

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-532657

(P2015-532657A)

(43) 公表日 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 Z N A D	4 B 0 2 4
A 6 1 K 47/22 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/12 (2006. 01)	A 6 1 K 47/22	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/02 (2006. 01)	A 6 1 K 47/12	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/26 (2006. 01)	A 6 1 K 47/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く		

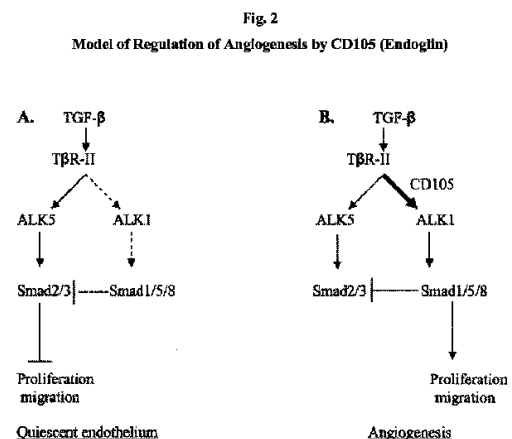
(21) 出願番号	特願2015-531196 (P2015-531196)	(71) 出願人	515059784
(86) (22) 出願日	平成25年9月5日 (2013. 9. 5)		トラコン ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月4日 (2015. 3. 4)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア、サンディエゴ、ユニヴァーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/058265		センター レイン 8 9 1 0、スイート 7 0 0
(87) 国際公開番号	W02014/039682	(74) 代理人	110000855
(87) 国際公開日	平成26年3月13日 (2014. 3. 13)		特許業務法人浅村特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/697, 111	(72) 発明者	ベネディクト、シュザンヌ
(32) 優先日	平成24年9月5日 (2012. 9. 5)		アメリカ合衆国、カリフォルニア、カールスバッド、サニーヒル ドライブ 4 0 9 9
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体製剤及びその使用

(57) 【要約】

本出願は、抗CD105抗体、その抗原結合断片の製剤、及びそれらの使用に関する。別の態様は、抗CD105抗体又はその抗原結合断片の製剤の、プレフィルドシリンジに関する。別の態様は、癌及び眼科疾患などの血管新生関連障害の1つ又は複数の兆候又は症状を低減させるための、これらの製剤の使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

約 1 mg/ml ～ 約 150 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片、最大約 100 mM の緩衝剤、最大約 1 M のポリオール及び約 4.0 ～ 約 7.5 の pH を含む、製剤。

【請求項 2】

抗 CD105 抗体の少なくとも 95% が、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって測定して、少なくとも 12 カ月間にわたる約 2 ～ 8 °C での保存後にモノマーとして存在する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 3】

抗 CD105 抗体の少なくとも 95% が、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって測定して、少なくとも 6 カ月間にわたる約 25 °C での保存後にモノマーとして存在する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 4】

抗 CD105 抗体の少なくとも 90% が、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって測定して、少なくとも 6 カ月間にわたる約 25 °C での保存後にモノマーとして存在する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 5】

前記緩衝剤がヒスチジン又はリン酸緩衝生理食塩水である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 6】

緩衝剤が酢酸塩であり、pH が約 4 である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 7】

緩衝剤がヒスチジンであり、pH が約 5.5 である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 8】

抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片が、少なくとも 12 カ月間にわたる約 2 ～ 8 °C での保存後に、CD105 ELISA 結合アッセイによって約 50 ～ 150 % の結合を示す、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 9】

抗 CD105 抗体の平均等電点 (pI) が、キャピラリー電気泳動ー等電点電気泳動によって測定して、少なくとも 12 カ月間にわたる 2 ～ 8 °C での保存後に、約 8.7 ～ 約 9.2 である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 10】

前記抗 CD105 抗体が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V_L) ; 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域 (C_L) ; 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V_H) ; 及び配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する定常領域 (F_c) を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 11】

前記抗 CD105 抗体が、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR1 ; 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR2 ; 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR3 ; 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR1 ; 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR2 ; 及び配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR3 を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 12】

約 25 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 13】

約 50 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 14】

約 100 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 1 に記載

10

20

30

40

50

の製剤。

【請求項 1 5】

前記緩衝剤がヒスチジン又は酢酸塩である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 1 6】

約 20 mM のヒスチジン又は酢酸塩を含む、請求項 1 5 に記載の製剤。

【請求項 1 7】

硝子体内投与又は静脈内投与のために製剤化されている、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 1 8】

許容される担体又は賦形剤を更に含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 1 9】

前記担体又は賦形剤が、薬学的に許容される担体又は賦形剤である、請求項 1 8 に記載の製剤。

【請求項 2 0】

等張又は高張である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 2 1】

ポリオールが 300 mM 未満であり、製剤が塩で等張にされる、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 2 2】

抗 CD 105 抗体の少なくとも 95 % が、SEC によって測定して、製剤の凍結解凍サイクルの後にモノマーとして存在する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 2 3】

抗 CD 105 抗体の少なくとも 95 % が、SEC によって測定して、攪拌ストレスにさらされた場合にモノマーとして存在する、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 2 4】

ポリオールが糖である、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 2 5】

前記糖が非還元糖である、請求項 2 4 に記載の製剤。

【請求項 2 6】

非還元糖がトレハロース又はスクロースである、請求項 2 5 に記載の製剤。

【請求項 2 7】

約 240 mM のトレハロース又はスクロースを含む、請求項 2 6 に記載の製剤。

【請求項 2 8】

糖がソルビトールである、請求項 2 4 に記載の製剤。

【請求項 2 9】

約 240 mM のソルビトールを含む、請求項 2 8 に記載の製剤。

【請求項 3 0】

界面活性剤を更に含む、請求項 1 に記載の製剤。

【請求項 3 1】

界面活性剤が、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80 又は Pluronic (登録商標) F68 である、請求項 3 0 に記載の製剤。

【請求項 3 2】

請求項 1 から 3 1 までのいずれか一項に記載の製剤を含む、静脈内投与又は硝子体内投与に適した、プレフィルドシリンジ。

【請求項 3 3】

それを必要とする対象において血管新生関連疾患を治療する方法であって、患者に、約 1 mg/ml ~ 約 150 mg/ml の抗 CD 105 抗体又はその抗原結合断片、最大約 100 mM の緩衝剤、最大約 1 M のポリオール及び約 4.0 ~ 約 7.5 の pH を含む製剤を投与することを含む、上記方法。

【請求項 3 4】

前記抗 CD 105 抗体が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V

10

20

30

40

50

_L) ; 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域 (C_L) ; 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V_H) ; 及び配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する定常領域 (F_C) を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記抗 CD105 抗体が、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR1 ; 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR2 ; 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR3 ; 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR1 ; 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR2 ; 及び配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR3 を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

約 25 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 37】

約 50 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

約 100 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 39】

前記製剤が 300 mM 未満のポリオールを含み、製剤が塩で等張にされる、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 40】

前記緩衝剤がヒスチジン又は酢酸塩である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 41】

約 20 mM のヒスチジン又は酢酸塩を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

ポリオールが糖である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 43】

糖が非還元糖である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

非還元糖がトレハロース又はスクロースである、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

約 240 mM のトレハロース又はスクロースを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

糖がソルビトールである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 47】

約 240 mM のソルビトールを含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

前記製剤が、硝子体内又は静脈内に投与される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 49】

界面活性剤を更に含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 50】

界面活性剤が、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80 又は Pluronic (登録商標) F68 である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

血管新生関連疾患が癌、又は転移である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 52】

癌が固形腫瘍である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

癌が上皮系腫瘍である、請求項 51 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 4】

癌が肺癌、婦人科悪性腫瘍、メラノーマ、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、頭部癌、膵臓癌、肝臓癌（肝細胞癌）、子宮癌、首部癌、腎臓癌（腎細胞癌）、肉腫、ミエローマ、脳癌又はリンパ腫である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記血管新生関連疾患が眼科的状态である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

眼科的状态が、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症又は脈絡膜血管新生である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記加齢性黄斑変性症（A M D）が滲出型 A M D 又は萎縮型 A M D である、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記製剤が前記患者に 1 回又は複数回投与される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記製剤が、1 日 1 回、1 週間に 1 回、1 カ月に 1 回、1 カ月に 2 回、2 カ月に 1 回、3 カ月に 1 回、4 カ月に 1 回、5 カ月に 1 回又は 6 カ月に 1 回投与される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記製剤が、血管新生関連疾患の 1 つ又は複数の兆候又は症状が低減されるまで投与される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、重症度又は持続期間において、約 2 %、約 5 %、約 1 0 %、約 1 5 %、約 2 0 %、約 2 5 %、約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 % 又は約 1 0 0 % 低減される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、重症度又は持続期間において、約 2 倍、約 5 倍、約 1 0 倍、約 1 5 倍、約 2 0 倍、約 2 5 倍、約 3 0 倍、約 3 5 倍、約 4 0 倍、約 4 5 倍、約 5 0 倍、約 5 5 倍、約 6 0 倍、約 6 5 倍、約 7 0 倍、約 7 5 倍、約 8 0 倍、約 9 0 倍、約 9 5 倍、約 1 0 0 倍又はそれ以上低減される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、血管を収縮する、眼部疾患と関係がある内皮細胞増殖を阻害する、出血の兆候若しくは症状を除去する、不透明な視界を治療する、視力喪失の停止をもたらす、視覚を改善する、及び／又は血管漏出を防ぐことである、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 4】

治療が、患者の状態における改善をもたらす、1 つ又は複数の以下の要因：細胞増殖の低下、細胞数の低下、アポトーシスの増大、又は細胞増殖障害を含む細胞の少なくとも一部分の生存の低下が発生したかどうか決定することによって評価することができる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

治療が、腫瘍若しくは転移の部分的若しくは完全な排除及び／又は患者の生存期間の延長をもたらす、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

それを必要とする患者において眼科的状态を治療する方法であって、前記患者に、約 1 m g / m l ～約 1 5 0 m g / m l の抗 C D 1 0 5 抗体又はその抗原結合断片、最大約 1 0 0 m M の緩衝剤、最大約 1 M のポリオール、約 4 . 0 ～約 7 . 5 の p H 及び任意選択で界面活性剤を含む製剤を投与することを含み、それによって前記眼科的状态の 1 つ又は複数の兆候又は症状が改善される、上記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 67】

眼科的状态が、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症又は脈絡膜血管新生である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記加齢性黄斑変性症 (AMD) が滲出型 AMD 又は萎縮型 AMD である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記抗 CD105 抗体が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V_L) ; 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域 (C_L) ; 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V_H) ; 及び配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する定常領域 (Fc) を含む、請求項 66 に記載の方法。

10

【請求項 70】

前記抗 CD105 抗体が、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR1 ; 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR2 ; 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR3 ; 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR1 ; 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR2 ; 及び配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR3 を含む、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 71】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、血管を収縮する、眼部疾患と関係がある内皮細胞増殖を阻害する、出血の兆候若しくは症状を除去する、不透明な視界を治療する、視力喪失の停止をもたらす、視覚を改善する、及び／又は血管漏出を防ぐことである、請求項 66 に記載の方法。

20

【請求項 72】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、重症度又は持続期間において、約 2 %、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 90 %、約 95 % 又は約 100 % 低減される、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 73】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、重症度又は持続期間において、約 2 倍、約 5 倍、約 10 倍、約 15 倍、約 20 倍、約 25 倍、約 30 倍、約 35 倍、約 40 倍、約 45 倍、約 50 倍、約 55 倍、約 60 倍、約 65 倍、約 70 倍、約 75 倍、約 80 倍、約 90 倍、約 95 倍、約 100 倍又はそれ以上低減される、請求項 66 に記載の方法。

30

【請求項 74】

前記製剤が 300 mM 未満のポリオールを含み、製剤が塩で等張にされる、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 75】

それを必要とする対象において癌又は転移を予防又は治療する方法であって、前記患者に、約 1 mg/ml ~ 約 150 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片、最大約 100 mM の緩衝剤、最大約 1 M のポリオール及び約 4.0 ~ 約 7.5 の pH を含む製剤を投与することを含み、それによって前記癌又は転移の 1 つ又は複数の兆候又は症状が改善される、上記方法。

40

【請求項 76】

抗 CD105 抗体が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V_L) ; 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域 (C_L) ; 配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (V_H) ; 及び配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を有する定常領域 (Fc) を含む、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 77】

前記抗 CD105 抗体が、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR1 ; 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR2 ; 配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を有する V_L CDR3 ; 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有する V_H CDR1

50

；配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有する V H C D R 2 ；及び配列番号 1 0 に記載のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

製剤の投与が、対象の生命を延長させる、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記癌が原発性腫瘍又は転移性腫瘍である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記癌が固形腫瘍である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記固形腫瘍が、皮膚、メラノーマ、肺、膵臓、乳、卵巣、結腸、直腸、胃、甲状腺、喉頭、卵巣、前立腺、結腸直腸、頭、首、眼、口、喉、食道、胸、骨、精巣、リンパ、骨髓、骨、肉腫、腎臓、汗腺、肝臓、腎臓、脳（例えば、多形性膠芽腫、グリオーマ）などから選択される組織又は器官の固形腫瘍である、請求項 8 0 に記載の方法。

10

【請求項 8 2】

前記固形腫瘍が、結腸腫瘍、乳房腫瘍、腎臓腫瘍、肺腫瘍、前立腺腫瘍、卵巣腫瘍、又はこのような腫瘍のいずれかの転移である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

治療が、対象の状態における改善をもたらし、1 つ又は複数の以下の要因：細胞増殖の低下、細胞数の低下、アポトーシスの増大、又は細胞増殖障害を含む細胞の少なくとも一部分の生存の低下が発生したかどうか決定することによって評価することができる、請求項 7 5 に記載の方法。

20

【請求項 8 4】

治療が、腫瘍若しくは転移の部分的若しくは完全な排除及び／又は患者の生存期間の延長をもたらす、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、重症度又は持続期間において、約 2 %、約 5 %、約 1 0 %、約 1 5 %、約 2 0 %、約 2 5 %、約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 9 0 %、約 9 5 % 又は約 1 0 0 % 低減される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記 1 つ又は複数の兆候又は症状が、重症度又は持続期間において、約 2 倍、約 5 倍、約 1 0 倍、約 1 5 倍、約 2 0 倍、約 2 5 倍、約 3 0 倍、約 3 5 倍、約 4 0 倍、約 4 5 倍、約 5 0 倍、約 5 5 倍、約 6 0 倍、約 6 5 倍、約 7 0 倍、約 7 5 倍、約 8 0 倍、約 9 0 倍、約 9 5 倍、約 1 0 0 倍又はそれ以上低減される、請求項 7 5 に記載の方法。

30

【請求項 8 7】

約 2 5 m g / m l の抗 C D 1 0 5 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 8 8】

約 5 0 m g / m l の抗 C D 1 0 5 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 7 5 に記載の方法。

40

【請求項 8 9】

約 1 0 0 m g / m l の抗 C D 1 0 5 抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記緩衝剤がヒスチジン又は酢酸塩である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 9 1】

約 2 0 m M のヒスチジン又は酢酸塩を含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

ポリオールが糖である、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 9 3】

50

前記糖が非還元糖である、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

非還元糖がトレハロース又はスクロースである、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

約 2 4 0 m M のトレハロース又はスクロースを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記糖がソルビトールである、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 7】

約 2 4 0 m M のソルビトールを含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記製剤が 3 0 0 m M 未満のポリオールを含み、製剤が塩で等張にされる、請求項 7 5 に記載の方法。 10

【請求項 9 9】

界面活性剤を更に含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

界面活性剤が、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0 又は P l u r o n i c (登録商標) F 6 8 である、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記製剤が静脈内投与される、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

表 1 の製剤 1 ～ 3 9 のいずれか 1 つを含む、製剤。 20

【請求項 1 0 3】

請求項 1 0 2 に記載の製剤を含む、プレフィルドシリンジ。

【請求項 1 0 4】

血管新生関連疾患の治療のための、請求項 1 0 2 に記載の製剤の使用。

【請求項 1 0 5】

血管新生関連疾患の治療のための医薬品の製造における、請求項 1 0 2 に記載の製剤の使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、その出願が参照として完全に本明細書に組み込まれる 2 0 1 2 年 9 月 5 日に
出願された米国仮出願第 6 1 / 6 9 7 , 1 1 1 号の特典を請求するものである。

【0 0 0 2】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、以下の同時係属中の特許出
願：米国特許出願公開第 2 0 1 0 - 0 0 9 8 6 9 2 号 A 1 [代理人書類番号 3 5 8 8 2 - 7 0 6 . 2 0 1] ; 米国特許第 8 , 2 2 1 , 7 5 3 号 [代理人書類番号 3 5 8 8 2 - 7 0 6 . 2 0 2] ; 米国特許出願第 1 3 / 4 8 5 , 7 0 2 号 [代理人書類番号 3 5 8 8 2 - 7 0 6 . 3 0 1] ; 及び米国特許出願第 1 3 / 3 9 0 , 8 9 6 号 [代理人書類番号 3 5 8 8 2 - 7 1 2 . 2 0 1] に関連している。 40

配列表

【0 0 0 3】

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I フォーマットで提出された、その全体が
参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記 A S C I I のコピーは、2 0 1 3
年 9 月 4 日に作成され、名称は 3 5 8 8 2 - 7 1 4 . 6 0 1 _ S L . t x t であり、2 2
, 1 2 1 バイトのサイズである。

【背景技術】

【0 0 0 4】

癌は、冠状疾患に次ぐヒトの死の第二の主な原因である。世界中で毎年数百万人の人々 50

が、癌が原因で死んでいる。米国単独で、癌は毎年五十万人をはるかに超える人々の死を引き起こし、一年当たり約140万の新たな症例が診断される。心臓疾患が原因の死は有意に減少している一方で、癌が原因の死は一般に増加している。多くの国では、癌は、既に死の主な原因である。

【0005】

更に、その原発性癌を早期に生き延びた癌患者に関してさえ、それらの生命が劇的に変化するという一般的な経験が示されている。多くの癌患者は、再発又は治療の失敗に関する可能性を意識することにより駆り立てられる強い不安を経験する。多くの癌患者は、治療後に相当な身体の衰弱を経験する。

【0006】

一般的に言うと、致命的な癌の管理における根本的な問題は、有効で非毒性の全身療法の欠如である。癌は、制御不能な細胞増殖をもたらす遺伝子突然変異によって特徴付けられる複雑な疾患である。癌細胞は全生物中に存在し、通常の下条件下では、それらの過剰な増殖は様々な生理的要因によって密接に制御される。

【0007】

血管新生は、それによって新たな血管が既存の血管から発生する生理的プロセスである。血管新生は、正常プロセスと病状プロセスの両方において役割を果たすことが示唆されている。例えば、血管新生プロセスは、動物の器官及び組織の脈管系の発生と関係がある。

【0008】

特定の病状では、患部組織内の細胞に十分な血液及び栄養供給をもたらすための手段として血管新生が刺激される。これらの病状の多くは、異常な細胞増殖及び／又は制御と関係がある。固形癌及び滲出型黄斑変性症は、連続的増殖及び転移に関する新たな血液供給の動員に依存する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

抗CD105抗体の新たな製剤、この製剤を含むプレフィルドシリンジ、及び血管新生関連障害を治療するためのこのような製剤の使用を、本明細書で提供する。本出願は、例えば、CD105と関係がある癌及び眼科的状態の処置の静脈内投与又は眼内投与のために使用され得る製剤を提供する。

【0010】

一態様では、約1mg/ml～約150mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片、最大約100mMの緩衝剤、最大約1Mのポリオール及び約4.0～約7.5のpHを含む製剤を、本明細書で提供する。

【0011】

一態様では、この製剤は調製後に安定であり、従来の手段に従って試験され得る。製剤の経時的な安定性に関して、抗CD105抗体又はその抗原結合断片の少なくとも95%が、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって測定して、少なくとも約12カ月間にわたる約2～8℃での保存後にモノマーとして存在し得る。いくつかの実施形態では、このような製剤の緩衝剤は、ヒスチジン又はリン酸緩衝生理食塩水である。製剤の経時的な安定性に関して、抗CD105抗体又はその抗原結合断片の少なくとも90%が、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって測定して、少なくとも約6カ月間にわたる約25℃での保存後にモノマーとして存在し得る。いくつかの実施形態では、このような製剤の緩衝剤は、酢酸塩である。

