるALK-1活性の阻害

ALK-1結合を阻害する抗ALK-1モノクローナル抗体は、多くのアッセイを用いて同定することができる。たとえば、中和抗ALK-1抗体は、実施例12において記述されるように、ALK-1の下流の特異的標的遺伝子Id1のアップレギュレーションの阻害によって同定することができる。好ましい抗ALK-1抗体は、500 nM、300 nM、200 nM、150 nM、100 nM、50 nM、20 nM、10 nM、または1 nMに過ぎないIC<sub>50</sub>を有する。40

#### 【 0 1 7 7 】

同様に、実施例13において記述されるようにOdyssey赤外線イメージングシステムを用いてウェスタンプロットティングにより決定されたSmad1リン酸化を抗ALK-1抗体が阻害するか否かを決定することもできる。様々な態様において、抗ALK-1抗体は、このアッセイにおいて、250 nM、200 nM、150 nM、100 nM、50 nM、20 nM、10 nM、または1 nMに過ぎないIC<sub>50</sub>値を有する。

#### 【 0 1 7 8 】

##### 抗ALK-1抗体による血管新生の阻害

10

20

30

40

50

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、実施例17において記述され、表13において示されるように、ヒトCD-31シグナルアッセイのIHC分析によって決定した場合に、ヒト黒色腫M24met腫瘍細胞を皮内に移植したヒト包皮組織植え付けSCIDマウスにおいて証明されるように、対照試料と比較して少なくとも40%の割合でヒト血管新生を阻害する。

#### 【0179】

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその一部は、実施例16において記述され、表12において示されるように、ヒトCD-31シグナルアッセイのIHC分析によって決定した場合に、コラーゲンを皮内に移植したヒト包皮組織を移植したSCIDマウスにおいて証明されるように対照試料と比較して少なくとも50%の割合でヒト血管新生を阻害する。 10

#### 【0180】

##### 種および分子選択性

本発明のもう1つの局面において、抗ALK-1抗体は、種および分子選択性の双方を示す。本明細書の教示に従って、当技術分野において周知の方法を用いて抗ALK-1抗体に関する種または分子選択性を決定してもよい。たとえば、ウェスタンプロット、表面プラズモン共鳴、たとえばBIAcore、ELISA、免疫沈降、またはRIAを用いて種選択性を決定してもよい。

#### 【0181】

いくつかの態様において、抗ALK-1抗体は齧歯類ALK-1に関するその $K_D$ より少なくとも2倍小さい $K_D$ で靈長類ALK-1に結合する。さらなる態様において、靈長類ALK-1に関する $K_D$ は、フローサイトメトリーによって測定した場合に、齧歯類ALK-1に関するその $K_D$ より少なくとも3倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも200倍、少なくとも500倍、または少なくとも1000倍小さい。 20

#### 【0182】

他の態様において、抗ALK-1抗体は、ALK-2～ALK-7に対するよりALK-1に対して選択性を有する。いくつかの態様において、抗ALK-1抗体は、ALK-1以外の他の任意のタンパク質に対してもかかる認識可能な特異的結合も示さない。好ましくは、抗ALK-1抗体はヒトALK-1のECDに結合する。

#### 【0183】

##### 抗体および抗体産生細胞株を產生する方法

##### ALK-1免疫原

いくつかの態様において、ALK-1免疫原または抗原は、単離および／または精製ALK-1である。いくつかの態様において、ALK-1免疫原はヒトALK-1である。好ましい態様において、ALK-1免疫原はヒトALK-1のECDである。ヒトALK-1またはその抗原部分は、当業者に周知の方法に従って調製することができる、または販売元から購入することができる。ヒトALK-1アミノ酸およびヌクレオチド配列は公知である(たとえば、Genbank記録アクセッション番号L17075を参照されたい)。完全長のALK-1をコードするACVRL1遺伝子は、Invitrogen Inc. から市販されており Clone ID 10H21048である。たとえば、R&D Systems, Inc. は、そのDNA配列がマウス骨髄腫細胞株においてポリペプチドリンクをコードするDNA配列によってヒトIgGのFc領域をコードするDNA配列に融合している、ALK-1のECDアミノ酸残基1～118位をコードするDNA配列の発現によって調製された、組換え型ヒトALK-1/Fcキメラ(カタログ番号370-AL)を販売している。組換え型成熟ヒトALK-1/Fcキメラは、アミノ末端でAsp 22を有するジスルフィド結合ホモ二量体タンパク質である。さらに、実施例1は、本発明に従う抗ALK-1抗体を產生するハイブリドーマの作製のために用いられているALK-1 ECD His-Tagタンパク質の調製を記述している。 40

#### 【0184】

他の態様において、ALK-1抗原は、ALK-1を発現する、または過剰発現する細胞である。他の態様において、ALK-1抗原は、酵母、昆虫細胞、大腸菌のような細菌、または組換え技術による他の資源から発現された組換え型タンパク質である。

#### 【0185】

## 免疫

いくつかの態様において、ヒト抗体は、そのゲノムにおいてヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖座の一部または全てを含む非ヒトトランスジェニック動物を、ALK-1抗原によって免疫することによって作製される。好ましい態様において、非ヒト動物は、XENOMOUSE(登録商標)動物 (Abgenix, Inc., Fremont, CA)である。

### 【0186】

XENOMOUSE(登録商標)マウスは、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖座の大きい断片を含む操作されたマウス系統であり、マウス抗体産生を欠損する。たとえば、Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)および米国特許第5,916,771号、第5,939,598号、第5,985,615号、第5,998,209号、第6,075,181号、第6,091,001号、第6,114,598号、第6,130,364号、第6,162,963号および第6,150,584号を参照されたい。同様にWO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560、およびWO 00/037504も参照されたい。

10

### 【0187】

もう1つの局面において、本発明は、ヒト免疫グロブリン座を含む非ヒトトランスジェニック動物をALK-1抗原によって免疫することによって、非ヒト非マウス動物から抗ALK-1抗体を作製するための方法を提供する。先に引用した文書において記述される方法を用いて、そのような動物を產生することができる。これらの文書において開示される方法は、参考により本明細書に組み入れられる米国特許第5,994,619号において記述されるように、改変することができる。米国特許第5,994,619号は、ブタおよびウシに由来する新規培養内細胞塊(CICM)細胞および細胞株、ならびにその中に異種DNAが挿入されているトランスジェニックCICM細胞を作製する方法を記述している。CICMトランスジェニック細胞は、クローニングされたトランスジェニック胚、胎児、および子孫を作製するために用いることができる。第'619号特許はまた、異種DNAをその子孫に伝搬することができるトランスジェニック動物を作製する方法も記述している。本発明の好ましい態様において、非ヒト動物は哺乳動物、特に、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、またはニワトリである。

20

### 【0188】

XENOMOUSE(登録商標)マウスは、完全なヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを產生して、抗原特異的ヒト抗体を生成する。いくつかの態様において、XENOMOUSE(登録商標)マウスは、ヒト重鎖座および軽鎖座のメガベースの大きさの生殖系列立体配座断片の酵母人工染色体(YAC)への導入を通してヒト抗体V遺伝子レパートリーの約80%を含む。他の態様において、XENOMOUSE(登録商標)マウスはさらに、ヒト 軽鎖座のほぼ全てを含む。その開示が参考により本明細書に組み入れられる、Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits, *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998)、およびWO 98/24893を参照されたい。

30

### 【0189】

いくつかの態様において、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン「ミニ座」を有する動物である。ミニ座のアプローチにおいて、外因性のIg座は、Ig座からの個々の遺伝子を含めることによって模倣される。このように、1つまたは複数のV<sub>H</sub>遺伝子、1つまたは複数のD<sub>H</sub>遺伝子、1つまたは複数のJ<sub>H</sub>遺伝子、μ定常ドメイン、および第二の定常ドメイン(好ましくは 定常ドメイン)は、動物に挿入するための構築物に形成される。このアプローチは、中でも参考により本明細書に組み入れられる米国特許第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,661,016号、第5,770,429号、第5,789,650号、第5,814,318号、第5,591,669号、第5,612,205号、第5,721,367号、第5,789,215号、および第5,643,763号において記述されている。

40

### 【0190】

もう1つの局面において、本発明はヒト化抗ALK-1抗体を作製するための方法を提供する。いくつかの態様において、非ヒト動物は、抗体産生を許容する条件で以下に記述されるようにALK-1抗原によって免疫される。抗体産生細胞は、動物から単離され、関心対象の

50

抗ALK-1抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸は、単離された抗体産生細胞から、またはそのような細胞から產生された不死化細胞株から単離される。これらの核酸は、次に、非ヒト配列の量を低減するために、すなわちヒトにおける免疫応答を低減するために抗体をヒト化するために、当業者に公知のおよび以下により詳細に記述されるような技術を用いて操作される。

#### 【0191】

動物の免疫は当技術分野において公知の任意の方法によって行うことができる。たとえば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990を参照されたい。マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、およびウマのような非ヒト動物を免疫するための方法は当技術分野において周知である。たとえば、Harlow and Lane, 前記および米国特許第5,994,619号を参照されたい。好ましい態様において、ALK-1抗原は、免疫応答を刺激するためにアジュバントと共に投与される。例としてのアジュバントには、完全または不完全なフロイントのアジュバント、RIBI(ムラミルジペプチド)またはISCOM(免疫刺激複合体)が含まれる。そのようなアジュバントは、局所的な沈殿物においてそれを隔離することによって急速な分散からポリペプチドを保護する可能性があり、またはそれらはマクロファージおよび免疫系の他の成分に対して走化性である因子を分泌するように宿主を刺激する物質を含んでもよい。好ましくは、ポリペプチドが投与される場合、免疫スケジュールは、数週間に及ぶポリペプチドの2回またはそれより多い投与を含むであろう。実施例2は、XENOMOUSE(登録商標)マウスにおける抗ALK-1モノクローナル抗体を产生するための方法を例示する。

10

20

#### 【0192】

##### 抗体および抗体産生細胞株の產生

動物をALK-1抗原によって免疫した後、抗体および／または抗体産生細胞を動物から得ることができる。いくつかの態様において、抗ALK-1抗体含有血清は、採血することによって、または動物を屠殺することによって動物から得られる。血清は、動物から得られたまま用いてもよく、免疫グロブリン分画を血清から得てもよく、または抗ALK-1抗体を血清から精製してもよい。

#### 【0193】

いくつかの態様において、抗体産生細胞株は、免疫した動物から単離した細胞から調製される。免疫後、動物を屠殺して、リンパ節および／または脾臓B細胞を当技術分野において公知の任意の手段によって不死化する。細胞を不死化する方法には、それらに腫瘍遺伝子をトランスフェクトさせる段階、それらを腫瘍ウイルスに感染させる段階およびそれらを不死化細胞に関して選択する条件で培養する段階、それらを発癌または変異誘発化合物に供する段階、それらを不死化細胞、たとえば骨髄腫細胞と融合する段階、ならびに腫瘍抑制遺伝子を不活化する段階が含まれるがこれらに限定されるわけではない。たとえば、Harlow and Lane、前記を参照されたい。骨髄腫細胞との融合を用いる場合、骨髄腫細胞は好ましくは免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない(非分泌細胞株)。不死化細胞は、ALK-1またはその一部を用いてスクリーニングされる。好ましい態様において、酵素結合イムノアッセイ(ELISA)またはラジオイムノアッセイを用いて初回スクリーニングを行う。ELISAスクリーニングの例は、参照により本明細書に組み入れられるWO 00/37504において提供される。

30

40

#### 【0194】

抗ALK-1抗体産生細胞、たとえばハイブリドーマは、選択され、クローニングされて、さらに以下において詳しく考察するように、強い成長、高い抗体産生、および望ましい抗体特徴を含む望ましい特徴に関してスクリーニングされる。ハイブリドーマはインビボで同系動物、免疫系を欠損する動物、たとえばヌードマウスにおいて、またはインビトロでの細胞培養において拡大することができる。ハイブリドーマを選択、クローニング、および拡大する方法は当業者に周知である。

#### 【0195】

好ましい態様において、免疫した動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する非ヒト

50

動物であり、脾臓B細胞を非ヒト動物と同じ種からの骨髓腫細胞株に融合させる。最も好ましい態様において、免疫した動物は、XENOMOUSE(登録商標)マウスであり、骨髓腫細胞株は非分泌性のマウス骨髓腫である。さらにより好ましい態様において、骨髓腫細胞株は、P3-X63-Ag8.653(American Type Culture Collection)である。たとえば実施例2を参照されたい。

#### 【0196】

このように、1つの態様において、本発明は、(a)本明細書において記述される非ヒトトランスジェニック動物を、ALK-1、ALK-1の一部、またはALK-1を発現する細胞もしくは組織によって免疫する段階、(b)トランスジェニック動物にALK-1に対する免疫応答を開始させる段階、(c)トランスジェニック動物から抗体産生細胞を単離する段階、(d)抗体産生細胞を不死化する段階、(e)不死化された抗体産生細胞の個々のモノクローナル集団を作製する段階、および(f)ALK-1に向かられる抗体を同定するために不死化抗体産生細胞をスクリーニングする段階を含む、ALK-1に対して向かられたヒトモノクローナル抗体またはその断片を産生する細胞株を産生するための方法を提供する。

10

#### 【0197】

もう1つの局面において、本発明は、ヒト抗ALK-1抗体を産生する細胞株を提供する。いくつかの態様において、細胞株は、ハイブリドーマ細胞株である。他の態様において、ハイブリドーマは先に記述されたようにマウスハイブリドーマである。他の態様において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、またはウマのような非ヒト非マウス種において産生される。もう1つの態様において、ハイブリドーマはヒトハイブリドーマである。

20

#### 【0198】

もう1つの態様において、トランスジェニック動物は、ALK-1抗原によって免疫され、初代培養細胞、たとえば脾臓または末梢血B細胞を、免疫したトランスジェニック動物から単離して、所望の抗原に関して特異的な抗体を産生する個々の細胞を同定する。それぞれの個々の細胞からのポリアデニル化mRNAを単離して、様々なドメイン配列にアニールするセンスプライマー、たとえばヒト重鎖および軽鎖可変ドメイン遺伝子のFR1領域のほとんどまたは全てを認識する縮重プライマー、ならびに定常領域または接合領域配列にアニールするアンチセンスプライマーを用いて逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を行う。次に、重鎖および軽鎖可変ドメインのcDNAをクローニングして、任意の適した宿主細胞、たとえば骨髓腫細胞において、重鎖およびまたは定常ドメインのような、それぞれの免疫グロブリン定常領域を有するキメラ抗体として発現させる。参考により本明細書に組み入れられる、Babcock, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-48, 1996を参照されたい。次に、抗ALK-1抗体を、本発明明細書において記述されるように同定および単離してもよい。

30

#### 【0199】

もう1つの態様において、ファージディスプレイ技術を用いて、ALK-1に関して多様な親和性を有する抗体のレパートリーを含むライプラリを提供することができる。そのようなレパートリーを産生するために、免疫した動物からのB細胞を不死化する必要はない。むしろ、初代培養B細胞をDNA源として直接用いることができる。たとえば脾臓に由来するB細胞から得たcDNAの混合物を用いて、発現ライプラリ、たとえば大腸菌にトランスフェクトしたファージディスプレイライプラリを調製する。得られた細胞を、ALK-1に対する免疫反応性に関して試験する。そのようなライプラリからの高親和性ヒト抗体の同定に関する技術は、参考により本明細書に組み入れられる、Griffiths et al., EMBO J., 13:3245-3260 (1994); Nissim et al., ibid, pp. 692-698、およびby Griffiths et al., ibid, 12:725-734によって記述されている。最終的に、抗原に関して望ましい程度の結合親和性を産生するライプラリからのクローンを同定して、そのような結合の原因となる産物をコードするDNAを回収し、標準的な組換え体発現のために操作する。ファージディスプレイライプラリはまた、既に操作されたヌクレオチド配列を用いて構築して、類似の方法でスクリーニングしてもよい。一般的に、重鎖および軽鎖をコードするcDNAは、ファージラ

40

50

イブラリにおいて産生するために、独立して供給または連結されて、Fv類似体を形成する。

#### 【0200】

次に、ファージライブラリを、ALK-1に関して最高の親和性を有する抗体に関してスクリーニングして、適当なクローンから遺伝材料を回収する。さらなるラウンドのスクリーニングは、単離された当初の抗体の親和性を増加させることができる。

#### 【0201】

#### 核酸、ベクター、および抗体を作製する組換え法

##### 核酸

本発明はまた、抗ALK-1抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸分子を含む。いくつかの態様において、異なる核酸分子は、抗ALK-1免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする。他の態様において、同じ核酸分子が、抗ALK-1免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をコードする。

10

#### 【0202】

いくつかの態様において、軽鎖( $V_L$ )の可変ドメインをコードする核酸分子は、ヒトA27、A2、A1、A3、B3、B2、L1またはL2  $V_K$ 遺伝子、および $J_K$  5、 $J_K$  1、 $J_K$  3、または $J_K$  4遺伝子を利用する。いくつかの態様において、核酸分子はヒトA27  $V_K$ 遺伝子およびヒト $J_K$  5遺伝子を利用する。他の態様において、核酸分子は、ヒトA2遺伝子およびヒト $J_K$  1遺伝子を利用する。いくつかの態様において、軽鎖をコードする核酸分子は、生殖系列アミノ酸配列から1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の置換を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの態様において、核酸分子は、生殖系列 $V_K$ および $J_K$ 配列と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個の保存的アミノ酸置換および/または1、2、または3個の非保存的置換を含む $V_L$ アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。置換はCDR領域、フレームワーク領域、または定常ドメインにおいて行ってもよい。

20

#### 【0203】

いくつかの態様において、核酸分子は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M291/D19A)；1.12.1(M291)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；または5.59.1の任意の1つの $V_L$ において見いだされる生殖系列からの変異と同一である生殖系列配列と比較して1つまたは複数の変異を含む $V_L$ アミノ酸配列をコードする。

30

#### 【0204】

いくつかの態様において、核酸分子は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M291/D19A)；1.12.1(M291)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；または5.59.1の任意の1つの $V_L$ において見いだされる生殖系列からの変異と同一である生殖系列配列と比較して少なくとも3個のアミノ酸置換をコードする。

40

#### 【0205】

いくつかの態様において、核酸分子は、モノクローナル抗体1.12.1(M291/D19A)；1.11.1；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；5.59.1；または1.12.1の $V_L$ アミノ酸配列をコードする、SEQ ID NO: 7、11、15、19、23、27、31、35、39、43、47、51、55、59、63、67、71、75、79、83、87、91、または126からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

#### 【0206】

いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO: 8；12；16；20；24；28；32；36；40；44；48；52；56；60；64；68；72；76；80；84；88；92または127の1つのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID

50

NO: 3のヌクレオチド配列またはその一部を含む。いくつかの態様において、核酸は、該抗体の1、2、または3個全てのCDRの軽鎖のアミノ酸配列をコードする。いくつかの態様において、該部分は、抗ALK-1抗体の軽鎖のCDR1-CDR3からの連続した領域をコードする。

#### 【 0 2 0 7 】

いくつかの態様において、核酸分子は、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M291/D19A)；1.12.1(M291)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；もしくは5.59.1のいずれか1つのV<sub>L</sub>アミノ酸配列と、またはSEQ ID NO: 4のV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一であるV<sub>L</sub>アミノ酸配列をコードする。本発明の核酸分子には、先に記述した条件のような、高ストリンジメント条件でハイブリダイズする核酸、またはSEQ ID NO: 8；12；16；20；24；28；32；36；40；44；48；52；56；60；64；68；72；76；80；84；88；92もしくは126のV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列をコードする核酸と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一である核酸が含まれる。  
10

#### 【 0 2 0 8 】

他の好ましい態様において、核酸分子は、ヒトV<sub>H</sub> 4-31、V<sub>H</sub> 3-11、V<sub>H</sub> 3-15、V<sub>H</sub> 3-33、V<sub>H</sub> 4-61、もしくはV<sub>H</sub> 4-59遺伝子配列、またはそれらに由来する配列を利用する重鎖(V<sub>H</sub>)の可変ドメインをコードする。いくつかの態様において、核酸分子は、ヒトV<sub>H</sub> 4-31遺伝子、DH6-19遺伝子およびヒトJH 4B遺伝子を利用する。  
20

#### 【 0 2 0 9 】

いくつかの態様において、核酸分子は、ヒトV、D、またはJ遺伝子の生殖系列アミノ酸配列と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11個の変異を含むアミノ酸配列をコードする。いくつかの態様において、該変異はV<sub>H</sub>領域に存在する。いくつかの態様において、該変異はCDR領域に存在する。

#### 【 0 2 1 0 】

いくつかの態様において、核酸分子は、モノクローナル抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M291/D19A)；1.12.1(M291)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；または5.59.1の任意の1つのV<sub>H</sub>において見いだされるアミノ酸変異と同一である生殖系列V<sub>H</sub>配列と比較して1つまたは複数のアミノ酸変異を含むV<sub>H</sub>配列をコードする。いくつかの態様において、核酸は、上記のモノクローナル抗体の1つにおいて見いだされる少なくとも3つのアミノ酸変異と同一である生殖系列と比較して少なくとも3つのアミノ酸変異をコードする。  
30

#### 【 0 2 1 1 】

いくつかの態様において、核酸分子は、モノクローナル抗体1.12.1(M291/D19A)；1.11.1；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；5.59.1；または1.12.1のV<sub>H</sub>アミノ酸配列をコードする、SEQ ID NO: 5、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、77、81、85、89、または103からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。  
40

#### 【 0 2 1 2 】

いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO: 2；6；10；14；18；22；26；30；34；38；42；46；50；54；58；62；66；70；74；78；82；86；90または104の1つのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。様々な好ましい態様において、核酸分子はSEQ ID NO: 1または95のヌクレオチド配列の少なくとも一部を含む。いくつかの態様において、該部分は、V<sub>H</sub>領域、CDR3領域、3つ全てのCDR領域、またはCDR1-CDR3を含む隣接領域をコードする。

#### 【 0 2 1 3 】

いくつかの態様において、核酸分子は、SEQ ID NO: 2；6；10；14；18；22；26；30；3  
50

4 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90または104の任意の1つにおける $V_H$ アミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一である $V_H$ アミノ酸配列をコードする。本発明の核酸分子には、先に記述した条件のような高ストリンジエント条件でハイブリダイズする核酸、またはSEQ ID NO: 2 ; 6 ; 10 ; 14 ; 18 ; 22 ; 26 ; 30 ; 34 ; 38 ; 42 ; 46 ; 50 ; 54 ; 58 ; 62 ; 66 ; 70 ; 74 ; 78 ; 82 ; 86 ; 90、100もしくは104のアミノ酸配列をコードする核酸と、その $V_H$ 領域と、SEQ ID N 0: 1、5、9、13、17、21、25、29、33、37、41、45、49、53、57、61、65、69、73、77、81、85、89、95、103、128、もしくは129のヌクレオチド配列を含む核酸と、またはその $V_H$ 領域をコードするヌクレオチド配列と、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一である核酸が含まれる。

10

#### 【0214】

もう1つの態様において、核酸は、1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1；および5.59.1からなる群より選択される抗体の完全長の重鎖、またはSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖をコードする。さらに、核酸はSEQ ID NO: 1または95のヌクレオチド配列を含んでもよい。

#### 【0215】

抗ALK-1抗体またはその一部の重鎖または軽鎖をコードする核酸分子は、そのような抗体を産生する任意の起源から単離することができる。様々な態様において、核酸分子は、ALK-1によって免疫した動物から、またはそのようなB細胞に由来する不死化細胞から単離された抗ALK-1抗体を発現するB細胞から単離される。抗体をコードする核酸を単離する方法は当技術分野において周知である。たとえばSambrook J. & Russell D.. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2000)を参照されたい。mRNAを単離して、これを用いて抗体遺伝子のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)またはcDNAクローニングにおいて用いるためのcDNAを產生してもよい。好ましい態様において、核酸分子は、ヒト免疫グロブリンを产生する、非ヒトトランスジェニック動物からの細胞をその融合パートナーの一部として有するハイブリドーマから単離される。さらにより好ましい態様において、ヒト免疫グロブリンを产生する細胞は、XENOMOUSE(登録商標)動物から単離される。もう1つの態様において、ヒト免疫グロブリンを产生する細胞は、先に記述されるように非ヒト非マウストランスジェニック動物から単離される。もう1つの態様において、核酸は非ヒト非トランスジェニック動物から単離される。非ヒト非トランスジェニック動物から単離された核酸分子は、たとえば本発明のヒトALK-1抗体からの1つまたは複数のアミノ酸配列を含むヒト化抗体のために用いられてもよい。

20

#### 【0216】

いくつかの態様において、本発明の抗ALK-1抗体の重鎖をコードする核酸は、任意の起源からの重鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列とインフレームで接合される本発明の $V_H$ ドメインをコードするヌクレオチド配列を含みうる。同様に、本発明の抗ALK-1抗体の軽鎖をコードする核酸分子は、任意の起源からの軽鎖定常ドメインをコードするヌクレオチド配列とインフレームで接合される本発明の $V_L$ ドメインをコードするヌクレオチド配列を含みうる。

30

#### 【0217】

本発明のさらなる局面において、重鎖( $V_H$ )および/または軽鎖( $V_L$ )の可変ドメインをコードする核酸分子は、完全長の抗体遺伝子に「変換される」。1つの態様において、 $V_H$ または $V_L$ ドメインをコードする核酸分子は、 $V_H$ セグメントがベクターにおいて $C_H$ セグメントに機能的に連結するように、および/または $V_L$ セグメントがベクター内で $C_L$ セグメントに機能的に連結するように、重鎖定常ドメイン( $C_H$ )または軽鎖定常ドメイン( $C_L$ )をそれぞれ既にコードする発現ベクターに挿入することによって、完全長の抗体遺伝子に変換される。もう1つの態様において、 $V_H$ および/または $V_L$ ドメインをコードする核酸分子は、標準

40

50

的な分子生物学的技術を用いて、 $V_H$ および／または $V_L$ ドメインをコードする核酸分子を $C_H$ および／または $C_L$ ドメインをコードする核酸分子に連結することによって、たとえばライゲーションすることによって、完全長の抗体遺伝子に変換される。ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン定常ドメイン遺伝子の核酸配列は、当技術分野において公知である。たとえば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., NIH Publ. No. 91-3242, 1991を参照されたい。次に完全長の重鎖および／または軽鎖をコードする核酸分子を、それらが導入されて抗ALK-1抗体が単離される細胞から発現させてよい。

#### 【0218】

核酸分子は、抗ALK-1抗体の大量を組換えによって発現させるために用いてよい。核酸分子はまた、以下にさらに詳しく記述されるように、キメラ抗体、二重特異的抗体、一本鎖抗体、イムノアドヘシン、二重特異性抗体、変異抗体および抗体誘導体を産生するために用いてよい。核酸分子が非ヒト非トランスジェニック動物に由来する場合、核酸分子を、以下に記述するように抗体のヒト化のために用いてよい。

10

#### 【0219】

もう1つの態様において、本発明の核酸分子は特異的抗体配列のためのプローブまたはPCRプライマーとして用いられる。たとえば核酸は、診断法におけるプローブとして、または中でも抗ALK-1抗体の可変ドメインをコードするさらなる核酸分子を単離するために用いることができるDNA領域を増幅するためのPCRプライマーとして用いることができる。いくつかの態様において、核酸分子はオリゴヌクレオチドである。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは関心対象抗体の重鎖および軽鎖の高度可変ドメインに由来する。いくつかの態様において、オリゴヌクレオチドは、抗体1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M29I/D19A)；1.12.1(M29I)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；もしくは5.59.1のCDR、または本明細書において記述されるその変種の1つまたは複数の全てまたは一部をコードする。

20

#### 【0220】

ベクター

30

本発明は、本発明の抗ALK-1抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードする核酸分子を含むベクターを提供する。本発明はまた、そのような抗体またはその抗原結合部分の軽鎖をコードする核酸分子を含むベクターも提供する。本発明はさらに、融合タンパク質、改変抗体、抗体断片、およびそのプローブをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。

#### 【0221】

いくつかの態様において、本発明の抗ALK-1抗体または抗原結合部分は、先に記述されるように得られた、部分的または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを、転写および翻訳制御配列のような必要な発現制御配列に遺伝子が機能的に連結するように発現ベクターに挿入することによって発現される。発現ベクターには、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルスのような植物ウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソーム等が含まれる。抗体遺伝子は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するその意図された機能を果たすようにベクターにライゲーションされる。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞と適合性となるように選択される。抗体の軽鎖遺伝子および抗体の重鎖遺伝子は異なるベクターに挿入することができる。好みしい態様において、双方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は、標準的な方法によって発現ベクターに挿入される(たとえば、抗体遺伝子断片上の相補的制限部位とベクターとのライゲーション、または制限部位が存在しない場合、平滑末端ライゲーション)。