【0012】

更に、抗CD105抗体又はその抗原結合断片は、少なくとも約12カ月間にわたる約2～8℃での保存後に、CD105 ELISA結合アッセイによって約50～約150%の結合を示し得る。

【0013】

抗CD105抗体の平均等電点（pI）は、例えばキャピラリー電気泳動－等電点電気泳動によって測定して、少なくとも約12カ月間にわたる2～8℃での保存後に、約8.7～約9.2であり得る。

【0014】

抗CD105抗体又はその抗原結合断片は、少なくとも約12カ月間、少なくとも約18カ月間、少なくとも約24カ月間、少なくとも約30カ月間、少なくとも約36カ月間又はそれ以上にわたって安定であり得ることが理解される。

【0015】

製剤は、SECによって測定して、製剤の凍結解凍サイクルの後にモノマーとして存在する、抗CD105抗体の少なくとも95%を含み得る。或いは、又は更に、製剤は、SECによって測定して、攪拌ストレスにさらされた場合にモノマーとして存在する、抗CD105抗体の少なくとも95%を含み得る。

【0016】

この抗CD105抗体又はその抗原結合断片は、CD105に結合することが可能なCDRの任意の配列を含み得る。非制限的な一実施形態では、この抗CD105抗体は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（V_L）；配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（C_L）；配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（V_H）；及び配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（Fc）を含む（例えば、図1を参照）。

【0017】

別の非制限的实施形態では、この抗CD105抗体は、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR3；配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR3を含む。

【0018】

単離されたヒト化脱免疫化抗CD105抗体は、配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得る。ヒト化脱免疫化重鎖の他の非制限的例には、配列番号13、14、15及び16が含まれるが、これらだけには限られない。ヒト化脱免疫化軽鎖の他の非制限的例には、配列番号17、18、19、20、21、22及び23が含まれるが、これらだけには限られない。これらの配列は、以下の例17に示される。

【0019】

この製剤は、約1mg/ml～約150mg/mlの抗CD105抗体若しくはその抗原結合断片、又は約2mg/ml、約5mg/ml、約7.5mg/ml、約10mg/ml、20mg/ml、約25mg/ml、約30mg/ml、約35mg/ml、約40mg/ml、約45mg/ml、約50mg/ml、約55mg/ml、約60mg/ml、約65mg/ml、約70mg/ml、約75mg/ml、約80mg/ml、約85mg/ml、約90mg/ml、約95mg/ml、約100mg/ml、約105mg/ml、約110mg/ml、約115mg/ml、約120mg/ml、約125mg/ml、約130mg/ml、約135mg/ml、約140mg/ml、約145mg/ml、約150mg/ml若しくはそれ以上が含まれるが、これらだけには限られないそれらの間の任意の値の抗CD105抗体若しくはその抗原結合断片を含み得る。

【0020】

一実施形態では、この製剤は、約25mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む。

【0021】

別の実施形態では、この製剤は、約50mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む。

【0022】

なお別の実施形態では、この製剤は、約 100 mg/ml の抗 CD105 抗体又はその抗原結合断片を含む。

【0023】

本明細書に記載する製剤は、例えば、ヒスチジン、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤を含み得る。一実施形態では、この製剤は、約 5 mM、約 7.5 mM、約 10 mM、約 12.5 mM、約 15 mM、約 17.5 mM、20 mM、約 22.5 mM、約 25 mM、約 30 mM、約 35 mM、約 40 mM、約 45 mM、約 50 mM、約 55 mM、約 60 mM、約 65 mM、約 70 mM、約 75 mM、約 80 mM、約 85 mM、約 90 mM、約 95 mM 又は約 100 mM のヒスチジン、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩を含む。

10

【0024】

製剤は、硝子体内投与及び静脈内投与が含まれるが、これらだけには限られない、抗体について公知の任意の型の投与のために調製され得る。

【0025】

本明細書に提供する製剤は、薬学的に許容される担体又は賦形剤であり得、患者への投与のために許容される任意の担体又は賦形剤を含む、許容される担体又は賦形剤を更に含み得る。

【0026】

一実施形態では、本明細書に提供する製剤は等張である。「等張」とは、対象の製剤が、ヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有することを意味する。等張な製剤は、約 250～350 ミリオスモル (mOsm) の浸透圧を一般に有する。等張性は、例えば、蒸気圧又は氷-凍結 (ice-freezing) 型の浸透圧計を使用して測定され得る。別の実施形態では、本明細書に提供する製剤は高張である。「等張」な製剤は、ヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有する製剤である。対応して、用語「高張」は、ヒト血液の浸透圧を上回る浸透圧を有する製剤を記述するために使用される。

20

【0027】

本明細書に提供する製剤は、1 M 未満の量でポリオールを含み得る。例えば、ポリオールは、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 150 mM、約 200 mM、約 225 mM、約 240 mM、約 250 mM、約 300 mM、約 350 mM、約 400 mM、約 450 mM、約 500 mM、約 550 mM、約 600 mM、約 650 mM、約 700 mM、約 750 mM、約 800 mM、約 850 mM、約 900 mM、約 950 mM、約 1 M 又はそれらの間の任意の整数の量で、製剤中に存在し得る。一実施形態では、この製剤は、約 100 mM～約 175 mM の濃度の塩で等張にされる。例えば、300 mM 未満の量でポリオールを含む製剤は、約 130 mM の濃度の塩で等張にされる。

30

【0028】

一態様では、本明細書に提供する製剤中で使用されるポリオールは、例えば非還元糖などの糖であり得る。非還元糖の代表的な例には、トレハロース及びスクロースが含まれるが、これらだけには限られない。例えば、製剤は、約 200 mM～約 300 mM のトレハロース又はスクロースを含み得る。一実施形態では、製剤は、約 240 mM のトレハロース又はスクロースを含み得る。

40

【0029】

或いは、この糖は、約 200 mM～約 300 mM の量（濃度）のソルビトールであり得る。一実施形態では、製剤は、約 240 mM のソルビトールを含み得る。

【0030】

本明細書に提供する製剤の更なる非制限的例は、表 1 の製剤 1～39 のいずれか 1 つである。

【0031】

本明細書に提供する製剤は、約 4.0～約 7.5 の pH を有し得る。一実施形態では、本明細書に提供する製剤は、約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 6.0、約 6.5 又は約 7.0 の pH を有し得る。

50

【0032】

一実施形態では、本明細書に提供する製剤は、界面活性剤を含まない。任意選択で、いくつかの場合には、界面活性剤は製剤中に含まれ得る。界面活性剤の非制限的例には、ポリソルベート20、ポリソルベート80及びPluronic（登録商標）F68が含まれる。

【0033】

本明細書に記載する製剤を含む、静脈内投与又は硝子体内投与に適したプレフィルドシリンジもまた、本明細書で提供する。このようなプレフィルドシリンジは、本明細書に記載する状態のいずれかなどの血管新生関連状態の治療への使用のために、パッケージ及びラベルされ得る。パッケージは、保存及び投与のための指示を更に含み得る。上記請求項のいずれか一項に記載の製剤を含む、静脈内投与又は硝子体内投与に適した1つ又は複数のプレフィルドシリンジを含むパッケージを、本明細書で提供する。

10

【0034】

本出願の一実施形態は、本明細書に記載する任意の組成物を使用して、本明細書に記載する障害を治療するための医薬品を製剤化することを企図する。医薬品は治療を必要とする患者／対象の身体的特徴に基づいて製剤化することができ、一回又は複数回の製剤で製剤化することができる。医薬品は病院及びクリニックに配給するのに適したラベルを有する適切なパッケージ中にパッケージすることができ、そのラベルは対象中の本明細書に記載する障害の治療を示すものである。医薬品は一回又は複数回単位としてパッケージすることができる。本明細書に記載する組成物の用量及び投与に関する説明書を、パッケージ中に含めることができる。

20

【0035】

本明細書に記載する製剤を患者に投与することを含む、それを必要とする患者（対象）において血管新生関連疾患を治療する方法を、本明細書で提供する。このような製剤は、患者に硝子体内又は静脈内投与され得る。

【0036】

本明細書に記載する血管新生関連疾患は、例えば、癌又は転移であり得る。一実施形態では、この癌は固形腫瘍である。治療する癌には、例えば、上皮ベースの腫瘍が含まれる。このような製剤で治療する癌の非制限的例には、肺癌、婦人科悪性腫瘍、メラノーマ、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、頭部癌、膵臓癌、肝臓癌（肝細胞癌）、子宮癌、首部癌、腎臓癌（腎細胞癌）、肉腫、ミエローマ及びリンパ腫が含まれるが、これらだけには限られない。癌又は転移の治療のための製剤は、患者に静脈内投与され得る。

30

【0037】

或いは、本明細書に記載する血管新生関連疾患は、例えば、眼科的状态であり得る。眼科的状态には、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫及び／又は脈絡膜血管新生が含まれるが、これらだけには限られない。加齢性黄斑変性症（AMD）は、滲出型AMD（ウェット型AMD）又は萎縮型AMD（ドライ型AMD）であり得る。眼科的状态の治療のための製剤は、患者に硝子体内投与され得る。

【0038】

このような方法では、この製剤は、患者に1回又は複数回投与され得る。例えば、この製剤は、1日1回、1週間に1回、1カ月に1回、1カ月に2回、2カ月に1回、3カ月に1回、4カ月に1回、5カ月に1回又は6カ月に1回投与され得る。治療スケジュールは、治療に対する患者の応答に応じて、必要に応じて増加又は減少され得る。

40

【0039】

一態様では、製剤は、血管新生関連疾患の1つ又は複数の兆候又は症状が低減されるまで投与される。

【0040】

眼科的状态に関して、この1つ又は複数の兆候又は症状には、血管を収縮する、眼部疾患と関係がある内皮細胞増殖を阻害する、出血の兆候若しくは症状を除去する、不透明な

50

視界を治療する、視力喪失の停止をもたらす、視覚を改善する、視力を改善する、黄斑浮腫を低減する、及び／又は血管漏出を防ぐことが含まれ得るが、これらだけには限られない。

【0041】

癌又は転移に関して、治療は、患者の状態における改善をもたらし得、治療は、1つ又は複数の以下の要因：細胞増殖の低下、細胞数の低下、アポトーシスの増大、又は細胞増殖障害を含む細胞の少なくとも一部分の生存の低下が発生したかどうか決定することによって評価することができる。

【0042】

治療は、腫瘍若しくは転移の部分的若しくは完全な排除及び／又は患者の生存期間の延長をもたらし得る。

10

【0043】

一実施形態では、1つ又は複数の兆候又は症状は、患者への1つ又は複数の用量の製剤の投与後に、重症度又は持続期間において、約2%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約90%、約95%又は約100%低減される。

【0044】

別の実施形態では、1つ又は複数の兆候又は症状は、患者への1つ又は複数の用量の製剤の投与後に、重症度又は持続期間において、約2倍、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約90倍、約95倍、約100倍又はそれ以上低減される。

20

【0045】

本明細書に記載する製剤を患者に投与することを含み、それによって眼科的状态の1つ又は複数の兆候又は症状がこの治療によって改善される、それを必要とする患者において眼科的状态を治療する方法を、本明細書で提供する。製剤の投与は硝子体内投与であり得る。

【0046】

本明細書に記載する製剤を患者に投与することを含み、それによって癌又は転移の1つ又は複数の兆候又は症状が改善される、それを必要とする対象において癌又は転移を予防又は治療する方法もまた、本明細書で提供する。製剤の投与は静脈内投与であり得る。

30

【0047】

本明細書に提供する方法では、治療する対象はヒト又は非ヒト対象であってよい。本明細書に提供する製剤は、患者の健康状態、疾患又は状態の進行、及び治療の有効性に応じて一回又は多数回投与することができる。療法及び治療に対する調節は治療過程を通じて行うことができる（例えば、組成物中の抗体の用量）。

【0048】

本明細書に提供する任意の1つ又は複数の方法の有効性をモニタリングする方法を本明細書で提供する。可溶性CD105のレベルは、癌患者の生存と関連付けられており、治療前及び治療中にモニタリングすることができる。従って、可溶性CD105のレベルは、治療レジメンが患者を治療する際に有効である1つの指標であり得る。本明細書に記載する治療は、1つ又は複数の更なる治療を含み得る。

40

【0049】

参照による組込み

本明細書中に言及する全ての刊行物、特許及び特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許又は特許出願が参照として組み込まれることが具体的且つ個別に示される場合と同程度に、参照として本明細書に組み込まれる。

【0050】

実施形態の新規特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本発明の実施形態

50

の特徴及び利点のより良い理解は、実施形態の原理が利用されている例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照して得ることができる：

【図面の簡単な説明】

【0051】

【図1】図1A～Jは、本明細書に記載する抗CD105抗体（TRC105）の例示的なアミノ酸配列を与える図である。図1Aは、抗CD105抗体の代表的な可変軽（VL）鎖（配列番号1）である；図1Bは、抗CD105抗体の代表的な定常軽鎖（CL）（配列番号2）である；図1Cは、抗CD105抗体の代表的な可変重（VH）鎖（配列番号3）である；図1Dは、抗CD105抗体の代表的な定常 γ -1重鎖（配列番号4）である。図1E～Gは、それぞれVLのCDR1、2及び3を示す。図1H～Jは、それぞれVHのCDR1、2及び3を示す。 10

【0052】

【図2】TGF- β /ALK5シグナル伝達経路のダイアグラムを与える図である。TGF- β /ALK5経路（A）は細胞増殖の阻害をもたらす。TGF- β /ALK1経路（B）は内皮細胞増殖を誘導し、ALK1シグナル伝達にCD105（エンドグリン）を必要とする。点線は不活性又は遮断経路を示す。太い矢印はシグナル伝達経路の刺激を示す。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本明細書で使用する用語は単に個々の実施形態を記載する目的であり、限定的であることを意図するものではないことを理解されよう。更に、本明細書に記載する方法及び材料と類似又は均等ないくつかの方法及び材料は、本発明を実施する際に使用することができることは理解される。 20

【0054】

本出願によれば、当技術分野で完全に説明されるように、従来の細胞生物学、分子生物学、微生物学、及び組換えDNA技法を利用することができる。

【0055】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」及び「この（the）」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数形の言及を含む。従って、例えば、「（1つの）方法」に対する言及には、本明細書に記載する型の及び／又は本開示を読んだ当業者に明らかな、1つ又は複数の方法及び／又はステップを含む。 30

【0056】

抗CD105抗体は、種々の形態の血管新生関連障害を治療又は予防するために使用され得る。本明細書に記載する製剤の投与を介して、種々の形態の癌、固形腫瘍及び転移などを治療又は予防する方法を、本明細書に記載する。

【0057】

抗体に関する用語

本明細書で使用する用語「抗体」は、天然又は部分的若しくは完全に合成によって産生されたものであれ免疫グロブリン（Ig）を指す。この用語は、抗原結合ドメインである、又はそれと相同的である結合ドメインを有する任意のポリペプチド又はタンパク質も含む。この用語は、「抗原結合断片」及び以下に記載するような類似の結合断片に関する他の交換可能な用語を更に含む。 40

【0058】

天然抗体及び天然免疫グロブリンは通常、2つの同一軽鎖（L）及び2つの同一重鎖（H）で構成される、約150,000ダルトンのヘテロ三量体糖タンパク質である。それぞれの軽鎖は典型的には1つの共有ジスルフィド結合によって重鎖と結合するが、一方でジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。それぞれの重鎖と軽鎖は、規則正しく配置した鎖間ジスルフィド架橋も有する。それぞれの重鎖は、一端に可変ドメイン（「V_H」又は「VH」）次にいくつかの定常ドメイン（「C_H」 50

又は「C_H」)を有する。それぞれの軽鎖は、一端に可変ドメイン(「V_L」又は「V_L」)及びその他端に定常ドメイン(「C_L」又は「C_L」)を有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと一直線に並び、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと一直線に並ぶ。個々のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられる。

【0059】

本明細書で使用する用語「合成ポリヌクレオチド」、「合成遺伝子」又は「合成ポリペプチド」は、対応するポリヌクレオチド配列若しくはその一部分、又はアミノ酸配列若しくはその一部分が、設計された、又はde novo合成された、又は修飾された、同等の本来存在する配列に匹敵する配列に由来することを意味する。合成ポリヌクレオチド(抗体若しくは抗原結合断片)又は合成遺伝子は、核酸又はアミノ酸配列の化学合成だけには限られないが、これを含めた当技術分野で知られている方法によって調製することができる。合成遺伝子は典型的には、アミノ酸、又はポリヌクレオチドレベルのいずれか(又は両方)で天然に存在する遺伝子と異なり、典型的には合成発現制御配列の状態内に位置する。合成遺伝子ポリヌクレオチド配列は、天然遺伝子と比較して、タンパク質及び異なるアミノ酸を必ずしもコードすることはできず、例えばそれらは、異なるコドンを取り込むが同じアミノ酸をコードする合成ポリヌクレオチド配列も包含することができる(即ち、ヌクレオチドの変化はアミノ酸レベルでのサイレント突然変異を表す)。

【0060】

抗体に関して、用語「可変ドメイン」は、その個々の抗原に対するそれぞれ個々の抗体の結合及び特異性において使用される抗体の可変ドメインを指す。しかし、可変性は抗体の可変ドメイン全体中に均一に分布されているわけではない。そうではなくて、可変性は軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの両方で(CDRとしても知られる)超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中する。可変ドメインのより高度に保存された部分は「フレーム領域」又は「FR」と呼ばれる。非修飾重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、結合ループ、及びいくつかの場合β-シート構造の一部を形成する3つのCDRと散在する、主にβ-シート形状をとる4個のFR(FR1、FR2、FR3及びFR4)をそれぞれ含有する。それぞれの鎖中のCDRはFRと非常に接近して一緒に保たれ、他の鎖由来のCDRは抗体の抗原結合部位の形成に貢献する(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), pages 647-669を参照)。

【0061】

用語「超可変領域」及び「CDR」は、本明細書で使用する時、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。CDRは、抗原と相補的に結合しV_H及びV_L鎖のそれぞれに関してCDR1、CDR2、及びCDR3として知られる3つの配列領域由来のアミノ酸残基を含む。(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))によれば、軽鎖可変ドメイン中では、CDRは典型的にはおよそ残基24~34(CDR_L1)、50~56(CDR_L2)及び89~97(CDR_L3)に相当し、及び重鎖可変ドメイン中では、CDRは典型的にはおよそ残基31~35(CDR_H1)、50~65(CDR_H2)及び95~102(CDR_H3)に相当する。異なる抗体のCDRは挿入部分を含有する可能性があり、したがってアミノ酸ナンバリングは異なる可能性があることは理解される。Kabatのナンバリングシステムは、特定残基と結びつけた文字(例えば、軽鎖中のCDR_L1の27A、27B、27C、27D、27E、及び27F)を利用するナンバリングスキームを用いてこのような挿入を説明し、異なる抗体間のナンバリング中の任意の挿入を反映する。或いは、Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:9

10

20

30

40

50

01-917 (1987)) によれば、軽鎖可変ドメイン中では、CDRは典型的にはおよそ残基26~32 (CDRL1)、50~52 (CDRL2) 及び91~96 (CDRL3) に相当し、及び重鎖可変ドメイン中では、CDRは典型的にはおよそ残基26~32 (CDRH1)、53~55 (CDRH2) 及び96~101 (CDRH3) に相当する。

【0062】

本明細書で使用する「フレームワーク領域」又は「FR」は、抗原結合のポケット又は溝の一部を形成するフレームワークアミノ酸残基を指す。いくつかの実施形態では、フレームワーク残基は抗原結合のポケット又は溝の一部であるループを形成し、ループ中のアミノ酸残基は抗原と接触することができる、又は接触することができない。フレームワーク領域はCDR間の領域を一般に含む。Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) によれば、軽鎖可変ドメイン中では、FRは典型的にはおよそ残基0~23 (FRL1)、35~49 (FRL2)、57~88 (FRL3)、及び98~109に相当し、及び重鎖可変ドメイン中では、FRは典型的にはおよそ残基0~30 (FRH1)、36~49 (FRH2)、66~94 (FRH3)、及び103~133に相当する。軽鎖に関してKabataのナンバリングを用いて前に論じたように、重鎖も同様の形式で挿入を説明する(例えば、重鎖中のCDRH1の35A、35B)。或いは、Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)) によれば、軽鎖可変ドメイン中では、FRは典型的にはおよそ残基0~25 (FRL1)、33~49 (FRL2) 53~90 (FRL3)、及び97~109 (FRL4) に相当し、及び重鎖可変ドメイン中では、FRは典型的にはおよそ残基0~25 (FRH1)、33~52 (FRH2)、56~95 (FRH3)、及び102~113 (FRH4) に相当する。

【0063】

抗体の定常ドメイン (Fc) は抗体と抗原の結合には直接関与しないが、そうではなくて、例えばFc受容体 (FcR) との相互作用による抗体依存性細胞傷害性における抗体の関与などの、様々なエフェクター機能を示す。Fcドメインは、患者への投与後循環中に、抗体の生物学的利用能を増大することもできる。ヒトFcドメインとマウスFcドメインの置換もHAMA副反応を減らすことができる。

【0064】

その重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスに割り当てることができる。5つの主なクラスの免疫グロブリン、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのいくつかは、サブクラス (アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2に更に分けることができる。異なるクラスの免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメイン (Fc) はそれぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元形状はよく知られている。

【0065】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ又は(「 κ 」) 及びラムダ又は(「 λ 」) と呼ばれる2つの明らかに異なる型の1つに割り当てることができる。

【0066】

用語「抗体の抗原結合部分」、「抗原結合断片」、「抗原結合ドメイン」、「抗体断片」又は「抗体の機能的断片」は、本明細書で交互に使用して、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ又は複数の断片を指す。このような用語内に含まれる抗体断片の非制限的な例には、(i) Fab断片、 V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_{H1} ドメインからなる一価断片、(ii) $F(ab')_2$ 断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFab断片を含有する二価断片、(iii) V_H 及び C_{H1} ドメインからなるFd

断片、(i v) 抗体の1アームの V_L 及び V_H ドメインを含有するFv断片、(v) V_H ドメインを含有するdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)、及び(vi)単離CDRがあるが、これらだけには限られない。この定義中に更に含まれるのは、一本の重鎖と一本の軽鎖を含む「2分の1」抗体である。ダイアボディなどの他の型の単鎖抗体も、本明細書に包含される。

【0067】

「F(ab')₂」及び「Fab'」成分は、ペプシン及びパパインなどのプロテアーゼでIgを処理することによって生成することができ、2本の重鎖それぞれ中のヒンジ領域間に存在するジスルフィド結合付近の免疫グロブリンを消化することによって作製される抗体断片を含む。例えば、パパインは2本の重鎖それぞれ中のヒンジ領域間に存在するジスルフィド結合上流のIgGを切断して、その中において V_L 及び C_L (軽鎖定常領域)で構成される軽鎖と、重鎖の定常領域中の V_H 及び $C_{H\gamma 1}$ ($\gamma 1$)領域で構成される重鎖断片とがジスルフィド結合を介してそれらのC末端領域で結合した、2つの相同的抗体断片を作製する。この2つの相同的抗体断片のそれぞれがFab'と呼ばれる。ペプシンも2本の重鎖それぞれ中のヒンジ領域間に存在するジスルフィド結合下流のIgGを切断して、その中で2つの前述のFab'がヒンジ領域で結合した断片よりわずかに大きい抗体断片を作製する。この抗体断片はF(ab')₂と呼ばれる。

【0068】

Fab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一定常ドメイン(C_{H1})も含有する。抗体ヒンジ領域由来の1つ又は複数のシステイン(単数又は複数)を含めた重鎖 C_{H1} ドメインのカルボキシル末端に数個の残基を加えることによって、Fab'断片はFab断片と異なる。Fab'-SHは、その中で定常ドメインのシステイン残基(単数又は複数)が遊離チオール基を有するFab'に関する本明細書における呼称である。F(ab')₂抗体断片は、本来はその間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

【0069】

「Fv」は、完全抗原認識及び抗原結合部位を含有する抗体断片を指す。この領域は、強力な、非共有又は共有結合状態の1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる(ジスルフィド結合したFv'は当技術分野で記載されている。Reiter et al., (1996) Nature Biotechnology 14:1239-1245)。それぞれの可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、 V_H - V_L 二量体の表面上の抗原結合部位を画定するのは、この形状中である。集合的に、 V_H 鎖及び V_L 鎖のそれぞれ由来の1つ又は複数のCDRの組合せは、抗体に抗原結合特異性を与える。例えばCDRH3及びCDRL3は、レシピエント抗体又はその抗原結合断片の V_H 鎖及び V_L 鎖に移すと、抗体に抗原結合特異性を与えるのに十分である可能性があること、及びCDRのこの組合せは、本明細書に記載する任意の技法を使用して結合、親和性などに関して試験することができることは、例えば理解されよう。1つの可変ドメイン(又は、抗原に特異的なわずか3つのCDRを含むFvの半分)でさえ、第二の可変ドメインと組合せたときよりおそらく低い親和性ではあるが、抗原を認識しそれと結合する能力を有する。更に、Fv断片の2ドメイン(V_L 及び V_H)は別個の遺伝子によってコードされるが、 V_L 及び V_H 領域が対になり一価分子を形成する一本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る組換え法を使用して、それらを接合することができる(単鎖Fvとして知られる(scFv); Bird et al., (1988) Science 242:423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; 及びOsbourne et al., (1998) Nat. Biotechnol. 16:778)。このようなscFvsも、用語抗体の「抗原結合部分」内に包含されると考えられる。特異的scFvの任意の V_H 及び V_L 配列をFc領域cDNA又はゲノム配列と結合させて、完全Ig(例えばIgG)分子又は他のアイソタイプをコードする発現ベクターを作製することが可能である。 V_H 及び V_L は、タンパク質化学又は組換えDNA技術のい

10

20

30

40

50

れかを使用して、F a b、F v又はI gの他の断片の作製において使用することもできる。

【0070】

「単鎖F v」又は「s F v」抗体断片は抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは一本のポリペプチド鎖中に存在する。いくつかの実施形態では、F vポリペプチドはV_HドメインとV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーを更に含み、これはs F vが抗原結合に望ましい構造を形成するのを可能にする。s F vの総説に関しては、例えば、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenburg及びMoore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照。

10

【0071】

用語「AVIMER (商標)」は、抗体及び抗体断片と無関係であり、いくつかのモジューラー、及びAドメイン(クラスAモジュール、相補型反復、又はLDL受容体クラスAドメインとも呼ばれる)と呼ばれる再利用可能結合ドメインで構成される、ヒト起源クラスの治療用タンパク質を指す。それらは、in vitroエクソンシャッフリング及びファージディスプレイによってヒト細胞外受容体ドメインから開発された(Silverman et al., 2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-1494; Silverman et al., 2006, Nat. Biotechnol. 24:220)。生成するタンパク質は、1エピトープ結合タンパク質と比較して改善された親和性(いくつかの場合、ナノモル未満)及び特異性を示す可能性がある、多数の独立した結合ドメインを含有することができる。例えば、その各々が参照として全容が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2005/0221384号、同第2005/0164301号、同第2005/0053973及び同第2005/0089932号、同第2005/0048512号、及び同第2004/0175756号を参照。

20

【0072】

知られている217ヒトAドメインのそれぞれは約35アミノ酸(約4kDa)を含み、これらのドメインは平均5アミノ酸長のリンカーによって隔てられている。天然Aドメインは、カルシウム結合及びジスルフィド形成によって主に仲介される均一な安定構造に、迅速且つ効率よくフォールディングする。わずか12アミノ酸の保存足場モチーフは、この共通構造に必要とされる。最終結果は、そのそれぞれが別個の機能を示す多数のドメインを含有する1タンパク質鎖である。タンパク質のそれぞれのドメインは独立して結合し、それぞれのドメインのエネルギー貢献は付加的である。これらのタンパク質は、親和性多量体からAVIMER (商標)と呼ばれた。

30

【0073】

用語「ダイアボディ」は2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、それらの断片は同じポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン(VL)と結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む(VH-VL)。同じ鎖上において2ドメイン間で対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインを別の鎖の相補ドメインと対形成させ、2つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディは、例えばEP404, 097; WO93/11161; 及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)中により完全に記載される。

40

【0074】

抗原結合ポリペプチドは、例えばラクダ及びサメ由来の抗体などの重鎖二量体も含む。ラクダ及びサメ由来の抗体は、V様ドメインとC様ドメイン(いずれも軽鎖を有さない)の二本鎖のホモ二量体対を含む。ラクダにおける重鎖二量体IgGのV_H領域は軽鎖と疎水性相互作用する必要はないので、軽鎖と通常接触する重鎖中の領域はラクダ中では親水性アミノ酸残基に変わる。重鎖二量体IgGのV_HドメインはV_{H H}ドメインと呼ばれる。サメIg-NARは、1つの可変ドメイン(V-NARドメインと呼ばれる)及び5つ

50

のC様定常ドメイン（C-NARドメイン）のホモ二量体を含む。ラクダでは、抗体レパートリーの多様性は、 V_H 又は V_{HH} 領域中のCDR1、2、及び3によって決定する。ラクダ V_{HH} 領域中のCDR3は、その比較的長い長さ、平均16アミノ酸によって特徴付けられる（Muyldermans et al., 1994, Protein Engineering 7 (9) : 1129）。これは、多くの他種の抗体のCDR3領域と対照的である。例えば、マウス V_H のCDR3は平均9アミノ酸を有する。ラクダの可変領域のin vivo多様性を維持するラクダ由来抗体可変領域のライブラリーは、例えば米国特許出願第20050037421号中に開示された方法によって作製することができる。

【0075】

10

「キメラ」型の非ヒト（例えばマウス）抗体は、非ヒトIg由来の最小配列を含有するキメラ抗体を含む。大部分に関して、キメラ抗体は、その中で少なくとも一部分の免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれが、マウスFcの代わりに挿入されたマウス抗体である。詳細に関しては、Jones et al., Nature 321 : 522-525 (1986) ; Reichmann et al., Nature 332 : 323-329 (1988) ; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2 : 593-596 (1992)を参照。

【0076】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に相同な抗体の集団から得られる抗体を指す。即ち、その集団を含む個々の抗体は、微量で存在し得る考えられる天然突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、1つの抗原部位を対象とする。更に、異なる抗原決定基（エпитープ）を対象とする異なる抗体を含む可能性がある、従来の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、それぞれのモノクローナル抗体は抗原上の1つの抗原決定基を対象とする。修飾語「モノクローナル」は、実質的に相同な抗体の集団から得られる抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするとは解釈すべきでない。例えば、モノクローナル抗体はKohler et al., Nature 256 : 495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができ、又は組換えDNA法によって作製することができる（例えば、米国特許第4,816,567号を参照）。特定の実施形態では、例えばClackson et al., Nature 352 : 624-628 (1991) 及びMarks et al., J. Mol. Biol. 222 : 581-597 (1991)中に記載された技法を使用して、ファージ抗体ライブラリーからモノクローナル抗体を単離することができる。

20

30

【0077】

飽和硫酸アンモニウム沈殿、ユーグロビン沈殿法、カブロン酸法、カプリル酸法、イオン交換クロマトグラフィー（DEAE又はDE52）、又は以下でより詳細に記載するように抗Igカラム又はプロテインA、G若しくはLカラムを使用する親和性クロマトグラフィーによって、前述のように培養上清又は腹水から抗体を単離し精製することができる。

【0078】

40

免疫グロブリン分子の構築時に、可変領域又はその一部分を、1つ又は複数の定常領域又はその一部分と融合、結合、又は他の場合は接合させて、本明細書に記載する任意の抗体を産生することが可能である。これは、分子クローニング技法又は分子をコードする核酸の直接合成だけには限らないが、これらを含めた、当技術分野で知られている様々な方法で実施することができる。

【0079】

本明細書で使用する「免疫反応物質」は、アミノ酸残基の配列（「結合部位」又は「エпитープ」）に特異的である、ただし他のペプチド／タンパク質と交差反応し、それらがヒトへの投与用途のために製剤化されるレベルで毒性ではない場合、結合剤、抗体又はその断片を指す。用語「結合」は、塩架橋及び水架橋などの相互作用及び任意の他の従来結

50

合手段を含めた、例えば生理条件下での共有、静電気、疎水性、並びにイオン及び／又は水素結合相互作用による、2分子間の直接結合を指す。用語「優先的に結合」は、結合剤が、それが無関係なアミノ酸配列と結合するより高い親和性で、結合部位と結合することを意味する。親和性は、無関係なアミノ酸配列に対する結合剤の親和性より、少なくとも1倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも6倍高い、少なくとも7倍高い、少なくとも8倍高い、少なくとも9倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも20倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも40倍高い、少なくとも50倍高い、少なくとも60倍高い、少なくとも70倍高い、少なくとも80倍高い、少なくとも90倍高い、少なくとも100倍高い、又は少なくとも1000倍高い可能性がある。用語「免疫反応性」と「優先的に結合」は本明細書で交互に使用する。

10

【0080】

本明細書で使用する用語「親和性」は、2つの作用物質の可逆的結合に関する平衡定数を指し、 K_d として表す。エピトープに対する抗体の親和性などの、リガンドに対する結合タンパク質の親和性は、例えば約100ナノモル(nM)～約0.1nM、約100nM～約1ピコモル(pM)、又は約100nM～約1フェトモル(fM)であってよい。本明細書で使用する用語「親和力」は、希釈後の解離に対する2つ以上の作用物質の複合体の耐性を指す。見かけの親和性は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)又は当業者が精通している任意の他の技法などの方法によって決定することができる。親和力は、Scatchard解析又は当業者が精通している任意の他の技法などの方法によって決定することができる。

20

【0081】

「エピトープ」は、抗体の可変領域結合ポケットとの結合相互作用を形成することができる、抗原又は他のマクロ分子のその部分を指す。このような結合相互作用は、1つ又は複数のCDRの1つ又は複数のアミノ酸残基との分子間接触として現れる可能性がある。抗原結合は、例えば、CDR3若しくはCDR3対、又はいくつかの場合、 V_H 及び V_L 鎖の最大6個全てのCDRの相互作用を含み得る。エピトープは直線状ペプチド配列(即ち「連続的」)であってよく、又は非隣接アミノ酸配列(即ち、「立体的」又は「不連続」)で構成されてよい。抗体は1つ又は複数のアミノ酸配列を認識することができ、したがってエピトープは2つ以上の異なるアミノ酸配列を画定することができる。抗体によって認識されるエピトープは、当業者によく知られるペプチドマッピング及び配列分析技法によって決定することができる。結合相互作用は、CDRの1つ又は複数のアミノ酸残基との分子間接触として現れる。TRC105は、米国特許第5,928,641号、同第6,200,566号、同第6,190,660号、及び同第7,097,836号中でY4-2F1又はSN6jとして記載されたマウス抗体と同じアミノ酸配列である、マウス抗体である。Y4-2F1及びSN6j、及びしたがってTRC105によって認識されるエピトープは以前に同定されている。

30

【0082】

用語「特異的」は、抗体が、その抗体によって認識されるエピトープを含有する抗原以外の分子といかなる有意な結合も示さない状況を指す。この用語は、例えば抗原結合ドメインが、いくつかの抗原によって保有される特定のエピトープに特異的である場合にも適用可能であり、その場合抗体はそのエピトープを保有する様々な抗原と結合することが可能である。用語「優先的に結合」又は「特異的に結合」は、抗体が、それが無関係なアミノ酸配列と結合するより高い親和性でエピトープと結合すること、及びエピトープを含有する他のポリペプチドと交差反応する場合、それらがヒトへの投与用途のために製剤化されるレベルでは毒性ではないことを意味する。一態様では、このような親和性は、無関係なアミノ酸配列に対する抗体の親和性より、少なくとも1倍高い、少なくとも2倍高い、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも5倍高い、少なくとも6倍高い、少なくとも7倍高い、少なくとも8倍高い、少なくとも9倍高い、少なくとも10倍高い、少なくとも20倍高い、少なくとも30倍高い、少なくとも40倍高い、少なくとも5

40

50

0 倍高い、少なくとも 6 0 倍高い、少なくとも 7 0 倍高い、少なくとも 8 0 倍高い、少なくとも 9 0 倍高い、少なくとも 1 0 0 倍高い、又は少なくとも 1 0 0 0 倍高い。用語「免疫反応性」、「結合」、「優先的に結合」及び「特異的に結合」は本明細書で交互に使用する。用語「結合」は、塩架橋及び水架橋などの相互作用、及び任意の他の従来結合手段を含めた、例えば生理条件下での共有、静電気、疎水性、並びにイオン及び／又は水素結合相互作用による、2 分子間の直接結合を指す。

【0083】

（「実質的に純粋」と交互に使用する）「単離」は、ポリペプチドに適用するとき、本来又は操作によって、（i）発現ベクターの一部分の発現産物として宿主細胞中に存在する、又は（i i）タンパク質又はそれが本来結合する化学成分以外の他の化学成分と結合した、又は（i i i）本来存在しない、例えば、タンパク質が本来見られない形状であるように、タンパク質に少なくとも 1 つの疎水性成分を追加、又は付加することによって化学的に操作したタンパク質である、ポリペプチド又はその一部分を意味する。「単離」によって、（i）化学的に合成された、又は（i i）宿主細胞中で発現され結合及び汚染タンパク質から精製されたタンパク質を更に意味する。この用語は、それらが本来共に存在した他のタンパク質及び核酸から分離されたポリペプチドを一般に意味する。典型的には、それを精製するために使用される抗体又はゲルマトリクス（ポリアクリルアミド）などの物質からも、ポリペプチドは分離される。

【0084】

血管新生に関する用語

本明細書で使用する用語「血管新生阻害」、「血管新生を阻害する」又は「抗血管新生」は血管発生の阻害を含み、新血管形成の程度、量、又は割合の低下に影響を与えることを意味するものとする。組織中の内皮細胞増殖若しくは移動の程度、量、又は割合の低下に影響を与えることは、血管新生阻害の具体例である。

【0085】

用語「血管新生阻害組成物」は、内皮細胞移動、増殖、血管形成などの血管新生仲介プロセスを阻害し、その後既存の血管からの新しい血管の発生の阻害をもたらし、結果として血管新生依存的状態に影響を与える組成物を指す。

【0086】

本明細書で使用する用語「血管新生依存的状態」は、血管新生又は血管発生のプロセスが病的状態を維持若しくは増大し、又は正常な生理的プロセスに有利に影響を与える状態を意味するものとする。したがって、血管新生が病的状態を維持する血管新生依存的状態の治療は疾患の鎮静をもたらすことが可能であり、一方で血管新生が正常な生理的プロセスに有利に影響を与える血管新生依存的状態の治療は、例えば正常プロセスの向上をもたらす可能性がある。

【0087】

血管新生とは、既存の毛細管又は後毛細管細静脈からの新しい血管の形成である。血管発生は、内皮細胞前駆体である血管芽細胞から生じる新しい血管の形成が原因である。いずれのプロセスも新しい血管の形成をもたらす、用語血管新生依存的状態の意味の中に含まれる。本明細書で使用する用語「血管新生」は、血管発生から生じる血管新生、及び既存の血管、毛細管及び細静脈の枝分かれ又は簇出から生じる血管新生などの、血管の d e n o v o 形成を含むものとする。血管新生は、A L K 1 シグナル伝達及び関連 S m a d 1 / 5 / 8 リン酸化及び／又はシグナル伝達の誘導も含むことができる。C D 1 0 5 も A L K 1 シグナル伝達経路に関与することが知られており、したがってこれも血管新生の意味の中に含まれる。