40

#### 【0222】

50

都合のよいベクターは、先に記述されるように、 $V_H$ または $V_L$ 配列が容易に挿入および発現されうるよう適当な制限部位が操作された、機能的に完全なヒト $C_H$ または $C_L$ 免疫グロブリン配列をコードするベクターである。そのようなベクターにおいて、スプライシングは通常、挿入されたJ領域におけるスライスドナー部位とヒトCドメインの前に存在するスライスアクセプター部位との間で起こり、同様にヒト $C_H$ エキソン内で起こるスライス領域で起こる。ポリアデニル化および転写終止は、コード領域の下流の本来の染色体部位で起こる。組換え型発現ベクターはまた、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードしうる。抗体鎖の遺伝子は、シグナルペプチドが免疫グロブリン鎖のアミノ末端にインフレームで連結されるようにベクターにおいてクローニングされてもよい。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド)となりうる。

## 【0223】

抗体鎖遺伝子のほかに、本発明の組換え型発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、望ましいタンパク質発現レベル等のような要因に依存する可能性があることは当業者によって認識されるであろう。哺乳動物宿主細胞発現にとって好ましい調節配列には、レトロウイルスLTR、サイトメガロウイルス(CMV)(CMVプロモーター／エンハンサーのような)、シミアンウイルス40(SV40)(SV40プロモーター／エンハンサーのような)、アデノウイルス(たとえば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))に由来するプロモーターおよび／またはエンハンサーのような哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を指示するウイルス要素、ポリオーマおよび本来の免疫グロブリンおよびアクチンプロモーターのような強い哺乳動物プロモーターが含まれる。ウイルス調節要素およびその配列に関する詳しい記述に関しては、たとえば米国特許第5,168,062号、米国特許第4,510,245号、および米国特許第4,968,615号を参照されたい。プロモーターおよびベクターに関する記述と共に、植物の形質転換に関する記述を含む、植物において抗体を発現させるための方法は、当技術分野において公知である。たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,517,529号を参照されたい。細菌細胞または真菌細胞、たとえば酵母細胞においてポリペプチドを発現させる方法も同様に当技術分野において周知である。

## 【0224】

抗体鎖遺伝子および調節要素のほかに、本発明の組換え型発現ベクターは、宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列(たとえば、複製開始点)および選択マーカー遺伝子のようなさらなる配列を保有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する(たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号、および第5,179,017号を参照されたい)。たとえば、典型的に選択マーカー遺伝子は、G418、ヒグロマイシン、またはメソトレキセートのような薬物に対する耐性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。たとえば、選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子(メソトレキセート選択／増幅によりdhfr-宿主細胞において用いるために)、neo遺伝子(G418選択のため)、およびグルタメートシンターゼ遺伝子が含まれる。

## 【0225】

非ハイブリドーマ宿主細胞およびタンパク質を組換えによって産生する方法

抗ALK-1抗体をコードする核酸およびこれらの核酸分子を含むベクターは、適した哺乳動物、植物、細菌、または酵母宿主細胞のトランスフェクションのために用いることができる。形質転換は、宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための任意の公知の方法によって行うことができる。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は当技術分野において周知であり、これにはデキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔、リポソームにおけるポリヌクレオチドの封入、および核へのDNAの直接マイクロインジェクションが含まれる。さらに、核酸分子をウイルスベクターによって哺乳動物細胞に導

10

20

30

40

50

入してもよい。細胞を形質転換する方法は当技術分野において周知である。たとえば、参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号、および第4,959,455号を参照されたい。植物細胞を形質転換する方法は、たとえばアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)媒介形質転換、バイオリストイック(biolistic)形質転換、直接注入、電気穿孔およびウイルス形質転換を含み、当技術分野において周知である。細菌および酵母細胞を形質転換する方法も同様に、当技術分野において周知である。

#### 【0226】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当技術分野において周知であり、これには、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。これらには、中でもチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NS0細胞、SP 2細胞、HEK-293T細胞、293 Freestyle細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎(BHK)細胞、アフリカミドリザル腎細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(たとえば、Hep G2)、A549細胞、および他の多くの細胞株が含まれる。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有するかを決定することによって選択される。用いてもよい他の細胞株は、Sf9またはSf21細胞のような昆虫細胞株である。抗体遺伝子をコードする組換え型発現ベクターを、哺乳動物宿主細胞に導入する場合、抗体は、宿主細胞において抗体を発現させるために、またはより好ましくはその中で宿主細胞が成長する培養培地に抗体を分泌させるために十分な期間、宿主細胞を培養することによって產生される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培養培地から回収することができる。植物宿主細胞には、タバコ(*Nicotiana*)、シロイヌナズナ(*Arabidopsis*)、ウキクサ、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモ等が含まれる。細菌宿主細胞には、大腸菌(*E. coli*)およびストレプトミセス(*Streptomyces*)種が含まれる。酵母宿主細胞には、シゾサッカロミセズポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、およびピチアパストリス(*Pichia pastoris*)が含まれる。

#### 【0227】

さらに、產生細胞株からの本発明の抗体の発現は、多くの公知の技術を用いて増強することができる。たとえば、グルタミンシンターゼ遺伝子発現系(GS系)は、特定の条件で発現を増強するための一般的なアプローチである。GS系は、欧州特許第0 216 846号、第0 2 56 055号、第0 323 997号、および第0 338 841号と全てまたは部分的に結びつけて考察される。

#### 【0228】

異なる細胞株によってまたはトランスジェニック動物において発現される抗体は、互いに異なるグリコシリ化を有する可能性がある。しかし、本明細書において提供される核酸分子によってコードされる、または本明細書において提供されるアミノ酸配列を含む抗体は全て、抗体のグリコシリ化によらず、本発明の一部である。

#### 【0229】

#### トランスジェニック動物および植物

本発明の抗ALK-1抗体はまた、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に関してトランスジェニックである哺乳動物または植物の作製、ならびにそこから回収可能な型での抗体の產生を通してトランスジェニックにより產生することができる。哺乳動物におけるトランスジェニック產生と組み合わせて、抗ALK-1抗体はヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁において產生され、そこから回収することができる。たとえば、参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,827,690号、第5,756,687号、第5,750,172号、および第5,741,957号を参照されたい。いくつかの態様において、ヒト免疫グロブリン座を含む非ヒトトランスジェニック動物は、先に記述されるようにALK-1またはその免疫原性部分によって免疫される。植物において抗体を作製するための方法は、たとえば参考により本明細書に組み入れられる、U.S. patents 6,046,037および5,959,177において記述されている。

#### 【0230】

いくつかの態様において、非ヒトトランスジェニック動物または植物は、本発明の抗AL

10

20

30

40

50

K-1抗体をコードする1つまたは複数の核酸分子を、標準的なトランスジェニック技術によって動物または植物に導入することによって產生される。Hoganおよび米国特許第6,417,429号、前記を参照されたい。トランスジェニック動物を作製するために用いられるトランスジェニック細胞は、胚幹細胞、体細胞、または受精卵となりうる。トランスジェニック非ヒト生物は、キメラ、非キメラヘテロ接合体、および非キメラホモ接合体となりうる。たとえば、その全てが参考により本明細書に組み入れられる、Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1999) ; Jackson et al., Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000) ; およびPinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook. Academic Press (1999)を参考されたい。10 いくつかの態様において、トランスジェニック非ヒト動物は、関心対象となる重鎖および／または軽鎖をコードするターゲティング構築物による標的化破壊および置換を有する。好ましい態様において、トランスジェニック動物は、ALK-1、好ましくはヒトALK-1に特異的に結合する重鎖および軽鎖をコードする核酸分子を含み、および発現する。いくつかの態様において、トランスジェニック動物は、一本鎖抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体のような改変抗体をコードする核酸分子を含む。抗ALK-1抗体は、任意のトランスジェニック動物において作製してもよい。好ましい態様において、非ヒト動物は、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、またはウマである。非ヒトトランスジェニック動物は、血液、乳汁、尿、唾液、類液、粘液、および他の体液において該コードされるポリペプチドを発現する。20

## 【0231】

## ファージディスプレイライブラリ

本発明は、ファージ上でヒト抗体ライブラリを合成する段階、ALK-1またはその抗体結合部分によってライブラリをスクリーニングする段階、ALK-1に結合するファージを単離する段階、およびファージから抗体を得る段階を含む、抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分を產生するための方法を提供する。例として、ファージディスプレイ技術において用いるための抗体のライブラリを調製するための1つの方法は、ALK-1またはその抗原性部分によってヒト免疫グロブリン座を含む非ヒト動物を免疫して免疫応答を作製する段階、免疫した動物から抗体産生細胞を抽出する段階、本発明の抗体の重鎖および軽鎖をコードするRNAを単離する段階、RNAを逆転写してcDNAを產生する段階、プライマーを用いてcDNAを増幅する段階、および抗体がファージ上で発現されるようにcDNAをファージディスプレイベクターに挿入する段階を含む。本発明の組換え型抗ALK-1抗体はこのようにして得てもよい。30

## 【0232】

本発明の組換え型ヒト抗ALK-1抗体は、組換え型コンビナトリアル抗体ライブラリをスクリーニングすることによって単離することができる。好ましくは、ライブラリは、B細胞から単離されたmRNAから調製されたヒト $V_L$ および $V_H$  cDNAを用いて生成されたscFvファージディスプレイである。そのようなライブラリを調製およびスクリーニングするための方法は、当技術分野において公知である。ファージディスプレイライブラリを作製するためのキットは市販されている(たとえば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；およびStratagene SurfZAP(商標)ファージディスプレイキット、カタログ番号240612)。同様に、抗体ディスプレイライブラリの生成およびスクリーニングにおいて用いることができる他の方法および試薬が存在する(たとえば、その全てが参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,223,409号；PCT公報WO 92/18619、WO 91/17271、WO 92/20791、WO 92/15679、WO 93/01288、WO 92/01047、WO 92/09690；Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991)；Hay et al., Hum. Antibod. Hybrids 3:81-85 (1992)；Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)；McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)；Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)；Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)；Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)；Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580 (1992)；Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377 (1991)；Hoogenboom et al., Nuc. Acid Res. 19:4140  
50

33-4137 (1991) ; およびBarbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982 (1991)を参照されたい)。

### 【0233】

1つの態様において、所望の特徴を有するヒト抗ALK-1抗体を単離および產生するために、本明細書において記述されるヒト抗ALK-1抗体を最初に用いて、参照により本明細書に組み入れられる、PCT公報WO 93/06213において記述されるエピトープインプリンティング法を用いて、ALK-1に対して類似の結合活性を有するヒト重鎖および軽鎖配列を選択する。この方法において用いられる抗体ライブラリは、好ましくは、その全てが参照により本明細書に組み入れられる、PCT公報WO 92/01047、McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990) ; およびGriffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)において記述されるように調製およびスクリーニングされたscFvライブラリである。scFv抗体ライブラリは、好ましくは抗原としてヒトALK-1を用いてスクリーニングされる。10

### 【0234】

最初のヒト $V_L$ および $V_H$ ドメインを選択した後、好ましい $V_L/V_H$ 対の組み合わせを選択するため最初に選択された $V_L$ および $V_H$ セグメントの異なる対がALK-1結合に関してスクリーニングされる、「混合およびマッチ」実験を行う。さらに、抗体の質をさらに改善するために、好ましい $V_L/V_H$ 対の $V_L$ および $V_H$ セグメントを、天然の免疫応答の際の抗体の親和性成熟の原因となるインビオ体変異プロセスと類似のプロセスにおいて、好ましくは $V_H$ および / または $V_L$ のCDR3領域内で、無作為に変異させることができる。このインビトロ親和性成熟は、得られたPCR産物が、 $V_H$ および / または $V_L$  CDR3領域に無作為変異が導入されている $V_H$ および $V_L$ セグメントをコードするように、特定の位置で4つのヌクレオチド塩基の無作為な混合物によって、そのプライマーが「スパイク」されている、 $V_H$  CDR3または $V_L$  CDR3に対してそれぞれ相補的なPCRプライマーを用いて $V_H$ および $V_L$ ドメインを增幅することによって行うことができる。これらの無作為変異 $V_H$ および $V_L$ セグメントを、ALK-1に対する結合に関して再スクリーニングすることができる。20

### 【0235】

組換え型免疫グロブリンディスプレイライブラリからの本発明の抗ALK-1抗体のスクリーニングおよび単離後、選択された抗体をコードする核酸をディスプレイパッケージ(たとえば、ファージゲノムから)から回収して、標準的な組換えDNA技術によって他の発現ベクターにサブクローニングすることができる。望ましければ、以下に記述されるように、本発明の他の抗体型を作製するように核酸をさらに操作することができる。コンビナトリアルライブラリのスクリーニングによって単離された組換え型ヒト抗体を発現させるために、抗体をコードするDNAを組換え型発現ベクターにクローニングして、上記のように哺乳動物宿主細胞に導入する。30

### 【0236】

#### 脱免疫抗体

本発明のもう1つの局面において、抗体は、たとえばPCT公報WO98/52976およびW000/34317(参照により本明細書に組み入れられる)において記述される技術を用いて、その免疫原性を低減するように脱免疫されてもよい。

### 【0237】

#### 変異抗体

もう1つの態様において、核酸分子、ベクター、および宿主細胞を用いて変異した抗ALK-1抗体を作製してもよい。抗体は、たとえば抗体の結合特性を変化させるために、重鎖および / または軽鎖の可変ドメインにおいて変異させてもよい。たとえば、変異は、ALK-1に関する抗体の $K_D$ を増加もしくは減少させるために、 $k_{off}$ を増加もしくは減少させるために、または抗体の結合特異性を変化させるために、CDR領域の1つまたは複数において行つてもよい。部位特異的変異誘発における技術は、当技術分野において周知である。たとえば、Sambrook et al. およびAusubel et al.、前記を参照されたい。もう1つの態様において、モノクローナル抗体1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.34050

1.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; または5.59.1における生殖系列と比較して変化していることが知られているアミノ酸残基で1つまたは複数の変異を作製する。変異は、可変ドメインのCDR領域もしくはフレームワーク領域、または定常ドメインにおいて作製してもよい。好ましい態様において、変異は可変ドメインにおいて作製される。いくつかの態様において、SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、もしくは127の、またはその核酸配列がSEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、95、102、もしくは126において示されるアミノ酸配列の可変ドメインのCDR領域またはフレームワーク領域における生殖系列と比較して変化していることがわかっているアミノ酸残基で1つまたは複数の変異を作製する。  
10

## 【0238】

もう1つの態様において、フレームワーク領域は、得られたフレームワーク領域が対応する生殖系列遺伝子のアミノ酸配列を有するように変異している。変異は、抗ALK-1抗体の半減期を増加させるようにフレームワーク領域または定常ドメインにおいて作製してもよい。たとえば、参照により本明細書に組み入れられるPCT公報WO 00/09560を参照されたい。抗体の免疫原性を変化させるため、もう1つの分子に対する共有結合もしくは非共有結合部位を提供するため、または補体固定、FcR結合、および抗体依存的細胞性細胞障害性(ADCC)のような特性を変化させるために、フレームワーク領域または定常ドメインにおける変異も同様に行っててもよい。本発明に従って、1つの抗体は、可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域の任意の1つもしくは複数において、または定常ドメインにおいて変異を有してもよい。  
20

## 【0239】

いくつかの態様において、変異前の抗ALK-1抗体と比較して変異した抗ALK-1抗体のV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>ドメインのいずれかにおけるアミノ酸変異は、その間の任意の数を含む1~13個存在する。上記のいずれかにおいて、変異は1つまたは複数のCDR領域において起こってもよい。さらに、いかなる変異も保存的アミノ酸置換となりうる。いくつかの態様において、定常ドメインにおけるアミノ酸変化は5、4、3、2、または1個に過ぎない。  
30

## 【0240】

## 改变抗体

もう1つの態様において、もう1つのポリペプチドに連結した本発明の抗ALK-1抗体の全てまたは一部を含む融合抗体またはイムノアドヘシンを作製してもよい。好ましい態様において、抗ALK-1抗体の可変ドメインのみがポリペプチドに連結される。もう1つの好ましい態様において、抗ALK-1抗体のV<sub>H</sub>ドメインは、第一のポリペプチドに連結され、抗ALK-1抗体のV<sub>L</sub>ドメインは、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが互いに相互作用して抗原結合部位を形成することができるよう、第一のポリペプチドに会合する第二のポリペプチドに連結する。もう1つの好ましい態様において、V<sub>H</sub>ドメインは、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが互いに相互作用することができるようにリンカーによってV<sub>L</sub>ドメインから離れている(以下の一本鎖抗体の章を参照されたい)。次に、V<sub>H</sub>リンカー-V<sub>L</sub>抗体を関心対象ポリペプチドに連結させる。さらに、2つ(またはそれより多い)一本鎖抗体が互いに連結している融合抗体を作製することができる。これは、1つのポリペプチド鎖において二価もしくは多価抗体を作製したい場合、または二重特異的抗体を作製したい場合には、有用である。  
40

## 【0241】

一本鎖抗体(scFv)を作製するために、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>コードDNA断片を、柔軟なリンカーをコードする、たとえばアミノ酸配列(Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>をコードするもう1つの断片に、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインが柔軟なリンカーによって連結されて、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列が隣接する一本鎖タンパク質として発現されうるように、機能的に連結させる。たとえば、Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883 (19  
50

88) ; McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)を参照されたい。一本鎖抗体は、1つのみのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を用いる場合には一価であってもよく、2つのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を用いる場合には二価であってもよく、または2つより多いV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を用いる場合には、多価であってもよい。ALK-1およびもう1つの分子に対して特異的に結合する二重特異性または多価抗体を作製してもよい。

#### 【0242】

他の態様において、核酸分子をコードする抗ALK-1抗体を用いて他の改変抗体を調製してもよい。たとえば、「 体」(III et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997))、「ミニボディ」(Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994))、「二重特異性抗体」(Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 6444-6448 (1993))、または「ヤヌシンズ(Janusins)」(Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991)およびTraunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992))は、明細書の教示に従って標準的な分子生物学的技術を用いて調製してもよい。  
10

#### 【0243】

二重特異的抗体または抗原結合断片は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結を含む様々な方法によって产生することができる。たとえば、Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelnik et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992)を参考されたい。さらに、二重特異的抗体は、「二重特異性抗体」または「ヤヌシンズ」として形成されてもよい。いくつかの態様において、二重特異的抗体は、ALK-1の2つの異なるエピトープに結合する。いくつかの態様において、二重特異的抗体は、モノクローナル抗体1.11.1 ; 1.12.1 ; 1.12.1(rWT) ; 1.12.1(M29I/D19A) ; 1.12.1(M29I) ; 1.12.1(D19A) ; 1.13.1 ; 1.14.1 ; 1.151.1 ; 1.162.1 ; 1.183.1 ; 1.27.1 ; 1.29.1 ; 1.31.1 ; 1.8.1 ; 1.9.1 ; 4.10.1 ; 4.24.1 ; 4.38.1 ; 4.58.1 ; 4.62.1 ; 4.68.1 ; 4.72.1 ; 5.13.1 ; 5.34.1 ; 5.53.1 ; 5.56.1 ; 5.57.1 ; または5.59.1からの第一の重鎖および第一の軽鎖、ならびにさらなる抗体重鎖および軽鎖を有する。いくつかの態様において、さらなる軽鎖および重鎖も同様に上記の同定されたモノクローナル抗体の1つに由来するが第一の重鎖および軽鎖とは異なる。  
20

#### 【0244】

いくつかの態様において、上記の改変抗体は、本明細書において提供されたヒト抗ALK-1モノクローナル抗体からの可変ドメインまたはCDR領域の1つまたは複数を用いて調製される。  
30

#### 【0245】

##### 誘導体化および標識抗体

本発明の抗ALK-1抗体または抗原結合部分は、誘導体化されうる、またはもう1つの分子(たとえば、もう1つのペプチドまたはタンパク質)に連結することができる。一般的に、抗体またはその一部は、ALK-1結合が誘導体化または標識によって有害な影響を受けないように誘導体化される。したがって、本発明の抗体および抗体の一部には、本明細書において記述されるヒト抗ALK-1抗体の無傷および改変型の双方が含まれると意図される。たとえば、本発明の抗体または抗体の一部は、もう1つの抗体(たとえば、二重特異的抗体または二重特異性抗体)、検出物質、薬剤、および/または抗体または抗体の一部ともう1つの分子(ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグのような)との会合を媒介することができるタンパク質またはペプチドのような1つまたは複数の他の分子実体に機能的に(化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合またはそれ以外によって)連結することができる。  
40

#### 【0246】

誘導体化抗体の1つのタイプは、2つまたはそれより多い抗体(同じタイプまたは異なるタイプの、たとえば二重特異性抗体を作製するために)をクロスリンクさせることによって產生される。適したクロスリンク剤には、適當なスペーサーによって離れた異なる2つの反応基(たとえば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシニミドエステル)を有するヘテロ二官能性である、またはホモ二官能性(たとえばジスクシニミルスペレート)  
50

であるクロスリンク剤が含まれる。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company, Rockford, ILから入手可能である。

#### 【0247】

もう1つのタイプの誘導体化抗体は、標識抗体である。それによって本発明の抗体または抗原結合部分が誘導体化される可能性がある有用な検出物質には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリン、ランタニドリン等を含む蛍光化合物が含まれる。抗体はまた、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等のような検出にとって有用な酵素によって標識することができる。抗体を検出可能な酵素によって標識する場合、これは、区別される反応産物を産生するために酵素が用いるさらなる試薬を加えることによって検出される。たとえば、物質西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジンの付加によって着色反応産物が得られ、これは検出可能である。抗体はまた、ビオチンによって標識して、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的な測定を通して検出することができる。抗体はまた、二次レポーター(たとえば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)によって認識される既定のポリペプチドエピトープによって標識することができる。いくつかの態様において、標識は、可能性がある立体障害を低減するために様々な長さのスペーサーアームによって付着される。

#### 【0248】

抗ALK-1抗体はまた、ポリエチレングリコール(PEG)、メチルもしくはエチル基、または炭水化物基のような化学基によって誘導体化することができる。これらの基は、たとえば血清半減期を増加させるために抗体の生物学的特徴を改善するために有用である。

#### 【0249】

##### 薬学的組成物および投与

本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物における望ましくない増加した血管新生に関連する状態を処置するために有効である、本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分の量と、薬学的に許容される担体とを含む、そのような状態を処置するための薬学的組成物にも関する。

#### 【0250】

本発明の抗体および抗原結合部分は、被験者に投与するために適した薬学的組成物に組み入れることができる。典型的に、薬学的組成物は、本発明の抗体または抗原結合部分と薬学的に許容される担体とを含む。本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」は、生理的に適合性である、任意および全ての溶媒、分散培地、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等を意味する。薬学的に許容される担体のいくつかの例は、水、生理食塩液、リン酸緩衝生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノール等と共に、その組み合わせである。多くの場合において、等張剤、たとえば糖、マンニトールのような多価アルコール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいであろう。薬学的に許容される物質のさらなる例は、湿潤剤、または湿潤剤もしくは乳化剤、抗体の有効期限または有効性を増強する保存剤もしくは緩衝剤のような微量の補助物質である。

#### 【0251】

本発明の組成物は、多様な剤形、たとえば液体溶液(たとえば、注射用および注入可能溶液)、分散剤または懸濁剤、錠剤、丸剤、粉剤、リポソーム、および坐剤のような液体、半固体、固体投与剤形であってもよい。好ましい剤形は、意図される投与様式および治療応用に依存する。典型的な好ましい組成物は、ヒトの受動免疫に用いられる組成物と類似の組成物のような、注射可能または注入可能溶液の剤形である。好ましい投与様式は非経口(たとえば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。好ましい態様において、抗体は静脈内注入または注射によって投与される。もう1つの好ましい態様において、抗体は、筋肉内または皮下注射によって投与される。注射用製剤は、単位投与剤形で、たとえばア

10

20

30

40

50

ンプルまたは多用量容器において、保存剤を添加してまたは保存剤を添加せずに示されてもよい。組成物は、油性または水性媒体において、懸濁剤、溶液、または乳剤のような剤形をとってもよく、懸濁剤、安定化剤、および／または分散剤のような処方物質を含んでもよい。または、活性成分は、適した媒体、たとえば発熱物質を含まない水において使用前に溶解するための粉末剤形であってもよい。

#### 【0252】

治療的組成物は典型的に無菌的で、製造および保存条件において安定でなければならぬ。組成物は、溶液、微小乳剤、分散剤、リポソーム、または薬物の高濃度に適した他の秩序だった構造として製剤化されうる。滅菌注射用溶液は、必要量の抗ALK-1抗体を、先に列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に適当な溶媒に組み入れた後に、必要であれば濾過滅菌することによって調製することができる。一般的に、分散液は、基礎分散培地および先に列挙した物質から必要な他の成分を含む滅菌媒体に活性化合物を組み入れることによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、その予め濾過滅菌した溶液から活性成分プラス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凍結乾燥である。溶液の適切な流動性は、たとえばレシチンのようなコーティングを用いることによって、分散剤の場合には必要な粒子径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持することができる。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅らせる物質、たとえばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含めることによってもたらされうる。

#### 【0253】

多くの治療応用に関して、好ましい投与経路／様式は皮下、筋肉内、または静脈内注入であるが、本発明の抗体または抗体の一部は、当技術分野において公知の多様な方法によって投与することができる。当業者によって認識されるように、投与経路および／または投与様式は所望の結果に応じて変化するであろう。

#### 【0254】

特定の態様において、本発明の抗体組成物は、インプラント、経皮パッチ、および微小封入送達系を含む、徐放性製剤のような急速な放出に対して抗体を保護するであろう担体と共に調製されてもよい。エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような生体分解性で生体適合性のポリマーを用いることができる。そのような処方を調製するための多くの方法は一般的に当業者に公知である。たとえば、参照により本明細書に組み入れられる、*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978*を参照されたい。

#### 【0255】

さらなる活性化合物も同様に組成物に組み入れることができる。特定の態様において、本発明の阻害性の抗ALK-1抗体は、1つまたは複数のさらなる治療物質と同時製剤化および／または同時投与される。これらの物質には、他の標的に結合する抗体、抗腫瘍物質、抗血管新生物質、シグナル伝達阻害剤、抗増殖物質、化学療法剤、または抗ALK-1を阻害するペプチド類似体が含まれるがこれらに限定されるわけではない。そのような併用治療は、阻害性の抗ALK-1抗体の低用量と共に、同時投与物質を必要としてもよく、このように様々な単剤治療に関連する起こりうる毒性または合併症を回避する。

#### 【0256】

先に述べたように、本発明の組成物は任意で、キレート物質のほかに薬学的に許容される抗酸化剤をさらに含んでもよい。適した抗酸化剤には、メチオニン、チオ硫酸ナトリウム、カタラーゼ、および白金が含まれるがこれらに限定されるわけではない。たとえば、組成物は、1 mM～約100 mMの範囲の濃度、特に約27 mMであるメチオニンを含んでもよい。たとえば、水性製剤は、10 mg/ml抗ALK-1抗体、20 mMヒスチジン、pH 5.5、84 mg/mlトレハロース二水和物、0.2 mg/mlポリソルベート80、0.05 mg/ml EDTA二ナトリウム、0.1 mg/ml L-メチオニンであってもよい。

#### 【0257】

10

20

30

40

50

本発明の組成物には、本発明の抗体または抗原結合部分の「治療的有効量」、または「予防的有効量」が含まれてもよい。「治療的有効量」は、所望の治療結果を發揮するために必要な用量および期間で有効な量を指す。抗体または抗原結合部分の治療的有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体における抗体または抗体部分が所望の反応を誘発する能力のような要因に従って変化する可能性がある。治療的有効量はまた、抗体または抗原結合部分の任意の毒性または有害な効果が治療的に有益な効果を上回る量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な用量および期間で有効な量を指す。典型的に、予防的用量は、疾患の前、または疾患の初期段階の被験者において用いられることから、予防的有効量は治療的有効量より少ない可能性がある。

10

#### 【0258】

投与レジメは最適な所望の反応(たとえば、治療的または予防的反応)を提供するように調節することができる。たとえば、1回ボーラス投与を行うことができ、数回分割用量を経時的に投与することができ、または用量を治療状況の緊急性に応じて比例して低減もしくは増加することができる。投与の容易さおよび用量の均一性のためにタンパク質に単位投与剤形で非経口組成物を製剤化することが特に都合がよい。本明細書において用いられる単位投与剤形は、処置される哺乳動物被験者に関する単位用量として適した物理的に個別の単位を指す；それぞれの単位は、必要な薬学的担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算された活性化合物の規定量を含む。本発明の単位投与剤形の仕様は、(a)抗ALK-1抗体またはその部分の独自の特徴および達成される特定の治療または予防効果、ならびに(b)個体における感受性を処置するためにそのような抗体を混合する当技術分野における固有の制限によって指示され、直接依存する。