【0088】

腫瘍開始 C D 1 0 5 + 細胞集団はヒト腎臓癌中で発見されている。C D 1 0 5 + 細胞は、他の腫瘍型中に存在する癌幹細胞に関して以前に記載された腫瘍幹細胞の特徴を示した。観察された C D 1 0 5 + 細胞はクローン原性であり、幹細胞マーカーを発現し、分化マーカーを欠いており、i n v i t r o で上皮及び内皮細胞型に分化する可能性があり、

10

20

30

40

50

i n v i v oで連続移植可能な腫瘍を生成する可能性がある。これらの腫瘍は、間葉系マーカーを発現するクローンに由来するにもかかわらず腫瘍源としての上皮癌であり、C D 1 0 5 + 腫瘍原性集団の維持によって、及び非腫瘍原性の分化したC D 1 0 5 集団の存在によって特徴付けられる。

【0089】

「宿主の免疫応答の誘導」は、患者が疾患の兆候又は症状の緩和又は低減を経験することを意味し、具体的には、生存期間の延長を非制限的に含む。

【0090】

本明細書で使用する用語「増殖障害」及び「増殖状態」は、異常又は望ましくない増殖によって特徴付けられる任意の病的又は非病的生理状態を意味する。用語「細胞増殖障害」及び「細胞増殖状態」は、異常又は望ましくない細胞増殖によって特徴付けられる任意の病的又は非病的生理状態を意味し、且つ望ましくない又は望まない細胞増殖又は細胞生存（例えば、欠損アポトーシスが原因）によって特徴付けられる状態、欠損又は異常又は欠損アポトーシスによって特徴付けられる状態、及び異常又は望ましくない又は望まない細胞生存によって特徴付けられる状態を含む。用語「分化障害」は、異常又は欠損分化によって特徴付けられる任意の病的又は非病的生理状態を意味する。

【0091】

治療の影響を受けやすい増殖又は分化障害は、異常又は望ましくない細胞数、細胞増殖又は細胞生存によって特徴付けられる、良性及び新生物性の疾患状態を含む。したがって、このような障害又は状態は疾患状態を構成する可能性があり、全ての型の癌増殖又は発癌プロセス、転移性組織又は悪性形質転換細胞、組織、又は器官を含む。

【0092】

増殖又は分化障害を含む細胞は細胞塊に凝集する、又は散在する可能性がある。「非固形腫瘍」は、リンパ腫、ミエローマ及び白血病、又は本来広汎性の新形成などの、造血系の新形成を指す。それらは典型的には固形塊を形成しないからである。白血病の個々の例には、例えば、急性及び慢性リンパ性白血病、骨髓芽球性及び多発性骨髓腫がある。

【0093】

用語「固形腫瘍」は、典型的には1つに凝集し塊を形成する新形成又は転移を指す。このような障害は、ほぼ任意の細胞又は組織型に影響を与える可能性がある新生物又は癌、例えば癌腫、肉腫、メラノーマ、転移性障害又は造血系新形成障害を含む。転移性腫瘍は、乳房、肺、甲状腺、頭頸部、脳、リンパ、胃腸（口、食道、胃、小腸、結腸、直腸）、尿生殖器官（子宮、卵巣、子宮頸部、膀胱、睪丸、陰茎、前立腺）、腎臓、脾臓、肝臓、骨、筋肉、皮膚などだけには限られないが、これらを含めた多数の原発性腫瘍型から生じる可能性がある。

【0094】

癌腫は上皮又は内分泌組織の悪性腫瘍を指し、呼吸系癌腫、胃腸系癌腫、尿生殖器系癌腫、睪丸癌腫、乳癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、及びメラノーマを含む。例示的な癌腫には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸、肝臓及び卵巣から形成される癌腫がある。この用語は、例えば癌腫及び肉腫組織で構成される悪性腫瘍を含む、癌肉腫も含む。腺癌は、腺組織の癌腫、又は腫瘍が腺様構造を形成する癌腫を含む。

【0095】

治療する癌性組織は、例えば、異常なレベルのC D 1 0 5を発現する内皮組織又は形質転換細胞である。本明細書で使用する用語「形質転換細胞」は、無制限な増殖の状態に自然に転換されている細胞を指し、即ちそれらは、培養中に無限数の分裂によって増殖する能力を獲得している。形質転換細胞は、それらの増殖制御の消失に関して新形成、退形成及び／又は過形成などの用語によって特徴付けることができる。本発明の目的で、用語「悪性哺乳動物細胞の形質転換した表現型」及び「形質転換した表現型」は、哺乳動物細胞の細胞形質転換、不死化、形態的又は増殖形質転換、及び細胞培養中の長期増殖、半固形培地中での増殖、又は免疫不全若しくは同系動物中での発癌性増殖によって検出される発癌性との関係がある以下の表現型形質のいずれかだけには限られないが、これらを含むもの

とする。

【0096】

用語「腫瘍細胞抗原」は、無関係な腫瘍細胞、正常細胞、又は正常体液より、腫瘍細胞上又は体液中に多量に存在する抗原として本明細書では定義する。抗原の存在は当業者に知られている任意の数のアッセイによって試験することができ、ELISAアッセイ、ラジオイムノアッセイ、又はウエスタンブロットなどの、抗体を用いた陰性及び／又は陽性選択を非制限的に含む。

【0097】

用語「アポトーシス」又は「プログラムされた細胞死」は、それによって望まない若しくは無用な細胞が、発生及び他の正常な生物学的プロセス中に除去される生理プロセスを指す。アポトーシスは、正常な生理条件下で起こる細胞死の一形態であり、細胞は自己の消滅への積極的な参加者である（「細胞の自殺」）。アポトーシスは、正常な細胞ターンオーバー及び組織ホメオスタシス、胚発生、免疫寛容の誘導及び維持、神経系の発生及びエンドグリン依存性組織萎縮中に最も頻繁に見られる。アポトーシスを経る細胞は、特徴的な形態的及び生化学的特徴を示す。これらの特徴には、クロマチン凝集、核及び細胞質濃縮、リボソーム、形態学的に完全なミトコンドリア及び核物質を含有する膜結合小胞（アポトーシス体）への細胞質及び核の分配がある。in vivoにおいて、これらのアポトーシス体は、マクロファージ、樹状細胞又は隣接上皮細胞により迅速に認識され貪食される。in vivoでアポトーシス細胞を除去するのに有効なこのメカニズムのため、炎症応答が誘導されることはない。in vitroにおいて、アポトーシス体及び残りの細胞断片は、結局膨張し最終的に溶解する。このin vitro細胞死の末期は「第二次壊死」と呼ばれている。DNA断片化、アネキシンVの露出、カスパーゼの活性化、シトクロームcの放出などのような当業者に知られている方法によって、アポトーシスを測定することができる。死を誘導されている細胞は、本明細書では「アポトーシス細胞」と呼ぶ。

【0098】

「アポトーシス誘導剤」は、アポトーシス／プログラムされた細胞死を誘導すると本明細書では定義し、例えば、細胞、例えば腫瘍細胞又は内皮細胞がプログラムされた細胞死を経るように誘導する、抗CD105抗体、抗VEGF抗体、照射、化学療法剤又は受容体リガンド剤を含む。例示的なアポトーシス誘導剤は以下でより詳細に記載する。

【0099】

アポトーシスは、標準的なアネキシンVアポトーシスアッセイを使用して試験することができる。NIH：OVCAR-3細胞を6ウェルプレート（NUNC）中で増殖させ、4～48時間アントゴニスト（又は別の抗癌剤と併用して）で照射又は処理し、洗浄し、1時間アネキシンV-FITC（BD-Pharmingen）で染色する。細胞はフローサイトメトリー（Becton-Dickinson、CellQuest）によって分析し、ヨウ化プロピジウムで対比染色し、フローサイトメーターで再度分析する。

【0100】

抗体を作製及び発現する方法

キメラ免疫グロブリンが遺伝子操作によって構築されている。以前に記載された大部分のキメラ免疫グロブリンは、マウスモノクローナル抗体由来のV_H及びV_L並びにヒト抗体のC_L及びFcを含んでいる。本明細書に記載する任意のアイソタイプ由来のFc領域を使用することができる。本明細書に記載するように、キメラは、それによって軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変鎖のフレームワーク中の限られた数のアミノ酸が修飾されて、抗体の親和性が増大する基準も含み得る。

【0101】

一般にキメラ抗体は、ヒト療法における用途に関して、マウス抗体に優るいくつかの考えられる利点を有する。抗体のエフェクター部分はヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分とより良く相互作用する（例えば、補体依存性細胞傷害作用（CDC）又は抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）によってより効率よく標的細胞を破壊する）と考えられる。更

に、ヒト免疫系は外来としてキメラ抗体の定常領域を認識しないはずであり、したがって、このような注射抗体に対する抗体応答は、典型的には、全く外来のマウス抗体に対する応答未満であるはずである。最後に、マウス抗体は、ヒト抗体の半減期よりはるかに短いヒト循環中の半減期を有することが知られている。おそらくキメラ抗体は、本来存在するヒト抗体と更に類似した半減期を有する可能性があり、より少量で低頻度の投与を与えることを可能にする。

【0102】

抗体の高い親和性が望ましいとき、抗体のCDR内の残基を、他のアミノ酸で更に置換することができる。典型的には、CDR中の4個を超えないアミノ酸残基が変わり、最も典型的には、重鎖CDR2を除いたCDR中の2個を超えない残基が変わり、この場合10個もの多くの残基が変わる可能性がある。親和性の変化は、本明細書に記載する方法などの従来の方法（例えば、Biacore）によって測定することができる。

10

【0103】

抗体は、当技術分野で知られている従来技法を使用して構築及び産生することができる。更に、特に高レベルの発現ベクターを利用するとき、組換え調製抗体をしばしば多量に産生することができる。

【0104】

獣医学的用途のため、非ヒトFcを使用することによって、非ヒト（例えば、霊長類、ウシ、ウマ、ブタなど）への投与用に抗体を合成することができる。

【0105】

制限エンドヌクレアーゼ部位において組換え技法を使用して、アミノ酸配列をコードするヌクレオチドを修飾するために、本明細書で提供し組み込む技法などの当技術分野で認められる技法を使用することができる。

20

【0106】

発現用に、発現系は、選択可能マーカーとしてグルタミンシンテターゼ遺伝子を使用してGS系(Lonza)を利用する発現系である。簡単に言うと、選択可能マーカーとしてグルタミンシンテターゼ遺伝子を使用しGS系(Lonza)を使用して、エレクトロポレーション(250V)によりCHO細胞においてトランスフェクションを実施する。野生型CHO細胞を、10%透析ウシ胎児血清(FCS)及び2mMグルタミンを含有するDMEM(Sigma)中で増殖させる。6×10⁷個のCHO細胞を、エレクトロポレーションによって300μgの線状DNAでトランスフェクトする。エレクトロポレーション後、細胞はグルタミンを含むDMEM中に再懸濁し、36×96ウェルプレート(50μl/ウェル)に平板培養し、5%CO₂中で37℃においてインキュベートする。翌日、150μl/ウェルの選択培地(グルタミンを含まないDMEM)を加える。約3週間後、陰性対照として無関係な抗体を使用して、ELISA(以下参照)によってコロニーをスクリーニングする。20μg/mlより多く産生する全てのコロニーは24ウェルプレート、次に二連のT25フラスコに増殖させる。

30

【0107】

高レベルの産生用に、広く使用される哺乳動物発現系は、デヒドロ葉酸レダクターゼ欠損(「dhfr-」)チャイニーズハムスター卵巣細胞によってもたらされる遺伝子増幅手順を利用する発現系である。この系は、テトラヒドロ葉酸へのデヒドロ葉酸の転換を触媒するDHFR酵素をコードする、デヒドロ葉酸レダクターゼ「dhfr」遺伝子に基づく。高い産生を得るために、dhfr-CHO細胞を、機能性DHFR遺伝子、及び所望のタンパク質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターでトランスフェクトする。この場合、所望のタンパク質は組換え抗体重鎖及び/又は軽鎖である。

40

【0108】

競合DHFR阻害剤メトトレキサート(MTX)の量を増大することによって、dhfr遺伝子を増幅することにより、組換え細胞は耐性が発達する。標準的な場合、利用する増幅単位はdhfr遺伝子のサイズよりはるかに大きく、結果として抗体重鎖が同時に増幅される。

50

【0109】

抗体鎖などのタンパク質の大規模産生が望ましいとき、利用する細胞の発現レベルと安定性の両方を考慮に入れる。長期培養中、組換えCHO細胞集団は、それらが片親クローンに由来するときでさえ、増幅中にそれらの特異的抗体産生に関する均一性を失う。

【0110】

本出願は、本明細書に記載する抗体又はその一部分をコードする単離ポリヌクレオチド（核酸）、このようなポリヌクレオチドを含有するベクター、並びにポリペプチドにこのようなポリヌクレオチドを転写及び翻訳するための宿主細胞及び発現系を提供する。

【0111】

本出願は、前述の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの型の構築物も提供する。

10

【0112】

本出願は、前述の1つ又は複数の構築物を含む組換え宿主細胞も提供する。本明細書に記載する任意の抗体をコードする核酸は本出願の一態様を形成し、そのコード核酸からの発現を含む抗体の産生法も同様である。適切な条件下で核酸を含有する組換え宿主細胞を培養することによって、発現を好都合に実施することができる。発現による産生後、抗体又はその一部分は、任意の適切な技法を使用して単離及び／又は精製することができ、次いで必要に応じて使用することができる。

【0113】

特異的抗体（又はその一部分）をコードする核酸分子及び本明細書に記載するそれらを含有するベクターは、例えばそれらの本来の環境から、実質的に純粋又は均質な形態で、単離及び／又は精製して提供することができる。核酸の場合は、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の、元の核酸又は遺伝子を含まない又は実質的に含まない。核酸配列はDNA又はRNAを含むことができ、完全又は部分的に合成状態であってよい。精製の方法は当技術分野でよく知られている。

20

【0114】

様々な異なる宿主細胞中でのポリペプチドのクローニング及び発現のための系はよく知られている。適切な宿主細胞は、細菌、哺乳動物細胞、酵母及びバキュロウイルス系を含む。異種ポリペプチドの発現に関して当技術分野で利用可能な哺乳動物細胞系には、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NS0マウスミエローマ細胞及びその他多くがあるが、これらだけには限られない。

30

【0115】

広く様々な単細胞宿主細胞もDNA配列の発現において有用である。これらの宿主は、よく知られている真核生物及び原核生物宿主、大腸菌（*E. coli*）、シュードモナス（*Pseudomonas*）、バシラス（*Bacillus*）、ストレプトミセス（*Streptomyces*）の株など、酵母などの真菌、及びCHO、YB/20、NS0、SP2/0、R1.1、B-W及びL-M細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞（例えば、COS1、COS7、BSC1、BSC40、及びBMT10）などの動物細胞、昆虫細胞（例えばSf9）、並びに組織培養中のヒト細胞及び植物細胞を含む。

【0116】

大腸菌などの原核生物細胞中での抗体又はその一部分の発現は、当技術分野で十分確立している。総説に関しては、例えば、Pluckthun、A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)を参照。

40

【0117】

培養中の真核生物細胞中での発現も、本明細書に記載する抗体の産生に関する選択肢として当業者には利用可能である。最新の総説に関しては、例えば、その各々が参照として全容が本明細書に組み込まれる、Raff, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J. J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560を参照。

【0118】

50

プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及び必要に応じて他の配列を含めた適切な制御配列を含有する、適切なベクターを選択又は構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス、例えばファージ、又はファージミドであってよい。更なる詳細に関しては、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。例えば核酸構築物の調製において核酸を操作するための、多くの知られている技法及びプロトコル、突然変異誘発、配列決定、細胞中へのDNAの導入及び遺伝子発現、及びタンパク質の分析は、Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992中に詳細に記載される。Sambrook et al及びAusubel et alの方法の開示は参照として全容が本明細書に組み込まれ、当技術分野でよく知られている。

【0119】

したがって、更なる態様は、本明細書で開示する核酸を含有する宿主細胞を提供する。別の更なる態様は、宿主細胞にこのような核酸を導入することを含む方法を提供する。導入は任意の利用可能な技法を利用することができる。真核生物細胞に関して、適切な技法は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、レトロウイルス又は他のウイルス、例えばワクシニア、又は昆虫細胞用にバキュロウイルスを使用するリポソーム仲介トランスフェクション及び形質導入を含むことができる。細菌細胞に関して、適切な技法は、例えば、バクテリオファージを使用する、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション及びトランスフェクションを含むことができる。

【0120】

例えば遺伝子発現用の条件下で宿主細胞を培養することによって、核酸からの発現を発生又は可能にした後に導入を続けることができる。

【0121】

一実施形態では、核酸を宿主細胞のゲノム（例えば染色体）に組み込む。標準的な技法に従いゲノムでの組換えを促進する配列を封入することによって、組込みを促進することができる。Igエンハンサーを必要に応じて初期化して発現を最大にすることができる。

【0122】

本出願は、発現系中で前述の構築物を使用して前述の抗体（又はその一部分）を発現させることを含む方法も提供する。

【0123】

本出願は、CD105と結合する抗体をコードする、組換えDNA分子又はクローン遺伝子、又はその変性変異体、突然変異体、アナログ、又はその断片などの単離核酸にも関する。

【0124】

更なる実施形態では、本明細書に記載する抗体又はその一部分の組換えDNA分子又はクローン遺伝子の完全DNA配列を、適切な宿主中に導入することができる発現制御配列に作動可能に連結させることが可能である。したがって本出願は、抗体のV_H、V_L、C_L及び／又はFcをコードするDNA配列を含むクローン遺伝子又は組換えDNA分子で形質転換した単細胞宿主に広がる。

【0125】

別の特徴は、本明細書に開示するDNA配列の発現である。当技術分野でよく知られているように、DNA配列を適切な発現ベクター中の発現制御配列に作動可能に連結させ、その発現ベクターを利用して適切な単細胞宿主を形質転換することによって、DNA配列を発現させることが可能である。

【0126】

発現制御配列とDNA配列のこのような作動可能な連結は、当然ながら、すでにDNA配列の一部ではない場合、DNA配列の上流において適切なリーディングフレームで、開始コドン、ATGを与えることを含む。

【0127】

ポリヌクレオチド及びベクターは、単離及び／又は精製型で提供することができる（例えば、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド以外の、元のポリヌクレオチドを含まない又は実質的に含まない）。本明細書で使用する、「実質的に純粋」及び「実質的に含まない」は、例えば約20%以下の異物、約10%以下の異物、約5%以下の異物、約4%以下の異物、約3%以下の異物、約2%以下の異物、又は約1%以下の異物を含有する溶液又は懸濁液を指す。

10

【0128】

広く様々な宿主／発現ベクターの組合せを、本発明のDNA配列の発現において利用することができる。有用な発現ベクターは、例えば染色体、非染色体及び合成DNA配列のセグメントからなる可能性がある。適切なベクターには、SV40及び知られている細菌プラスミドの誘導体、例えば大腸菌プラスミドcolE1、Pcr1、Pbr322、Pmb9及びそれらの誘導体、RP4などのプラスミド、ファージDNA、例えばファージλ、例えばNM989の多数の誘導体、及び他のファージDNA、例えばM13及び繊維状単鎖ファージDNA、酵母プラスミド、2uプラスミド又はその誘導体など、真核生物細胞中で有用なベクター、昆虫又は哺乳動物細胞中で有用なベクターなど、プラスミドDNAとファージDNAの組合せに由来するベクター、ファージDNA又は他の発現制御配列などを利用するように修飾されたプラスミドなどがあるが、これらだけには限られない。

20

【0129】

1つ又は複数のポリヌクレオチド構築物を含む組換え宿主細胞も本明細書で提供する。本明細書で提供する抗体をコードするポリヌクレオチドは本出願の一態様を形成し、1つ又は複数のポリヌクレオチドからの発現を含む抗体の産生法も同様である。例えば、適切な条件下でポリヌクレオチドを含有する組換え宿主細胞を培養することによって、発現を実施することができる。次いで抗体は任意の適切な技法を使用して単離及び／又は精製することができる。