20

#### 【0259】

本発明の抗体または抗体部分の治療的または予防的有効量に関する例としての非制限的な範囲は、0.025～50 mg/kg、より好ましくは0.1～50 mg/kg、より好ましくは0.1～25、0.1～10、または0.1～3 mg/kgである。いくつかの態様において、製剤は、20 mMクエン酸ナトリウム、pH 5.5、140 mM NaCl、および0.2 mg/mlポリソルベート80の緩衝液において5 mg/mlの抗体を含む。用量の値は、緩和される状態のタイプおよび重症度によって変化する可能性があることに注目されるべきである。任意の特定の被験者に関して、特異的な用量レジメは個体の必要性および組成物の投与を管理または監督する人の専門的判断に従つて、時間と共に調節すべきであること、および本明細書において述べた用量範囲は例であるに過ぎず、特許請求される組成物の範囲または実践を限定すると意図されないとさらに理解すべきである。

30

#### 【0260】

本発明のもう1つの局面は、本発明の抗ALK-1抗体もしくはその抗原結合部分、またはそのような抗体もしくは部分を含む組成物を含むキットを提供する。キットには、抗体または組成物のほかに、診断または治療物質が含まれてもよい。キットにはまた、診断または治療法において用いるための説明書が含まれうる。好ましい態様において、キットには、抗体、または抗体と以下に記述される方法において用いることができる診断物質とを含む組成物が含まれる。もう1つの好ましい態様において、キットには、抗体、または抗体と以下において記述される方法において用いることができる1つまたは複数の治療物質とを含む組成物が含まれる。

40

#### 【0261】

##### 診断的使用法

抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分は、インビトロまたはインビボで生物学的試料においてALK-1を検出するための診断法において用いることができる。たとえば、抗ALK-1抗体は、ELISA、RIA、フローサイトメトリー、組織免疫組織化学、ウェスタンプロット、または免疫沈殿が含まれるがこれらに限定されるわけではない従来のイムノアッセイにおいて用いることができる。本発明の抗ALK-1抗体は、ヒトからのALK-1を検出するために用いることができる。抗ALK-1抗体はまた、他の靈長類、たとえばカニクイザルからのALK-1を

50

検出するために用いることができる。

**【0262】**

本発明は、生物試料を本発明の抗ALK-1抗体に接触させる段階および結合した抗体を検出する段階を含む、生物学的試料におけるALK-1を検出するための方法を提供する。1つの態様において、抗ALK-1抗体は、検出可能な標識によって直接標識される。もう1つの態様において、抗ALK-1抗体(第一抗体)は、標識されず、第二抗体または抗ALK-1抗体に結合することができる他の分子を標識する。当業者に周知であるように、第一抗体の特定の種およびクラスに特異的に結合することができる第二抗体を選択する。たとえば、抗ALK-1抗体がヒトIgGである場合、第二抗体は抗ヒトIgGとなりうるであろう。抗体に結合することができる他の分子には、その双方がたとえばPierce Chemical Co.から市販されているプロテインAおよびプロテインGが含まれるがこれらに限定されるわけではない。10

**【0263】**

抗体または二次抗体に関する適した標識は、既に考察されており、様々な酵素、補欠分子群、蛍光材料、発光材料および放射活性材料が含まれる。適した酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる；適した補欠分子群複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンが含まれる；適した蛍光材料の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリスリンが含まれる；発光材料の例には、ルミノールが含まれる；および適した放射活性材料の例には、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ が含まれる。20

**【0264】**

他の態様において、ALK-1は、検出可能な物質によって標識したALK-1標準物質および非標識抗ALK-1抗体を利用する競合的イムノアッセイによって、生物学的試料においてアッセイされうる。このアッセイにおいて、生物学的試料、標識ALK-1標準物質および抗ALK-1抗体を混合して、非標識抗体に結合した標識ALK-1標準物質の量を決定する。生物学的試料におけるALK-1の量は、抗ALK-1抗体に結合した標識ALK-1標準物質の量と反比例する。

**【0265】**

多数の目的のために先に開示したイムノアッセイを用いることができる。たとえば、抗ALK-1抗体を用いて、培養細胞におけるALK-1を検出することができる。好ましい態様において、抗ALK-1抗体は、様々な化合物によって処置されている細胞によって産生されたALK-1の量を決定するために用いられる。この方法は、ALK-1タンパク質レベルを調節する化合物を同定するために用いることができる。この方法に従って、1つの細胞試料を、試験化合物によって一定期間処置して、もう1つの試料を無処置のままとする。総ALK-1レベルを測定する場合、細胞を溶解して、先に記述したイムノアッセイの1つを用いて総ALK-1レベルを測定する。処置細胞対無処置細胞における総ALK-1レベルを比較して、試験化合物の効果を決定する。30

**【0266】**

総ALK-1レベルを測定するための好ましいイムノアッセイは、フローサイトメトリーまたは免疫組織化学である。ELISA、RIA、フローサイトメトリー、ウェスタンプロット、免疫組織化学、膜構成要素タンパク質の細胞表面標識、および免疫沈降のような方法は、当技術分野において周知である。たとえば、Harlow and Lane、前記を参照されたい。さらに、イムノアッセイは、ALK-1発現の活性化または阻害のいずれかのために多くの化合物を試験するためにハイスループットスクリーニングのために規模拡大することができる。40

**【0267】**

本発明の抗ALK-1抗体は、組織または組織に由来する細胞におけるALK-1レベルを決定するため用いることができる。いくつかの態様において、組織は疾患組織である。方法のいくつかの態様において、組織またはその生検は患者から切除される。組織または生検をイムノアッセイにおいて用いて、たとえば先に考察した方法によって総ALK-1レベルまたはALK-1の局在を決定する。50

**【 0 2 6 8 】**

本発明の抗体はまた、ALK-1を発現する組織および臓器を同定するためにインビボで用いることができる。本発明のヒト抗ALK-1抗体を用いる1つの長所は、非ヒト起源の抗体、またはヒト化もしくはキメラ抗体とは異なり、投与した場合に抗体に対して実質的な免疫応答を誘発することなく、インビボで安全に用いられる可能性がある点である。

**【 0 2 6 9 】**

方法は、検出可能に標識した抗ALK-1抗体またはそれらを含む組成物を、そのような診断試験を必要とする患者に投与する段階、およびALK-1発現組織の局在を決定するために患者を画像分析に供する段階を含む。画像分析は医学の技術分野において周知であり、これにはx線解析、磁気共鳴画像(MRI)、またはコンピューター断層撮影(CT)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。抗体は、インビボ造影のために適した任意の物質、たとえばx線解析のために用いることができるバリウムのような造影剤、またはMRIもしくはCTのために用いることができるガドリニウムキレートのような磁気造影剤によって標識することができる。他の標識物質には、<sup>99</sup>Tcのような放射性同位元素が含まれるがこれらに限定されるわけではない。もう1つの態様において、抗ALK-1抗体は非標識であり、検出可能であって抗ALK-1抗体に結合することができる第二抗体または他の抗体を投与することによって造影されるであろう。1つの態様において、関心対象組織がALK-1を発現するか否かを決定するために、生検を患者から得る。

10

**【 0 2 7 0 】****治療的使用法**

20

もう1つの態様において、本発明は、それを必要とする患者に抗ALK-1抗体を投与することによってALK-1活性を阻害するための方法を提供する。本明細書において記述される任意の抗体またはその抗原結合部分を治療的に用いてもよい。好ましい態様において、抗ALK-1抗体はヒト、キメラ、またはヒト化抗体である。もう1つの好ましい態様において、抗ALK-1抗体はヒト抗体であって、患者はヒト患者である。または、患者は抗ALK-1抗体が交叉反応するALK-1を発現する哺乳動物であってもよい。抗体は、獣医学目的のために、またはヒト疾患の動物モデルとして抗体が交叉反応する(たとえば、カニクイザル)ALK-1を発現する非ヒト哺乳動物に投与されてもよい。そのような動物モデルは、本発明の抗体の治療的有効性を評価するために有用となる可能性がある。

**【 0 2 7 1 】**

30

もう1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその抗体部分は、高レベルのALK-1を不適切に発現する患者に投与されてもよい。抗体は1回投与されてもよいがより好ましくは多回投与される。抗体は1日3回から6ヶ月またはそれより長い間に1回投与されてもよい。投与は1日3回、1日2回、1日1回、2日毎に1回、3日毎に1回、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回および6ヶ月に1回のスケジュールで投与されてもよい。抗体はミニポンプによって連続的に投与してもよい。抗体は、粘膜、口腔内、鼻腔内、吸入、静脈内、皮下、筋肉内、非経口、または腫瘍内経路によって連続的に投与してもよい。抗体は、1回、少なくとも2回、または少なくとも状態が処置される、緩和される、または治癒されるまでの期間投与してもよい。抗体は一般的に、状態が存在する限り、投与されてもよい。抗体は、一般的に前記のように薬学的組成物の一部として投与されるであろう。抗体の用量は一般的に、0.1～100 mg/kgの範囲であり、より好ましくは0.5～50 mg/kg、より好ましくは1～20 mg/kg、およびさらにより好ましくは1～10 mg/kgの範囲であろう。抗体の血清濃度は、当技術分野において公知の任意の方法によって測定されてもよい。

40

**【 0 2 7 2 】**

1つの態様において、抗体は、約5.0～約6.5の範囲のpHを有し、約1 mg/ml～約200 mg/ml抗体、約1ミリモル～約100ミリモルのヒスチジン緩衝液、約0.01 mg/ml～約10 mg/mlポリソルベート80、約100ミリモル～約400ミリモルのトレハロース、および約0.01ミリモル～約1.0ミリモルのEDTA二ナトリウム二水和物を含む滅菌水溶液としての製剤で投与される。

50

**【0273】**

本明細書における任意の組成物を、血管新生の増加に関連する状態(「血管新生状態」)に対して感受性がある、または状態に罹患している患者に投与してもよいことは、本発明によってさらに企図される。

**【0274】**

本発明の組成物／方法によって処置／予防されてもよい血管新生状態の例には、癌(固体癌および血液癌の双方)、加齢性黄斑変性(AMD)、発達異常(器官形成)、糖尿病性失明、子宮内膜症、眼の新生血管形成、乾癬、リウマチ性関節炎(RA)、および皮膚の変色(たとえば、血管腫、火炎状母斑、または単純性母斑)が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

10

**【0275】**

たとえば、本発明は、本明細書における任意の組成物／方法を用いて眼の新生血管形成に関連する状態を処置または予防するための方法に関する。眼の新生血管形成に関連する状態には、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性(「ARMD」)、血管新生緑内障、間質性角膜炎、未熟児網膜症、虚血性網膜症(たとえば、鎌状細胞)、病的近視、眼のヒストプラスマ症、翼状片、punctuate内部脈絡膜症等が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

**【0276】**異常な細胞成長の処置

本発明はまた、異常な細胞成長を処置するために有効である、本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分の治療的有効量を哺乳動物に投与する段階を含む、ヒトを含む哺乳動物における異常な細胞成長を処置するための方法に関する。

20

**【0277】**

この方法の1つの態様において、異常な細胞成長は、中皮腫、肝胆管(肝臓および胆管)腫瘍、原発性または二次性CNS腫瘍、原発性または二次性脳腫瘍、肺癌(NSCLCおよびSCLC)、骨癌、肺腫瘍、皮膚癌、頭部または頸部の癌、皮膚または眼内黒色腫、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、消化器(胃、結腸直腸、および十二指腸)癌、乳癌、子宮癌、ファロピー管の癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腫瘍、外陰癌、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、精巣癌、慢性または急性白血病、慢性骨髓性白血病、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎細胞癌、腎骨盤癌、中枢神経系の新生物(CNS)、原発性CNSリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、副腎皮質癌、胆嚢癌、多発性骨髓腫、胆管癌、線維肉腫、神経芽腫、網膜芽腫、または1つもしくは複数の前述の癌の組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない癌である。

30

**【0278】**

本発明の好ましい態様において、癌は、肺癌(NSCLCおよびSCLC)、頭部または頸部の癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、肛門周囲の癌、胃癌、乳癌、腎臓または尿管の癌、腎細胞癌、腎骨盤癌、中枢神経系(CNS)の新生物、原発性CNSリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、脊髄軸腫瘍、または前述の癌の1つもしくは複数の組み合わせから選択される。

**【0279】**

本発明のもう1つの好ましい態様において、癌は、肺癌(NSCLCおよびSCLC)、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、肛門領域の癌、または前述の癌の1つもしくは複数の組み合わせから選択される。

40

**【0280】**

該方法のもう1つの態様において、この異常な細胞成長は、乾癬、良性前立腺肥大、または網膜症が含まれるがこれらに限定されるわけではない良性の増殖性疾患である。

**【0281】**

本発明はまた、分裂阻害剤、アルキル化剤、抗代謝剤、インターフェロン抗生物質、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物反応改変剤、抗体、細胞障害剤、抗ホルモン、および抗アンドロゲン剤からなる群より選択される抗腫瘍剤と併用して、異常な細胞成長を処置するために有効である量の、本明細書において記述さ

50

れる抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分を、該哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物における異常な細胞成長を処置するための方法に関する。

【0282】

本発明はまた、薬学的に許容される担体および分裂阻害剤、アルキル化剤、抗代謝剤、インターラーント抗生物質、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素トポイソメラーゼ阻害剤、生物反応改変剤、抗体、細胞障害剤、抗ホルモン、および抗アンドロゲン剤からなる群より選択される抗腫瘍剤と併用して、異常な細胞成長を処置するために有効である量の、本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分を含む、ヒトを含む哺乳動物における異常な細胞成長を処置するための薬学的組成物に関する。

【0283】

本発明はまた、抗増殖剤、キナーゼ阻害剤、血管新生阻害剤、増殖因子阻害剤、cox-I阻害剤、cox-II阻害剤、分裂阻害剤、アルキル化剤、抗代謝剤、インターラート抗生物質、増殖因子阻害剤、放射線、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、生物反応改変剤、抗体、細胞障害剤、抗ホルモン、スタチン、および抗アンドロゲン剤からなる群より選択される抗腫瘍剤と併用して、本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分の治療的有効量を哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物における過増殖障害を処置するための方法にも関する。

【0284】

本発明の1つの態様において、抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分と共に用いられる抗腫瘍剤、および本明細書において記述される薬学的組成物は、抗血管新生物質、キナーゼ阻害剤、汎キナーゼ阻害剤、または増殖因子阻害剤である。好ましい汎キナーゼ阻害剤には、米国特許第6,573,293号(Pfizer, Inc., NY, USA)において記述されるSutent(Pfizer Inc., SU-11248)が含まれる。

【0285】

抗血管新生剤には、EGF阻害剤、EGFR阻害剤、VEGF阻害剤、VEGFR阻害剤、TIE2阻害剤、IGF1R阻害剤、COX-II(シクロオキシゲナーゼII)阻害剤、MMP-2(マトリクス-メタロプロテナーゼ2)阻害剤、およびMMP-9(マトリクスメタロプロテナーゼ9)阻害剤のような物質が含まれるがこれらに限定されるわけではない。好ましいVEGF阻害剤には、たとえば、Genentech, Inc. of South San Francisco, Californiaの抗VEGFモノクローナル抗体である、Avastin(ベバシズマブ)が含まれる。

【0286】

さらなるVEGF阻害剤には、CP-547,632(Pfizer Inc., NY, USA)、アキシチニブ(Pfizer Inc.; AG-013736)、ZD-6474(AstraZeneca)、AEE788(Novartis)、AZD-2171、VEGF Trap(Regeneron/Aventis)、バタラニブ(PTK-787, ZK-222584としても知られる: Novartis & Schering AG)、Macugen(ペガブタニブオクタナトリウム、NX-1838、EYE-001、Pfizer Inc./吉利得/Eyetech)、IM862(Cytran Inc. of Kirkland, Washington, USA); およびアンジオザイム、Ribozyme(Boulder, Colorado)およびChiron(Emeryville, California)からの合成リボザイム、ならびにその組み合わせが含まれる。本発明の実践において有用なVEGF阻害剤は、その双方が目標とされる全てに関してその全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,534,524号および第6,235,764号において開示される。特に好ましいVEGF阻害剤には、CP-547,632、AG13736、バタラニブ、Macugenおよびその組み合わせが含まれる。

【0287】

さらなるVEGF阻害剤は、たとえばその全てのその全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、WO 99/24440(1999年5月20日に公表)、PCT国際出願PCT/IB99/00797(1999年5月3日提出)、WO 95/21613(1995年8月17日に公表)、WO 99/61422(1999年12月2日に公表)、米国特許第6,534,524号(AG13736を開示する)、米国特許第5,834,504号(1998年11月10日公布)、WO 98/50356(1998年11月12日公表)、米国特許第5,883,113号(1999年3月16日に公表)、米国特許第5,886,020号(1999年3月23日に公表)、米国特許第5,792,783号(1998年8月11日公布)、米国特許第6,653,308号(2003年11月25日公布)、WO 99/10349(1999年3月4日に公

10

20

30

40

50

表)、WO 97/32856(1997年9月12日公表)、WO 97/22596(1997年6月26日公表)、WO 98/54093(1998年12月3日公表)、WO 98/02438(1998年1月22日公表)、WO 99/16755(1999年4月8日公表)、およびWO 98/02437(1998年1月22日公表)において記述されている。

#### 【0288】

本発明の抗体またはその抗原結合部分と共に用いてもよい他の抗増殖物質には、以下の米国特許出願：第09/221946号(1998年12月28日提出)；第09/454058号(1999年12月2日提出)；第09/501163号(2000年2月9日提出)；第09/539930号(2000年3月31日提出)；第09/202796号(1997年5月22日提出)；第09/384339号(1999年8月26日提出)；および第09/383755号(1999年8月26日提出)において開示および請求される化合物；ならびに以下の米国特許仮出願：第60/168207(1999年11月30日提出)；第60/170119号(1999年12月10日提出)；第60/177718号(2000年1月21日提出)；第60/168217号(1999年11月30日提出)；および第60/200834号(2000年5月1日提出)において開示および請求される化合物を含む、酵素ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼの阻害剤、受容体チロシンキナーゼPDGFrの阻害剤が含まれる。  
前述の特許出願および特許仮出願はその全内容物が参考により本明細書に組み入れられる。

10

#### 【0289】

さらなるPDGFr阻害剤に関しては、全ての目的に関するその全内容物が参考により本明細書に組み入れられる、2001年7月7日に公表されたWO01/40217および2004年3月11日に公表されたWO2004/020431を参考されたい。好ましいPDGFr阻害剤には、Pfizer's CP-868,596およびその薬学的に許容される塩が含まれる。

20

#### 【0290】

好ましいGARF阻害剤には、PfizerのAG-2037(ペリトレキソールおよびその薬学的に許容される塩)が含まれる。本発明の実践において有用なGARF阻害剤は、その全内容物が全ての目的に関する本明細書に組み入れられる米国特許第5,608,082号において開示されている。

20

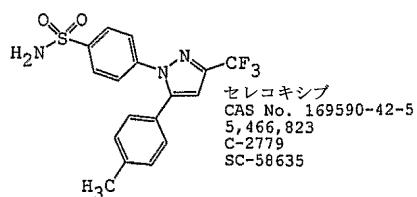
#### 【0291】

本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその結合部分と共に用いることができる有用なCOX-II阻害剤には、CELEBREX(商標)(セレコキシブ)、パレコキシブ、デラコキシブ、ABT-963、MK-663(エトリコキシブ)、COX-189(ルミラコキシブ)、BMS 347070、RS 57067、NS-398、Bextra(バルデコキシブ)、パラコキシブ、Vioxx(ロフェコキシブ)、SD-8381、4-メチル-2-(3,4-ジメチルフェニル)-1-(4-スルファモイル)-1H-ピロール、2-(4-エトキシフェニル)-4-メチル-1-(4-スルファモイルフェニル)-1 H-ピロール、T-614、JTE-522、S-2474、SVT-2016、CT-3、SC-58125およびArcoxia(エトリコキシブ)が含まれる。さらなるCOX-II阻害剤に関しては、その内容物が、全ての目的に関する全内容物が本明細書に組み入れられる米国特許出願第10/801,446号および第10/801,429号を参考されたい。

30

#### 【0292】

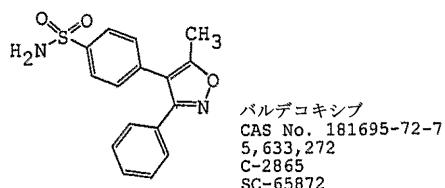
1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、セレコキシブであり、全ての目的に関するその全内容物が参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,466,823号を参考されたい。セレコキシブの構造を以下に示す：



40

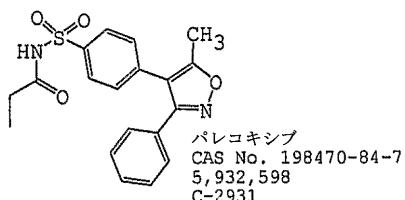
#### 【0293】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、パレコキシブであり、その全内容物が全ての目的に関する参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,633,272号を参考されたい。バルデコキシブの構造を以下に示す：



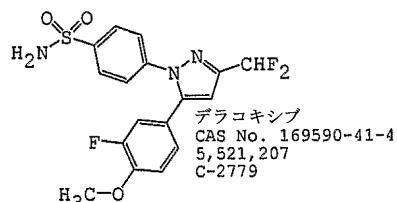
## 【 0 2 9 4 】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、パレコキシブであり、その全内容物が全ての目的に關して參照により本明細書に組み入れられる、米國特許第5,932,598号を參照されたい。パレコキシブの構造を以下に示す：



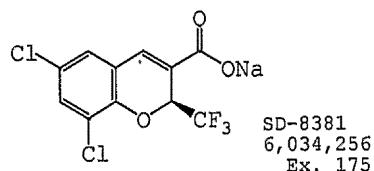
## 【 0 2 9 5 】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、デラコキシブであり、その全内容物が全ての目的に關して參照により本明細書に組み入れられる、米國特許第5,521,207号を參照されたい。デラコキシブの構造を以下に示す：



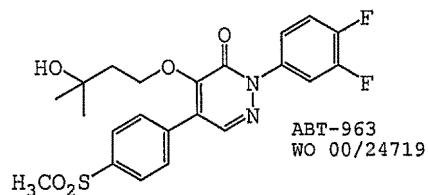
## 【 0 2 9 6 】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、SD-8381であり、その全内容物が全ての目的に關して參照により本明細書に組み入れられる、米國特許第6,034,256号を參照されたい。SD-8381の構造を以下に示す：



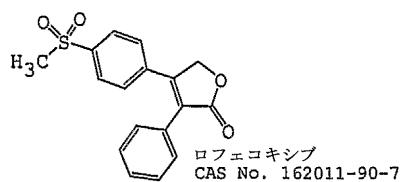
## 【 0 2 9 7 】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、ABT-963であり、その全内容物が全ての目的に關して參照により本明細書に組み入れられる、國際特許出願番号WO 2002/24719を參照されたい。ABT-963の構造を以下に示す：



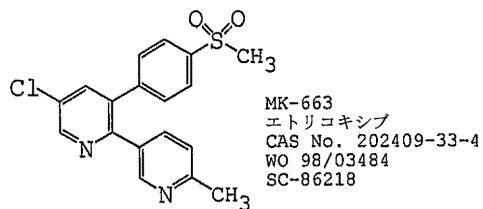
## 【 0 2 9 8 】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は以下に示されるロフェコキシブである：



## 【0299】

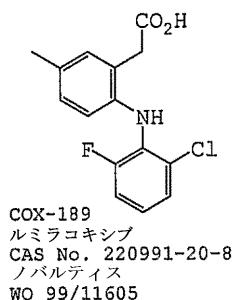
1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、MK-663(エトリコキシブ)であり、その全内容物が全ての目的に関して参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願番号WO 1998/03484を参照されたい。エトリコキシブの構造を以下に示す：



10

## 【0300】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、COX-189(ルミラコキシブ)であり、その全内容物が全ての目的に関して参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願番号WO 1999/11605を参照されたい。ルミラコキシブの構造を以下に示す：



20

## 【0301】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、BMS-347070であり、その全内容物が全ての目的に関して参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,180,651号を参照されたい。BMS-347070の構造を以下に示す：

30

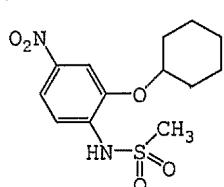


BMS 347070  
CAS No. 197438-48-5  
6,180,651

40

## 【0302】

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質はNS-398 (CAS 123653-11-2)である。NS-398 (CAS 123653-11-2)の構造を以下に示す：

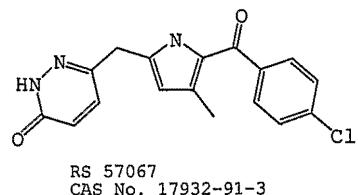


NS-398  
CAS No. 123653-11-2

50

## 【0303】

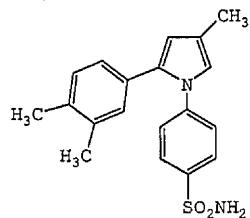
1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、RS 57067 (CAS 17932-91-3)である、RS 57067 (CAS 17932-91-3)の構造を以下に示す：



## 【0304】

10

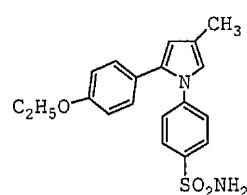
1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、4-メチル-2-(3,4-ジメチルフェニル)-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1H-ピロールである。4-メチル-2-(3,4-ジメチルフェニル)-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1H-ピロールの構造を以下に示す：



## 【0305】

20

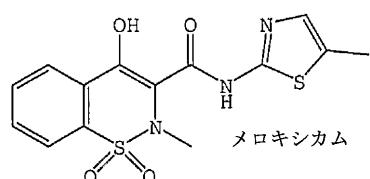
1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質は、2-(4-エトキシフェニル)-4-メチル-1-(4-スルファモイルフェニル)-1H-ピロールである。2-(4-エトキシフェニル)-4-メチル-1-(4-スルファモイルフェニル)-1H-ピロールの構造を以下に示す：



## 【0306】

30

1つの好ましい態様において、抗腫瘍物質はメロキシカムである。メロキシカムの構造を以下に示す：



## 【0307】

本発明の抗体および本明細書において記述される薬学的組成物と共に用いられる抗腫瘍物質として他の有用な阻害剤には、アスピリンが含まれ、プロスタグラランジンを作製する酵素(シクロオキシゲナーゼIおよびII)を阻害して、それによってプロスタグラランジンの低レベルが起こる非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)には、サルサラート(Amigesic)、ジフルニサール(Dolobid)、イブプロフェン(Motrin)、ケトプロフェン(Orudis)、ナブメトン(Relafen)、ピロキシカム(Feldene)、ナプロキセン(Aleve, Naprosyn)、ジクロフェナク(Voltaren)、インドメタシン(Indocin)、サリンダック(Clinoril)、トルメチン(Tolectin)、エトドラック(Lodine)、ケトロラック(Toradol)、オキサプロジン(Daypro)およびその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない。好ましいCOX-I阻害剤には、イブプロフェン(Motrin)、ヌプリン、ナプロキセン(Aleve)、インドメタシン(Indocin)、ナブメトン(Relafen)、およびその組み合わせが含まれる。

40

## 【0308】

50

本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分、および本明細書において記述されるその薬学的に許容される組成物と共に用いられる標的化物質には、Iressa(ゲフィチニブ、AstraZeneca)、Tarceva(エルロチニブまたはOSI-774、OSI Pharmaceuticals Inc.)、Erbitux(セツキシマブ、Imclone Pharmaceuticals, Inc.)、EMD-7200(Merck AG)、ABX-EGF(Amgen Inc.およびAbgenix Inc)、HR3(キューバ政府)、IgA抗体(University of Erlangen-Nuremberg)、TP-38(IVAX)、EGFR融合タンパク質、EGF-ワクチン、抗-EGFr免疫リポソーム(Hermes Biosciences Inc.)およびその組み合わせのようなEGFr阻害剤が含まれる。