【0130】

任意の広く様々な発現制御配列、それと作動可能に連結したDNA配列の発現を制御する配列をこれらのベクター中で使用して、DNA配列を発現させることが可能である。このような有用な発現制御配列には、例えば、SV40、CMV、ワクシニア、ポリオーマ又はアデノウイルス、lac系、trp系、TAC系、TRC系、LTR系の初期又は後期プロモーター、ファージλの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖系酵素に関するプロモーター、酸性ホスファターゼ（例えばPho5）のプロモーター、酵母アルファ接合因子のプロモーター、及び原核生物又は真核生物細胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、及びそれらの様々な組合せがある。

30

【0131】

全てのベクター、発現制御配列及び宿主が、十分等しく機能して、DNA配列を発現するわけではないことは理解されよう。全ての宿主が、同じ発現系で十分等しく機能するわけでもない。しかし当業者は、本出願の範囲から逸脱せずに、過度の実験なしで適切なベクター、発現制御配列及び宿主を選択して、望ましい発現を実施することが可能である。例えばベクターを選択する際に、宿主は考慮しなければならない。ベクターはその中で機能しなければならないからである。ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、及び抗体マーカーなどのベクターによってコードされる任意の他のタンパク質の発現も考慮する。当業者は、本出願の範囲から逸脱せずに、適切なベクター、発現制御配列及び宿主を選択して、望ましい発現を実施することが可能である。例えばベクターを選択する際には、宿主を考慮する。ベクターはその中で機能するからである。ベクターのコピー数、

40

50

そのコピー数を制御する能力、及び抗体マーカーなどのベクターによってコードされる任意の他のタンパク質の発現も考慮することができる。

【0132】

本出願は、前述の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む、本明細書中の他の箇所に記載するプラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの型の構築物も提供する。プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子及び必要に応じて他の配列を含めた適切な制御配列を含有する、適切なベクターを選択又は構築することができる。ベクターは、必要に応じて、プラスミド、ウイルス、例えばファージ、ファージミドなどであってよい。更なる詳細に関しては、例えば、*Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd edition*, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照。例えば核酸構築物の調製において核酸を操作するための、多くの知られている技法及びプロトコル、突然変異誘発、配列決定、細胞中へのDNAの導入及び遺伝子発現、及びタンパク質の分析は、*Short Protocols in Molecular Biology, Second Edition*, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992中に詳細に記載される。Sambrook et al及びAusubel et alの方法及び開示は参照として本明細書に組み込まれる。

10

【0133】

発現制御配列を選択する際に、様々な要因が通常考慮される。これらは、例えば、系の相対的な強さ、その制御能力、及び発現される特定DNA配列又は遺伝子との、特に考えられる二次構造に関するその適合性を含む。適切な単細胞宿主は、例えば、選択したベクターとのそれらの適合性、それらの分泌特性、タンパク質を正確にフォールディングするそれらの能力、及びそれらの発酵要件、及び発現されるDNA配列によってコードされる産物の宿主に対する毒性、及び発現産物の精製し易さを考慮して選択される。

20

【0134】

更なる態様は、本明細書で開示する1つ又は複数のポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を提供する。別の更なる態様は、任意の利用可能な技法によって、宿主細胞にこのような1つ又は複数のポリヌクレオチドを導入することを含む方法を提供する。真核生物細胞に関して、適切な技法は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、レトロウイルス又は他のウイルス（例えばワクシニア）、又は昆虫用にバキュロウイルスを使用するリボソーム仲介トランスフェクション及び形質導入を含むことができる。細菌細胞に関して、適切な技法は、例えば、バクテリオファージを使用する、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション及びトランスフェクションを含むことができる。

30

【0135】

例えば1つ又は複数のポリヌクレオチドからの1つ又は複数のポリペプチドの発現用の条件下で宿主細胞を培養することによって、1つ又は複数のポリヌクレオチドからの発現を発生又は可能にした後に導入を続けることができる。誘導系を使用することができ、発現は活性剤を加えることによって誘導することができる。

40

【0136】

一実施形態では、ポリヌクレオチドを宿主細胞のゲノム（例えば染色体）に組み込むことができる。標準的な技法に従いゲノムでの組換えを促進する配列を封入することによって、組込みを促進することができる。別の実施形態では、宿主細胞中のエピソームベクター上に核酸を維持する。

【0137】

発現系中で前述の構築物を使用して特定ポリペプチドを発現させることを含む方法を、本明細書で提供する。

【0138】

これら及び他の要因を考慮して、当業者は、発酵又は大規模動物培養においてDNA配

50

列を発現する様々なベクター／発現制御配列／宿主の組合せを構築することが可能である。

【0139】

抗体又はその一部分をコードするポリヌクレオチドは、クローニングに加えて、又はクローニングではなく、組換えによって／合成によって調製することができる。適切なコドンを用いてポリヌクレオチドを設計することができる。一般に、配列が発現に使用される場合、目的の宿主に好ましいコドンを選択する。完全なポリヌクレオチドは、標準的な方法によって調製した重複オリゴヌクレオチドから構築することができ、完全なコード配列に構築することができる。例えば、Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambair et al., Science, 223:1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259:6311 (1984)を参照。

10

【0140】

抗体（又はその一部分）コード核酸と選択したアミノ酸位置変化の同時的取込みは、例えば組換え及び化学合成を含めた、当業者に知られる様々な方法によって実施することができる。

【0141】

抗CD105抗体

エンドグリン（CD105）は、180kDaのホモ二量体膜貫通タンパク質として細胞表面上で発現される。外部ドメインは高い親和性（50nM）でTGF-β1及び-3アイソフォームと結合し、CD105の膜貫通ドメインと細胞内ドメインはベータグリカンと71%の配列類似性を共有する。ヒトCD105遺伝子は染色体9q34上に位置し、蛍光in situハイブリダイゼーションを使用して同定され、コード領域は14のエクソンを含有し、TGF-βと結合する能力を有するCD105の2つの異なるアイソフォーム（L及びS）が特徴付けされている。600アミノ酸残基及び14アミノ酸細胞質尾部からなるS-CD105に対して、L-CD105は633アミノ酸残基及び47アミノ酸残基細胞質尾部からなる。しかし、L-CD105が主要型である。CD105は内皮細胞中、主にセリン及びスレオニン残基では構成的にリン酸化されており、このリン酸化は細胞内の構成的に活性があるTGF-βRIIによるものである。CD105とTGF-βの結合は、タンパク質キナーゼC阻害剤で見られる影響と類似した、リン酸化の下方制御をもたらす。ヒトCD105アミノ酸配列は、細胞外ドメインの露出領域中に位置するトリペプチドアルギニン-グリシン-アスパラギン酸（RGD）を含有する。RGDペプチドは、フィブロネクチン、ビトロネクチン、フォンヴィレブランド因子（vWF）、I型コラーゲン、及びフィブリノゲンなどのECMタンパク質において見られる重要な認識構造であり、細胞表面インテグリンによって認識される。インテグリン接着は、ホメオスタシス、血栓症、血管新生及び炎症、内皮が重要な役割を果たすプロセスと関係している（Duff et al., FASEB J., 17:984-992 (2003)）。

20

30

【0142】

CD105は、増殖内皮細胞によって発現されるTGF-β受容体ファミリーのメンバーである。正常レベルのCD105が内皮細胞増殖に必要とされる。CD105の発現は、低酸素誘導因子-1-α（HIF-1-α）の生成を介した細胞の低酸素状態によって増大し、アポトーシスから低酸素細胞を保護する。CD105のいくつかの機能はTGF-βシグナル伝達と関係がある。TGF-βは、セリンキナーゼ、受容体I（RI）、及び受容体II（RII）からなるヘテロ二量体受容体を介してシグナル伝達する。受容体の外部ドメインとTGF-βの結合は、TGF-βRIをリン酸化し、したがってSmadタンパク質などの下流シグナル伝達物質と相互作用することができる細胞質RIIキナーゼ活性を除去する。CD105はTGF-β受容体複合体の一部を形成するが、それは細胞表面上で独立して存在することができる。in vitroでは多くの細胞中で、CD105はTGF-βシグナル伝達を抑制する。

40

50

【0143】

CD105は、アクチビンA及び骨形成タンパク質（BMP）-10、-9、-7及び-2などの他の増殖因子とも結合する。CD105とTGF- β 又は増殖因子リガンドの結合は少なくとも受容体RIIの存在を必要とし、それはひとりでにリガンドと結合することはできない。受容体とCD105結合が、リガンド自体に対するそれらの親和性を変えることはない。結合によって、CD105の細胞質ドメインはTGF- β RI及びTGF- β RII、次いでTGF- β RIIではなくTGF- β RIによってリン酸化され、キナーゼは受容体複合体から解離する。

【0144】

CD105の発現はTGF- β RIIのリン酸化レベルを阻害するが、TGF- β RIのそれは増大させ、Smad3ではなくSmad2の増大したリン酸化をもたらす。Smad2は様々な転写因子、コアクチベーター、及び抑制物質と相互作用することができるので、リン酸化したSmad2は、遺伝子転写を調節する多重シグナルのインテグレーターとして作用することができる。したがって、CD105はTGF- β RI及びTGF- β RIIとの相互作用によってTGF- β 機能を調節し、下流Smadタンパク質のリン酸化を改変する。

【0145】

CD105は、TGF- β 受容体（TGF- β R）、アクチビン受容体様キナーゼ（ALK）及びアクチビン受容体を含めた、TGF- β スーパーファミリーの多数のキナーゼ受容体複合体のシグナル伝達を調節するために作用する。CD105の不在下において、TGF- β 受容体の活性化は、内皮細胞増殖を阻害するSMADタンパク質（SMAD2及び3）のリン酸化をもたらす。しかし、TGF- β によるCD105の活性化は、（SMAD1、5及び8のリン酸化を含めた）SMADタンパク質のリン酸化を調節する。最終結果は、内皮細胞に対するTGF- β 受容体活性化の増殖阻害効果の表れである（図2参照）。驚くべきことではないが、抗CD105抗体又はアンチセンスオリゴヌクレオチドによるCD105活性化の防止は、TGF- β と共同作用して内皮細胞の増殖を抑制する。

【0146】

CD105プロモーターは2.6kb長であるが、TATA又はCAAT転写開始ボックスは含有しない。しかし、それは2つのGC多量領域、Sp1、ets、GATA、AP-2、NGF- β 、及びMadのコンセンサスモチーフ、並びにTGF- β 応答エレメントを有する。それにもかかわらず、CD105は比較的制限された細胞分布を有する。基底レベルの転写は、位置-68にets部位、及びSp1部位を必要とするようであるが、例えば内皮細胞に対する発現の相対的制限は、多数の制御領域、特に-1294~-932における領域、及び転写開始部位と非常に近い別の領域と関係があるようである。CD105はTGF- β によって上方制御され、これは-37~-29におけるSp1部位を必要とし、（TGF- β シグナル伝達によって活性化される）Smads3及び/又は4と結合した1つ又は複数の並列した上流SBE部位とも関係があることが示されている。低酸素は虚血組織及び腫瘍の一般的な特徴であり、血管内皮細胞（EC）中でのCD105遺伝子発現の強力な刺激物質である。このような効果はTGF- β 1を併用して高まる。上方制御されたCD105は、EC中で低酸素ストレス下において自己防御の役割を果たすことができる。

【0147】

血管ECはCD105の主な供給源である。血管平滑筋細胞、線維芽細胞、マクロファージ、前B及び骨髓単球起源の白血病細胞、及び赤血球前駆体を含めた他の細胞型は、CD105を低い程度で発現する。

【0148】

CD105は血管新生に関与する。アンチセンス実験は、HUVEC中でのCD105発現の抑制はTGF- β 1と併用してin vitro血管新生の顕著な阻害をもたらすことを実証しており、CD105は内皮細胞中では血管新生促進成分であることを示す。

血管新生におけるCD105の重要な役割の更なる証拠は、CD105ノックアウトマウスに由来する。CD105欠損マウスは、初期胚段階で死をもたらす血管多重欠損及び心多重欠損を示す。CD105欠損マウス中で観察されるいくつかの血管障害は、CD105は胚外脈管構造中の成熟血管の形成に必要とされることを示し、血管新生におけるCD105の直接的役割が更に確認される。

【0149】

特にエンドグリン又はedg-1としても知られるCD105は、増殖血管内皮細胞において高レベルで発現されるI型ホモ二量体膜糖タンパク質である。したがって、CD105は主に、活性血管新生を経る内皮細胞の増殖関連マーカーである。しかし、正常組織の血管内皮によるCD105の限られた発現が存在する可能性がある。ヒトCD105は

10

【0150】

CD105は腫瘍血管系を減らす抗体ベースの方法における標的となっている。CD105は、内皮及び白血病細胞上の増殖関連抗原であるからである。その発現は腫瘍関連血管内皮中で上方制御され、CD105は血管新生に必要不可欠である。血管新生は、新血管形成をもたらす新しい毛細血管の形成、及び既存の血管系の維持を含む。それは、血管基底膜及び間質性マトリクスの内皮細胞伸介分解、内皮細胞の移動、内皮細胞の増殖、及び内皮細胞による毛細血管ループの形成を含む、一連の連続ステップを含む複雑なプロセスである。

20

【0151】

CD105は、既存の血管系を含み支持する細胞、及び新たな血管系の増殖を促進する、その一部となる細胞において見ることができる。これらの抗体は、CD105と結合しそれによって血管新生を阻害することができ、既存の血管系又は既存の血管系の維持を阻害する、及び／又は小血管の拡張を阻害することができる。CD105を精製するためのその使用以外に、これらの抗体は精製、検出及び診断目的、並びに治療目的で有用である。本明細書で提供する抗体は、様々な状態及び疾患を治療するための医薬品の製剤化、前記状態及び疾患を治療するための方法、及び検出又は診断の方法に使用することができる。本明細書で使用する血管新生は、新たな血管の増殖及び／又は発達（新血管形成とも呼ばれる）、小血管の拡張、過剰又は長期血管増殖、及び既存の血管系の維持を含む。血管新生状態及び疾患は、血管新生に関連する、それによって引き起こされる、又はそれと関係がある疾患及び状態を指す。このような疾患の非制限的な例には、例えば様々な型の癌（原発性腫瘍及び転移）がある。CD105活性を調節しそれによって血管新生を阻害する及び／又は小血管の拡張を阻害するマウスモノクローナル抗体（mAb）が、CD105に対して産生されている。これらのマウス抗体は、その各々が参照として全容が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,928,641号、同第6,200,566号、同第6,190,660号、及び同第7,097,836号中に記載される。更に、これらの抗体のいくつかのex vivo及びin vivo有効性が実証されている。CD105と結合するモノクローナル抗体は、CD105調節化合物としての対象である。マウス抗体の治療用途は、しかし実現可能ではない。マウス抗体の投与には、例えばヒト抗マウス抗体（HAMAs）の型での免疫原性を含めた、いくつかの制約があるからである。

30

40

【0152】

いくつかの抗CD105抗体、特に抗CD105モノクローナル抗体（「mAb」）が記載されている。MAbSN6は、ヒト白血病細胞の細胞膜の糖タンパク質混合物を用いたマウスの免疫処置から作製された抗体である（Haruta and Seon, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7898-7902）。SN6は、ヒトCD105を認識するマウスmAbである。MAb44G4は、ヒト前B白血病細胞の全細胞懸濁液を用いたマウスの免疫処置から作製された抗体である（Gougos and Letarte, 1988, J. Immunol. 141:1925-1933

50

；1990, J. Biol. Chem. 265:8361-8364)。44G4も、ヒトCD105を認識するマウスmAbである。MAbMJ7/18は、炎症状態のマウス皮膚を用いたラットの免疫処置から作製された抗体である（Ge and Butcher, 1994, 上記）。MJ7/18も、マウスCD105を認識するmAbである。mAbTec-11は、ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いたマウスの免疫処置から作製された抗体である（Burrows et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1623-1634）。Tec-11は、ヒトCD105限定の反応性を有するマウスmAbである。それらの特異性を維持及び／又は改善しながら、低い免疫原性を示すCD105と結合するキメラ抗体を、本明細書で記載する。更に、マウス抗体に関する問題に対処するため、それらの特異性を維持及び／又は改善しながら低い免疫原性を示す、CD105と結合し血管新生を低減及び／又は阻害するキメラ抗体を、本明細書で記載する。これらの抗CD105抗体は、様々な状態及び疾患の診断及び治療、並びにCD105の精製及び検出に有用である。CD105に対する抗体は、血管新生と関係がある、それによって影響される、又はそれによって悪影響を受ける、様々な疾患及び状態を治療するための療法開発の重要部分となる。

10

【0153】

CD105と結合するその抗体を本明細書で提供する。CD105と結合し、血管新生／新血管形成、小血管の拡張を（部分的又は完全に）阻害又は（部分的又は完全に）管理／治療する、細胞増殖を阻害する又は腫瘍増殖を阻害する、抗体（又はその抗原結合断片）も提供する。同様に、CD105機能（例えば、シグナル伝達、結合、活性化など）の阻害も、阻害又は結合CD105の意味の中に含まれる。更に別の実施形態では、抗体は、CD105と結合することによって血管新生を阻害する。本出願は、抗体を産生するために使用することができる細胞系、これらの細胞系を生成するための方法、抗体を発現させそれらを精製するための方法も提供する。

20

【0154】

本明細書で記載する方法を使用して作製したCD105と特異的に結合する抗体は、本明細書で提供するアッセイ又は当技術分野で知られているアッセイを使用して、ELISAだけには限らないがこれを含めた従来の方法を使用して、CD105と結合する能力に関して試験することができることは理解することができる。本明細書で記載する抗体の親和性も、Biacore又は表面プラズモン共鳴だけには限らないが、これらを含めた従来の方法を使用して決定することができる。

30

【0155】

CD105と結合する抗体を本明細書で提供する。CD105と結合し血管新生を阻害する抗体も、本明細書で提供する。

【0156】

配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域、配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するガンマ1（ γ 1）定常領域（Fc）を含む抗体を、本明細書で提供する。配列番号3に記載の；及び配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（Fc）。

40

【0157】

別の非制限的实施形態では、この抗CD105抗体は、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR3；配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR3を含む。

【0158】

別の非制限的实施形態では、単離されたヒト化脱免疫化抗CD105抗体は、配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得る。ヒト化脱免疫化重鎖の他の非制限的例には、配列番号

50

13、14、15及び16が含まれるが、これらだけには限られない。ヒト化脱免疫化軽鎖の他の非制限的例には、配列番号17、18、19、20、21、22及び23が含まれるが、これらだけには限られない。これらの配列は、以下の例17に示される。

【0159】

別の態様では、本出願は、抗体の V_H 及び V_L 配列を有する抗体の少なくとも5%が、ELISAアッセイ中でこのような抗体との競合によってCD105との結合から遮断される条件下で、本明細書で記載する抗CD105抗体と競合することができる抗体を提供する。

【0160】

CD105と結合しCD105の活性を調節する中和抗体を本明細書で提供する。中和抗体は、例えば、CD105と結合することによって血管新生を阻害することができる。

【0161】

本明細書で記載する抗体は、以下でより詳細に記載するように検出又は診断用途において有用である。本明細書で記載する抗体は、CD105と結合するのに有用であり、したがって本明細書で記載するように血管新生を阻害することができる。