#### 【0309】

好ましいEGFr阻害剤には、Iressa、Erbitux、Tarceva、およびその組み合わせが含まれる。 10

#### 【0310】

本発明はまた、CP-724,714(Pfizer, Inc.)、CI-1033(カネルチニブ、Pfizer, Inc.)、Herceptin(トラスツズマブ、Genentech Inc.)、Omitarg(2C4、ペルツズマブ、Genentech Inc.)、TAK-165(Takeda)、GW-572016(ロナファルニブ、GlaxoSmithKline)、GW-282974(GlaxoSmithKline)、EKB-569(Wyeth)、PKI 166(Novartis)、dHER2(HER2ワクチン、Corixa and GlaxoSmithKline)、APC8024(HER2ワクチン、Dendreon)、抗-HER2/neu二重特異的抗体(Decof Cancer Center)、B7.her2.IgG3(Agensys)、AS HER2(Research Institute for Rad Biology & Medicine)、三官能基二重特異的抗体(University of Munich)、ならびにmAB AR-209(Aronex Pharmaceuticals Inc)およびmAB 2B-1(Chiron)のような、汎erb受容体阻害剤 20またはErbB2受容体阻害剤から選択される抗腫瘍物質に関する。好ましいerb選択的抗腫瘍物質には、Herceptin、TAK-165、CP-724,714、ABX-EGF、HER3、およびその組み合わせが含まれる。好ましい汎erbb受容体阻害剤には、GW572016、CI-1033、EKB-569、およびOmitarg、ならびにその組み合わせが含まれる。

#### 【0311】

さらなるerbB2阻害剤には、そのそれぞれの全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、WO 98/02434(1998年1月22日公表)、WO 99/35146(1999年7月15日公表)、WO 99/35132(1999年7月15日公表)、WO 98/02437(1998年1月22日公表)、WO 97/13760(1997年4月17日公表)、WO 95/19970(1995年7月27日公表)、米国特許第5,587,458号(1996年12月24日公布)、および米国特許第5,877,305号(1999年3月2日公布)における阻害剤が含まれる。本発明において有用なさらなるErbB2受容体阻害剤に関しては、そのそれぞれの全内容物が参考により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,465,449号および第6,284,764号、ならびに国際特許出願WO 2001/98277を参照されたい。 30

#### 【0312】

さらに、抗腫瘍物質は以下の物質:Sorafenib(Onyx Pharmaceuticals Inc.; BAY-43-9006)、Genasense(augmerosen, Genta)、Panitumumab(Abgenix/Amgen)、Zevalin(Schering)、Bexxar(Corixa/GlaxoSmithKline)、Abarelix、Alimta、EPO 906(Novartis)、discodermolide(XAA-296)、ABT-510(Abbott)、Neovastat(Aeterna)、enzastaurin(Eli Lilly)、Combrustatin A4P(Oxigene)、ZD-6126(AstraZeneca)、flavopiridol(Aventis)、CYC-202(Cycle)、AVE-8062(Aventis)、DMXAA(Roche/Antisoma)、Thymiqtaq(Eximias)、Temodar(テモゾロミド、Schering Plough)およびRevlimid(Celgene)ならびにその組み合わせから選択されてもよい。 40

#### 【0313】

他の抗腫瘍物質は以下の物質:CyPat(酢酸シプロテロン)、Histerelin(酢酸ヒストリレン)、Plenaxis(アバレリクスデポー剤)、Atrasentan(ABT-627)、Satraplatin(JM-216)、thalomid(サリドマイド)、Theratope、Temilifene(DPPE)、ABI-007(パクリタキセル)、Erista(ラロキシフェン)、Atamestane(Biomed-777)、Xyotax(ポリグルタメートパクリタキセル)、Targetin(ベキサロチン)およびその組み合わせから選択されてもよい。

#### 【0314】

さらに、他の抗腫瘍物質は、以下の物質:Trizaone(チラバザミン)、Aposyn(エキスリ

50

ンド)、Nevastat(AE-941)、Ceplene(塩酸ヒスタミン)、Orathecin(ルビテカン)、Virulizin、Gastrimmune(G17DT)、DX-8951f(メシル酸エキサテカン)、Onconase(ランピルナーゼ)、BEC2(ミツモアブ)、Xcytrin(モテキサフィンガドリニウム)およびその組み合わせから選択されてもよい。

#### 【0315】

さらなる抗腫瘍物質は以下の物質：CeaVac(CEA)、NeuTrexin(グルクロン酸トリメトレセート)およびその組み合わせから選択されてもよい。さらなる抗腫瘍物質は：OvaRex(オレゴボマブ)、Osidem(IDM-1)、およびその組み合わせから選択されてもよい。さらなる抗腫瘍物質は、以下の物質：Advexin(ING 201)、Tirazone(チラバザミン)、およびその組み合わせから選択されてもよい。さらなる抗腫瘍物質は、以下の物質：RSR13(エファプロキシラル)、Cotara(1311 chTNT 1/b)、NBI-3001(IL-4)およびその組み合わせから選択されてもよい。さらなる抗腫瘍物質は、以下の物質：Canvaxin、GMKワクチン、PEG Interon A、Taxoprexin(DHA/パクリタキセル)およびその組み合わせから選択されてもよい。他の好ましい抗腫瘍物質には、PfizerのMEK1/2阻害剤PD325901、Array BiopharmのMEK阻害剤ARRY-142886、Bristol MyersのCDK2阻害剤BMS-387,032、PfizerのCDK阻害剤PD0332991およびAstraZenecaのAXD-5438、ならびにその組み合わせが含まれる。さらに、CCI-779(Wyeth)およびラパマイシン誘導体RAD001(Novartis)およびAP-23573(Ariad)、HDAC阻害剤SAHA(Merck Inc./Aton Pharmaceuticals)のようなmTOR阻害剤も同様に利用してもよい。さらなる抗腫瘍物質には、aurora 2阻害剤VX-680(Vertex)、Chk1/2阻害剤XL844(Exelixis)が含まれる。

10

20

#### 【0316】

以下の細胞障害物質、たとえばエピルビシン(Ellence)、ドセタキセル(Taxotere)、パクリタキセル、Zinecard(デクスラゾキサン)、リツキシマブ(Rituxan)、メシル酸イマチニブ(Gleevec)、およびその組み合わせからなる群より選択される1つまたは複数の物質を、本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分、および本明細書において記述されるその薬学的組成物と併用して用いてもよい。

#### 【0317】

本発明はまた、エキセメスタン(Aromasin、Pfizer Inc.)、リュープロレリン(LupronまたはLeuplin、TAP/Abbott/Takeda)、アナズトロゾール(Arimidex、AstraZeneca)、ゴスレリン(Zoladex、AstraZeneca)、ドキセルカルシフェロール、ファドロゾール、フォルメスタン、クエン酸タモキシフェン(タモキシフェン、Nolvadex、AstraZeneca)、Casodex(AstraZeneca)、Abarelix(Praecis)、Trelstar、およびその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではないホルモン療法と共に本発明の抗体およびその抗原結合部分を用いることを企図する。

30

#### 【0318】

本発明はまた、フルベストラント、トレミフェン、ラロキシフェン、ラソフォキシフェン、レトロゾール(Femara, Novartis)が含まれるがこれらに限定されるわけではない抗エストロゲン、ビカルタミド、フルタミド、ミフェプリストン、ニルタミド、Casodex(登録商標)(4'-シアノ-3-(4-フルオロフェニルスルホニル)-2-ヒドロキシ-2-メチル-3'-(トリフルオロメチル)プロピオニアニリド、ビカルタミド)のような抗アンドロゲン剤、およびその組み合わせのような、ホルモン治療物質にも関する。

40

#### 【0319】

さらに、本発明は、単独で、または1つもしくは複数の補助医療用製剤、たとえばフィルグラスチム(Neupogen)、オンダンセトロン(Zofran)、Fragmin、Procrit、Aloxi、Emend、またはその組み合わせからなる群より選択される製品と併用して本発明の抗体を提供する。

#### 【0320】

特に好ましい細胞障害剤には、Camptosar、Erbitux、Iressa、Gleevec、Taxotere、およびその組み合わせが含まれる。

#### 【0321】

50

以下のトポイソメラーゼI阻害剤：カンプトテシン、塩酸イリノテカン(Camptosar)、エドテカリン、オラテシン(Supergen)、エキサテカン(Daiichi)、BN-80915(Roche)およびその組み合わせを、抗腫瘍物質として利用してもよい。特に好ましいトポイソメラーゼII阻害剤には、エピルビシン(Ellence)が含まれる。

### 【0322】

本発明の抗体は、抗腫瘍物質、アルキル化剤、抗代謝剤、抗生物質、植物由来抗腫瘍物質、カンプトテシン誘導体、チロシンキナーゼ阻害剤、他の抗体、インターフェロン、および/または生物反応変換剤と共に用いてもよい。

### 【0323】

アルキル化剤には、ナイトロジエンマスターD-N-オキシド、シクロホスファミド、イフオスファミド、メルファラン、ブスルファン、ミトプロニトール、カルボコン、チオテパ、ラニムスチン、ニムスチン、テモゾロミド、AMD-473、アルトレタミン、AP-5280、アパジコン、プロスタリシン、ベンダムスチン、カルムスチン、エストラムスチン、フォテムスチン、グルフォスファミド、イフォスファミド、KW-2170、マフォスファミド、およびミトラクトールが含まれるがこれらに限定されるわけではない。白金配位結合アルキル化合物には、シスプラチン、Paraplatin(カルボプラチニン)、エプタプラチニン、ロバプラチニン、ネダプラチニン、Eloxatin(オキサリプラチニン、Sanofi)、またはサトルプラチニンおよびその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない。特に好ましいアルキル化剤には、Eloxatin(オキサリプラチニン)が含まれる。

### 【0324】

抗代謝剤には、メソトレキセート、6-メルカプトプリンリボシド、メルカプトプリン、5-フルオロウラシル(5-FU)を単独でまたはロイコボリンと併用して、テガフル、UFT、ドキシフルリジン、カルモフル、シタラビン、シタラビンオクホスファート、エノシタビン、S-1、Alimta(プレメトレクスドニトリウム、LY231514、MTA)、Gemzar(ゲンシタビン、Eli Lilly)、フルダラビン、5-アザシチジン、カペシタビン、クラドリビン、クロファラビン、デシタビン、エフロルニチン、エチニルシチジン、シトシンアラビノシド、ヒドロキシウレア、TS-1、メルファラン、ネララビン、ノラトレクスド、オクホスファート、プレメトレクスドニトリウム、ペントスタチン、ペリトレキソール、ラルチトレクスド、トリアピン、トリメトレキセート、ビダラビン、ビンクリスチン、ビノレルビン；またはたとえば、N-(5-[N-(3,4-ジヒドロ-2-メチル-4-オキソキナゾリン-6-イルメチル)-N-メチルアミノ]-2-テノイル)-L-グルタミン酸のような、欧州特許出願第239362号において開示される好ましい抗代謝剤の1つ、およびその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

### 【0325】

抗生物質には、アクラルビシン、アクチノマイシンD、アムルビシン、アナマイシン、アドリアマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エルサミトルシン、エピルビシン、ガラルビシン、イダルビシン、マイトマイシンC、ネモルビシン、ネオカルジノスタチン、ペブロマイシン、ピラルビシン、レベッカマイシン、スチマラマー、ストレプトゾシン、バルルビシン、ジノスタチン、およびその組み合わせに限定されない、インターラート抗生物質が含まれる。

### 【0326】

植物由来抗腫瘍物質には、たとえば分裂阻害剤、たとえばビンプラスチン、ドセタキセル(Taxotere)、パクリタキセル、およびその組み合わせから選択される物質が含まれる。

### 【0327】

細胞障害性トポイソメラーゼ阻害物質には、アクラルビシン、アモナフィド、ベロテカニン、カンプトテシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、ジフロモテカニン、塩酸イリノテカン(Camptosar)、エドテカリン、エピルビシン(Ellence)、エトポシド、エキサテカン、ギマテカン、ルルトテカニン、ミトキサントロン、ピラルビシン、ピキサントロン、ルビテカニン、スブゾキサン、SN-38、タフルポシド、トポテカニン、およびその組み合わせから選択される1つまたは複数の物質が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0328】

好ましい細胞障害性トポイソメラーゼ阻害物質には、カンプトテシン、10-ヒドロキカ  
ンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、塩酸イリノテカン(Camptosar)、エドテカリン  
、エピルビシン(Ellence)、エトポシド、SN-38、トポテカン、およびその組み合わせから  
なる群より選択される1つまたは複数の物質が含まれる。

## 【0329】

免疫物質には、インターフェロンおよび多数の他の免疫増強物質が含まれる。インター  
フェロンには、インターフェロン<sub>α</sub>、インターフェロン<sub>-2a</sub>、インターフェロン<sub>-2b</sub>、  
インターフェロン<sub>β</sub>、インターフェロン<sub>-1a</sub>、インターフェロン<sub>-1b</sub>(Actimmune)、また  
はインターフェロン<sub>-n1</sub>およびその組み合わせが含まれる。他の物質には、フィルグ  
ラスチム、レンチナン、シゾフィラン、TheraCys、ウベニメクス、WF-10、アルデスロイ  
キン、アレムツズマブ、BAM-002、ダカルバジン、ダクリズマブ、デニロイキン、ゲムツ  
ズマブ、オゾガミシン、イブリツモマブ、イミキモド、レノグラスチム、レンチナン、黒  
色腫ワクチン(Corixa)、モルグラモスチム、OncoVAX-CL、サルグラモスチム、タソネルミ  
ン、テクロイキン、サイマラシン、トシツモマブ、ビルリジン、Z-100、エプラツズマブ  
、ミツモマブ、オレゴボマブ、ペムツモマブ(Y-muHMG1)、Provenge(Dendreon)、および  
その組み合わせが含まれる。  
10

## 【0330】

生物反応改変剤は、組織細胞の生存、成長、または分化のような、生きている生物の防  
御メカニズムまたは生物学的反応を、抗腫瘍効果を有するように改変する物質である。そ  
のような物質には、クレスチン、レンチナン、シゾフィラン、ピシバニール、ウベニメク  
スおよびその組み合わせが含まれる。  
20

## 【0331】

他の抗癌剤には、アリトレチノイン、アンプリゲン、アトラセンタンベクサロテン、ボ  
ルテゾミブ、Bosentan、カルシトリオール、エキスリンド、フィナステリド、フォテムス  
チム、イバンドロン酸、ミルテフォシン、ミトキサントロン、I-アスパラギナーゼ、プロ  
カルバジン、ダカルバジン、ヒドロキシカルバミド、ペガスパルガーゼ、ペントスタチン  
、タザロトン、Telcyta(TLK-286、Telik Inc.)、Velcade(ボルテマジブ、Millenium)、ト  
レチノインおよびその組み合わせが含まれる。

## 【0332】

他の抗血管新生化合物には、アシトレチン、フェンレチニド、サリドマイド、ゾレドロ  
ン酸、アンジオスタチン、アブリジン、シレンギチド、コンプレスタチンA-4、エンドス  
タチン、ハロフギノン、レビマstatt、レモバブ、Revlimid、スクアラミン、ウクレイ  
ン、Vitaxin、およびその組み合わせが含まれる。  
30

## 【0333】

白金配位結合化合物には、シスプラチニン、カルボプラチニン、ネダプラチニン、オキサリブ  
ラチニン、およびその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

## 【0334】

カンプトテシン誘導体には、カンプトテシン、10-ヒドロキシカンプトテシン、9-アミ  
ノカンプトテシン、イリノテカン、SN-38、エドテカリン、トポテカン、およびそれらの  
組み合わせが含まれるが、これらに制限されない。  
40

## 【0335】

他の抗腫瘍物質には、ミトキサントロン、I-アスパラギナーゼ、プロカルバジン、ダカ  
ルバジン、ヒドロキシカルバミド、ペントスタチン、トレチノイン、およびその組み合わ  
せが含まれる。

## 【0336】

CTLA-4(細胞障害性リンパ球抗原4)抗体のような抗腫瘍免疫応答を増強することができる  
抗腫瘍物質、MDX-010(Medarex)および米国特許第6,682,736号において開示されるCTLA-  
4化合物のようなCTLA-4を遮断することができる他の物質、ならびに他のファルネシルタ  
ンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、たとえばファルネシルタンパク質トランスフェラー  
ー

ゼ阻害剤のような抗増殖物質も同様に利用してもよい。本発明において用いることができるさらに特異的なCTLA-4抗体に関しては、その双方の全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第60/113,647号(1998年12月23日提出)、米国特許第6,682,736号を参照されたい。たとえば、本発明に従って用いることができるもう1つの抗CTLA-4抗体は、米国特許第6,682,736号におけるモノクローナル抗体11.2.1の配列を有するチシリムマップである。

#### 【0337】

本発明において用いることができる特異的IGF1 R抗体に関しては、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願WO2002/053596を参照されたい。

#### 【0338】

本発明において用いることができる特異的CD40抗体に関しては、その全内容物が参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願WO2003/040170を参照されたい。

#### 【0339】

放射線治療に反応してTNF<sub>α</sub>を発現するTNFerade(GeneVec)のような遺伝子治療物質を抗腫瘍物質として用いてよい。

#### 【0340】

本発明の1つの態様において、スタチンは、本明細書において記述される抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分およびその薬学的組成物と共に用いてよい。スタチン(HMG-CoAレダクターゼ阻害剤)は、アトルバスタチン(Lipitor、Pfizer Inc.)、プラバスタチン(Pravachol、Bristol-Myers Squibb)、ロバスタチン(Mevacor、Merck Inc.)、シンバスタチン(Zocor、Merck Inc.)、フルバスタチン(Lescol、Novartis)、セリバスタチン(Baycol、Bay er)、ロスバスタチン(Crestor、AstraZeneca)、ロバスタチンおよびナイアシン(Advicor、Kos Pharmaceuticals)、およびその組み合わせからなる群より選択されてもよい。

#### 【0341】

好みしい態様において、スタチンは、アトルバスタチンおよびロバスタチン、その誘導体および組み合わせからなる群より選択される。

#### 【0342】

抗腫瘍物質として有用な他の物質にはCaduetが含まれる。

#### 【0343】

抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分と少なくとも1つのさらなる治療物質との併用を用いて本明細書において記述される過増殖障害または異常な細胞成長を処置するための任意の方法に関して、抗ALK-1抗体を、さらなる治療物質に共役させる、またはそれによって誘導体化することができる。少なくとも1つのさらなる治療物質はまた、個別に、または非誘導体化もしくは非共役的に投与されうる。少なくとも1つのさらなる治療物質を抗体に誘導体化または共役しない場合、これは抗体と同じ薬学的製剤において投与することができ、または異なる製剤において投与することができる。

#### 【0344】

##### 視力喪失の処置

本発明の化合物およびそれらを含む薬学的組成物は、加齢性黄斑変性および脈絡膜新生血管形成、糖尿病性網膜症、緑内障、色素性網膜炎等のような眼の後方部分に罹患する他の疾患による重度の視力喪失を処置するために有用である。

#### 【0345】

たとえば、本発明の組成物は、眼の後方で薬物デポー剤を形成するために用いてよく、これらには本明細書において記述される1つまたは複数の非活性賦形剤のほかに1つまたは複数の薬学的活性物質が含まれてもよい。本発明の組成物において有用な薬学的活性物質の例には、抗生物質、抗ウイルス剤、および抗真菌剤が含まれるがこれらに限定されるわけではない抗感染物質；抗アレルギー剤および肥満細胞安定化剤；ステロイドおよび非ステロイド性抗炎症薬(ネバフェナクのような)；Cox IおよびCox II阻害剤が含まれるがこれらに限定されるわけではないシクロオキシゲナーゼ阻害剤；抗感染剤および抗炎症剤の併用；うつ血除去剤；アドレナリン作動薬、-アドレナリン遮断剤、-アドレナリン

10

20

30

40

50

アゴニスト、副交感神経模倣薬、コリンエステラーゼ阻害剤、炭酸脱水素酵素阻害剤、およびプロスタグランジンが含まれるがこれらに限定されるわけではない抗緑内障剤；抗緑内障剤の併用；抗酸化剤；栄養補助剤；非ステロイド性抗炎症剤が含まれるがこれらに限定されるわけではない類囊胞黄斑水腫の処置のための薬剤；VEGF受容体であるタンパク質キナーゼ受容体を含む、タンパク質キナーゼ受容体を阻害する血管新生阻害剤を含む、血管新生阻害剤が含まれるがこれらに限定されるわけではない、非滲出性(乾燥型)および滲出性(湿潤型)AMDを含む加齢性黄斑変性(AMD)を処置するための薬剤；栄養補助剤、ヘルペス感染症およびCMV眼感染症を処置するための薬剤；抗代謝剤およびフィブリソ溶解剤が含まれるがこれらに限定されるわけではない増殖性硝子体網膜症を処置するための薬剤；増殖因子が含まれるがこれらに限定されるわけではない創傷調節物質；抗代謝剤；エリプロジルが含まれるがこれらに限定されるわけではない神經保護剤；ならびに非滲出性(乾燥型)および滲出性(湿潤型)AMDを含む加齢性黄斑変性(AMD)、脈絡膜新生血管形成、網膜症、網膜炎、ブドウ膜炎、黄斑水腫、および緑内障が含まれるがこれらに限定されるわけではない後方セグメント26の疾患または状態を処置するための止血性ステロイド、が含まれる。そのような止血性ステロイドに関するさらなる情報に関しては、米国特許第5,679,666号および第5,770,592号を参照されたい。類囊胞黄斑水腫を処置するための非ステロイド性抗炎症剤はネバフェナクである。

## 【0346】

眼に投与するために、本発明の化合物は、たとえば前眼房、後眼房、硝子体、房水、硝子液、角膜、虹彩／毛様体、水晶体、脈絡膜／網膜および強膜を含む眼の角膜および／または強膜および内部領域に浸透できるように十分な期間、化合物が眼の表面に接触して維持されるように、薬学的に許容される眼科用媒体において送達される。薬学的に許容される眼科用媒体は、軟膏、植物油、または封入材料であってもよい。本発明の化合物はまた、硝子体または房水に直接注入してもよい。

## 【0347】

さらに、化合物は、テノン下および／または結膜下注射のような、周知の許容される方法によって投与されてもよい。眼科の技術分野において周知であるように、黄斑は、主に網膜錐体を含み、網膜における最大の視力領域である。テノン囊またはテノン膜は強膜の上に配置される。結膜は後方眼球の短い領域を辺縁部(球状結膜)まで覆い、上眼瞼および下眼瞼の内部領域をそれぞれ覆うように上に(上部盲囊)または下(下部盲囊)に折りたたまれる。結膜はテノン囊の上部に配置される。強膜およびテノン囊は、眼球の外部表面を定義する。非滲出性(乾燥型)および滲出性(湿潤型)AMDを含む加齢性黄斑変性(AMD)、脈絡膜新生血管形成、網膜症(糖尿病性網膜症、未熟児網膜症のような)、糖尿病性黄斑水腫、網膜炎、ブドウ膜炎、類囊胞黄斑水腫(CME)、緑内障および眼の後方セグメントの他の疾患または状態のような眼科疾患の処置に関して、強膜の外表面でテノン囊の下に眼科的に許容される薬学的活性物質の特異的な量のデポー剤を直接配置することが好ましい。さらに、非滲出性(乾燥型)および滲出性(湿潤型)AMDおよびCMEを含む加齢性黄斑変性(AMD)の場合、強膜の外表面、テノン囊の下、および一般的に黄斑の上にデポー剤を直接配置することが最も好ましい。

## 【0348】

化合物は、デポー調節物として製剤化されてもよい。そのような長時間作用型の製剤は、埋め込み(たとえば、皮下または筋肉内)、筋肉内注射、または上記のテノン下または硝子体内注射によって投与してもよい。または、活性成分は適した溶媒、たとえば滅菌の発熱物質を含まない水によって使用前に溶解するための粉末剤形であってもよい。

## 【0349】

本発明の特に好ましい態様において、化合物は、生理食塩液(眼科用調製物において一般的に用いられる任意の保存剤および抗菌剤と併用して)において局所投与するために調製されて、点眼液の剤形で投与されてもよい。溶液または懸濁液は、その純粋な剤形で調製されて、1日数回投与されてもよい。または、先のように調製した本発明の組成物を、角膜に直接投与してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0350】

好ましい態様において、組成物は、角膜に結合する粘膜接着性のポリマーと共に調製される。このように、たとえば組成物は適したポリマーもしくは疎水性材料(たとえば、許容される油における乳剤)またはイオン交換樹脂と共に、または溶解度の低い誘導体として、たとえば溶解度の低い塩として製剤化されてもよい。

## 【0351】

疎水性化合物の薬学的担体は、ベンジルアルコール、非極性界面活性剤、水混和性の有機ポリマー、および水相を含む共溶媒系である。共溶媒系は、VPD共溶媒系であってもよい。VPDは3%w/vベンジルアルコール、8%w/v非極性界面活性剤ポリソルベート80、および65%w/vポリエチレングリコール300の、無水メタノールで容積を調節した溶液である。  
VPD共溶媒系(VPD : 5W)は、5%デキストロース水溶液において1:1に希釈したVPDを含む。この共溶媒系は、疎水性化合物を良好に溶解して、それ自身、全身投与の際に生じる毒性は低い。本来、共溶媒系の比率は、その溶解度および毒性特徴を破壊しなければ、かなり変化させてもよい。さらに、共溶媒成分の同一性は変化させてもよい;たとえば、他の毒性の低い非極性界面活性剤をポリソルベート80の代わりに用いてもよい;ポリエチレングリコールの分画サイズは変化してもよい;他の生体適合性ポリマー、たとえばポリビニルピロリドンをポリエチレングリコールの代わりに用いてもよい;および他の糖または多糖類をデキストロースの代わりに用いてもよい。

## 【0352】

または、疎水性薬学的化合物に関する他の送達系を用いてもよい。リポソームおよび乳剤は疎水性薬物の送達媒体または担体の公知の例である。ジメチルスルホキシドのような特定の有機溶媒も同様に用いてもよいが、通常、毒性がより大きいという犠牲を払う。さらに、化合物は、治療物質を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスのような徐放系を用いて送達してもよい。様々な徐放性材料が確立されており、当業者において公知である。徐放性カプセルは、その化学的特性に応じて、数週間から100日より長くまで化合物を放出する。治療物質の化学特性および生物学的安定性に応じて、タンパク質安定化のためのさらなる戦略を用いてもよい。

## 【0353】

薬学的組成物はまた、適した固体もしくはゲル相担体または賦形剤を含んでもよい。そのような担体または賦形剤には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、糖、デンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのようなポリマーが含まれる。

## 【0354】

任意の組成物を個体に投与するために製剤化してもよい。本発明の個体は好ましくは哺乳動物であり、またはより好ましくはヒトである。

## 【0355】

本明細書において記述される薬学的製剤にはさらに、以下からなる群より選択される治療物質が含まれる:抗新生物剤、抗炎症剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗血管新生剤、および抗血管心製剤。そのような物質の例を本明細書において開示する。

## 【0356】

たとえば、抗新生物剤は、塩酸アコダゾール;アクロニン;アドゼレシン;アルデスロイキン;アルトレタミン;アンボマイシン;酢酸アメタントロン;アミノグルテチミド;アムサクリン;アナストロゾール;アントラマイシン;アスピラギナーゼ;アスペルリン;アザシチジン;アゼテバ;バチマスタッフ;ベンゾデバ;ビカルタミド;塩酸ビサントレン;ニメシル酸ビスナフィド;ビゼレシン;硫酸ブレオマイシン;ブレキナルナトリウム;プロピリミン;ブルファン;カクチノマイシン;カルステロン;カラセミド;カルベチメル;カルボプラチン;カルムスチン;塩酸カルビシン;カルゼレシン;セデフィンゴル;クロラムブシリ;シロルマイシン;シスプラチン;クラドリビン;メシル酸クリスナトール;シクロホスファミド;シタラビン;ダカルバジン;ダクチノマイシン;塩酸ダウノルビシン;デシタビン;デキソルマプラチン;デザグアニン;メシル酸デザグアニン