【0162】

本明細書で記載する抗体は、治療用途で使用するための治療成分を更に含むことができる。

【0163】

本明細書で記載する抗体は、免疫複合体として使用することもできる。本明細書で使用するように、本明細書及び特許請求の範囲の目的で、免疫複合体は、本発明による抗CD105抗体又はその断片、及び少なくとも1つの治療標識を含む複合体を指す。治療標識は、抗腫瘍剤及び血管新生阻害剤を含む。このような抗腫瘍剤は当技術分野で知られており、毒素、薬剤、酵素、サイトカイン、放射性核種、光線力学的物質、及び血管新生阻害剤だけには限られないが、これらを含む。毒素は、リシンA鎖、突然変異シュードモナスエキソトキシン、ジフテリア毒素、ストレプトニグリン、ボアマイシン、サポリン、ゲロニン、及びヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質だけには限られないが、これらを含む。薬剤は、ダウノルビシン、メトトレキサート、及びカリケアマイシンを含む。放射性核種は放射性金属を含む。サイトカインは、形質転換増殖因子(TGF)- β 、インターロイキン、インターフェロン、及び腫瘍壊死因子だけには限られないが、これらを含む。光線力学的物質は、ポルフィリン及びそれらの誘導体だけには限られないが、これらを含む。他の治療標識は当技術分野で知られており、本明細書でも企図する。抗CD105mAb又はその断片と少なくとも1つの抗腫瘍剤を複合体形成させるための方法は当技術分野でよく知られている(即ち、Ghetie et al., 1994, Pharmacol. Ther. 63: 209-34により総説された抗体複合体)。このような方法は、分子のカップリング又は結合に使用する、いくつかの利用可能なヘテロ二官能性試薬の1つを利用することができる。他の放射性核種は、治療及び診断標識などの分子を結合させるための他の方法と共に、本明細書で更に記載する。

【0164】

例えばポリエチレングリコール(PEG)の付加などによって、当技術分野で知られている技法を使用して、様々な目的で抗体を修飾することができる。PEGの修飾(PEG化)は、1つ又は複数の改善された循環時間、改善された可溶性、タンパク質分解に対する改善された耐性、低減した抗原性及び免疫原性、改善された生物学的利用能、低減した毒性、改善された安定性、及び形成し易さもたらしめることができる(総説に関しては、Francis et al., International Journal of Hematology 68: 1-18, 1998を参照)。

【0165】

抗体のFc部分を修飾して、患者へ投与したときの血中循環の半減期を増大することができる。例えば参照として全容が本明細書に組み込まれる米国特許第7,217,798号中に記載された手段などの、当技術分野の従来手段を使用して修飾を測定することがで

10

20

30

40

50

きる。

【0166】

例えばその各々が参照として本明細書に組み込まれる米国特許第7, 091, 321号及び同第6, 737, 056号中に記載された方法などの、循環中の抗体ベースの融合タンパク質の半減期を改善する他の方法も知られている。更に、それらがその複合N-グリコシド結合糖鎖上にフコースを含有しないように、抗体を産生又は発現することが可能である。複合N-グリコシド結合糖鎖からのフコースの除去は、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)及び補体依存性細胞傷害作用(CDC)だけには限られないが、これらを含めた、抗体及び抗原結合断片のエフェクター機能を増大することが知られている。同様に、CD105と結合することができる抗体は、任意の抗体アイソタイプ、例えばIgG、IgA、IgE、IgD及びIgM、及び任意のアイソタイプサブクラス、特にIgG1、IgG2b、IgG2a、IgG3及びIgG4由来の免疫グロブリン重鎖の全部又は一部と、それらのC末端において結合することができる。

10

【0167】

更に、本明細書で記載する抗体は、それらが血液脳関門を横断することができるように修飾することもできる。本明細書で記載する抗体のこのような修飾は、多形膠芽腫(GBM)などの脳疾患の治療を可能にする。抗体などのタンパク質が血液脳関門を横断するのを可能にする例示的な修飾は、参照として全容が本明細書に組み込まれる米国特許公開第20070082380号中に記載される。

【0168】

免疫グロブリンのグリコシル化は、それらのエフェクター機能、構造安定性、及び抗体産生細胞からの分泌率に対して有意な効果があることは示されている(Leatherbarrow et al., Mol. Immunol. 22:407(1985))。これらの性質を担う炭水化物群は、一般に抗体の定常(C)領域と結合する。例えば、C_H2ドメイン中のアスパラギン297におけるIgGのグリコシル化は、補体依存性細胞溶解の古典的経路を活性化するIgGの完全能力に必要とされる(Tao and Morrison, J. Immunol. 143:2595(1989))。C_H3ドメイン中のアスパラギン402におけるIgMのグリコシル化は、抗体の適切な構築及び細胞溶解活性に必要である(Muraoka and Shulman, J. Immunol. 142:695(1989))。IgA抗体のC_H1及びC_H3ドメイン中の位置162及び419におけるグリコシル化部位の除去は、細胞内分解及び少なくとも90%の分泌阻害をもたらした(Taylor and Wall, Mol. Cell. Biol. 8:4197(1988))。更に、それらがその複合N-グリコシド結合糖鎖上にフコースを含有しないように、抗体を産生又は発現することが可能である。複合N-グリコシド結合糖鎖からのフコースの除去は、抗体依存性細胞傷害作用(ADCC)及び補体依存性細胞傷害作用(CDC)だけには限られないが、これらを含めた、抗体及び抗原結合断片のエフェクター機能を増大することが知られている。これらの「脱フコシル化」抗体は、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物、又はそれらがもはや酵素を含有しないように遺伝子操作された細胞系、及び複合N-グリコシド結合糖鎖中のフコースの封入に必要な生化学的経路(フコシルトランスフェラーゼノックアウト動物、植物、又は細胞としても知られる)だけには限られないが、これらを含めた、当技術分野で知られている分子クローニング技法を利用する様々な系によって産生することができる。フコシルトランスフェラーゼノックアウト細胞となるように操作した細胞の非制限的な例には、CHO細胞、SP2/0細胞、NS0細胞、及びYB2/0細胞がある。

20

30

40

【0169】

可変(V)領域中の免疫グロブリンのグリコシル化も観察されている。Sox及びHodは、約20%のヒト抗体はV領域中でグリコシル化されることを報告した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66:975(1970))。Vドメインのグリコシル化はV領域配列中のN結合グリコシル化シグナルAsn-Xaa-Ser/Thrの偶然的発生から生じると考えられ、当技術分野では免疫グロブリン機能において役割を

50

果たすとして認められていない。

【0170】

可変ドメインフレームワーク残基でのグリコシル化は、抗体と抗原の結合相互作用を変える可能性がある。本発明は、免疫グロブリン鎖のフレームワーク又はCDR中の限られた数のアミノ酸を選択して（例えば、残基の置換、欠失、又は付加によって）突然変異させ抗体の親和性を増大させる基準を含む。

【0171】

抗原結合に対する親和性は一般に、V領域フレームワーク、典型的には1つ又は複数のCDRと隣接する領域中及び／又は1つ又は複数のフレームワーク領域中に、1つ又は複数の突然変異を導入することによって調節することができる。典型的には、このような突然変異は、グリコシル化部位配列を破壊又は作製するが、ポリペプチドのヒドロパシク構造性に実質的に影響を与えない保存的アミノ酸置換の導入を含む。典型的には、プロリン残基を導入する突然変異は回避する。抗体のグリコシル化は、グリコシル化に関して参照として本明細書に組み込まれる米国特許第6,350,861号中に更に記載される。

【0172】

抗体は短期送達又は広範囲（長期）送達用に製剤化することができる。

【0173】

CD105と結合する抗体は、CD105の精製及び／又はサンプル又は患者中のCD105レベルの検出に使用して、以下でより詳細に記載するようにCD105と関係がある疾患又は障害を検出又は診断することもできる。

【0174】

このような方法を使用して作製したCD105と結合する抗体は、それらの結合親和性、親和力、及び中和能力の1つ又は複数に関して試験することができる。有用な抗体は、血管新生と関係がある疾患状態又は障害を予防、阻害、管理又は治療するために患者に投与することができる。

【0175】

抗体は、結合親和性、会合率、解離率及び親和力の1つ又は複数に関して評価することができる。一態様では、CD105又はVEGFの活性を中和するそれらの能力に関して抗体を評価することができる。結合親和性、会合率、解離率及び親和力の測定は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、Scatchard解析、BIACORE解析（表面プラズモン共鳴）など、並びに一般に使用されており当業者に知られている他のアッセイだけには限られないが、これらを含めた、当技術分野で認められているアッセイを使用して実施することができる。

【0176】

CD105と抗体の結合、及び／又は、例えば血管新生を阻害する抗体の能力の測定は、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、競合結合アッセイ、ELISPOTアッセイ、又は当技術分野で知られている任意の他の有用なアッセイを使用して決定することができる。これらのアッセイは一般に使用されており、当業者によく知られている。

【0177】

非制限的な一実施形態では、ELISAアッセイを使用して、CD105と結合する特異的抗体の結合能力を測定することができる。

【0178】

ELISAなどのアッセイを使用して、他のそれに対する抗体と比較してCD105に対する高い特異性を示す、それに対する抗体を同定することもできる。ELISAなどのアッセイを使用して、1つ又は複数のポリペプチド上及び1又は複数種のCD105又はVEGF上のエピトープと結合する、それに対する抗体を同定することもできる。特異性アッセイは、CD105エピトープを含有する異なるポリペプチド種上の1つ又は複数のエピトープと結合する能力に関して、試験抗体を別個のアッセイチャンバー内で同時にスクリーニングして、CD105と結合するその抗体を同定する、平行ELISAを行うことによって実施することができる。当業者が熟知している、見かけの結合親和性を測定す

10

20

30

40

50

るための別の技法は、(B I A C O R E 2 0 0 0 システムで分析された) 表面プラズモン共鳴技法である (L i l j e b l a d , e t a l . , G l y c o . J . 2 0 0 0 , 1 7 : 3 2 3 - 3 2 9) 。標準的な測定法及び伝統的な結合アッセイは、H e e l e y , R . P . , E n d o c r . R e s . 2 0 0 2 , 2 8 : 2 1 7 - 2 2 9 によって記載される。

【0179】

C D 1 0 5 に特異的に結合する抗体は、様々な型の癌 (例えば、原発性腫瘍、再発腫瘍、及び転移) と関係がある血管新生に関する様々な疾患及び状態を治療する、それらの能力に関してアッセイすることもできる。当業者に知られている任意の適切なアッセイを使用して、このような効果をモニタリングすることができる。いくつかのこのような技法は本明細書に記載する。一例では、本明細書に記載する抗体を、C D 1 0 5 と結合するそれらの能力に関してアッセイする。別の例では、本明細書に記載する抗体の親和性定数を表面プラズモン共鳴 (S P R) によって決定する。更に別の例では、本明細書に記載する抗体を、血管新生の阻害に対するそれらの効果に関してアッセイする。

【0180】

製剤

本明細書に提供する製剤は、活性成分 (抗 C D 1 0 5 抗体又はその抗体断片) 以外に、当業者によく知られている、薬学的に許容される賦形剤、担体、バッファー、安定剤、界面活性剤又は他の物質を含むことができる。このような物質は無毒でなければならず、活性成分 (単数又は複数) の有効性に干渉してはならない。担体又は他の物質の正確な性質は投与の経路に依存する。

【0181】

抗 C D 1 0 5 抗体の新たな製剤、この製剤を含むプレフィルドシリンジ、及び血管新生関連障害を治療するために有用なこのような製剤の使用を、本明細書で提供する。本出願は、例えば、C D 1 0 5 と関係がある癌及び眼科的状态の処置の静脈内投与又は眼内投与のために使用され得る製剤を提供する。本明細書に記載する C D 1 0 5 に対する抗体又はその抗原結合断片の結合、親和性、親和力及び活性は、上記アッセイ及び実施例に下記されるアッセイが含まれるが、これらだけには限られない当該分野で認識された方法を使用して評価され得る。

【0182】

一態様では、約 1 m g / m l ~ 約 1 5 0 m g / m l の抗 C D 1 0 5 抗体又はその抗原結合断片、最大約 1 0 0 m M の緩衝剤、最大約 1 M のポリオール及び約 4 . 0 ~ 約 7 . 5 の p H を含む製剤を、本明細書で提供する。

【0183】

一態様では、この製剤は調製後に安定であり、従来手段に従って試験され得る。タンパク質を含む製剤の安全な取扱い及び投与は、薬剤処方者にとって顕著な挑戦を提示する。タンパク質は、安定性の問題を提示する独自の化学的性質及び物理的性質を有する：種々の分解経路がタンパク質について存在し、化学的不安定性及び物理的不安定性の両方を示している。化学的不安定性には、脱アミノ化、凝集、ペプチド骨格のクリッピング (c l i p p i n g) 、及びメチオニン残基の酸化が含まれる。物理的不安定性は、例えば、凝集を含む多数の現象を包含する。

【0184】

「安定な」製剤は、保存の際にその物理的安定性及び／若しくは化学的安定性並びに／又は生物活性をその中のタンパク質が本質的に保持している製剤である。タンパク質の安定性を測定するための種々の分析技法が当該分野で利用可能であり、例えば、P e p t i d e a n d P r o t e i n D r u g D e l i v e r y , 2 4 7 - 3 0 1 , V i n c e n t L e e E d . , M a r c e l D e k k e r , I n c . , N e w Y o r k , N . Y . , P u b s . (1 9 9 1) 及び J o n e s , A . A d v . D r u g D e l i v e r y R e v . 1 0 : 2 9 - 9 0 (1 9 9 3) で概説されている。安定性は、選択された時間にわたって選択された温度で測定され得る。好ましくは、この製剤は、少なくとも 1 カ月間にわたり室温 (約 3 0 ° C) 若しくは 4 0 ° C で安定であり、及び／又は少なくとも

も1年間若しくは少なくとも2年間にわたり約2～8℃で安定である。更に、この製剤は、製剤の凍結（例えば、－80℃まで）及び解凍の後に安定であり得る。

【0185】

タンパク質は、色及び／若しくは透明性の視覚的試験の際に、又はUV光散乱若しくはサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって測定して、凝集、沈殿及び／又は変性の兆候を示さない場合に、薬学的製剤中で「その物理的安定性を保持する」。このような測定値を決定する方法は、当該分野で公知であり、以下により詳細に記載される。

【0186】

タンパク質は、所与の時点における化学的安定性が、以下に規定されるその生物活性をタンパク質が未だ保持するとみなされるようなものである場合、製剤中で「その化学的安定性を保持する」。化学的安定性は、化学的に変えられた形態のタンパク質を検出及び定量することによって評価され得る。化学的変化は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE及び／又はマトリックス支援レーザー脱離イオン化／飛行時間型質量分析（MALDI/TOF MS）を使用して評価され得る、サイズ改変（例えば、クリッピング）を含み得る。他の型の化学的変化には、例えば、イオン交換クロマトグラフィー又はキャピラリー電気泳動－等電点電気泳動（cIEF）によって評価され得る、電荷変化（例えば、脱アミド化の結果として生じる）が含まれる。

【0187】

抗体は、所与の時点における抗体の生物活性が、例えば、例えば抗原結合アッセイにおいて決定した場合、製剤が調製された時点で示された生物活性の約50～150%以内（アッセイの誤差範囲内）にある場合、製剤中で「その生物活性を保持する」。抗体についての他の「生物活性」アッセイは、以下で詳述する。

【0188】

製剤の経時的な安定性に関して、抗CD105抗体又はその抗原結合断片の少なくとも95%が、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって測定して、少なくとも約12カ月間にわたる約2～8℃での保存後にモノマーとして存在し得る。実施例に記載するものが含まれるが、これらだけには限られない、安定性を評価するための更なる当該分野で認識された方法もまた、本明細書で企図される。

【0189】

更に、抗CD105抗体又はその抗原結合断片は、少なくとも約12カ月間にわたる約2～8℃での保存後に、CD105 ELISA結合アッセイによって約50～150%の結合を示し得る。

【0190】

抗CD105抗体の平均等電点（pI）は、例えばキャピラリー電気泳動－等電点電気泳動によって測定して、少なくとも約12カ月間にわたる2～8℃での保存後に、約8.8～約9.2であり得る。

【0191】

抗CD105抗体又はその抗原結合断片は、少なくとも約12カ月間、少なくとも約18カ月間、少なくとも約24カ月間、少なくとも約30カ月間、少なくとも約36カ月間又はそれ以上にわたって安定であり得ることが理解される。

【0192】

製剤は、SECによって測定して、製剤の凍結解凍サイクルの後にモノマーとして存在する、抗CD105抗体の少なくとも95%を含み得る。或いは、又は更に、製剤は、SECによって測定して、攪拌ストレスにさらされた場合にモノマーとして存在する、抗CD105抗体の少なくとも95%を含み得る。

【0193】

この抗CD105抗体又はその抗原結合断片は、CD105に結合することが可能なCDRの任意の配列を含み得る。非制限的な一実施形態では、この抗CD105抗体は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（VL）；配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（CL）；配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖

10

20

30

40

50

可変領域（VH）；及び配列番号４に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（Fc）を含むTRC105である。

【0194】

別の非制限的实施形態では、この抗CD105抗体は、配列番号５に記載のアミノ酸配列を有するVL CDR1；配列番号６に記載のアミノ酸配列を有するVL CDR2；配列番号７に記載のアミノ酸配列を有するVL CDR3；配列番号８に記載のアミノ酸配列を有するVH CDR1；配列番号９に記載のアミノ酸配列を有するVH CDR2；及び配列番号１０に記載のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む。

【0195】

この製剤は、約1mg/ml～約150mg/mlの抗CD105抗体若しくはその抗原結合断片、又は約2mg/ml、約5mg/ml、約7.5mg/ml、約10mg/ml、20mg/ml、約25mg/ml、約30mg/ml、約35mg/ml、約40mg/ml、約45mg/ml、約50mg/ml、約55mg/ml、約60mg/ml、約65mg/ml、約70mg/ml、約75mg/ml、約80mg/ml、約85mg/ml、約90mg/ml、約95mg/ml、約100mg/ml、約105mg/ml、約110mg/ml、約115mg/ml、約120mg/ml、約125mg/ml、約130mg/ml、約135mg/ml、約140mg/ml、約145mg/ml、約150mg/ml若しくはそれ以上が含まれるが、これらだけには限られないその間の任意の値、又はそれらの間の任意の整数の抗CD105抗体若しくはその抗原結合断片を含み得る。抗体濃度に言及して本明細書で使用する用語「約」は、示された値の±2%を意味する。

【0196】

一実施形態では、この製剤は、約25mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む。別の実施形態では、この製剤は、約50mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む。なお別の実施形態では、この製剤は、約100mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む。

【0197】

本明細書に記載する製剤は、例えば、ヒスチジン、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝剤を含み得る。緩衝剤は、約5mM～約100mMの量で含まれ得る。一実施形態では、この製剤は、約5mM、約7.5mM、約10mM、約12.5mM、約15mM、約17.5mM、20mM、約22.5mM、約25mM、約30mM、約35mM、約40mM、約45mM、約50mM、約55mM、約60mM、約65mM、約70mM、約75mM、約80mM、約85mM、約90mM、約95mM、約100mM又はそれらの間の任意の整数の、ヒスチジン、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩を含む。バッファー濃度に言及して本明細書で使用する用語「約」は、示された値の±2%を意味する。

【0198】

製剤は、硝子体内投与及び静脈内投与が含まれるが、これらだけには限られない、抗体について公知の任意の型の投与のために調製され得る。

【0199】

本明細書に提供する製剤は、薬学的に許容される担体又は賦形剤であり得、患者への投与のために許容される任意の担体又は賦形剤を含む、許容される担体又は賦形剤を更に含み得る。

【0200】

一実施形態では、本明細書に提供する製剤は等張である。代表的な等張な製剤には、約250～約350ミリオスモルの製剤が含まれるが、これらだけには限られない。別の実施形態では、本明細書に提供する製剤は高張である。代表的な高張製剤には、約351～約1000ミリオスモルの製剤が含まれるが、これらだけには限られない。

【0201】

ポリオールは、最大約1Mの量で本明細書に記載する製剤に加えられ得る。例えば、こ

10

20

30

40

50

の製剤は、約 50 mM、約 75 mM、約 100 mM、約 150 mM、約 200 mM、約 225 mM、約 240 mM、約 250 mM、約 300 mM、約 350 mM、約 400 mM、約 450 mM、約 500 mM、約 550 mM、約 600 mM、約 650 mM、約 700 mM、約 750 mM、約 800 mM、約 850 mM、約 900 mM、約 950 mM、約 1 M 又はそれらの間の任意の整数の量で、ポリオールを含み得る。一実施形態では、本明細書に提供する製剤は、300 mM 未満の量でポリオールを含み、この製剤は、約 100 mM ～約 175 mM の濃度の塩で等張にされる。例えば、300 mM 未満の量でポリオールを含む製剤は、約 130 mM の濃度の塩で等張にされる。ポリオール濃度に言及して本明細書で使用する用語「約」は、示された値の±2%を意味する。一態様では、本明細書に提供する製剤中で使用されるポリオールは、例えば非還元糖などの糖であり得る。非還元糖の代表的な例には、トレハロース及びスクロースが含まれるが、これらだけには限られない。例えば、製剤は、約 200 mM ～約 300 mM のトレハロース又はスクロースを含み得る。一実施形態では、製剤は、約 240 mM のトレハロース又はスクロースを含み得る。或いは、この糖は、約 200 mM ～約 300 mM の量（濃度）のソルビトールであり得る。一実施形態では、製剤は、約 240 mM のソルビトールを含み得る。

10

【0202】

本明細書に提供する製剤の更なる非制限的例は、表 1 の製剤 1 ～ 39 のいずれか 1 つである。

【表 1 - 1】

20

表 1

製剤番号	pH	phos (mM)	His (mM)	クエン酸塩 (mM)	酢酸塩 (mM)	NaCl (mM)	トレハロース (mM)	ソルビトール	タンパク質 mg/mL
F01	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F02	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F03	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F04	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F05	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F06	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F07	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F08	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F09	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F10	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F11	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F12	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F13	6	0	10	0	0	0	240	0	25

30

40

【表 1 - 2】

製剤番号	pH	phos (mM)	His (mM)	クエン酸塩 (mM)	酢酸塩 (mM)	NaCl (mM)	トレハロース (mM)	ソルビトール	タンパク質 mg/mL
F14	6	10	0	0	0	80	120	0	25
F15	6	0	10	0	0	80	120	0	25
F16	7	20	0	0	0	130	0	0	25
F17	6	20	0	0	0	130	0	0	25
F18	6	0	20	0	0	130	0	0	25
F19	5	0	20	0	0	130	0	0	25
F20	6	0	0	20	0	130	0	0	25
F21	5	0	0	20	0	130	0	0	25
F22	4	0	0	0	20	130	0	0	25
F23	5	0	0	0	20	130	0	0	25
F24	5	0	20	0	0	0	240	0	25
F25	5	0	0	20	0	0	240	0	25
F26	5	0	0	0	20	0	240	0	25
F27	6	10	0	0	0	0	240	0	25
F28	6	0	10	0	0	0	240	0	50
F29	6	10	0	0	0	80	120	0	50
F30	6	0	10	0	0	80	120	0	50
F31	7	17	0	0	0	145	0	0	5
F32	7	17	0	0	0	145	0	0	7
F33	5.5	0	20	0	0	0	240	0	25
F34	5.5	0	20	0	0	0	0	240	25
F35	4	0	0	0	20	0	0	240	25
F36	5.5	0	20	0	0	0	240	0	50
F37	4	0	0	0	20	0	240	0	50
F38	5.5	0	20	0	0	0	240	0	100
F39	4	0	0	0	20	0	240	0	100

Phos: リン酸緩衝生理食塩水; His: ヒスチジン

【0203】

本明細書に提供する製剤は、約 4.0 ～ 約 7.5 の pH を有し得る。一実施形態では、本明細書に提供する製剤は、約 4.5、約 5.0、約 5.5、約 6.0、約 6.5 又は約 7.0 の pH を有し得る。pH に言及して本明細書で使用する用語「約」は、 $pH \pm 0.1$

0.5、0.1又は0.2を指す。

【0204】

本明細書に記載する方法によって同定した抗体又は抗原結合断片を含む製剤は、望ましい純度を有するタンパク質と任意選択の生理的に許容される担体、賦形剤及び／又は安定剤を混合することによって、水溶液の形で、保存用に調製することができる (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。

【0205】

許容される担体は投与する患者に対して生理的に許容され、それと共に／その中に投与する化合物の治療性を保持する。許容される担体及びそれらの製剤は、例えばRemington's pharmaceutical Sciences (18th Edition, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990)中に一般的に記載される。1つの例示的な担体は生理食塩水である。本明細書で使用する語句「薬学的に許容される担体」は、一器官、又は身体の一部の投与部位から別の器官、又は身体の一部への対象化合物の運搬又は輸送に關与する、液体又は固形充填剤、希釈剤、賦形剤、及び／又は溶媒などの、許容される物質、組成物又は媒体を意味する。それぞれの担体は、製剤の他の成分と適合性があり、それを投与する対象に有害ではない意味で許容される。許容される担体は、対象化合物の特異的活性を変えてもいけない。

【0206】

一態様において、投与と適合性がある、溶媒（水性又は非水性）、溶液、エマルジョン、分散媒、コーティング、等張及び吸収促進又は遅延剤を含む、薬学的に許容される又は生理的に許容される組成物を本明細書で提供する。したがって、組成物又は製剤は、対象における治療及び／又は診断用途に適した組成物を指す。組成物及び製剤は、一定量の本明細書に記載する化合物、及び薬学的又は生理的に許容される担体を含む。

【0207】

特定の投与経路（即ち、全身又は局所）と適合性があるように組成物を製剤化することができる。したがって組成物は、様々な経路による投与に適した、担体、希釈剤、又は賦形剤を含む。

【0208】

組成物は、例えば、皮下、硝子体内、皮内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は筋肉内注射だけには限られないが、これらを含めた注射によって投与することができる。等張化剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、及び塩化ナトリウムを組成物中に含めることができる。生成する溶液は使用するためにパッケージ、又は凍結乾燥することができ、凍結乾燥した調製物は後に、投与前に滅菌溶液と併用することができる。静脈内注射、又は患部への注射用に、活性成分は、発熱性物質を含まず適切なpH、等張性及び安定性を有する、非経口的に許容される水溶液の形であってよい。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル液、乳酸加リンゲル液などの等張性媒体を使用して、適切な溶液を調製することが十分可能である。防腐剤、安定剤、バッファー、抗酸化剤及び／又は他の添加剤を必要に応じて含めることができる。滅菌注射溶液は、必要に応じて前に列挙した成分の1つ又は組合せと共に適切な溶媒中に必要量の活性成分を取り込み、次に濾過滅菌によって調製することができる。

【0209】

一実施形態では、本明細書に提供する製剤は、界面活性剤を含まない。別の実施形態では、本明細書に記載する製剤は、任意選択で、例えば、ポリソルベート20若しくは80、TWEEN（登録商標）、PLURONIC（登録商標）F68又はポリエチレングリコール（PEG）などの界面活性剤を含む。

【0210】

本明細書に提供する医薬品又は任意の方法における使用に関して組成物を考慮するとき、組成物は実質的に発熱性物質を含まない可能性があり、したがって組成物は、ヒト患者

に投与するとき、炎症反応又は危険なアレルギー反応を引き起こさないことは企図される。発熱性物質に関する組成物の試験及び実質的に発熱性物質を含まない組成物の調製は、当業者にはよく理解されており、市販のパッケージを使用して実施することができる。

【0211】

語句「薬学的に許容される」は、生理的耐性があり、対象に投与したとき、例えば胃の不調、めまいなどのアレルギー又は同様の悪反応を典型的にもたらさない分子体及び組成物を指す。

【0212】

用語「単位用量」は、治療用組成物に関して使用するとき、対象に関する単位の用量として適切な物理的に明確な単位を指し、それぞれの単位は、必要な希釈剤、即ち担体、又は賦形薬と共に望ましい治療効果をもたらすように計算された所定量の活性物質を含有する。

10

【0213】

組成物は投与製剤と適合性がある形式、及び治療有効量で投与することができる。投与する量は、治療する対象、活性成分を利用する対象の免疫系の能力、及び望まれる結合能力の程度に依存する。投与に必要とされる活性成分の正確な量は実践者の判断に依存し、各個人に特有である。初回投与及び追加抗原刺激に適したレジメも様々であるが、初回投与、次に二次注射又は他の投与による1又は複数の時間間隔での反復投与によって類型化される。或いは、血中濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入が企図される。

【0214】

20

一実施形態は、本明細書に記載する状態、疾患又は障害の治療用の医薬品を製造するための、本明細書に記載する組成物の使用を企図する。医薬品は治療を必要とする患者／対象の身体的特徴に基づいて製剤化することができ、状態、疾患又は障害の段階に基づいて1つ又は複数の製剤に製剤化することができる。病院及びクリニックへの配給に適したラベルを有する適切なパッケージに医薬品をパッケージすることができ、この場合ラベルは本明細書に記載する疾患を有する対象を治療する指標である。医薬品は単数回又は複数回単位としてパッケージすることができ、組成物の用量及び投与に関する説明書は、以下に記載するようにパッケージと共に含めることができる。

【0215】

30

本明細書に記載する製剤を含む、静脈内投与又は硝子体内投与に適したプレフィルドシリンジもまた、本明細書で提供する。このようなプレフィルドシリンジは、本明細書に記載する状態のいずれかなどの血管新生関連状態の治療への使用のために、パッケージ及びラベルされ得る。パッケージは、保存及び投与のための指示を更に含み得る。上記請求項のいずれか一項に記載の製剤を含む、静脈内投与又は硝子体内投与に適した1つ又は複数のプレフィルドシリンジを含むパッケージを、本明細書で提供する。本明細書に記載する状態のいずれかなどの血管新生関連状態の治療のための、本明細書に記載する製剤を含む医薬品の調製もまた、本明細書で提供する。

【0216】

治療方法

40

CD105と優先的に結合する抗体の製剤を対象に投与することによって、対象（ヒト又は非ヒト）を治療する方法を本明細書で提供する。抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む組成物を投与し、それによって疾患又はその重症度を予防、治療、改善、又は低減することを含む、血管新生／新血管形成、過剰な血管形成、腫瘍増殖、腫瘍細胞増殖又は小血管の拡張と関係がある1つ又は複数の疾患又は障害を予防又は治療する方法を本明細書で提供する。

【0217】

本発明の有効な応答は、具体的には生存期間の延長を非制限的に含む、疾患の兆候又は症状の停滞、又は部分的若しくは完全な緩和若しくは低減を、対象が経験するときに得られる。予想される無増悪生存期間は、再発数、疾患の段階、及び他の要因を含めた予後予測因子に応じて、数カ月から数年で測定することができる。生存期間の延長は、少なくとも

50

も1カ月(mo)、約少なくとも2カ月、約少なくとも3カ月、約少なくとも4カ月、約少なくとも6カ月、約少なくとも1年(yr)、約少なくとも2年、約少なくとも3年、約少なくとも4年、約少なくとも5年など又はそれらの間の任意の間隔の時間を非制限的に含む。全体又は無憎悪生存期間も、数カ月から数年で測定することができる。或いは、有効な応答は、対象の兆候又は症状又は癌負荷が停滞状態であり悪化しない応答であってよい。治療指標の更なる指標は以下でより詳細に記載する。

【0218】

本明細書に記載する抗体の組成物は非治療剤(例えば、親和性精製物質)として使用することができる。一般に、このような一実施形態では、対象のタンパク質は、当技術分野で知られている従来の方法を使用して、Sephadex(登録商標)樹脂又は濾過紙などの固相上に固定する。固定タンパク質は精製する対象の標的(又はその断片)を含有するサンプルと接触させ、その後支持体を、固定抗体と結合した標的タンパク質以外の、サンプル中の実質的に全ての物質を除去する適切な溶媒で洗浄する。最後に支持体を、グリシンバッファー、pH5.0などの別の適切な溶媒で洗浄し、これによって標的タンパク質を切り離す。精製以外に、組成物は、CD105と関係がある疾患及び障害の検出、診断及び治療に使用することができる。

【0219】

「接触」は、本明細書に記載するように、本明細書で提供する製剤を細胞、器官、組織又は流体と物理的に近づける手段として本明細書では定義する。接触は、本明細書で提供する任意の製剤の全身又は局所投与を包含し、in vitro、in vivo及び/又はex vivoの手順及び方法を非制限的に含む。「併用」と「接触」は本明細書では交互に使用して、同様に定義することを意味する。in vivo適用例に関して、例えば任意の適切な手段による患者への組成物の投与によって接触を行うことができ、薬学的に許容される賦形剤及び担体を含む組成物は前より詳細に記載している。

【0220】

本明細書で使用する「予防」は、兆候又は症状の発症の予防法、予防、血管新生と関係があるか又はCD105活性に関連する疾患又は障害の進行の予防を指す。非制限的な一実施形態では、段階1の癌を有すると診断されると、本明細書に記載する製剤が投与され得、それによって癌が段階2に進行するのを予防する。なお別の実施形態では、無症候性であるが1つ又は複数の癌バイオマーカーについて陽性反応を示す患者には、本明細書に記載する製剤が投与され得、それによって癌の進行を予防する。本明細書で使用する「阻害」、「治療」及び「治療する」は交互に使用し、例えば、兆候又は症状の停滞、生存期間の延長、兆候又は症状の部分的又は完全な改善、及び腫瘍又は転移の部分的又は完全な根絶を指す。

【0221】

「対象」又は「患者」(例えば、ヒトなどの哺乳動物、又は霊長類、げっ歯類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ラクダ、ラマなどの非ヒト動物など)は、本明細書に記載する疾患又は障害の、1つ又は複数の臨床兆候及び/又は兆候又は症状を示す哺乳動物であってよい。特定の状況では、対象は無症候性である可能性があり、疾患又は障害の臨床兆候を未だ依然として有する可能性がある。抗体は、治療成分、又は治療成分を含有する融合タンパク質と結合させることが可能である。抗体は、検出可能成分、又は検出可能成分を含有する融合タンパク質と結合させることが可能である。一実施形態では、抗体は、治療成分と検出可能成分の両方と結合させることが可能である。抗体は親和性タグ(例えば、精製タグ)と結合させる、又はそれらで組換え操作することが可能である。親和性タグは、当技術分野では従来のものである。

【0222】

本明細書で提供する抗体又はその断片は、それらが治療成分及び/又はイメージング又は検出可能成分及び/又は親和性タグと結合又は連結することができるようなものである。ポリペプチドの結合又は連結に関する方法は当技術分野でよく知られている。化合物と標識の間の会合(結合)は、共有及び非共有結合、化学結合及び組換え技法だけには限ら

れないが、これらを含めた、当技術分野で知られている任意の手段を含む。

【0223】

「血管新生」は、血管の維持及び発達の全態様を含めるために本明細書で使用する。したがって血管新生は、新血管形成、並びに既存の血管系及び小血管の維持及び制御をもたらす、(de novo又は既存の血管からの形成であれ)新しい毛細血管の形成を含む。血管新生は、血管基底膜及び間質性マトリクスの内皮細胞伸介分解、内皮細胞の移動、内皮細胞の増殖、及び内皮細胞による毛細血管ループの形成を含む、一連の連続ステップを含む複雑なプロセスである。血管新生は、新たな血管の増殖及び／又は発達(新血管形成とも呼ばれる)、小血管の拡張、過剰又は長期血管増殖、及び既存の血管系の維持を含む。

10

【0224】

用語「血管新生関連疾患」を、本明細書において使用して、血管新生が異常に長引いているヒト中の特定の病的プロセスを意味する。これは更に、血管新生と関連する、それによって引き起こされる、又はそれと関係がある疾患及び状態などの、血管新生状態及び疾患を含む。このような疾患の非制限的な例には、様々な型の癌及び転移、黄斑変性症、及びCNVがある。本明細書に記載する抗体を使用して、CD105との結合及び血管新生の阻害によって血管新生関連疾患を治療することができる。

【0225】

用語「抗血管新生療法」を本明細書において使用して、CD105を発現する(静止状態の血管系と比較して増殖血管系において高レベルで発現する)細胞及び／又は血管系を標的化する療法を意味し、これは更に、血管新生(即ち、新血管形成をもたらす新しい毛細血管の形成)を対象とする療法、既存の血管系及び／又は過剰な血管形成又は血管増殖を対象とする療法、小血管の拡張を対象とする療法、及び疾患又は状態を対象とする療法(例えば、血管標的化療法)を含む。本発明内で企図される例示的な疾患又は状態には、様々な型の癌及び転移があるが、これらだけには限られない。

20

【0226】

本明細書に記載する製剤を患者に投与することを含む、それを必要とする患者(対象)において血管新生関連疾患を治療する方法を、本明細書で提供する。このような製剤は、患者に硝子体内又は静脈内投与され得る。

【0227】

本明細書に記載する血管新生関連疾患は、例えば、癌又は転移であり得る。一実施形態では、この癌は固形腫瘍である。治療する癌には、例えば、上皮ベースの腫瘍が含まれる。このような製剤で治療する癌の非制限的な例には、肺癌、婦人科悪性腫瘍、メラノーマ、乳癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、頭部癌、膵臓癌、肝癌(肝細胞癌)、子宮癌、首部癌、腎臓癌(腎細胞癌)、肉腫、ミエローマ及びリンパ腫が含まれるが、これらだけには限られない。癌又は転移の治療のための製剤は、患者に静脈内投与され得る。

30

【0228】

或いは、本明細書に記載する血管新生関連疾患は、例えば、眼科的状态であり得る。眼科的状态には、加齢性黄斑変性症、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫及び／又は脈絡膜血管新生が含まれるが、これらだけには限られない。加齢性黄斑変性症(AMD)は、滲出型AMD又は萎縮型AMDであり得る。眼科的状态の治療のための製剤は、患者に硝子体内投与され得る。

40

【0229】

このような方法では、この製剤は、患者に1回又は複数回投与され得る。例えば、この製剤は、1日1回、1週間に1回、1カ月に1回、1カ月に2回、2カ月に1回、3カ月に1回、4カ月に1回、5カ月に1回又は6カ月に1回投与され得る。治療スケジュールは、治療に対する患者の応答に応じて、必要に応じて増加又は減少され得る。

【0230】

一態様では、製剤は、血管新生関連疾患の1つ又は複数の兆候又は症状が低減されるま

50

で投与される。

【0231】

眼科的状态に関して、この1つ又は複数の兆候又は症状には、血管を収縮する、眼部疾患と関係がある内皮細胞増殖を阻害する、出血の兆候若しくは症状を除去する、不透明な視界を治療する、視力喪失の停止をもたらす、視覚を改善する、及び／又は血管漏出を防ぐことが含まれ得るが、これらだけには限られない。

【0232】

癌又は転移に関して、治療は、患者の状態における改善をもたらし得、治療は、1つ又は複数の以下の要因：細胞増殖の低下、細胞数の低下、アポトーシスの増大、又は細胞増殖障害を含む細胞の少なくとも一部分の生存の低下が発生したかどうか決定することによって評価することができる。

10

【0233】

治療は、腫瘍若しくは転移の部分的若しくは完全な排除及び／又は患者の生存期間の延長をもたらし得る。

【0234】

一実施形態では、1つ又は複数の兆候又は症状は、患者への1つ又は複数の用量の製剤の投与後に、重症度又は持続期間において、約2%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約90%、約95%又は約100%低減される。

20

【0235】

別の実施形態では、1つ又は複数の兆候又は症状は、患者への1つ又は複数の用量の製剤の投与後に、重症度又は持続期間において、約2倍、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約90倍、約95倍、約100倍又はそれ以上低減される。

【0236】

本明細書に記載する製剤を患者に投与することを含み、それによって眼科的状态の1つ又は複数の兆候又は症状がこの治療によって改善される、それを必要とする患者において眼科的状态を治療する方法を、本明細書で提供する。製剤の投与は硝子体内投与であり得る。

30

【0237】

本明細書に記載する製剤を患者に投与することを含み、それによって癌又は転移の1つ又は複数の兆候又は症状が改善される、それを必要とする対象において癌又は転移を予防又は治療する方法もまた、本明細書で提供する。製剤の投与は静脈内投与であり得る。

【0238】

用語「再発」、「ぶり返し」又は「ぶり返した」は、疾患消失の臨床評価後の癌又は疾患の逆行を指す。遠隔転移又は局所再発の診断は、ぶり返しと考えることができる。

【0239】

用語「維持療法」は、以前の治療効果の維持を助けるために与えられるスケジュール化された再治療を指す。維持療法は、疾患の進行とは無関係に、癌を軽減状態に保つ又は特定療法に対する応答を延長するのを助けるために与えられることが多い。