10

20

30

40

50

; ジアジコン ; ドセタキセル ; ドキソルビシン ; 塩酸ドキソルビシン ; ドロロキシフェン ; クエン酸ドロロキシフェン ; プロピオン酸ドロモスタノロン ; デュアゾマイシン ; エダトレキセート ; 塩酸エフロルニチン ; エルサミトルシン ; エンロプラチン ; エンプロメート ; エピプロピジン ; 塩酸エビルビシン ; エルブロゾール ; 塩酸エソルビシン ; エストラムスチン ; リン酸エストラムスチンナトリウム ; エタニダゾール ; エチオダイズド油 1 131 ; エトボシド ; リン酸エトボシド ; エトプリン ; 塩酸ファドロゾール ; ファザラビン ; フェンレチニド ; フロクスウリジン ; リン酸フルダラビン ; フルオロウラシル ; フルオロシタビン ; フオスキドン ; フォストリエシンナトリウム ; ゲンシタビン ; 塩酸ゲンシタビン ; 金Au 198 ; ヒドロキシウレア ; 塩酸イダルビシン ; イフォスファミド ; イモフォシン ; インターフェロン -2a ; インターフェロン -2b ; インターフェロン -n1 ; インターフェロン -n3 ; インターフェロン -1a ; インターフェロン -1b ; イプロプラチン ; 塩酸イリノテカン ; 酢酸ランレオチド ; レトロゾール ; 酢酸リュープロリド ; 塩酸リアロゾール ; ロメトレキソールナトリウム ; ロムスチン ; 塩酸ロソキサントロン ; マソプロコール ; メイタンシン ; 塩酸メクロレタミン ; 酢酸メgestroール ; 酢酸メレンゲストロール ; メルファラン ; メノガリル ; メルカプトプリン ; メソトレキセート ; メソトレキセートナトリウム ; メトプリン ; メツレデパ ; ミチンドミド ; ミトカルシン ; ミトクロミン ; ミトギリン ; ミトマルシン ; マイトマイシン ; マイトスパー ; ミトタン ; 塩酸ミトキサントロン ; ミコフェノール酸 ; ノコダゾール ; ノガラマイシン ; オルマプラチン ; オキシスラン ; パクリタキセル ; ペガスパルガーゼ ; ペリオマイシン ; ペンタムスチン ; 硫酸ペプロマイシン ; ペルフォスファミド ; ピポプロマン ; ピポスルファン ; 塩酸ピロキサントロン ; プリカマイシン ; プロメスタン ; ポルフィマーナトリウム ; ポルフィロマイシン ; ブレドニムスチン ; 塩酸プロカルバジン ; ピューロマイシン ; 塩酸ピューロマイシン ; ピラゾフリン ; リボプリン ; ログレチミド ; サフィンゴール ; 塩酸サフィンゴール ; セムスチン ; シムトラゼン ; スバルフォセートナトリウム ; スバルソマイシン1 ; 塩酸スピロゲルマニウム ; スピロムスチン ; スピロプラチン ; ストレプトニグリン ; ストレプトゾシン ; 塩化ストロンチウムSr 89 ; スロフェヌール ; タリソマイシン ; タキサン ; タキソイド ; テコガランナトリウム ; テガフル ; 塩酸テロキサントロン ; テモボルфин ; テニボシド ; テロキシリコン ; テストラクトン ; チアミプリン ; チオグアニン ; チオテパ ; チアゾフリソル ; チラバザミン ; 塩酸トポテカン ; クエン酸トレミフェン ; 酢酸トレストロン ; リン酸トリシリビン ; トリメトレキセート ; グルクロン酸トリメトレキセート ; トリプトレリン ; 塩酸ツブロゾール ; ウラシルマスター ; ウレデパ ; バブレオチド ; ベルテポルфин ; 硫酸ビンプラスチン ; 硫酸ビンクリスチン ; ビンデシン ; 硫酸ビンデシン ; 硫酸ビネビジン ; 硫酸ビングリシネット ; 硫酸ビンリューロシン ; 酒石酸ビノレルビン ; 硫酸ビンロシジン ; 硫酸ビンゾリジン ; ボロゾール ; ゼニプラチン ; ジノスタチン ; 塩酸ゾルビシンからなる群より選択されてもよい。

【 0 3 5 7 】

抗血管新生物質は、本明細書において開示されている、または当技術分野において公知であるか否かによらず、血管新生を阻害する任意の物質である。好ましい態様において、抗血管新生物質は、Macugen(商標)(Eyetech, New York, NY)または抗VEGF抗体のような抗VEGF物質である。

【 0 3 5 8 】

薬学的組成物は、1つまたは複数の適した担体、賦形剤、および希釈剤を用いて標準的な技術によって製剤化することができる。たとえば、Remington's Pharmaceutical Sciences(19<sup>th</sup> Ed. Williams & Wilkins, 1995)(全ての目的に関して参照により本明細書に組み入れられる)を参照されたい。

[ 0 3 5 9 ]

非経口投与にとって適した製剤には、意図されるレシピエントの血液と等張である水性および非水性製剤、ならびに化合物を血液成分または1つもしくは複数の臓器に標的化するように設計された懸濁系が含まれてもよい水性および非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量または多用量密封容器において、たとえばアンプルまたはバイアルにおい

て示されてもよい。眼内製剤の場合、保存剤が製剤に含まれないことから、単位用量が好みしい。他の非経口製剤に関しては、保存剤を用いてもよく、それによって多用量容器が可能となるであろう。

#### 【0360】

即時調製注射溶液および懸濁液は、たとえば滅菌粉末から調製してもよい。非経口および静脈内剤形にも同様に、選択される注射のタイプまたは送達系に対してそれらを適合性にする無機質および他の材料が含まれてもよい。

#### 【0361】

本発明によって企図される特定の非経口投与には、眼内および眼の硝子体内投与が含まれる。眼内および硝子体内投与のための薬学的製剤には、タンパク質安定化剤として、マンニトールまたはソルビトールのような賦形剤を含む、または含まない、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)および平衡等張塩溶液(BSS)が含まれる。10

#### 【0362】

一般的に、水、適した油、生理食塩液、水性デキストロース(グルコース)、または関連する糖溶液およびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールは、非経口投与にとって適した担体である。非経口投与のための溶液は、好ましくは活性成分の水溶性の塩、適した安定化剤、および必要であれば、緩衝物質を含む。亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、またはアスコルビン酸のような抗酸化剤は、単独または併用して、適した安定化剤である。同様にそのクエン酸塩、またはEDTAナトリウムも用いられる。さらに、非経口溶液は、塩化ベンザルコニウム、メチルもしくはプロピルパラベン、またはクロロブタノールのような保存剤を含んでもよい。適した薬学的担体は、前記で引用したRemingtonにおいて記述されている。20

#### 【0363】

本明細書における任意の態様において、本明細書における組成物または約学的製剤は凍結乾燥されてもよい。

#### 【0364】

本明細書に記載の任意の態様において、薬学的製剤は、治療物質1 mgあたり好ましくは約1未満、より好ましくは約5未満、より好ましくは約3未満、またはより好ましくは約1エンドトキシン単位未満を有する。

#### 【0365】

いくつかの態様において、本明細書に開示の処置法にはさらに、抗新生物質、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗菌剤、血管新生剤、または抗血管新生剤からなる群より選択される1つまたは複数の治療物質を、血管新生状態に苦しむ個体に投与する段階が含まれる。30

#### 【0366】

そのような併用処置は、さらなる治療物質と共に本明細書に記述の組成物の同時処方を個体に投与することによって、または異なる2つの薬学的製剤として本明細書に記述の組成物および治療物質を投与することによって、得ることができる。1つより多い組成物/治療物質を個体に投与する態様において、双方の活性物質の相乗効果の結果として、組成物および/または治療物質の低用量を利用してもよい。

#### 【0367】

個体に投与されてもよい抗新生物質には、アクラルビシン；塩酸アコダゾール；アクロニン；アドゼレシン；アルデスロイキン；アルトレタミン；アンボマイシン；酢酸アメタントロン；アミノグルテチミド；アムサクリン；アナストロゾール；アントラマイシン；アスペラギナーゼ；アスペルリン；アザシチジン；アゼテパ；アゾトマイシン；バチマstattt；ベンゾデパ；ビカルタミド；塩酸ビサントレン；ニメシル酸ビスナフィド；ビゼレシン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナルナトリウム；プロピリミン；ブルファン；カクチノマイシン；カルステロン；カラセミド；カルベチメル；カルボプラチン；カルムスチン；塩酸カルビシン；カルゼレシン；セデフィンゴル；クロラムブシリ；シロルマイシン；シスプラチン；クラドリビン；メシル酸クリスナトール；シクロホスファミド；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；デシタビン；デキソ4050

ルマプラチン；デザグアニン；メシル酸デザグアニン；ジアジコン；ドセタキセル；ドキソルビシン；塩酸ドキソルビシン；ドロロキシフェン；クエン酸ドロロキシフェン；プロピオン酸ドロモスタノロン；デュアゾマイシン；エダトレキセート；塩酸エフロルニチン；エルサミトルシン；エンロプラチン；エンプロメート；エピプロピジン；塩酸エピルビシン；エルブロゾール；塩酸エソルビシン；エストラムスチン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；エチオダイズド油I 131；エトポシド；リン酸エトポシド；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンレチニド；フロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルオロシタビン；フォスキドン；フォストリエシンナトリウム；ゲンシタビン；塩酸ゲンシタビン；金Au 198；ヒドロキシウレア；塩酸イダルビシン；イフォスファミド；イモフォシン；インターフェロン -2a；インターフェロン -2b；インターフェロン -n1；インターフェロン -n3；インターフェロン -1a；インターフェロン -1b；イプロプラチン；塩酸イリノテカン；酢酸ランレオチド；レトロゾール；酢酸リュープロリド；塩酸リアロゾール；ロメトレキソールナトリウム；ロムスチン；塩酸ロソキサントロン；マソプロコール；メイタンシン；塩酸メクロレタミン；酢酸メゲストロール；酢酸メレンゲストロール；メルファラン；メノガリル；メルカプトプリン；メソトレキセート；メソトレキセートナトリウム；メトプリン；メツレデパ；ミチンドミド；ミトカルシン；ミトクロミン；ミトギリン；ミトマルシン；マイトイシン；マイトスパー；ミトタン；塩酸ミトキサントロン；ミコフェノール酸；ノコダゾール；ノガラマイシン；オルマプラチン；オキシスラン；パクリタキセル；ペガスバルガーゼ；ペリオマイシン；ペナタムスチン；硫酸ペプロマイシン；ペルフォスファミド；ピポブロマン；ピポスルファン；塩酸ピロキサントロン；ブリカマイシン；プロメスタン；ポルフィミーナトリウム；ポルフィロマイシン；プレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ピューロマイシン；塩酸ピューロマイシン；ピラゾフリン；リボプリン；ログレチミド；サフィングール；塩酸サフィングール；セムスチン；シムトラゼン；スバルフォセートナトリウム；スバルソマイシン1；塩酸スピロゲルマニウム；スピロムスチン；スピロプラチン；ストレプトニグリン；ストレプトゾシン；塩化ストロンチウムSr 89；スロフェヌール；タリソマイシン；タキサン；タキソイド；テコガランナトリウム；テガフル；塩酸テロキサントロン；テモポルフィン；テニポシド；テロキシロン；テストラクトン；チアミプリン；チオグアニン；チオテパ；チアゾフリン；チラバザミン；塩酸トポテカン；クエン酸トレミフェン；酢酸トレストロン；リン酸トリシリビン；トリメトレキセート；グルクロン酸トリメトレキセート；トリプトレリン；塩酸ツプロゾール；ウラシルマスター；ウレデパ；バブレオチド；ベルテポルフィン；硫酸ビンプラスチン；硫酸ビンクリスチン；ビンデシン；硫酸ビンデシン；硫酸ビネピジン；硫酸ビングリシネット；硫酸ビンリューロシン；酒石酸ビノレルビン；硫酸ビンロシジン；硫酸ビンゾリジン；ボロゾール；ゼニブラチン；ジノスタチン；塩酸ゾルビシンが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

### 【0368】

個体に投与してもよい抗菌剤には、ペニシリン、アミノグリコシド、マクロライド、モノバクタム、リファマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、イミペネム、フシジン酸、ノボビオシン、 fosfomycin、フシジン酸ナトリウム、ネオマイシン、ポリミキシン、カブレオマイシン、コリスチメート、コリスチン、グラミシジン、ミノサイクリン、ドキシサイクリン、バノマイシン、バシトラシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、およびセファロスボリンが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

### 【0369】

個体に投与してもよい抗炎症剤には、NSAIDs(たとえば、アスピリン(サリチルアミド)、サリチルアミドナトリウム、インドプロフェン、インドメタシン、インドメタシンナトリウム三水和物、Bayer(商標)、Bufferin(商標)、Celebrex(商標)、ジクロフェナク、Eco-trin(商標)、ジフルニサル、フェノプロフェン、ナプロキセン、サリンダック、Vioxx(商標)、コルチコステロイド、またはコルチコトロピン(ACTH)、コルヒチン、および酢酸アネコルタブが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

10

20

30

40

50

## 【0370】

個体に投与してもよい抗ウイルス剤には、 -メチル-P-アダマンタンメチルアミン、1-D-リボフラノシル-1,2,4-トリアゾール-3カルボキサミド、9-[2-ヒドロキシ-エトキシ]メチルグアニン、アダマンタナミン、5-ヨード-2'-デオキシリジン、トリフルオロチミジン、インターフェロン、アデニンアラビノシド、CD4、3'-アジド-3'-デオキシチミジン(AZT)、9-(2-ヒドロキシエトキシメチル)-グアニン(アシクロビル)、ホスホノギ酸、1-アダマンタナミン、ペプチドT、および2',3'ジデオキシシチジンが含まれるがこれらに限定されるわけではない。

## 【0371】

本発明の組成物のインピボでの標的細胞への投与は、当業者に周知の任意の多様な技術を用いて行うことができる。 10

## 【0372】

たとえば、本発明の組成物は、通常の薬学的に許容される担体、アジュバント、および媒体を含む、単位投与製剤において当技術分野において公知の任意の手段(たとえば、経口、眼内、静脈内(i.v.)、皮内、筋肉内、経皮、粘膜内、腸内、非経口、吸入噴霧、直腸内、または局所)によって全身または局所投与することができる。

## 【0373】

本明細書において用いられるように、眼内という用語には、硝子体内、網膜下等が含まれる。

## 【0374】

本明細書において用いられるように、本明細書において用いられる非経口という用語には、皮下、静脈内、筋肉内、槽内、注入技術、または腹腔内が含まれる。薬物の直腸投与のための坐剤は、通常の温度では固体であるが直腸温では液体であり、したがって直腸内で融解して薬物を放出するカカオバター、およびポリエチレングリコールのような適した非刺激性の賦形剤と薬物とを混合することによって調製することができる。 20

## 【0375】

本発明の組成物によって障害または疾患を処置するための投与レジメは、患者の疾患のタイプ、年齢、体重、性別、医学状態、疾患の重症度、投与経路、および用いる特定の化合物を含む多様な要因に基づく。このように、投与レジメは広く異なりうるが、標準的な方法を用いてルーチンで決定することができる。 30

## 【0376】

全身投与の場合、本発明の抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分および/または1つまたは複数のさらなる治療物質は、好ましくは少なくとも0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10、20、30、40、50、75、100、または150 mg/kgの用量で投与される。他の態様において、本明細書において記述されるポリペプチド(好ましくは二量体またはホモ二量体)、および/または低分子は、0.1~100 mg/kg、より好ましくは0.5~50 mg/kg、より好ましくは1~30 mg/kg体重、またはより好ましくは5~20 mg/kg体重で全身投与される。

## 【0377】

局所投与の場合、本発明の抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分および/または1つまたは複数のさらなる治療物質は、好ましくは少なくとも50 μg、100 μg、150 μg、200 μg、250 μg、300 μg、350 μg、400 μg、450 μg、500 μg、550 μg、600 μg、650 μg、または700 μgの用量で投与される。他の態様において、本明細書に記述のポリペプチド(好ましくは二量体またはホモ二量体)および/または低分子は、50~1000 μg、より好ましくは100~800 μg、より好ましくは200~500 μg、またはより好ましくは300~400 μg/部位の用量で局所投与される。 40

## 【0378】

たとえば、皮膚投与の場合、本発明の抗ALK-1抗体またはその抗原結合部分および/またはペプチド模倣体および/または1つまたは複数のさらなる治療物質は、50~1000 μg/cm<sup>2</sup>、より好ましくは100~800 μg/cm<sup>2</sup>、またはより好ましくは200~500 μg/cm<sup>2</sup>の用量

で投与される。眼内投与に関するもう1つの例において、本発明のポリペプチドおよび／またはペプチド模倣体および／または低分子は、50～1000 μg/眼、より好ましくは100～800 μg/眼、またはより好ましくは200～500 μg/眼の用量で投与される。

#### 【0379】

薬学的組成物には、好ましくは有効量の、すなわち治療効果または予防効果を得るために有効な量の活性成分(たとえば抗ALK-1抗体)が含まれる。特定の応用に関して有効な実際の量は、処置される状態および投与経路に依存するであろう。有効量の決定は、特に本明細書の開示に照らして、当業者の能力の範囲内である。

#### 【0380】

好ましくは、活性成分、たとえば抗ALK-1抗体の有効量は、患者の体重1 kgあたり活性物質約0.0001 mg～約500 mgであり、より好ましくは患者の体重1 kgあたり活性物質約0.01mg～約250 mgであり、さらにより好ましくは患者の体重1 kgあたり活性物質約0.01mg～約100 mgであり、なおさらにより好ましくは患者の体重1 kgあたり活性物質約0.5mg～約50 mgであり、最も好ましくは患者の体重1 kgあたり活性物質約1 mg～約15 mgである。

#### 【0381】

重量百分率に関して、本発明の製剤は、好ましくは活性成分、たとえば抗ALK-1抗体を約0.0001～約10重量%、より好ましくは約0.001～約1重量%、より好ましくは約0.05～約1重量%、またはより好ましくは約0.1～約0.5重量%の量で含むであろう。

#### 【0382】

##### 遺伝子治療

本発明の抗体および抗体部分をコードする核酸分子は、それを必要とする患者に遺伝子治療によって投与することができる。治療はインビボまたはエクスピボのいずれかであってもよい。好ましい態様において、重鎖および軽鎖の双方をコードする核酸分子を患者に投与する。より好ましい態様において、核酸分子は、B細胞が抗体を産生するために特殊化されていることから、それらがB細胞の染色体に安定に組み入れられるように投与される。好ましい態様において、前駆体B細胞をエクスピボでトランスフェクトまたは感染させて、それを必要とする患者に再度移植する。もう1つの態様において、前駆体B細胞または他の細胞を、関心対象となる細胞タイプに感染することが知られているウイルスを用いてインビボで感染させる。遺伝子治療のために用いられる典型的なベクターには、リボソーム、プラスミド、およびウイルスベクターが含まれる。例としてのウイルスベクターはレトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスである。インビボまたはエクスピボのいずれかで感染後、処置患者からの試料を採取して、当技術分野において公知または本明細書において考察される任意のイムノアッセイを用いて、抗体発現レベルをモニターすることができる。

#### 【0383】

好ましい態様において、遺伝子治療法は、抗ALK-1抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードする単離核酸分子を投与する段階、および核酸分子を発現させる段階を含む。もう1つの態様において、遺伝子治療法は、抗ALK-1抗体の軽鎖またはその抗原結合部分をコードする単離核酸分子を投与する段階および核酸分子を発現させる段階を含む。より好ましい方法において、遺伝子治療法は、本発明の抗ALK-1抗体の重鎖またはその抗原結合部分をコードする単離核酸分子、および軽鎖またはその抗原結合部分をコードする単離核酸分子を投与する段階、ならびに核酸分子を発現させる段階を含む。遺伝子治療法はまた、併用治療と結びつけて先に考察した任意の物質のようなもう1つの治療物質を投与する段階を含んでもよい。

#### 【0384】

##### ALK-1アンタゴニストまたはアゴニストをスクリーニングする方法

1つの態様において、本発明は、実施例12において記述されるId1のTaqmanアッセイのような、物質がALK-1の下流の特異的標的遺伝子、Id1のアップレギュレーションを阻害するか否かを決定するための方法を提供する。方法は、Id1を発現する細胞の試料を物質に接触させる段階、およびId1発現が阻害されるか否かを決定する段階を含み、対照細胞試料

10

20

30

40

50

と比較して物質に接触させた細胞試料におけるId1発現のレベルが低減すれば、該物質がId1発現を阻害することが示される。1つの特異的態様において、物質は、ALK-1の細胞外ドメインに結合する抗体である。もう1つの態様において、物質は低分子である。本発明に従って、細胞は、実施例12において記述されるHUVECsのようにALK-1およびId1の双方を固有に発現することができ、またはこれらの1つもしくは双方をコードするDNAによって形質転換もしくはトランスフェクトされている。たとえば実施例12において記述されるId1に関するTaqmanアッセイを用いることによってId1の発現を決定することができる。

## 【0385】

逆に、活性化物質またはアゴニストを同様に、同じタイプの技法に従って試験する、または利用することができる。

10

## 【0386】

本発明がよりよく理解されるために、以下の実施例を述べる。これらの実施例は、説明目的に限られ、本発明の方法をいかなるようにも制限すると解釈されない。

## 【0387】

実施例

以下の実施例および調製物において、「MW」は、分子量を意味する；「His-Tag」は、ニッケルキレート樹脂による迅速な精製および抗His(C-末端)抗体による検出のためのC-末端ポリヒスチジン(6×His)タグを意味する；「BSA」は、ウシ血清アルブミンを意味する；「EDTA」はエチレンジアミン四酢酸を意味する；「DMSO」はジメチルスルホキシドを意味する；「MOPS」は、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸を意味する；「MES」は、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸を意味する；「PBS」はリン酸緩衝生理食塩液を意味する；「dPBS」はダルベッコリン酸緩衝生理食塩液を意味する；「HEMA」は、2-ヒドロキシ-エチルメタクリレートを意味する；「DMEM」はダルベッコ改变イーグル培地を意味する；「FBS」は、ウシ胎児血清を意味する；「NEAA」は非必須アミノ酸を意味する；「HEPES」は、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸を意味する；および「DMF」は、ジメチルホルムアミドを意味する。

20

## 【0388】

実施例1. ALK-1免疫原調製物

ALK-1のECDを、フォワード

5'-ACGGCCCAGCCGGCCGACCCTGTGAAGCCGTCT (SEQ ID NO: 96)

30

およびリバース

5'-ACTAAGCTTTAATGATGATGATGATGCTGCCATCTGTTCCCG (SEQ ID NO: 97)

プライマーを用いるPCRによって、完全長のヒトALK-1 ORFクローン(Invitrogen、クローンID 1OH21048)からクローニングした。PCR産物を精製して、SfiIおよびHindIII制限酵素によって処置して、哺乳動物発現ベクターpSecTag2/Hygro(Invitrogen Inc、カタログ番号V910-20)のSfiI/HindIII部位にクローニングした。クローンを用いて、Fugene 6トランスフェクション試薬(Roche Applied Science、カタログ番号1814443)によって製造元の説明書に従って293T細胞に一過性にトランスフェクトさせた。分泌された標的タンパク質を含む細胞培養からの上清を、トランスフェクション後72時間目に採取して、Ni-NTA樹脂(QIAGEN、カタログ番号30430)に4℃で終夜結合させた。次に、樹脂を20 mMトリスpH 8.0、25 mMイミダゾール、および300 mM塩化ナトリウムを含む緩衝液によって洗浄した。His-Tagタンパク質を、20 mMトリスpH 8.0、300 mMイミダゾール、および300 mM塩化ナトリウムを含む緩衝液を用いて樹脂から溶出させた。CMセファロース陽イオン交換樹脂を用いて、20 mMリン酸ナトリウム(pH 7.0)においてタンパク質をさらに精製して、標的タンパク質を含む未結合分画を採取した。タンパク質を透析によってPBSまたは10 mM HEPES、pH7.4プラス150 mM塩化ナトリウムに緩衝液交換して、0.2~1 mg/mlに濃縮して、クーマシープルーによって染色したSDS PAGEゲルによって判断すると、最終純度は>90%であった。ALK-1 ECD His-Tagタンパク質は、タンパク質の理論的分子量11 kDaと比較すると、見かけ

40

50

の分子量26 kDaとなり、強くグリコシル化された。ALK-1 ECD His-Tagタンパク質(SEQ ID NO: 98)は、実施例2において記述されるように、抗ALK-1抗体を產生するハイブリドーマの生成のために用いられている。ヒトALK-1 ECD His-Tagタンパク質：遺伝子配列(小文字の部分は分泌シグナルである)：

```
atggagacagacacactcctgctatggtaactgctgctgggtccagggtccactggtgacgcggcccccagccggccGACCCTGTGAAGC  
CGTCTCGGGGCCGCTGGTGACCTGCACGTGTGAGAGCCCACATTGCAAGGGGCCTACCTGCCGG  
GGGGCCTGGTGCACAGTAGTGCTGGTGCAGGGAGGGAGGGAGGCACCCCCAGGAACATCGGGCT  
GCGGGAACTTGCACAGGGAGCTCTGCAGGGGCCACCGAGTTCGTCAACCAACTACTGCTGC  
GACAGCCACCTCTGCAACCACAACGTGTCCCTGGTGCAGGGCCACCCAACCTCCTCGGAGCAG  
CCGGGAACAGATGGCCAGCATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO: 99)
```

10

タンパク質配列：

DPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHPQEHRGCGNLHRELCRGRPTEFVNHY  
CCDSHLCHNHNVSLVLEATQPPSEQPGTDGQHHHHH (SEQ ID NO: 98)

### 【 0 3 8 9 】

#### 実施例2．抗ALK-1抗体を產生するハイブリドーマの生成

8～10週齢のXENOMOUSE(登録商標)マウスを、組換え型ヒトALK-1/Fcキメラ(R&D Systems, Inc.、カタログ番号370-AL)または実施例1において記述されるALK-1 ECD His-Tagタンパク質のいずれかによって10 μg/マウスでその後足に免疫した。この用量を3～5週間の間に5～7回繰り返した。融合の3または4日前に、マウスにPBSにおいて免疫原の最終注射を行った。免疫したマウスからのリンパ節リンパ球を、電気的細胞融合によって非分泌性の骨髄腫P3-X63-Ag8.653細胞株(ATCCカタログ番号CRL 1580)に融合させ、これらの融合細胞を既に記述されているようにHA-DMEM選択に供した(DMEM/15% FBS/1% 200 mM L-グルタミン/1% 100 × 非必須アミノ酸/1% 100 × Pen/Strep/10 U/ml IL-6/1バイアル/L OPI培地添加剤プラス0.5 × HA(アザセリン-ヒポキサンチン、Sigma、カタログ番号A9666))。ALK-1特異的ヒトIgG2抗体を全て分泌するハイブリドーマのパネルを回収した。

20

### 【 0 3 9 0 】

ELISAアッセイを用いて、抗体結合を検出した。免疫原を96ウェルイムロンマイクロタイプレート(NUNC-Immuno(商標)プレートMaxiSorp(商標)表面、Nalge Nunc International、カタログ番号439454)に50 mM重炭酸緩衝液において4 μg/mlで4 ℓで終夜コーティングした。プレートを洗浄した後、0.1% Tween-20および0.5% ウシ血清アルブミンを加えたPBSによってブロックした。ブロックしたELISAプレートに抗体を加えて、1時間インキュベートし、Tween-20を含むPBSによって洗浄した。抗ヒトIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Pierce、カタログ番号31420)の後にABTS(Pierce、カタログ番号37615)を加えることによって結合を検出した。比色測定はマイクロプレートリーダー(SpectraMax Plus 384, Molecular Devices)において405 nmで行った。

30

### 【 0 3 9 1 】

ハイブリドーマ25個をさらなる試験のために選択した。これらは、限界希釈によって単細胞クローニングされ、1.11.1；1.12.1；1.12.1(rWT)；1.12.1(M291/D19A)；1.12.1(M291)；1.12.1(D19A)；1.13.1；1.14.1；1.151.1；1.162.1；1.183.1；1.27.1；1.29.1；1.31.1；1.8.1；1.9.1；4.10.1；4.24.1；4.38.1；4.58.1；4.62.1；4.68.1；4.72.1；5.13.1；5.34.1；5.53.1；5.56.1；5.57.1；および5.59.1と命名された。

40

### 【 0 3 9 2 】

マウスハイブリドーマ細胞株LN 15916(ハイブリドーマ1.12.1)を、ブダペスト条約に従って、2005年6月21日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209に寄託した。ハイブリドーマ1.12.1は、以下のアクセション番号：PTA-6808を割付された。

### 【 0 3 9 3 】

#### 実施例3．抗ALK-1抗体の配列

50

本発明に従って產生された抗体の構造を分析するために、抗ALK-1モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマから重鎖および軽鎖断片をコードする核酸をクローニングした。クローニングおよびシークエンシングは標準的な手段によって行った。

【0394】

ALK-1抗体のそれぞれに関してハイブリドーマ細胞約 $2 \times 10^5$ 個からFast-Track(商標)キット(Invitrogen)を用いてポリ(A)<sup>+</sup>mRNAを単離した。ランダムプライマーを用いてmRNAからcDNAを合成した。ランダムプライミングしたcDNAを、フレームワーク領域(FRs)および相補性決定領域(CDRs)を全て含む抗体可変領域を増幅するために、ヒトC2定常領域またはC定常領域に対して特異的なプライマーと共に、ヒトV<sub>H</sub>またはヒトV<sub>K</sub>ファミリー特異的可変ドメインプライマーを用いてPCRによって増幅した。PCR産物の双方の鎖の直接シークエンシングによって、抗ALK-1產生ハイブリドーマからヒト重鎖および軽鎖転写物をコードする核酸配列を得た。Abgenix所有のソフトウェアならびにヒトV<sub>H</sub>およびV<sub>K</sub>遺伝子に関する公共入手可能な配列情報「V BASE配列ディレクトリ」(Tomlinson et al., MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK)を用いて配列を分析した。MacVectorおよびGeneworksソフトウェアプログラムを用いて、当業者は、公共入手可能な配列アラインメントを用いて同一の結果を得ることができた。

【0395】

具体的には、完全長のALK-1抗体1.12.1を以下のように発現ベクターにクローニングした：ポリ(A)<sup>+</sup>mRNAをRNeasyミニキット(Qiagen)を用いて単離して、オリゴ(dT)プライミングを用いてAdvantage RT-for-PCRキット(BD Biosciences)によってcDNAをmRNAから合成した。クローン1.12.1に関するオリゴ(dT)プライミングcDNAを、表2に記載するプライマーを用いて増幅した。増幅は、Pfu Ultraポリメラーゼ(Stratagene)およびPTC-200 DNA Engine(MJ Research)を用いて以下のようにサイクリングすることによって得た：95'で3'、(95'で20''、52'で30''、72'で1'20'')を25回、72'で10'。Grills 16<sup>th</sup> BDTv3.1/dGTP chemistry(Applied Biosystems Inc)および3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems Inc)を用いて、クローンの配列を確認した。1.12.1 V<sub>H</sub>のクローニングプロセスにおいて、第8コドンにサイレント変異を導入して、「GGC」を「GGT」に変換した。配列は全て、「V BASE配列ディレクトリ」(Tomlinson, et al., J. Mol. Biol., 227, 776-798 (1992); Hum. Mol. Genet., 3, 853-860 (1994); EMBO J., 14, 4628-4638 (1995))に対するアラインメントによって分析した。

【0396】

(表2) 完全長の1.12.1をクローニングするために用いた重鎖および軽鎖増幅プライマ

プライマーの名称	プライマーの配列	SEQ ID NO
4-61	5' tcttcaaggatgtatcttagaaggccgccaccATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCC 3'	105
G1/2_FL_R	5' ttctctgatcagaattcctaCTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGC 3'	106
A11	5' tcttcaaggccggagccgccaccATGGAAACCCCAGCGCAGCTT 3'	107
K_FL_R	5' ttcttgatcagaattctcaCTAACACTCTCCCTGTTGAAGCTTTG 3'	108

非ハイブリダイズ塩基を小文字で示す。

【0397】

実施例4. 遺伝子利用分析およびCDR分析

抗体の核酸配列および予想アミノ酸配列から、各抗体鎖に関する遺伝子の利用を同定した。表3は、本発明に従う抗体の選択されたハイブリドーマクローンの遺伝子利用を述べる。

【0398】

(表3) 重鎖および軽鎖遺伝子利用

クローン	重鎖生殖系列				$\kappa$ 軽鎖生殖系列		
	SEQ ID NO:	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>	SEQ ID NO:	V <sub>K</sub>	J <sub>K</sub>
1.11.1	9	3-33	6-19	JH3B	11	L1	JK4
1.12.1	103	4-31	6-19	JH4B	126	A27	JK5
1.13.1	13	4-61	6-19	JH4B	15	A27	JK5
1.14.1	17	4-61	6-19	JH4B	19	A27	JK5
1.151.1	21	4-31	3-3	JH3B	23	B3	JK1
1.162.1	25	4-31		JH3B	27	A27	JK5
1.183.1	29	4-59	6-19	JH4B	31	L2	JK3
1.31.1		4-31	6-19	JH4B		A27	JK5
1.8.1	33	4-31	3-3	JH3B	35	B3	JK1
1.9.1	37	3-11	3-22	JH6B	39	A2	JK1
4.10.1	41	3-15	3-22	JH4B	43	A3	JK4
4.24.1	45	4-31	5-12	JH6B	47	A27	JK5
4.38.1	49	4-31	4-23	JH4B	51	B3	JK1
4.58.1	53	4-31	4-23	JH4B	55	A27	JK5
4.62.1	57	4-31	5-12	JH6B	59	A27	JK5
4.68.1	61	4-31	2-2	JH5B	63	A27	JK5
4.72.1	65	4-31	5-12	JH6B	67	A27	JK5
5.13.1	69	4-31		JH3B	71	A27	JK4
5.34.1	73	4-31		JH6B	75	A1	JK1
5.53.1	77	3-15	1-1	JH4B	79	B2	JK4
5.56.1	81	3-11	6-19	JH6B	83	A2	JK1
5.57.1	85	3-11	3-10	JH6B	87	A2	JK1
5.59.1	89	3-11	6-6	JH6B	91	A2	JK1

## 【0399】

クローン1.12.1のV<sub>H</sub>(M29I)およびV<sub>K</sub>(D19A)領域における変異誘発を、表4において記載されるプライマーおよびQuickChangeキット(Stratagene)によって製造元の説明書に従つて行った。変異した変種の配列を確認して、標準的な技法によって発現ベクターにクローニングした。

## 【0400】

(表4) 変異原性オリゴヌクレオチド(配列5'から3')

プライマー	センス	アンチセンス
1.12.1(D19A)	CTCCAGGGAAAGAG <u>C</u> CACCCCTCTCCTGTAGG (SEQ ID NO: 109)	CCTACAGGAGAGGGTG <u>G</u> CTCTTCCCCTGGAG (SEQ ID NO: 110)
1.12.1(M29I)	GGTGGCTCCAT <u>C</u> AGCAGTGGTGAATACTAC (SEQ ID NO: 111)	GTAGTATTCAACC <u>T</u> GCT <u>G</u> ATGGAGGCCACC (SEQ ID NO: 112)

変異を太字および下線で示す。

## 【0401】

1.12.1(M29I/D19A)抗体の重鎖の可変ドメイン(SEQ ID NO: 5)および可変ドメイン軽鎖(SEQ ID NO: 7)をコードする核酸分子を、ブダペスト条約に従つて2005年7月14日にAmerican Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-22

10

20

30

40

50

09に寄託した。寄託物は以下のアクセッショ番号を割付された：プラスミドpCR2.1 TOP 0 1.12.1 V<sub>H</sub> (M29I) : UC 25502を含む大腸菌DH5 に関してATCC No. PTA-6864；およびプラスミドpCR2.1 TOPO 1.12.1 V<sub>K</sub> (D19A) : UC 25503を含む大腸菌DH5 に関してATCC No. PTA-6865。

#### 【0402】

多くの抗ALK-1特異的ヒト抗体が、重鎖可変ドメインのCDR1において共通のパターンを示した。これらのリード分子は、4-31または4-61重鎖V-遺伝子セグメントを利用する。これらの抗体重鎖に対応するFR1およびCDR1配列を、生殖系列配列に対して整列させて表4Aに示す。アライメントにおける破線は、生殖系列と同一の残基を指す。全ての場合において、CDR1の末端のGYYWS(SEQ ID NO: 136)パターンは体細胞変異を受けて、新しい配列パターンを生じ、それによってG残基は酸性の残基(DまたはE)に変化し、最後のS残基は例12個中9個においてNに変化する。V<sub>H</sub>の他の領域における配列多様性は、これらがVHのCDR1の末端で同じ配列パターンに至る独立した体細胞変異事象である可能性があることを示している。

#### 【0403】

(表4A) ALK-1抗体重鎖配列パターン

クローン	V-遺伝子	D-遺伝子	J-遺伝子	FR1	CDR1	
生殖系列						
5.34.1	VH4-31	-- NA --	JH6B	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO: 122)	GGSISSGGYWS (SEQ ID NO: 123)	
4.58.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	-----D---N	20
4.38.1	VH4-31	D4-23	JH4B	-----	-----D-----	
5.13.1	VH4-31	-- NA --	JH3B	-----	-----D---N	
1.162.1	VH4-31	-- NA --	JH3B	-----I---	-----E----	
4.72.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----E----	
4.24.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----ND---N	
4.62.1	VH4-31	D5-12	JH6B	-----	-----D---N	
1.31.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	-----D---N	
1.12.1	VH4-31	D6-19	JH4B	-----	---M---E---N	
生殖系列						
1.13.1	VH4-61	D6-19	JH4B	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO: 124)	GGSVSSGGYWS (SEQ ID NO: 125)	
1.14.1	VH4-61	D6-19	JH4B	--H-----	-----D---N	30
				-----	-----D---N	

#### 【0404】

##### 実施例5.1.12.1 Fab分子の調製

1.12.1(M29I/D19A)のFab断片を、パパインを用いて1.12.1(M29I/D19A) IgG1を消化することによって調製した。プロテインA精製完全長1.12.1(M29I/D19A) IgG1を、30 mMリン酸ナトリウム(pH 7.0)、2 mMシステインを含む緩衝液において、パパイン(VWR)と共に1:50の比率(パパイン:タンパク質)で37℃で2~3時間インキュベートした。消化混合物をプロテインAミニカラムに適用して、非消化完全長タンパク質およびFc断片を除去した。非結合Fabをフロースルーフィルターに適用して回収した。サイズ排除カラム(Superdex 200, Amersham Pharmacia Biotech)を用いてFabタンパク質をさらに精製して、緩衝液をPBSに交換した。タンパク質溶液をDetoxiゲル(PIERCE)およびVivapure Mini Qイオン交換カラム(VivaScience)の中に適用することによって、エンドトキシンを除去した。タンパク質を、0.2 μmシリングフィルターによって濾過して、エンドトキシンレベルをLAL発熱物質キット(Cambrex)によって試験した。最終精製タンパク質は濃度2~3 mg/mlであり、エンドトキシンレベルは<0.1 EU/mgであり、純度は>95%であった。1.12.1(M29I/D19A)Fab断片は、エレクトロスプレー質量分析によって示されるように、非還元状態で分子量47,347を有する。エドマンN-末端シーケンシング分析により、軽鎖N-末端配列EIVLTQSPG(SEQ ID NO: 113)、および重鎖配列QVQLQESG(SEQ ID NO: 114)がそれぞれ、確認された。

#### 【0405】

##### 実施例6.BIACORE(商標)を用いる表面プラズモン共鳴(SPR)による完全なヒト抗ALK-1モノ

10

20

30

40

50

### クローナル抗体の結合力値の決定

BIACORE(商標)3000機器を用いる表面プラズモン共鳴による精製抗ALK-1抗体の結合力測定は、製造元のプロトコールを用いて以下のように行った。

#### 【0406】

速度論分析を行うために、組換え型ヒトALK-1/Fc融合タンパク質(hALK-1/Fc)およびカニクイザルALK-1/Fc融合タンパク質(cALK-1/Fc)を、ルーチンのアミンカップリングを用いてCM5 BIACoreセンサーチップの異なるフローセルにおいて固定した。固定緩衝液として10 mM酢酸緩衝液pH 5.0を用いて表面を調製して、hALK-1/FcおよびcALK-1/Fc融合タンパク質に関してそれぞれ、300および150 RUのタンパク質密度を得た。1 M塩酸エタノールアミン、pH 8.5を用いて非反応N-ヒドロキシスクシニドエステルの脱活性化を行った。  
10 実施緩衝液における抗体試料を0.125~2 nM(実施緩衝液のみを含む0 nM溶液をゼロ参照として含めた)の範囲の濃度で調製した。試料を無作為化して、実施緩衝液としてHBS-EP(10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20)を用いて、フローセル4個全てに対してそれぞれ1試料あたり2個ずつ10分間注入した。On-rateは1~100 μL/分の流速とは無関係であることが観察され、質量輸送の制限を示していない。流速25 μL/分を、結合力値を決定するために用いた。抗体の解離を10分間モニターして、100 mM H<sub>3</sub>P  
O<sub>4</sub>(25 μL/分)の12秒間注入によって表面を再生した。未加工データをScrubber((著作権)BioLogic Software)ソフトウェアパッケージを用いて処理して、CLAMP((著作権)BioLogic Software)ソフトウェアパッケージを用いて分析した。1つの表面からの多数のデータセット、一度に6個のデータセットを、共通の多様なRmax値を利用して単純な1:1ラングミュア結合モデルに同時に全体的に適合させた。表5は、本発明の代表的な抗ALK-1抗体に関する結合力の値を示す。紹介したデータは、本発明に従って調製された抗体が、ヒトALK-1に関する高い親和性および強い結合定数を保有することを示している。  
20

#### 【0407】

(表5) 表面プラズモン共鳴(BIACore)による結合力値の決定

クローン	hALK-1/Fc 結合力(pM)	hALK-1/Fc $k_{off}$ (1/s)	cALK-1/Fc 結合力 (pM)
1.12.1(M29I/D19A)	<6.8	$<5.0 \times 10^{-6}$	27
1.14.2	76	$5.6 \times 10^{-5}$	280
1.27.3	2.9	$1.9 \times 10^{-5}$	60
1.31.1	<13	$<5.0 \times 10^{-6}$	150
1.162.1	18	$1.1 \times 10^{-5}$	62
1.183.2	220	$3.1 \times 10^{-5}$	1800
4.24.2	70	$4.4 \times 10^{-5}$	430
4.38.1	100	$4.0 \times 10^{-5}$	150
4.58.2	40	$1.6 \times 10^{-5}$	130
4.62.1	9.6	$7.6 \times 10^{-6}$	19
4.68.2	86	$3.8 \times 10^{-5}$	320
4.72.2	73	$3.4 \times 10^{-5}$	280
5.13.3	91	$6.3 \times 10^{-5}$	190

#### 【0408】

1.12.1(M29I/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.1 2.1変種を指す(重鎖の29位でのメチオニンがイソロイシンによって置換され、軽鎖の19位のアスパラギン酸がアラニンに置換される)。

#### 【0409】

10

20

30

40

50

実施例7. BIACORE(商標)を用いる表面プラズモン共鳴(SPR)による完全なヒト抗ALK-1モノクローナル抗体1.12.1の変種の親和性定数( $K_D$ )の決定

BIACORE(商標)3000機器を用いる表面プラズモン共鳴による精製抗ALK-1抗体の親和性測定を、製造元のプロトコールを用いて以下のように行った。

【0410】

速度論分析を行うために、完全なヒト抗ALK-1モノクローナル抗体1.12.1の変種を、アミノカッピングを用いてCM5バイオセンサーチップのデキストラン層に固定した。固定緩衝液として10 mM酢酸緩衝液pH 5.0を用いて表面を調製して、3500 ~ 4800 RUのタンパク質密度を得た。1 M塩酸エタノールアミン、pH 8.5を用いて非反応N-ヒドロキシスクシニミドエステルの脱活性化を行った。実施緩衝液における単量体ALK-ECD試料を2.63 ~ 640 nM(実施緩衝液のみを含む0 nM溶液をゼロ参照として含めた)の範囲の濃度で調製した。試料を無作為化して、実施緩衝液としてHBS-EP(10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20)を用いて4つ全てのフローセルに対して各2分間注入した。親和性定数を決定するために流速25  $\mu$ L/分を用いた。単量体ALK-ECDの解離を10分間モニターして、100 mM  $H_3PO_4$ (25  $\mu$ L/分)の12秒間注入によって表面を再生した。未加工データをScrubber((著作権)BioLogic Software)ソフトウェアパッケージを用いて処理して、CLAMP((著作権)BioLogic Software)ソフトウェアパッケージを用いて分析した。データを、単純な1:1ラングミュア結合モデルに全体的に適合させた。表6は、本発明のヒト抗ALK-1モノクローナル抗体1.12.1の変種に関する親和性測定を記載する。

【0411】

(表6) 表面プラズモン共鳴(BIAcore)によるmAb 1.12.1変種の親和性定数 $K_D$ の決定

抗体	オンレート ( $M^{-1} s^{-1}$ )	オフレート ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
1.12.1	$1.9 \times 10^3$	$7.4 \times 10^{-5}$	39
1.12.1(rWT)	$2.2 \times 10^3$	$5.8 \times 10^{-5}$	26
1.12.1(D19A)	$2.6 \times 10^3$	$4.4 \times 10^{-5}$	17
1.12.1(M29I)	$2.4 \times 10^3$	$9.1 \times 10^{-5}$	38
1.12.1(M29I/D19A) (1)*	$2.2 \times 10^3$	$9.5 \times 10^{-5}$	43
1.12.1(M29I/D19A) (2)*	$2.3 \times 10^3$	$8.4 \times 10^{-5}$	37

\* 1.12.1(M29I/D19A) (1)および(2)に関する2つの親和性定数は、異なる2つの表面を用いて得た。

【0412】

1.12.1は、ハイブリドーマから単離されたmAb 1.12.1変種を指す。

【0413】

1.12.1(rWT)は、組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0414】

1.12.1(M29I)は、重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換された特異的な1つのアミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0415】

1.12.1(D19A)は、軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換された特異的な1つのアミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0416】

1.12.1(M29I/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異(重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換され、軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換される)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

【0417】

実施例8. BIACORE(商標)を用いる表面プラズモン共鳴(SPR)による代表的な完全なヒト抗ALK-1モノクローナル抗体の親和性定数( $K_D$ )の決定

10

20

30

40

50

BIACORE(商標)3000機器を用いる表面プラズモン共鳴による精製抗ALK-1抗体の親和性測定( $K_D$ および $k_{off}$ )を、製造元のプロトコールを用いて以下のように実施した。

#### 【0418】

速度論分析を行うために、アフィニティ精製mAbを、アミノカップリングを用いてCM5バイオセンサーチップのデキストラン層に固定した。固定緩衝液として10 mM酢酸緩衝液pH 5.0を用いて表面を調製して、200～400 RUのタンパク質密度を得た。1 M塩酸エタノールアミン、pH 8.5を用いて非反応N-ヒドロキシスクシニミドエステルの脱活性化を行った。実施緩衝液における単量体ALK-ECD試料を3.125～400 nM(実施緩衝液のみを含む0 nM溶液をゼロ参照として含めた)の範囲の濃度で調製した。試料を無作為化して、実施緩衝液としてHBS-EP(10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005%Surfactant P20)を用いて4つ全てのフローセルに1試料あたり2個ずつ各2分間注入した。On-rateは、1～100  $\mu$ L/分の流速とは無関係であることが観察され、質量輸送限界を示さなかった。親和性定数を決定するために流速25  $\mu$ L/分を用いた。単量体ALK-ECDの解離を10分間モニターして、100 mM  $H_3PO_4$ (25  $\mu$ L/分)の12秒間注入によって表面を再生した。未加工データをScrubber((著作権)BioLogic Software)ソフトウェアパッケージを用いて処理して、CLAMP((著作権)BioLogic Software)ソフトウェアパッケージを用いて分析した。データを、単純な1:1ラグミュア結合モデルに全体的に適合させた。表7は、本発明の代表的な抗ALK-1抗体の親和性測定を記載する。

#### 【0419】

(表7)表面プラズモン共鳴(BIAcore)による代表的なモノクローナル抗体に関する親和性定数 $K_D$ の決定

mAb	オンレート( $M^{-1} s^{-1}$ )	オフレート( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
1.12.1(M29I/D19A)	$3.3 \times 10^4$	$8.2 \times 10^{-4}$	25
1.31.1	$3.2 \times 10^4$	$1.9 \times 10^{-4}$	6.0
4.72.1	$3.2 \times 10^4$	$2.5 \times 10^{-5}$	0.8
Fab 1.12.1(M29I/D19A)	$3.8 \times 10^4$	$8.2 \times 10^{-4}$	22

#### 【0420】

実施例8におけるデータを作成するために用いた単量体ALK-ECDは、実施例7におけるデータを作成するために用いた調製物とは異なる調製物であった。

#### 【0421】

1.12.1(M29I/D19A)は、上記の2つの特異的アミノ酸変異(軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換され、重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換される)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

#### 【0422】

Fab 1.12.1(M29I/D19A)は、パパインを用いて1.12.1(M29I/D19A) IgG1を消化することによって調製されたmAb 1.12.1(M29I/D19A)のFab断片を指す。

#### 【0423】

#### 実施例9. 抗ALK-1抗体のエピトープ選択性の同定

BIACORE(商標)3000機器(Biacore International AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を用いて製造元のプロトコールに従って、交叉競合実験を行った。

#### 【0424】

組換え型ヒトALK-1/FCキメラをアミノカップリングを用いてCM5バイオセンサーチップのデキストラン層に固定した。固定緩衝液として10 mM酢酸緩衝液pH 5.0を用いてチップを調製して、940 RUのタンパク質密度を得た。1 M塩酸エタノールアミン、pH 8.5を用いて非反応N-ヒドロキシスクシニミドエステルの脱活性化を行った。

#### 【0425】

精製mAbを、HBS-EP実施緩衝液(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005 %ポリソルベート20)において50 nMの濃度に希釈した。一次抗体を選択して、流速10  $\mu$ L/

10

20

30

40

50

分で600秒間フローセルに注入した。注入が完了した後、二次抗体を選択して、流速10 μL/分で600秒間同じフローセルに注入した。100 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(25 μL/分)の12秒間注入によってセンサー表面を再生した。

#### 【 0 4 2 6 】

再生後、一次抗体を再度10 μL/分の速度でフローセルに600秒間注入した。注入が完了した後、異なる二次抗体を選択して同じフローセルに10 μL/分の速度で600秒間注入した。抗体14個の完全なパネルを二次抗体として用いた後、新しい一次抗体を選択して、新しい一次抗体に関して技法を繰り返した。一次および二次抗体の起こりうる全ての組み合わせがフローセルに注入されるまでこれらの技法を行った。双方の抗体を注入後に観察された総反応が、起こりうる双方の閾値に関して観察された値を超えた場合、二次抗体の結合が起こったと見なされた。閾値は、一次抗体および二次抗体の双方と同じ抗体を用いて決定された。表8において示されるように、結合が観察されたか否かに基づいて反応行列を作成し、-は二次抗体の結合がないことを示し、xは結合が観察されたことを示す(反応が個々の抗体に関する閾値より大きかった)。同じ反応性パターンを示すクローニングのグループ分けによって、1つのBINに1.11.1が存在し、他の全ての抗体が他のBINに存在する、異なる2つのエピトープBINを生じる。

#### 【 0 4 2 7 】

(表8) BIACoreエピトープビニング反応マトリクス

一次 mAb	二次 mAb													
	1.9.1	1.11.1	1.12.1(M29I/D19A)	1.27.3	1.31.1	1.162.1	1.183.2	4.24.2	4.38.1	4.58.2	4.62.1	4.68.2	4.72	5.
1.9.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.11.1	x	-	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1.12.1(M29I/D19A)	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.27.3	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.31.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.162.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.183.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.24.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.38.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.58.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.62.1	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.68.2	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.72	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.13	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 【 0 4 2 8 】

##### 実施例10. カニクイザルALK-1遺伝子の単離

カニクイザル(「Cyno」)ALK-1遺伝子をCyno肺組織から抽出した。ヒトALK-1に関して公表された遺伝子配列(Genebank記録L17075)に基づいて、完全長のカニクイザルALK-1をPCR増幅するためにプライマーを設計した。mRNA精製キット(Ambion、カタログ番号1915)を用いて、製造元の説明書に従って凍結切除したカニクイザル肺組織(約1 g)からmRNAを調製した。遺伝子特異的オリゴ:

5'-AGCGGGCCCAGAGGGACC**TG** (Seq ID NO: 115) (フォワード) および 5'-CAGAAAGGAATCAGGTGCTCCTGGG**CTA** (Seq ID NO: 116) (リバース)

を利用するOneStep RT-PCRキット(Qiagen、カタログ番号210210)を用いてアニール温度61度、mRNA 200 ngを逆転写してPCR増幅した。適当な大きさ(~1.5 Kb)のRT-PCR産物を切除して電気泳動後の0.9%アガロースゲルから精製した後、TOPO-TAをpCR4-TOPOベクター(

10

20

30

40

50

Invitrogen、カタログ番号K4575-01)にクローニングした。インサートをシークエンシングして、カニクイザルALK-1のORFスクレオチド配列を得た。スクレオチドおよび予想翻訳アミノ酸配列をそれぞれ、SEQ ID NO: 93および94に示す。遺伝子の細胞質部分はCynoとヒトの間で同一のタンパク質配列をコードするが、細胞外ドメイン(ECD、22~118位を含む)においてアミノ酸5個の差、およびタンパク質の膜貫通ドメインにおいてアミノ酸1個の差を認める。ヒトおよびCynoのECD配列同一性は94.8%である。ヒトおよび靈長類ECDのアライメントを図2に示す。

【0429】

プライマー対

(フォワード: 5'- GATTATGGCCTTGGGCTCCCCCAGGAAA (Seq ID NO: 117) および 10

リバース: 5'- GGGCTATTGAATCACTTTAGGCTCTGGACTGTTG) (Seq ID NO: 118)

を用いて完全長のカニクイザルALK-1遺伝子をPCR増幅した。

【0430】

実施例11. 細胞表面結合特徴の決定およびフローサイトメトリー(FACS)による靈長類の交叉ハイブリダイゼーション

フローサイトメトリー(FACS)を用いる抗ALK-1結合親和性を試験するために用いることができるALK-1過剰発現細胞株を生成するために、完全長のヒト、Cyno、およびラットALK-1遺伝子をInvitrogen(カタログ番号K6510-20)のpcDNA5/FRT/To TOP0ベクターにクローニングして、293 F1p-In T-Rex宿主細胞(Invitrogen、カタログ番号R780-07)にそれぞれトランスクレクトした。ヒグロマイシンを用いて選択を行い、最終的に安定な細胞株を得た。それぞれの完全長ALK-1タンパク質の過剰発現は、37 /5%CO<sub>2</sub>で24時間のテトラサイクリン(2 μg/ml)誘導によって得た。 20

【0431】

ALK-1タンパク質を過剰発現する293安定細胞を用いて、抗ALK-1 mAbを、FACSアッセイを用いて細胞表面ALK-1に対するその結合親和性に関して試験した。細胞をトリプシン-EDTAによって剥離させ、冷PBS-SAによって洗浄した。96ウェルプレートに加えた後、細胞を血清によってブロックして、異なる濃度の特異的mAbと共に4 °Cで1時間インキュベートした。その後、細胞を洗浄して、R-PE蛍光体を共役した抗ヒト 二次抗体と共にインキュベートした後、FACSCaliburフローサイトメーター(BD Biosciences)を用いて分析した。ゲートを適用する前に各試料に関して事象10,000個を採取した。表9において示されるように、各試料のヒストグラムの幾何学平均をmAb濃度の関数としてプロットして、二状態平衡モデルに適合させた後各mAbに関してK<sub>D</sub>を計算した。同等のヒトおよび靈長類FACS実験の例を図3に示す。 30

【0432】

(表9) FACSによって測定した細胞表面ヒトまたはカニクイザルALK-1に対する抗ALK-1モノクローナル抗体の平均結合親和性(K<sub>D</sub>)の結果

抗体	$K_D$ (nM)	
	ヒト	カニクイザル
1.12.1	6.7	2.0
1.27.1	3.7	2.2
1.162.1	5.6	3.0
4.38.1	9.3	3.4
4.58.1	14.0	6.7
4.72.1	6.4	3.8
5.13.1	3.2	1.6
1.31.1	3.2	1.7
4.24.1	7.6	3.1
4.62.1	2.3	0.78
4.68.1	8.4	9.0

10

## 【0433】

さらに、1.12.1は、FACSアッセイによって、ラットに対して非常に限られた交叉を有する( $K_D > 100$  nM)ことが示され、ラット/ヒトおよびマウス/ヒトALK-1の間でそれぞれ、74%および68%というECD配列同一性を考慮すると、マウスに対して非常に低い交叉を有すると予想される。

20

## 【0434】

FACSアッセイを同様に用いて組換え型1.12.1 mAb変種の $K_D$ を決定した。表10において示されるように、結果は、組換え型抗体からの類似の結合親和性を示している。

## 【0435】

(表10) FACSにより測定した細胞表面ヒトまたはカニクイザルALK-1に対する1.12.1(M29I/D19A)変種の平均結合親和性( $K_D$ )結果

抗体	$K_D$ (nM)	
	ヒト	カニクイザル
1.12.1	6.7	2.0
1.12.1(rWT)	5.9	6.0
1.12.1(M29I)	6.0	3.3
1.12.1(D19A)	5.7	3.8
1.12.1(M29I/D19A)	7.2	3.4
Fab 1.12.1(M29I/D19A)	0.77	ND

30

## 【0436】

40

1.12.1は、ハイブリドーマから単離されたmAb 1.12.1変種を指す。

## 【0437】

1.12.1(rWT)は、組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

## 【0438】

1.12.1(M29I)は、重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換された特異的な1つのアミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

## 【0439】

1.12.1(D19A)は、軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換された特異的な1つのアミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

## 【0440】

50

1.12.1(M291/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異(重鎖における29位のメチオニンがイソロイシンに置換され、軽鎖における19位のアスパラギン酸がアラニンに置換される)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。

**【0441】**

Fab 1.12.1(M291/D19A)は、パパインを用いて1.12.1(M291/D19A)IgG1を消化することによって調製されたmAb 1.12.1(M291/D19A)のFab断片を指す。

**【0442】**

実施例12 . Id1のTaqmanアッセイ

HUVECs(Biohittaker、カタログ番号CC-2519)を、完全HUVEC培地(EGM-2 Bullet kit, Biohittaker、カタログ番号CC-3162)600 μlにおいて細胞1200個/ウェルで24ウェルプレートに播種して、終夜成長させた。翌日、細胞は典型的に50%コンフルエントであった。完全培地を除去して、枯渇培地(0.2%FBSのみを含むEBM-2)200 μlを加えた。細胞を2時間インキュベートした。次に、細胞を抗体のPBS溶液40 μlによって処置した。凍結乾燥Abを滅菌PBSによって溶解した。最後に、細胞を1%FBS/基本培地(最終濃度)によって30分間処置して、培地を除去し、細胞をRTL緩衝液(Rneasy 96キット、Qiagen、カタログ番号74182)400 μlにおいて製造元のプロトコールに従って溶解した。次に、RNeasyキットを用いて(製造元の説明書に従って)RNAを調製した。RNAを、RiboGreen(登録商標)RNA定量キット(Molecular probes、カタログ番号R-11490)によって溶出および定量した。総RNAの等量をリアルタイムPCR分析のために用いて、Id1 RNA発現を検出した(ABI 7900機器)。Taqman One Step PCR Master Mixキット(ABI、カタログ番号4309169)および以下に記載するID1プライマー/プローブ配列を用いてPCRを行った。PCRは、以下のアニーリングおよび増幅条件40サイクルを用いて行った：95℃で15秒、60℃で1分。

TaqManプローブ：CPG-共役5'-6-FAMおよび3'-TAMRA。

名称：ID1-プローブ

配列：

5' CCAGCACGTCATCGACTACATCAGGGGA 3' (Seq ID NO: 119)

Taqman PCRプライマー：

名称：ID1-F

配列：

5' AAGGTGAGCAAGGTGGAGATT 3' (Seq ID NO: 120)

名称：ID1-R

配列：

5' TTCCGAGTTCAGCTCCAATG 3' (Seq ID NO: 121)

**【0443】**

1.12.1(M291/D19A)リード分子(1.12.1配列変種を含む)およびFab誘導体に関するId1力価測定の例を図4および5に示す。

**【0444】**

このアッセイに関する平均IC<sub>50</sub>値の要約を表11に示す。IC<sub>50</sub>の決定は全て3連で行った。

**【0445】**

実施例13 . LI-COR Biosciences(24ウェルプレート)のOdyssey赤外線イメージングシステムによって検出されたSmad1リン酸化

HUVECs(Biohittaker、カタログ番号CC-2519)を24ウェルプレートにおいて、完全HUVEC培地(EGM-2 Bullet kit、Biohittaker、カタログ番号CC-3162)600 μlにおいて1800個/ウェルで播種して、終夜成長させた。翌日、細胞は典型的に50%コンフルエントであった。完全培地を除去して、枯渇培地(枯渇培地：0.2%FBSのみを含むEBM-2)200 μlを加えた。細胞を2時間インキュベートした。次に、細胞を抗体のPBS溶液40 μlによって3時間処

置した。最後に、細胞を $0.3\times$ 完全培地(最終濃度)によって35分間処置した。培地を除去し、細胞を $1.1\times$ 試料緩衝液(Invitrogen、カタログ番号NP0007)80 μlにおいて溶解した。リン酸化Smad1を、X Cell Surelock Mini-Cell & Blot Module(Invitrogen、カタログ番号EI0002)を用いてウェスタンプロッティングによって定量した。リン酸化Smad1をウサギ抗リン-Smad1抗体(Cell Signaling、カタログ番号9511)を用いて検出し、次にこれをIRDye(商標)800共役抗ウサギIgG(Rockland Immunochemicals、カタログ番号611-732-127)によって検出した。リン酸化Smad1の量はOdyssey赤外線イメージヤー(Li-Cor)を用いて定量した。アクチン(Santa Cruz、カタログ番号sc-8432)を標準化のために用いた(抗マウスAlex 680、Molecular Probe、カタログ番号A-21058)。このアッセイに関する平均IC<sub>50</sub>値の要約を表11に示す。IC<sub>50</sub>決定は全て3連で行った。

10

## 【0446】

(表11)

クローン	ID1 Taqman IC <sub>50</sub> nM	pSmad1 ウェスタン IC <sub>50</sub> nM
1.11.1	nd	nd
1.12.1(M29I/D19A)	16	18
1.13.1	100	87
1.27.1	82	70
1.29.1	94	82
1.31.1	24	21
1.162.1	75	15
1.183.1	58	17
4.24.1	100	82
4.38.1	87	52
4.58.1	14	15
4.62.1	24	34
4.68.1	141	110
4.72.1	21	35
5.13.1	30	68

20

## 【0447】

実施例14. 抗ALK-1モノクローナル抗体のインターナリゼーション特徴

FACSを用いて中和抗体と共に残っている細胞表面受容体ALK-1の時間経過をモニターした。残っている細胞表面ALK-1を、細胞表面ALK-1に結合することができるが、中和抗体の異なるエピトープも認識することができる、マーカー抗体によってモニターする。マウス抗ヒトALK-1 ECD mAb(R&D systems、カタログ番号AF310)を同定して、マーカー抗体として試験に用いた。

40

## 【0448】

内皮細胞株HUVECおよびHUAECを用いて、インターナリゼーションの時間経過を調べた。細胞を完全培地 $200\mu l$ /ウェルを含む24ウェルプレートにおいて $37-5\%CO_2$ において成長させた。48時間の間に11の時点のそれぞれにおいて、 $1\text{ mg/ml}$ 抗体溶液 $2\mu l$ をウェル1個に加えて、混合した(中和抗体の最終濃度は $10\mu g/ml$ )。次に、0時間の時点までプレートを37°のインキュベーターに戻して、プレートを氷中に入れてインターナリゼーションプロセスを停止させた。マーカー抗体をこの時点でウェルに加えて(最終濃度 $10\mu g/ml$ )、氷中で1時間インキュベートした。次に、細胞をトリプシン処理によって剥離させてPBSによって洗浄し、96ウェルプレートに移した。次に細胞を洗浄してブロックし、中和抗体と細胞

50

表面上に残っている受容体ALK-1の双方をモニターするために、異なる蛍光を有する二次抗体によって処置した。試料をFACSCaliburフローサイトメトリー機器においてアッセイして、3,000~5,000事象 / 試料を計数した。特異的蛍光チャンネルにおける各試料の幾何平均を計算して、時間の関数としてプロットした。データを改変放射崩壊等式に適合させて、インターナリゼーションが定常状態に達した場合に、インターナリゼーションの半減期( $t_{1/2}$ )と共に、中和抗体または細胞表面上に残っている受容体ALK-1の百分率を得た。図6に示すように、mAb 1.12.1(M291/D19A)は、細胞表面受容体ALK-1と同じ速度および同じ程度にインターナライズする。1.12.1(M291/D19A)インターナリゼーションの半減期は~2時間である。抗体の50%がインターナライズされた場合に平衡に達した。R & D system s(カタログ番号、AF370)から購入したポリクローナルは、 $t_{1/2}$  1時間でインターナライズして、受容体の~70%がインターナライズされる定常状態に達する(図6)。本発明の他のヒト抗ALK-1 mAbについても類似のインターナリゼーション特徴が観察された(示していない)。

#### 【 0 4 4 9 】

#### 実施例15. ヒト包皮-SCIDキメラマウスの確立

H-C Yan, et al "Human/Severe Combined Immunodeficient Mouse Chimeras, An Experimental In Vivo Model System to Study the Regulation of Human Endothelial Cell-L eukocyte Adhesion Molecules", J. Clin. Invest. 91 :986, 1993 ; J. Varner "Regulation of Angiogenesis in Vivo by Ligation of Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 with the Central Cell-B inding Domain of Fibronectin" Amer. J. Path. 156 (4):1345, 2000 ; K. Tahtis, et al "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mol. Canc er. Ther. 2(8):729, 2003によって既に公表されている技法に対して、手術技法の有意な改変を行った。National Disease Research Institute and Cooperative Human Tissue Networkから到着後、ヒト包皮片の不健康な部分を除去してペニシリンおよびストレプトマイシン(Gibco/Life Tech、カタログ番号15070-063)を添加したRPMI培地(Cellegro/Mediate ch、カタログ番号MT- 15-040-CV)(RPMI 500 mlにpen/strep保存溶液5 mlを加える)に移した。滅菌ペトリ皿においてメスおよびカッティングを用いて、切れ端および結合組織を除去して皮膚を約8×13 mmの卵形にして、湿潤氷中で手術まで保存した。100 mg/mlケタミン(Ketaset(商標)、Fort Dodge Animal Health)/1 mg/mlメデトミジン(Pfizer Animal Health - Dormitor)溶液の適量(4  $\mu$ L/g動物)をscidマウスの腹部(すなわち、45度の角度で皮膚の下であるが内部に深すぎない)に腹腔内注射した。麻酔後、マウスに眼の潤滑液を適用して、ケトプロフェン(10 mg/kg, Fort Dodge Animal Health)を皮下注射して、手術部位の毛を刈った。手術領域をClorahexiderm(Butler, Chclo-Scrub 40、カタログ番号WAB20109)を用いて外科的に3回洗浄して、手術部位の中心から外側に向けて汚れた領域からきれいな領域に戻らないように円形に動かしてアルコールによって洗浄した。マウスを準備された手術用フードに移し、37 °Cに維持された加熱した水パッド(Gaymar Industries、カタログ番号TP500 T/Pump)に載せた。次に、マウスを手術期間中イソフルオリン麻酔下に置いた。マウスの背部を、手術部位を曝露するように切断された手術用布で覆った。マウスの皮膚を鉗子でつまんで卵形の皮膚組織をわん曲したはさみによって1回の動きで切り取った。適当な大きさのヒト包皮をマウスの上に載せた。ヒトおよびマウス皮膚をEthicon縫合糸(Ethicon、カタログ番号697H)を用いて、卵形の上部から開始して下部、次に最も遠い右側および最も遠い左側まで縫合した。組織をしっかりと固定するためにより多くのステッチを行った。皮膚周囲にほぼ等間隔で8回のステッチを行った。手術の際に、皮膚 / マウス手術創傷が乾燥してくるとそれらを湿らせるために滅菌生理食塩液を有するシリングを用いた。創傷周囲にバンドエイドを載せた。透明な包帯(3M Tegaderm(商標))を用いて絆創膏周囲を緩く巻いた。包帯はバンドエイドよりわずかに広い領域を覆うような大きさに切断した。次に、マウスにアチバメゾール(50-100  $\mu$ L, Pfizer Animal Health - Antisedan)を投与して、マウスを加熱ケージにおいて5~10分間回復させた。包帯および絆創膏を7~10日目に除去して、15日目までに皮膚のほとんどは痂皮のように見えた。完

全な治癒は21～28日の間に起こり、その後皮膚は腫瘍細胞を接種される準備ができた。図8に、術後の植え付けされた皮膚切片の組織学的(H&E染色)分析の例を示す。植え付けされた皮膚の組織学は、Tahtis, et al "Expression and Targeting of Human Fibroblast Activation Protein in a Human Skin/Severe Combined Immunodeficient Mouse Breast Cancer Xenograft Model" Mol. Cancer. Ther. 2(8):729, 2003によって記述されるマウスにおいて移植されたヒト皮膚の特徴を厳密に模倣する。h.e. : ヒト表皮層 ; h.d. : ヒト真皮層。

#### 【 0 4 5 0 】

##### 実施例16 . ヒト包皮-SCIDキメラマウスにおけるコラーゲンモデル

コラーゲンI保存溶液(カタログ番号354236、Becten-Dickinson)を、0.02 N酢酸によつて4 mg/mlに希釈して、移植するまで氷中で維持した。酸性コラーゲン溶液(8等量)を10×M199(Sigma、カタログ番号M9163)(1等量)およびヒト血漿フィブロネクチン(Fn)(カタログ番号354008、Becten-Dickinson)と共に混合して、最終Fn濃度は90 μl/mlに達した。NaOH(1.0 N)を加えてpHを～7.2に調節した。コラーゲン/Fn混合物を、使用するまで氷中で維持した。ヒト大血管内皮細胞(HMVEC)を含むまたは含まない、上記のコラーゲン/Fn混合物プラス関心対象の血管新生阻害剤を用いて、移植混合物を調製した(Cascade Biologics、カタログ番号C-010-5C)。HMVECsをPBSにおいて細胞 $6 \times 10^6$ 個/mlとして調製した。移植混合物50～100 μlをscidキメラマウスの包皮の皮内に移植した。7～14日後、コラーゲン栓を回収してOCT化合物(カタログ番号4583、Sajura Finetek, CA)に抱埋し、免疫組織化学分析のために瞬間凍結した。包皮におけるコラーゲン栓は、3色キット(カタログ番号KC1641、Mater Tech, CA)によって、図9(A)において示されるように青色の染色として同定された。ヒト血管を、抗ヒトCD-31抗体(Clone 13.3, Vector Laboratories)を用いてヒトP-CA Mに関する染色によって同定した(図9(B))。表12は、包皮-SCIDキメラマウスにおけるコラーゲンモデルにおけるヒト血管染色および定量を要約する。

#### 【 0 4 5 1 】

##### (表12) コラーゲンモデル結果の要約

10

20

マトリクス	マトリクスにおけるHMVEC	処置(Rx)	Rxの日数	試験のエンドポイント	ヒト血管のスコア( $1 \times 10^3$ )	%対照(ヒト血管)
1.6 mg/mlコラーゲン	なし	無処置	4	ヒトCD-31染色	0.036 ± 0.001	40
1.6 mg/mlコラーゲン	$7 \times 10^3$	無処置	4		0.071 ± 0.022	78
1.6 mg/mlコラーゲン	$1.4 \times 10^4$	無処置	4		0.063 ± 0.016	69
2.4 mg/mlコラーゲン	なし	無処置	4		0.091 ± 0.056	100
2.4 mg/mlコラーゲン	$7 \times 10^3$	無処置	4		0.067 ± 0.049	74
2.4 mg/mlコラーゲン	$1.4 \times 10^4$	無処置	4		0.062 ± 0.047	68
3.0 mg/mlコラーゲン	$8.8 \times 10^3$	無処置	4	ヒトCD-31染色	54 ± 9	100
3.0 mg/mlコラーゲン	$8.8 \times 10^3$	アイソタイプ対照抗体 $100 \mu\text{g/ml}$ をゲルにおいて混合	4		52 ± 13	96
3.0 mg/mlコラーゲン	$8.8 \times 10^3$	1.12.1(M291/D19A)抗体 $100 \mu\text{g/ml}$ をゲルにおいて混合	4		15 ± 3	28
3.0 mg/mlコラーゲン	なし	無処置	4	ヒトCD-31染色	0.112 ± 0.026	100
5.0 mg/mlコラーゲン	なし	無処置	4		0.031 ± 0.012	28
3.0 mg/mlコラーゲン	なし	アイソタイプ対照抗体 $100 \mu\text{g/ml}$ 皮内注射	4	ヒトCD-31染色	75 ± 15	100
3.0 mg/mlコラーゲン	なし	1.12.1(M291/D19A)抗体 $100 \mu\text{g/ml}$ を皮内注射	4		39 ± 11	52
3.0 mg/mlコラーゲン	なし	1.14.1抗体 $100 \mu\text{g/ml}$ を皮内注射	4		44 ± 28	59

【0452】

実施例17. ヒト包皮 - SCIDキメラマウスにおけるM24met腫瘍モデル

典型的に、術後5~10日の移植年齢をこれらの試験において用いた。M24met細胞株は、Mueller and coworkers in "Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells", Cancer Research, 55(8): 1629-32, 1995によって記述された。M24met細胞浮遊液は以下のように調製した: 80%コンフルエントM24met細胞を洗浄して、トリプシン/EDTA(Gibco、カタログ番号25200-056)を用いてトリプシン処置して、10%FBS(Cellgro/Mediatech、カタログ番号AKD-11775)および2 mM L-グルタミン(Cellgro/Mediatech、カタログ番号25-005-CI)を添加したRPMI(Cellgro/Mediatech、カタログ番号MT-15-040-CV)培地において回収した。細胞を600 rpmで5分間遠心して滅菌PBSに浮遊させた。コールターカウンター(Beckman Coulter, Model

10

20

30

40

50

Z2)を用いて細胞数を推定した。細胞を600 rpmで5分間遠心して、コラーゲン/およびFn(3 mg/ml)混合物に浮遊させて、移植のための細胞浮遊液 $4 \times 10^7$ 個/mlを得た。

#### 【0453】

接種するために、上記の細胞 $2 \times 10^6$ 個を、マウスの植え付けヒト皮膚に皮内注射した( $4 \times 10^7$ 個/ml 50 μl)。移植5~7日後、腫瘍は触診可能であり、マウスを対照群および処置群に無作為化して、投与を開始した。対照群は、動物に投与を行わない、抗ALK-1を溶解する溶媒を投与する、またはアイソタイプをマッチさせたIgG<sub>2</sub>ヒトモノクローナル抗体抗KLH(Pfizer Inc)の用量を投与した動物であると定義される。処置群は、抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)を投与された動物であると定義される。

#### 【0454】

#### 実施例18. ヒトおよびマウスCD-31免疫蛍光(IF)二重染色

凍結組織切片を空気乾燥させて、アセトン(Fisher、カタログ番号A16S-4)において-20度10分間固定した。試料を再度空気乾燥させて、PBSにおいて各5分間3回洗浄した。試料を5%ウサギ血清(Vector Laboratories、カタログ番号S-5000)のPBS溶液において室温で30分間ブロックした。一次抗体混合物を5%ウサギ血清において抗ヒトCD-31抗体(Santa Cruz、カタログ番号SC1505)および抗マウスCD-31(Pharmingen, Clone Mec1 3.3、カタログ番号01951A)のそれぞれ1:100倍および1:150倍希釈によって調製した。上記の抗体混合物を組織試料に室温で1時間加えた。ブロックをPBSにおいて各5分間3回洗浄した後、二次抗体混合物と共に室温で1時間インキュベートした。二次抗体混合物をPBS/0.05%Tween-20(Sigma、カタログ番号P1379)、テキサスレッドウサギ抗ヤギ抗体(Jackson Labs、カタログ番号305-075-003)およびFITCウサギ抗ラット抗体(Jackson Labs、カタログ番号312-095-003)において調製した。凍結抗体を用いる場合には抗体を1:50倍希釈し、新鮮な抗体を用いる場合には1:100倍希釈した。スライドガラスを再度PBSにおいて各5分間3回洗浄した後、Vectashield(Hard Set, Mounting medium with DAPI, Vector Lab, CA、カタログ番号H-1500)に抱埋した。スライドガラスを画像分析まで暗所の4で維持した。画像分析は、Olympus BX60蛍光顕微鏡を用いて行い、Olympus microfireデジタルカラーカメラを用いて写真を撮影した。ホットスポット3~5個/スライドガラス、スライドガラス1枚/動物、動物4~7匹/群からの写真を得て、抗ヒトCD-31染色陽性によって示された血管面積を、Image Pro Plus v4.5(MediaCybernetics)を用いて3人が定量した。薬物動態エンドポイント(群の平均値)を、対照群と比較したヒトCD-31阻害百分率として、または総ヒト血管面積として表記した。統計学的有意性をANOVAによって決定した。ヒト包皮SCIDキメラマウスにおけるM24met腫瘍のヒト(赤色)およびマウス(緑色)血管の免疫蛍光画像を図10において示す。

#### 【0455】

#### 実施例19. ヒトCD-31免疫組織化学(IHC)染色

凍結組織切片を空気乾燥させて、アセトンにおいて-20度10分間固定した。試料を再度空気乾燥させて、PBSによって2回各5分間洗浄した。試料を0.075%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノール(Fisher、カタログ番号A433-4)において15分間インキュベートして、PBSにおいて3回各5分間洗浄した。試料を5%ウサギ血清/PBSにおいて30分間ブロックして、5%ウサギ血清において抗ヒトCD-31抗体の1:100倍希釈液(Santa Cruz、カタログ番号SC1505)を室温で1時間適用した。試料をPBSにおいて2回各5分間洗浄して、1:200倍希釈のウサギ抗ヤギ抗体(Vector Labs、カタログ番号BA-5000)を室温で35分間適用した。スライドガラスをPBSにおいて2回各5分間洗浄して、新たに作製したストレプトアビジン(Vector Labs, ABC Elite kit、カタログ番号PK-6100)を加えた。スライドガラスを再度PBSにおいて2回各5分間洗浄した後、ジアミノベンジジン(DAB)(Vector Labs、カタログ番号SK-4100)において展開した。スライドガラスをPBSにおいて2回各5分間洗浄した後、Mayersヘマトキシリン(Sigma、カタログ番号HHS-32)を5秒間処置した。試料を脱イオン水において十分にすすいで、希釈した(脱イオン水1 L中に5 mlの保存液)水酸化アンモニウム溶液(Sigma、カタログ番号A-6899)に短く2回浸し、脱イオン水において再度すすいだ。試料を70%、90%および100%アルコール(Harleco、カタログ番号65347/85)において各1分間脱水して、最終的にキシリ

10

20

30

40

50

(JT Baker、カタログ番号516,09)において脱水した。スライドガラスにCytoseal 60(Stephens Scientific、カタログ番号8310-4)を載せて、画像分析のためにカバーガラスで覆った。ヒト包皮-SCIDキメラマウスにおけるM24met腫瘍のヒト血管(茶色)のIHC画像を図11に示す。

【 0 4 5 6 】

実施例20 . 抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)による治療的処置

処置のために、皮下(sc)または静脈内(iv)投与を行った。典型的に1.12.1(M291/D19A)抗体1用量を各試験に関して投与した。必要であれば、ALK-1抗体の2回目の用量を9または10日目に投与した。時に、ヒト血管成長の用量依存的阻害を調べるために、多用量レベル、すなわち1、5、10、50 mg/kgを投与した。動物を毎日モニターして、腫瘍をキャリバーによって週に3回測定した。14~17日までに、腫瘍は250~350 mm<sup>3</sup>であり、これをマウスから摘出して、OCTに抱埋してIFまたはIHC分析のために凍結した。ヒト包皮SCIDキメラマウスにおける対照および1.12.1(M291/D19A)処置(10 mg/kg)M24met腫瘍のヒト(赤色)およびマウス(緑色)血管の代表的な免疫蛍光画像を図12に示す。ヒト包皮SCIDキメラマウスマodelにおける1.12.1(M291/D19A)によるヒト腫瘍血管の用量依存的な阻害を図13に示して、関連する試験の要約を表13に紹介する。  
10

【 0 4 5 7 】

(表13) SCIDキメラモデルにおけるM24met腫瘍のインビボモデル特徴およびヒト血管成長の阻害の要約

プロトコールパラメータ					エンドポイント		全般的注意
腫瘍	薬物	用量	経路	スケジュール	CD31 (対照と 比較した %阻害)	試験日	
MCF-7	なし	na	na	na	定量していない	19	腫瘍を皮内に移植した。 エストラジオールおよび コラーゲンインプラントの 存在下および非存在下で試験。 腫瘍はゆっくりと成長して ヒトCD31をほとんど発現しない
M24met	なし	na	na	na	定量していない	19	腫瘍を皮内に移植した。 コラーゲン/FNマトリクスの 存在下および非存在下で試験。 マトリクスの存在下では 優れた腫瘍の成長が 見いだされたことから、以降の 試験は全てマトリクス補助剤を 含む。腫瘍は良好なヒトCD31染色 を示した。
M24met (小さい)	なし	na	na	na	定量していない	9	腫瘍の大きさ<100 mm <sup>3</sup> ヒトCD31をほとんど発現しない
M24met (中等度)	なし	na	na	na	定量していない	12	腫瘍の大きさ<100~200 mm <sup>3</sup> 何らかのヒトCD31
M24met (大きい)	なし	na	na	na	定量していない	12	腫瘍の大きさ<200 mm <sup>3</sup> 大きいM24met腫瘍は優れた数の ヒト血管染色を有することから、 以降の試験はより大きい腫瘍について行われる。
M24met	非特異的 ヒト IgG	10 mg/kg	IV	2回投与 (5日目および 9日目)	0	15	初回スクリーニング試験。 1.12.1(M291/D19A)は、 ヒトCD31染色の有意な低減を 示した。腫瘍成長阻害は 観察されなかった。
	1.12.1(M2 91/D19A)	10 mg/kg	IV		42		
M24met	非特異的 ヒト IgG	10 mg/kg	IV	2回投与 (5日目および 10日目)	0	14	2回目のスクリーニング試験。 GW-366の結果の確認。腫瘍の 成長阻害は観察されなかった。
	1.12.1(M2 91/D19A)	10 mg/kg	IV		40		
M24met	非特異的 ヒト IgG	10 mg/kg	SC	2回投与 (5日目および 10日目)	0	14	ヒトCD31に対する 1.12.1(M291/D19A)の 用量依存的活性の最初の試験。 何らかの用量依存的効果が 観察された。PK試験は、CD31の 有意な低減にとって1回投与で 十分であることを示す。腫瘍の 成長阻害を認めなかった。
	1.12.1(M2 91/D19A)	10 mg/kg	SC		43		
	1.12.1(M2 91/D19A)	1 mg/kg	SC		50		
	1.12.1(M2 91/D19A)	0.1 mg/kg	SC		20		

10

20

30

40

プロトコールパラメータ					エンドポイント		全般的注意
腫瘍	薬物	用量	経路	スケジュール	CD31 (対照と 比較した %阻害)	試験日	
M24met	投与なし	0 mg/kg	na	na	ND		ヒトCD31に対する 1.12.1(M291/D19A)の 用量依存的活性の2回目の試験。 明確な用量依存的抗-CD31効果が 観察された。腫瘍の成長阻害を 認めなかった。 10
	アイソタイプ マッチ IgG	10 mg/kg	SC	1回投与 (5日目)	0		
	非特異的 ヒト IgG	10 mg/kg	SC		ND		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	1 mg/kg	SC		24		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	5 mg/kg	SC		59		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	10 mg/kg	SC		72		
	アイソタイプ マッチ IgG	10 mg/kg	SC		0		
M24met	1.12.1(M2 9I/D19A)	1 mg/kg	SC	1回投与 (5日目)	33		1.12.1(M291/D19A)の最終の 広い用量設定試験。試験は、 良好な用量依存的効果を示した。 S字状の用量反応曲線に対する データの適合により、IC <sub>50</sub> 93 nM が得られる。腫瘍の成長阻害を 認めなかった。 20
	1.12.1(M2 9I/D19A)	3 mg/kg	SC		41		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	7.5 mg/kg	SC		60		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	10 mg/kg	SC		73		
	1.12.1(M2 9I/D19A)	50 mg/kg	SC		70		

【0458】

実施例21. インビボEC<sub>50</sub>の定量

ヒト包皮SCIDキメラマウスにM24met細胞を皮内に移植して抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)の1、3、5、7.5、10、および50 mg/kg、またはアイソタイプマッチ抗ヒトKLH抗体(10 mg/kg)によって処置した(sc)。実験の結論として、それぞれの腫瘍におけるヒト血管面積を先に記述したように定量した。抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)のマウス血漿濃度を、以下に記述される方法を用いて測定した：マウスからの血清試料を、ELISA(酵素結合イムノソルベントアッセイ)によって抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)濃度に関して分析した。ELISAプレートを10 µg/mlヤギ抗ヒトIgG Fc特異的抗体(Pierce、カタログ番号31123)のPBS溶液によってコーティングして、4 ℃で終夜インキュベートした後、StartBlockプロッキング緩衝液(Pierce、カタログ番号37542)によって室温で1時間ブロックした。血清試料を分析の前にStartBlockプロッキング緩衝液において100倍および1000倍希釈した。2組の標準物質を100倍および100倍希釈したブランク血清において調製した。標準物質および希釈した血清試料をプレートにおいて1時間インキュベートした。結合した抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)-標識ヤギ抗ヒトIgG(Fab特異的)抗体(Sigma、カタログ番号A0293)を用いて検出した。用いた基質は3,3'-5,5'-テトラメチルベンジジン(Sigma、カタログ番号T8665)であった。Vmaxプレートリーダー(Molecular Devices, Menlo Park, CA)において450 nmで吸光度を読み取った。非直線回帰を用いて標準曲線を適合させた。このアッセイの検出限界は、抗ALK-1抗体1.12.1(M291/D19A)10 ng/mlであった。

40

50

## 【0459】

抗ALK-1抗体1.12.1(M29I/D19A)のSCIDマウス血漿濃度を図15に示す。

## 【0460】

図15は、M24met包皮SCIDキメラモデルにおける1.12.1(M29I/D19A)に関する推定EC<sub>50</sub>を表す。ヒト血管面積を各処置群に関して試験期間(14日)に対する平均血漿PKに対してプロットした。適合曲線は、Graphpad(Prizm)におけるシグモイド用量依存的プログラムによって作製した。EC<sub>50</sub> 93 ng/ml(EC<sub>50</sub>は、対照群におけるヒト血管面積の50%低減のために必要な血漿濃度であると定義される)を曲線の適合から誘導した。

## 【0461】

本明細書において引用した全ての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が具体的におよび個々に参照により本明細書に組み入れられることが示されるように、参照により本明細書に組み入れられる。前述の本発明は、理解を明快にする目的で説明および例によつていくぶん詳細に記述してきたが、本発明は、特定の変化および改変をそれらに行ってもよく、それらも添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲に含まれることは、本発明の教示に照らして当業者に容易に明らかとなるであろう。10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0462】

【図1】エピトープ結合データの例を示す。1.12.1(M29I/D19A)抗体を10分間注射した後に、1.12.1(M29I/D19A)抗体の2回目の10分間の注射を行った。これは、その抗体の20分注射の最大の反応を定義する。20分注射の最大反応を、1.27.1抗体に関しても同様に決定した。1.12.1(M29I/D19A)抗体を10分間注射した後に、1.27.1抗体の10分間の注射を行つた。総反応が定義された最大反応の間にに入る場合、2つの抗体は同じエピトープに結合するに違ひない。総反応が最高の最大反応を超える場合、抗体は異なるエピトープに結合するに違ひない。実施例9において記述されるように注射順序を逆にして実験を繰り返した。20

## 【図2】ヒトおよびカニクイザルALK-1タンパク質の配列アラインメントを示す。

【図3】細胞表面ALK-1に対する組換え型1.12.1抗体結合のK<sub>D</sub>決定を示す。(a)ヒト、(b)カニクイザル。1.12.1(rWT)は、組換え型mAbを発現したmAb1.12.1変種を指す。1.12.1(M29I/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異(重鎖の29位のメチオニンがイソロイシンに置換され、軽鎖の19位のアスパラギン酸がアラニンに置換されている)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(M29I)は、重鎖の29位のメチオニンがイソロイシンに置換されている1つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(D19A)は、軽鎖の19位のアルバラギン酸がアラニンに置換されている、1つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。30

## 【図4】1.12.1抗体変種に関するID1 Taqmanアッセイを用いるID1力価測定の例を示す。

1.12.1はハイブリドーマから単離したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(rWT)は、組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(M29I/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異(重鎖の29位のメチオニンがイソロイシンに置換され、軽鎖の19位のアスパラギン酸がアラニンに置換されている)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(M29I)は、重鎖の29位のメチオニンがイソロイシンに置換されている1つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(D19A)は、軽鎖の19位のアスパラギン酸がアラニンに置換されている、1つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。40

【図5】1.12.1抗体配列変種およびFab誘導体に関するId1 Taqmanアッセイを用いたID1力価測定の例を示す。1.12.1はハイブリドーマから単離したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(rWT)は、組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(M29I)は、重鎖の29位のメチオニンがイソロイシンに置換されている1つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(D19A)は、軽鎖の19位のアスパラギン酸がアラニンに置換されている、1つの特異的アミノ酸変異を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。1.12.1(M29I/D19A)は、2つの特異的アミノ酸変異(重鎖の29位のメチオニンがイソロイシンに置換され、軽鎖の19位のアスパラギン酸がアラニンに置換される)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。50

換されている)を含む組換え型mAbを発現したmAb 1.12.1変種を指す。Fab 1.12.1(M291/D19A)は、パパインを用いて1.12.1(M291/D19A)IgG1を消化することによって調製したmAb 1.12.1(M291/D19A)のFab断片を指す。

【図6】ALK-1インターナライゼーションを示す。(a)細胞表面上に残っている中和抗体のモニター、(b)残っている細胞表面受容体ALK-1のモニター。

【図7】図7Aは、本発明の抗ALK-1抗体に関する可変ドメイン配列の生殖系列配列に対するアラインメントを示す。生殖系列と比較した変異を太字で示す。CDR配列を下線で示す。図7Bは、ヒト生殖系列A27  $V_K$ 配列に対する抗ALK-1抗体1.12.1、1.14.1、1.162.1、1.31.1、4.62.1、および4.72.1に関する軽鎖可変ドメインの予想アミノ酸配列のアラインメントを示す。図7Cおよび7Dは、ヒト生殖系列4-31  $V_H$ 配列に対する、抗ALK-1抗体1.12.1、1.151.1、1.162.1、1.8.1、4.24.1、4.38.1、4.58.1、4.62.1、4.68.1、4.72.1、5.13.1、および5.34.1に関する重鎖軽鎖可変ドメインの予想アミノ酸配列のアラインメントを示す。  
10

【図8】術後の植え付けされたヒト皮膚の切片の組織学(H&E染色)分析の例を示す。

【図9】図9(A)は、ヒト皮膚キメラマウスにおけるコラーゲンの三色染色を示す。図9(B)は、ヒト包皮キメラマウスにおいて移植されたコラーゲンゲルにおけるヒト血管の検出を示す。テキサスレッド：ヒト血管。FITC：マウス血管。黄色：同時染色。

【図10】ヒト包皮SCIDキメラマウスにおけるM24met腫瘍のヒト(赤色)およびマウス(緑色)血管の免疫蛍光画像を示す。  
20

【図11】ヒト包皮SCIDキメラマウスにおけるM24met腫瘍のヒト血管(茶色)のIHC画像を示す。

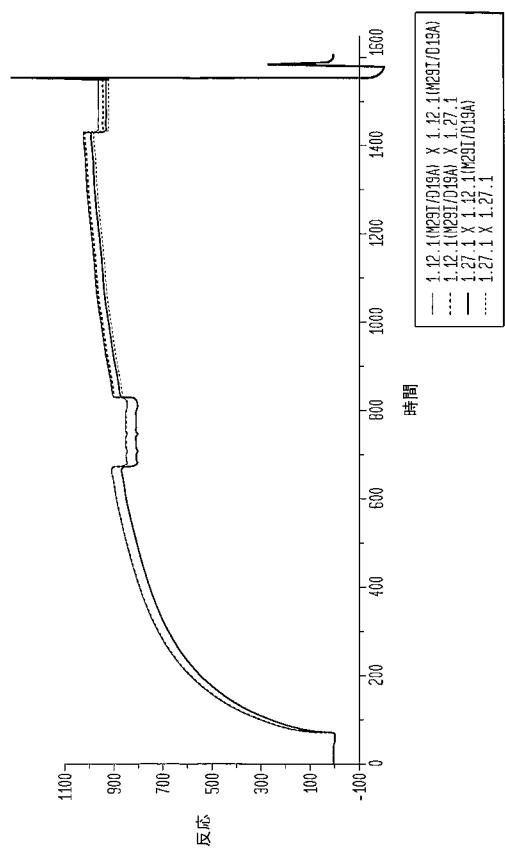
【図12】ヒト包皮SCIDキメラマウスにおける対照および1.12.1(M291/D19A)抗体処置(10 mg/kg)M24met腫瘍のヒト(赤色)およびマウス(緑色)血管の代表的な免疫蛍光画像を示す。  
10

【図13】ヒト包皮SCIDキメラマウスモデルにおける1.12.1(M291/D19A)抗体によるヒト腫瘍血管成長の用量依存的阻害を示す。

【図14】1.12.1(M291/D19A)抗体のSCIDマウス血漿濃度を示す。

【図15】M24met包皮SCIDキメラモデルにおける1.12.1(M291/D19A)抗体に関する推定EC<sub>50</sub>を示す。100%での対照値は、グラフ作成目的のために0.1 nMの人工血清濃度を与えた。これは見かけのEC<sub>50</sub>を変化させない。  
30

【図1】



【図2】

ヒト  
カニクイザル

```
MTLGSPRKGLLMLLMAVTQGDPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAIVTVLVRREG 60
MTLGSPRKGLLMLLMAVTQGDPVKPSRGPLVTCTCESPHCKGPTCRGAIVTVLVRREG 60
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

ヒト  
カニクイザル

```
RHPOEHRCGNHLRELCRGRPTEFVNHHCCDSHLCNHNVLVLEATOPPSEQPGTDGOLA 120
RHPOEHRCGNHLRELCRGRPTEFVNHHCCDSHLCNHNVLVLEATOPPSEQPGTDGOLA 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

ヒト  
カニクイザル

```
LILGPVLALLALVALGVVLGLWIVRRRQEKGRLHSELGESSLILKASEQGDMLGDLDS 180
LILGPVLALLALVALGVVLGLWIVRRRQEKGRLHSELGESSLILKASEQGDMLGDLDS 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

ヒト  
カニクイザル

```
DCTTGCGSGLPFLVORTVAROVALVEVGKGRYGEWVRLWGESVAVKIFSSRDEQSWF 240
DCTTGCGSGLPFLVORTVAROVALVEVGKGRYGEWVRLWGESVAVKIFSSRDEQSWF 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

ヒト  
カニクイザル

```
RETEIYNTVLLRHONILGFIASDMTSRSNSQLWLITHYHEHGSLYDFLQROTLEPHLAL 300
RETEIYNTVLLRHONILGFIASDMTSRSNSQLWLITHYHEHGSLYDFLQROTLEPHLAL 300
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

ヒト  
カニクイザル

```
RLAVSAAGLHLHVIEFGTOGKPAIAHDFKSRNLVKSNLCCIAUDGLAVMHSQSD 360
RLAVSAAGLHLHVIEFGTOGKPAIAHDFKSRNLVKSNLCCIAUDGLAVMHSQSD 360
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

ヒト  
カニクイザル

```
YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCFESYKWTDIWAFGLWEIFARRTIVNGIVED 420
YLDIGNNPRVGTKRYMAPEVLDEQIRTDCFESYKWTDIWAFGLWEIFARRTIVNGIVED 420
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

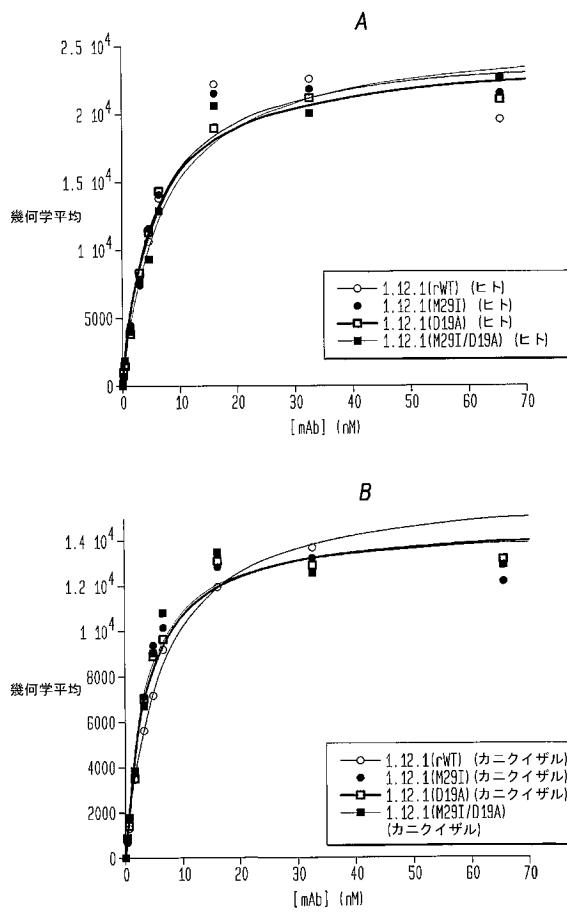
ヒト  
カニクイザル

```
YAPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDQQTPTIPNRLAADPVLSGLAOMMRECWPNPNSRL 480
YAPPFYDVVPNDPSFEDMKKVVCDQQTPTIPNRLAADPVLSGLAOMMRECWPNPNSRL 480
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

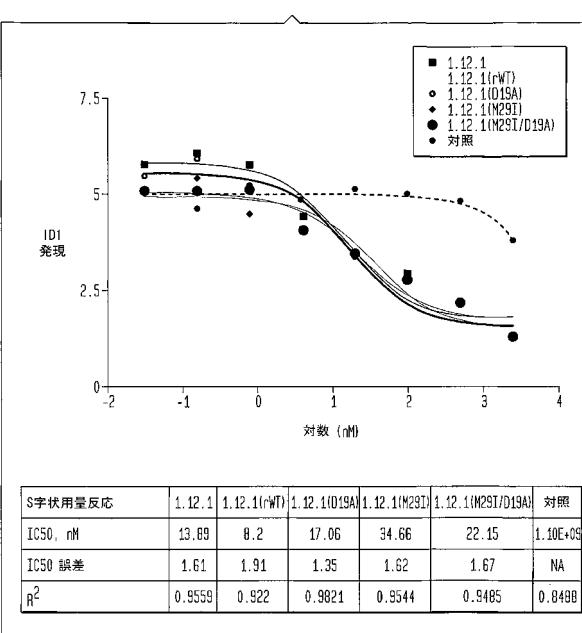
ヒト  
カニクイザル

```
TALPIKKTLKISNSPERPKVIO 503 (SEQ. ID NO.:130)
TALPIKKTLKISNSPERPKVIO 503 (SEQ. ID NO.:93)
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
```

【図3】

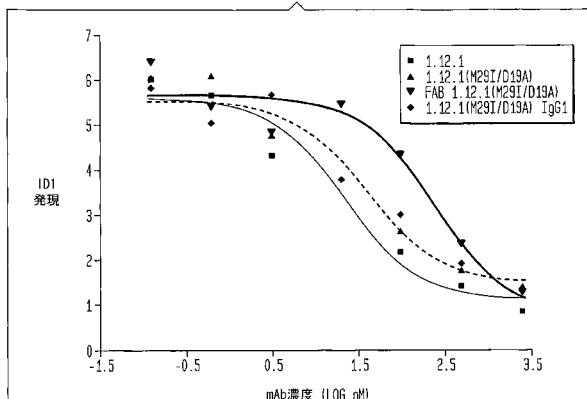


【図4】



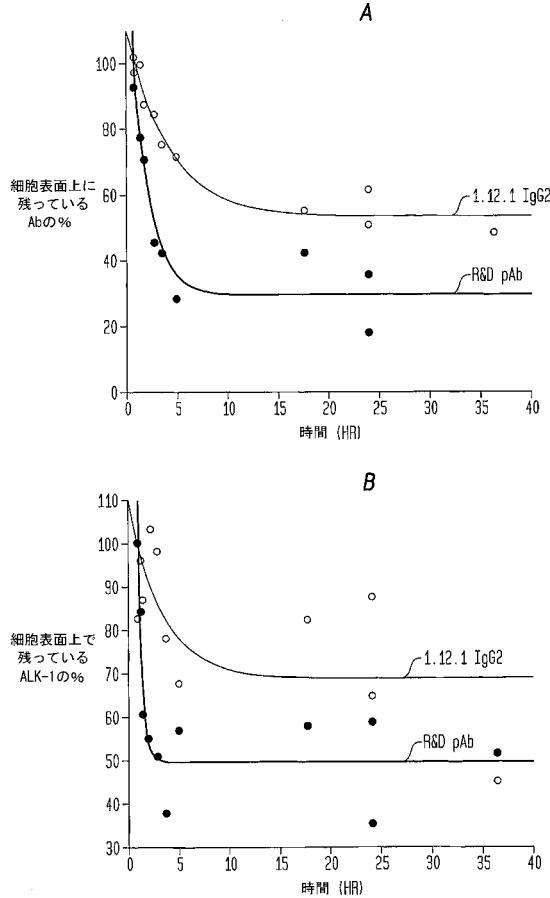
S字状反応	1.12.1	1.12.1(rWT)	1.12.1(D19A)	1.12.1(M29I)	1.12.1(M29I/D19A)	対照
IC50, nM	13.89	8.2	17.06	34.66	22.15	1.10E+09
IC50 誤差	1.61	1.91	1.35	1.62	1.67	NA
R <sup>2</sup>	0.9559	0.922	0.9821	0.9544	0.9485	0.8488

【図5】



S状用量反応	1.12.1	1.12.1(M29I/D19A)	FAB 1.12.1(M29I/D19A)	1.12.1(M29I/D19A) IgG1
IC50, nM	22.81	17.62	254.00	40.95
IC50 誤差	1.62	1.49	1.83	1.65
R <sup>2</sup>	0.96	0.97	0.94	0.96

【図6】



【図7 A】

**1.12.1 VH**  
発現された: 1 QVLOQESGPLVKPSOTLSLTCTVSGGMSSE~~EYYNNWIR~~ROPGKLEWIGIYIYSGSTY 60  
(SEQ ID NO:104)  
生殖系列: 1 QVLOQESGPLVKPSOTLSLTCTVSGGMSSE~~GYYWSWIR~~ROPGKLEWIGIYIYSGSTY 60  
(SEQ ID NO:131)

発現された: 61 YNPSLKSARVITISVDTSKNOFSLKLSSVTAADTAVYYCARE-SVAG-FDYGCGCTLVTVSS 118  
生殖系列: 61 YNPSLKSARVITISVDTSKNOFSLKLSSVTAADTAVYYCARGIAVAGYFDYGCGCTLVTVSS 120

**1.12.1 VL**  
発現された: 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERDTLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGTSRATGIP 60  
(SEQ ID NO:127)  
生殖系列: 1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 60

発現された: 61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD~~AVYYCQYGS~~SPITFGQGTRLEIK 108  
生殖系列: 61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD~~AVYYCQYGS~~SPITFGQGTRLEIK 108

【図7 B】

10	20	30
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERDTLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGTSRATGIP 1.12.1 VL (SEQ ID 127)	1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.12.1 VL (SEQ ID 20)	1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.12.1 VL (SEQ ID 28)
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.31.1 VL (SEQ ID 135)	1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 4.62.1 VL (SEQ ID 60)	1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 4.72.1 VL (SEQ ID 68)
1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.12.1 VL (SEQ ID 127) 生殖系列 (A27) (SEQ ID NO:133)		
40		
31 SSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGTSRATGIP 1.12.1 VL	31 STYLAHOKPGQAPRLLIYGVSRAVGVP 1.14.1 VL	31 SSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.162.1 VL
31 SSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 1.31.1 VL	31 SSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGVSRAVGVP 4.62.1 VL	31 SSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGVSRAVGVP 4.72.1 VL
31 SSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIP 4.72.1 VL 生殖系列 (A27)		
50		
61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 1.12.1 VL	61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 1.14.1 VL	61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 1.162.1 VL
61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 1.31.1 VL	61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 4.62.1 VL	61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 4.72.1 VL
61 DRFGSGSGSGTDFTLTISRLPEPFD <del>AVYYCQYGS</del> SPITFGQGTRLEIK 1.12.1 VL 生殖系列 (A27)		
60		
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.12.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.14.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.162.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.31.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.62.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL 生殖系列 (A27)		
70		
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.12.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.14.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.162.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.31.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.62.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL 生殖系列 (A27)		
80		
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.12.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.14.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.162.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.31.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.62.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL 生殖系列 (A27)		
90		
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.12.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.14.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.162.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.31.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.62.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL 生殖系列 (A27)		
100		
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.12.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.14.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.162.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 1.31.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.62.1 VL	91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL
91 QYGSSPITFGOGTRLEIK 4.72.1 VL 生殖系列 (A27)		

【図 7 C】

	10	20	30
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSMS	1.12.1 VH (SEQ ID: 104)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	1.151.1 VH (SEQ ID: 22)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	1.162.1 VH (SEQ ID: 26)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	1.8.1 VH (SEQ ID: 34)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4.24.1 VH (SEQ ID: 46)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4.38.1 VH (SEQ ID: 50)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4.58.1 VH (SEQ ID: 54)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4.62.1 VH (SEQ ID: 58)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4.68.1 VH (SEQ ID: 62)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4.72.1 VH (SEQ ID: 66)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	5.13.1 VH (SEQ ID: 70)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	5.34.1 VH (SEQ ID: 74)	
1	QVOLQESGPGLVKPQSOTLSLTCTVSGGSIS	4-31 生殖系列 (SEQ ID NO: 134)	

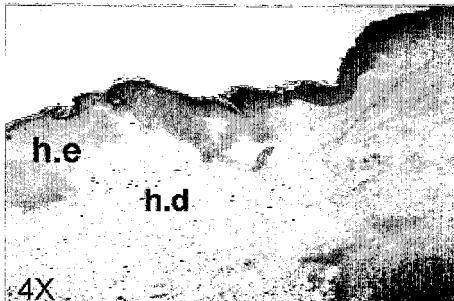
	40	50	60
31	SGEYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	1.12.1 VH	
31	SGCHYWSWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	1.151.1 VH	
31	SGEYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	1.162.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	1.8.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	4.24.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	4.38.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	4.62.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	4.68.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	4.72.1 VH	
31	SGDYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	5.13.1 VH	
31	SGGYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	5.34.1 VH	
31	SGGYYWNWIRQHPGKGLEWIGYIYYYSGSTY	4-31 生殖系列	

【図 7 D】

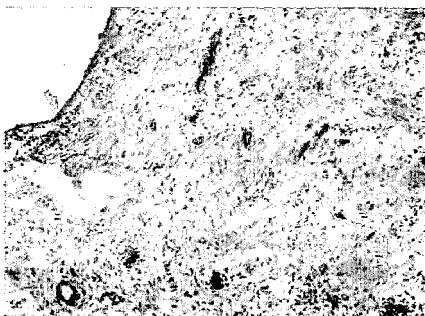
	70	80	90
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	1.12.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	1.151.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	1.162.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	1.8.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4.24.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4.38.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4.58.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4.62.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4.68.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4.72.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	5.13.1 VH	
61	YNSSLKSHVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	5.34.1 VH	
61	YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAA	4-31 生殖系列	

	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
91	DTAVYYCAR	1.12.1 VH								
91	DTAVYYCAR	1.151.1 VH								
91	DTAVYYCAR	1.162.1 VH								
91	DTAVYYCAR	1.8.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4.24.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4.38.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4.58.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4.62.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4.68.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4.72.1 VH								
91	DTAVYYCAR	5.13.1 VH								
91	DTAVYYCAR	5.34.1 VH								
91	DTAVYYCAR	4-31 生殖系列								

【図 8】

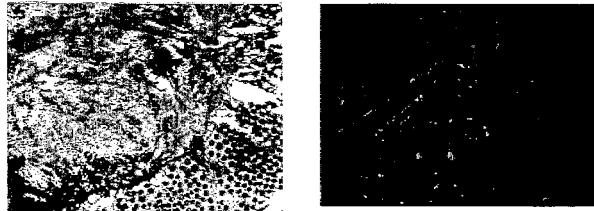


【図 11】

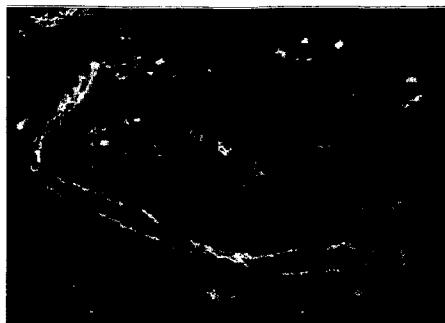


【図 9】

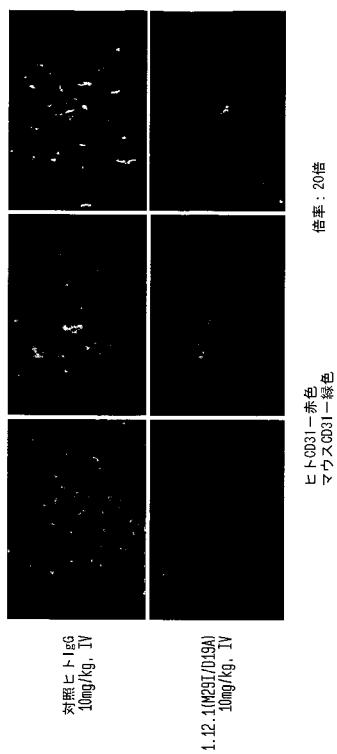
A B



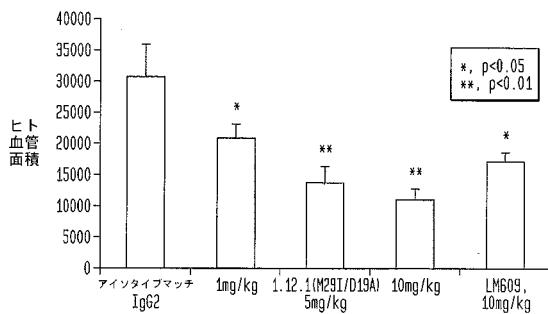
【図 10】



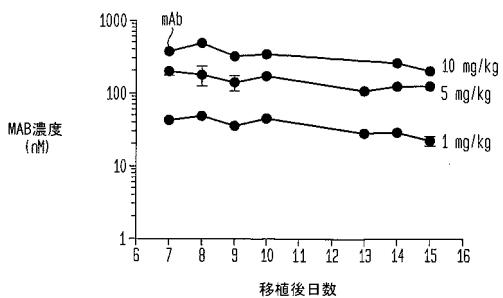
【図12】



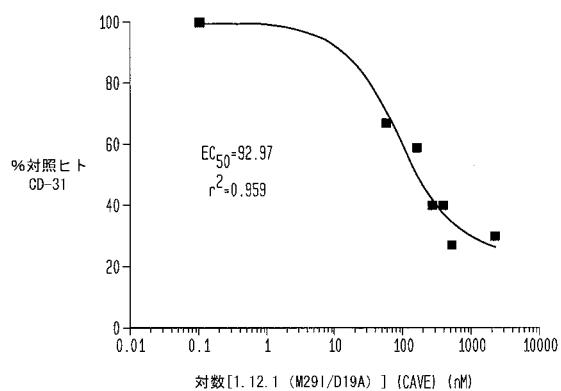
【図13】



【図14】



【図15】



【配列表】

0005161777000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I

A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845  
弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929  
弁理士 井上 隆一

(72)発明者 ノース マイケル エイダン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ランチョ サンタフェ エル カミーノ レアル 1504  
7

(72)発明者 アムンゾン カーリン クリストイーナ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン デイエゴ モレナ ブールバード 2033 1 / 2

(72)発明者 ベディアン ヴァーウ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 フレーミングガム オーバールック ドライブ イースト  
35

(72)発明者 ベルースキ シェリー シムズ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カマリロ ラ トゥナ コート 4541

(72)発明者 フ ロウェ ダナ ダン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 エンスィニータス アーデン ドライブ 942

(72)発明者 ジアン シン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン デイエゴ #1722 チャーマント ドライブ 7  
556

(72)発明者 カーリチェック シャノン マリー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン デイエゴ ユニット 1318 ノーベル ドライブ  
3717

(72)発明者 ケラーマン シリド エイミー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 メンロ パーク アルマナー アベニュー 1000

(72)発明者 トムソン ジェームズ アーサー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン デイエゴ ハヴェチュア ウェイ 8931

(72)発明者 ワン ジアニン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン デイエゴ パーク ヴィレッジ ロード 7478

(72)発明者 ウィックマン グラント レイモンド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン デイエゴ #38 ノーベル ドライブ 4249

(72)発明者 チャン ジンチュアン  
アメリカ合衆国 コロラド州 ボルダー ウエスト ムーアヘッド サークル 4790

審査官 三原 健治

(56)参考文献 国際公開第99/046386 (WO, A1)

LUX, A., et al., DEFINITION Homo sapiens activin A receptor type II-like 1 (ACVRL1),  
mRNA, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. NM\_000020, 2005年 7月1  
9日, [retrieved on 2012.03.05], URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/4557242?at=34&satkey=13274975>

EMBO J., 2002 Apr 2, Vol.21, No.7, p.1743-1753

フナコシ 試薬総合カタログ 2004 Part 1 抗体, フナコシ株式会社, 2004年  
, p.36, RSD MAB370

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00

C07K 16/00

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/UniProt/GeneSeq