40

【0240】

腫瘍学における用語「無増悪生存期間」は、癌が進行しない治療中及びその後の時間の長さを指す。無増悪生存期間は、患者が完全奏功又は部分奏功を経験した時間の量、及び患者が安定 (stable disease) を経験した時間の量を含む。

【0241】

一態様では、癌又は転移に罹患する患者に本明細書で提供する任意の組成物を投与することによって、対象中の癌又は転移を予防又は治療する方法を本明細書で提供する。このような患者は症候性又は無症候性であってよい。

50

【0242】

いくつかの場合、組成物の投与は、治療する患者の生命を延長し、腫瘍体積を低減し、腫瘍を除去し、細胞増殖を低下させ、腫瘍細胞のアポトーシスを増大する、又はこれらの組合せである。

【0243】

必要な場合、方法は、外科手術による癌の除去及び／又は追加的抗癌剤又は治療剤の投与を更に含むことができる。抗癌剤は本明細書の他の箇所で提供する。

【0244】

一態様では、癌に罹患する患者の兆候又は症状を改善する。改善は、例えば痛みの低下、腫瘍サイズの低下、腫瘍の除去、腫瘍サイズの増大若しくは疾患の進行の予防、転移の形成の予防、又は転移増殖の阻害、又はこれらの組合せとして現れ得る。

10

【0245】

一態様では、本明細書に記載する製剤の投与は、患者が外科手術又は1つ若しくは複数の追加的抗癌剤若しくは治療剤を用いた治療を受ける必要性を低減又は排除する。

【0246】

抗CD105抗体を含む組成物は、抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）を含有する組成物と順次又は同時に投与することができる。このような投与には、互いに約12週間以内、互いに約8週間以内、互いに約4週間以内、互いに約3週間以内、互いに約2週間以内、互いに約1週間以内、互いに1日以内、互いに約12時間以内、互いに約6時間以内、互いに約3時間以内、互いに約1時間以内、互いに約30分以内、同日、同時、又はこれらの組合せの投与が含まれるが、これらだけには限られない。多用量の本発明の組成物及び／又は併用療法成分を企図するとき、標準的な市販品を使用し対象の年齢、身長、体重、健康状態及び他の身体的特徴に基づいて、知られている用量及び濃度を使用して、それぞれの用量を経験的に決定することができることは理解される。

20

【0247】

任意の医学治療に適用可能な妥当な利点／リスク比で疾患又は障害を阻害することによって、ある程度の望ましい治療効果をもたらすのに有効である治療有効量で、患者に製剤を投与することができる。ヒト患者への本発明の製剤の投与のため、当業者に知られている方法によって製剤を製剤化することができる。治療有効量は、器官又は組織において少なくとも部分的に望ましい治療又は予防効果を得る量である。疾患又は障害の予防及び／又は療法治療をもたらすのに必要な抗CD105抗体又は抗VEGF抗体の量は、それ自体は固定されていない。投与する抗体の量は、疾患又は障害に罹患する哺乳動物の疾患の型、疾患の拡大、及び大きさと共に変わる可能性がある。一実施形態では、本明細書に記載する2つの抗体を、前に記載したように併用して患者に投与する。投与の併用は、一製剤又は別個の製剤での投与を指すことができる。

30

【0248】

「投与」は、患者の身体内に製剤をもたらす形式で、患者に1つ又は複数の製剤を与えることを本明細書では指す。このような投与は、皮下、硝子体内、皮内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は筋肉内投与（例えば注射）による局所、局部又は全身投与を非制限的に含む、任意の経路による投与であってよい。

40

【0249】

製剤中の活性成分の実際の用量レベルは、患者に対する毒性なしで、特定の患者、製剤、及び投与の形式に望ましい治療応答を得るのに有効な量の活性成分を得るように変えることが可能である。選択する用量レベルは、利用する個々の化合物の活性、投与の経路、投与の時間、利用する個々の化合物の分泌率、治療の期間、利用する個々の製剤と併用使用する他の薬剤、化合物及び／又は物質、治療する患者の年齢、性別、体重、状態、一般的健康状態及び以前の病歴、及び医学分野でよく知られている同様の要因を含めた、様々な要因に依存する。

【0250】

更に、用量（単数又は複数）の抗体を、週2回、週1回、2週毎、3週毎、4週毎、6

50

週毎、8週毎、12週毎、24週毎、又はこれらの週の任意の組合せで投与することができる。例えば2、3、4、5又は6週、次に療法なしで1、2、3、4、5、又は6週の週1回又は2回の抗体投与などの、投与サイクルも企図される。或いは、療法に対する対象の応答性に依じて、治療間のサイクル時間は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12カ月であってよい。例えば本明細書に記載する異なる用量の組合せ及び週一回サイクルを含めた、別の投与サイクルも本発明の範囲内で企図される。

【0251】

医師又は獣医師は、必要とされる製剤の有効量（ED50）を容易に決定し処方することができる。例えば、医師又は獣医師は、必要とされるより低いレベルにおいて製剤中に利用する化合物の投与で始め、望ましい治療効果を得て、望ましい効果が得られるまで用量を徐々に増大することが可能である。或いは、用量は一定に保つことができる。

10

【0252】

前に記載した経路などの任意の好都合な経路によって、患者に製剤を投与することができる。選択する投与の経路とは無関係に、適切な水和型で利用することができる本発明の化合物、及び／又は製剤は、以下に記載するように、又は当業者に知られている他の従来の方法によって許容される剤形に製剤化する。

【0253】

細胞培養アッセイ及び／又は動物試験から得たデータは、ヒトにおける使用のために一定範囲の用量で製剤化の際に使用することができる。利用する剤形及び利用する投与経路に応じて、用量はこの範囲内で変わる可能性がある。任意の化合物に関して、治療有効用量は細胞培養アッセイから初期に推測することができる。用量は動物モデルにおいて処方して、細胞培養において決定するIC₅₀（即ち、半最大阻害を得る試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を得ることができる。血漿中のレベルは、例えば高性能液体クロマトグラフィーによって測定することができる。このような情報を使用して、ヒト中で有用な用量をより正確に決定することができる。化合物の組合せを含有する製剤は、任意のこれらの方法を使用して評価することもできる。

20

【0254】

一実施形態では、本発明は組織中の血管新生の阻害を企図する。組織中の血管新生の程度、及び、したがって得られる阻害の程度は、本明細書に記載するように様々な方法によって評価することができる。

30

【0255】

CD105又はVEGFを認識し（例えば、優先的に結合する）血管新生を阻害する抗体の独自の特異性は、血管新生（新血管形成）、小血管の拡張、過剰な血管形成、腫瘍細胞増殖、及び／又は腫瘍増殖によって特徴付けられる疾患用の診断及び治療用途を与える。抗体は様々な型の癌（原発性腫瘍及び転移）に罹患する対象に投与することができる。

【0256】

本明細書に記載する組成物の投与以外に、1つ又は複数の追加的血管新生阻害剤で対象を治療することも可能であることが、本明細書において企図されることは理解されよう。

【0257】

用語「血管新生阻害剤」は、本明細書及び特許請求の範囲の目的で本明細書において使用して、血管新生を阻害するために機能する、ペプチド、タンパク質、酵素、多糖、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、組換えベクター、及び薬剤だけには限られないが、これらを含めた化合物又は分子を意味する。血管新生阻害剤は当技術分野で知られており、全ての型は本明細書において企図される。化合物及び分子の非制限的な例には、パクリタキセル、O-（クロロアセチルカルボミル）フマギロール（「TNP-470」又は「AGM1470」）、トロンボスポンジン-1、トロンボスポンジン-2、アンギオスタチン、ヒト軟骨細胞由来血管新生阻害剤（「hCHAMP」）、軟骨由来血管新生阻害剤、血小板因子-4、グロ-β、ヒトインターフェロン誘導性タンパク質10（「IP10」）、インターロイキン12、Ro318220、トリシクロデカン-9-イルキサントレート（「D609」）、イルソグラジン、8, 9-ジヒドロキシ-7-メチルベンゾ

40

50

〔b〕キノリジニウムブロマイド（「G P A 1 7 3 4」）、メドロキシプロゲステロン、ヘパリンとコルチゾンの組合せ、グルコシダーゼ阻害剤、ゲニステイン、サリドマイド、ジアミノアントラキノン、ヘルビマイシン、ウルソル酸、及びオレアノール酸などの天然及び合成生体分子がある。抗体の非制限的な例には、V E G F、V E G F受容体、又はC D 1 0 5の異なるエピトープなどの分子を対象とする抗体がある。更に、V E G F受容体の小分子阻害剤が知られており、本明細書において企図される。V E G F受容体阻害剤の非制限的な例には、ラニビズマブ、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ、ペガプタニブ及びパゾパニブがある。

【0258】

これらのV E G F受容体阻害剤の多数の併用は、本明細書に記載する製剤と共に投与することができる。一実施形態では、併用は低用量の記載する抗体又は抗原結合断片の使用をもたらす可能性がある。このような用量の改変は、抗体の併用の相乗効果に原因がある可能性がある。

【0259】

癌

C D 1 0 5は腫瘍血管新生と関係があり、正常組織中のそれと比較して様々な腫瘍組織の内皮中で強く上方制御される。C D 1 0 5は広範囲の腫瘍内皮において上方制御される。更に、対応する正常組織より強いC D 1 0 5の発現が腫瘍内皮において存在する。したがって、抗C D 1 0 5抗体を用いた血管新生の阻害は、癌性腫瘍の治療オプションとなる。本明細書に記載する製剤を使用して、癌性腫瘍及び転移を治療することができる。癌性腫瘍及び転移を治療するための医薬品の製剤化において、製剤を使用することもできる。

【0260】

V E G Fは抗腫瘍療法の一標的となる。その発現が一定範囲の固形腫瘍において上方制御されるからである。V E G Fは、血管新生、既存の血管からの新たな血管の増殖の主なレギュレーターである。このプロセスは固形腫瘍の増殖の根本にあり、新たな血管の形成に頼るものである。特定の小分子療法剤は血管内皮増殖因子受容体（「V E G F R」）を標的化することができ、小分子療法剤によるこのような標的化は抗癌効果をもたらすことができる。V E G F受容体標的化作用物質は、新たな血管形成の阻害によって腫瘍増殖を間接的に遮断する。V E G F誘導血管新生を阻害することによって、マクロファージ、骨芽細胞又は軟骨吸収細胞のV E G F刺激を著しく阻害せずに、抗腫瘍又は改善された抗腫瘍効果を発揮することができる。

【0261】

用語「腫瘍」は、（同型の正常組織による発現と比較して）C D 1 0 5及び／又はV E G Fを発現する癌性組織を指すために本明細書で使用する。腫瘍は固形腫瘍及び半固形腫瘍を含むことができる。腫瘍の非制限的な例には、非T細胞型（非T）急性リンパ芽球性白血病（A L L）、骨髄単球性白血病を含めたヒト白血病、並びに、血管肉腫、乳癌腫、胃癌腫、結腸癌腫、ホジキンリンパ腫、リンパ腫、多形膠芽腫（G B M）、肺癌腫、メラノーマ、ミエローマ、リンパ腫、骨肉腫、卵巣癌腫、耳下腺腫瘍、咽頭癌腫、前立腺癌腫、肝細胞癌腫、腎臓癌腫、及び直腸S字結腸癌腫を含めた、ヒト固形腫瘍及び半固形腫瘍、並びに（同型の正常組織による発現と比較して）中～高レベルでC D 1 0 5を発現するその周囲の血管系がある。

【0262】

治療する癌性組織は、例えば、異常なレベルのC D 1 0 5及び／又はV E G Fを発現する内皮組織である。

【0263】

腫瘍組織の新血管形成の不在下では、腫瘍組織は必要な栄養素が得られず、増殖が遅れ、更なる増殖が停止し、退化し最終的には壊死状態になり、腫瘍の殺傷に至る。腫瘍の血管新生を阻害することによって、腫瘍の新血管形成を阻害する方法を本明細書で提供する。同様に、腫瘍の増殖を阻害する方法を本明細書で提供する。

【0264】

これらの方法は、転移の形成に対しても特に有効である。それらの形成は、転移性癌細胞が原発性腫瘍から出ることができるような原発性腫瘍の血管形成を必要とし、二次部位中でのそれらの樹立は転移増殖をサポートするための新血管形成を必要とするからである。

【0265】

本発明の「癌／転移に罹患する対象」は、突然変異タンパク質（腫瘍関連抗原）又は突然変異遺伝子を発現する可能性があり、未だ疾患の前兆を示していないことは理解されよう。（突然変異K-rasタンパク質と関連がある）結腸癌の非制限的な一実施形態では、結腸のいくつかの細胞中の突然変異K-rasタンパク質を有する対象は、その対象が未だ結腸癌の前兆を示していない可能性がある場合でも、治療する対象である。「疾患の前兆又は症状」は、臨床的に認められた疾患の出現又は指標を表す。

10

【0266】

腫瘍又は転移に罹患する対象を「治療すること」によって、対象の兆候又は症状が、治療後に部分的に軽減されている、完全に軽減されている、又は停滞状態であることを意味する。治療されている患者は、腫瘍量の部分的又は完全な軽減を示すことができる。これは予防、療法及び治癒を含むものとする。非制限的な一例では、高転移性の癌（例えば、乳癌）に罹患する対象を治療し、この場合更なる転移がいずれかで生じる、又は治療を受けていない対象と比較して数が減少する。非制限的な別の例では、対象を治療し、この場合治療を受けていない対象と比較して、対象の固形癌は大きさが減少した状態、又は大きさが増大しない状態のいずれかになる。非制限的な更に別の例では、治療した対象中の癌細胞の数は、治療を受けていない対象中の癌細胞の数と比較して増大しないか、又は減少するかのいずれかである。例えば、細胞増殖の低下、細胞数の低下、アポトーシスの増大、及び／又は治療する対象の生存期間の増大として、改善を定義することもできる。

20

【0267】

治療は、腫瘍若しくは転移の部分的若しくは完全な排除及び／又は患者の生存期間の延長をもたらす得る。

【0268】

一実施形態では、1つ又は複数の兆候又は症状は、患者への1つ又は複数の用量の製剤の投与後に、重症度又は持続期間において、約2%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約90%、約95%又は約100%低減される。

30

【0269】

別の実施形態では、1つ又は複数の兆候又は症状は、患者への1つ又は複数の用量の製剤の投与後に、重症度又は持続期間において、約2倍、約5倍、約10倍、約15倍、約20倍、約25倍、約30倍、約35倍、約40倍、約45倍、約50倍、約55倍、約60倍、約65倍、約70倍、約75倍、約80倍、約90倍、約95倍、約100倍又はそれ以上低減される。

【0270】

本明細書に記載する方法中で治療する腫瘍又は癌には、肺癌、婦人科悪性腫瘍、メラノーマ、乳癌、脳癌（例えば、多形膠芽腫、「GBM」又はグリオーマ）、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、頭部癌、肝臓癌（肝細胞癌）、頸部癌、腎臓癌（腎臓細胞癌）、陰茎癌、胃癌、甲状腺癌、膀胱癌、肉腫、癌腫、ミエローマ、及びリンパ腫があるが、これらだけには限られない。一実施形態では、治療する腫瘍は固形又は半固形腫瘍である。別の実施形態では、治療する腫瘍は原発性腫瘍である。別の実施形態では、治療する腫瘍は転移性腫瘍である。一実施形態では、治療する腫瘍又は癌は上皮起源である。別の実施形態では、治療する癌はミエローマである。別の実施形態では、治療する癌は卵巣癌である。別の実施形態では、治療する癌は腎臓／腎癌である。更に別の実施形態では、治療する癌は肝細胞／肝臓癌である。

40

【0271】

50

化合物は、必要に応じて、アドリアマイシン、シクロホスファミド、パクリタキセル、ペメトレキセド、テモゾロミド、オキサリプラチン、セツキシマブ、パニツムマブ、ソラフェニブ、スニチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、5-フルオロウラシル、イリノテカン、トポテカン、ロイコボリン、ボルテズミブ、レナリドマイド、サリドマイド、カペシタビン、ドセタキセル、及び本明細書に記載する多くの他の従来の癌治療剤だけには限られないが、これらを含めた、1つ若しくは複数の他の療法治療剤と併用して投与することができる。本明細書で使用する「放射線」は、例えば、マイクロ波、紫外線（UV）、赤外線（IR）、又は α -、 β -若しくは γ -放射線を指す。放射線は、従来技法を使用して体全体を照射せずに1つ若しくは複数の腫瘍部位に「焦点を当てる」、又はそこに放射線に向けて局所送達することができる。以下に列挙する治療レジメンの一覧は従来の療法を表すが、本発明が、本明細書で具体的に開示しない他の知られている治療レジメンを包含することは理解されるであろう。

10

【0272】

一実施形態では、癌は卵巣癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、化学療法剤（例えば、ドキソルビシン、塩酸ドキソルビシンリボソーム、ゲムシタビン、及び白金系化学療法剤、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンなど）、メルファラン、トポテカン及びイリノテカンなどのトポイソメラーゼI阻害剤、タキサン系化学療法剤、ホルモン、放射線療法、全身低体温法、イソフラボン誘導体、エポチロンなどの細胞障害性マクロライド、ベバシズマブなどの血管新生阻害剤、トラツズマブなどのシグナル伝達阻害剤、遺伝子療法、RNAi療法、免疫療法、モノクローナル抗体、ラパ

20

【0273】

一実施形態では、癌は腎臓／腎臓癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、化学療法剤、パゾパニブ、インターフェロン- α 又はIL-2である。更に別の実施形態では、他の作用物質はVEGF受容体阻害剤である。VEGF受容体阻害剤の非制限的な例には、前に記載した阻害剤、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ及びパゾパニブがある。本明細書に記載する抗体と腎臓癌療法剤の併用療法は、療法剤の同時投与からの相乗効果により、低用量の1つ又は2つの療法をもたらすこともできる。

30

【0274】

一実施形態では、癌はミエローマであり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、放射線療法、ボルテズミブ、レナリドマイド、又はサリドマイドである。任意のこれらの療法に関する用量は当技術分野で知られており、必要に応じて併用療法で調節することができる。

【0275】

一実施形態では、癌は前立腺癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、放射線療法（例えば、外部ビーム又は小線源治療）、ホルモン剥奪療法（アビラテロンを含めたアンドロゲン抑制）、熱ショックタンパク質90（HSP90）阻害剤、化学療法剤（例えば、ドセタキセル、エストラムスチン、シスプラチン、カルボプラチン、サトラプラチン及びオキサリプラチンなどの白金系化学療法剤）、プレドニソン又はプレドニソロン、スタチンなどのコレステロール低下薬、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、RNAi療法、樹状細胞系療法、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を分泌するように遺伝的に改変された完全腫瘍細胞（GVAXとしても知られる）、又はこれらの任意の組合せである。更に別の実施形態では、他の作用物質はVEGF受容体阻害剤である。VEGF受容体阻害剤の非制限的な例には、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ及びパゾパニブがある。

40

【0276】

一実施形態では、癌は肺癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、放

50

射線療法（例えば、胸部放射線療法、帯電粒子を用いた放射線療法）、ウラシルーテガフル及び白金系化学療法剤（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチンなど）、及びビノレブリン、エルロチニブ、ゲフィニチブ、抗上皮増殖因子受容体抗体（例えば、セツキシマブ）、チロシンキナーゼの小分子阻害剤、肺癌細胞増殖に關与するタンパク質の直接阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、レーザー誘導温熱療法、RNAi療法、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）を分泌するように遺伝的に改変された完全腫瘍細胞（GVAXとしても知られる）、又はこれらの任意の組合せである。他の療法治療剤はパクリタキセル又はペメトレキセドを含む。更に別の実施形態では、他の作用物質はVEGF受容体阻害剤である。VEGF受容体阻害剤の非制限的な例には、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ及びパゾパニブがある。任意のこれらの療法に關する用量は当技術分野で知られており、必要に応じて併用療法で調節することができる。

10

【0277】

一実施形態では、癌は乳癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、モノクローナル抗体（例えば、Her-2抗体、ヘルセプチン）、単剤化学療法又は併用化学療法などのアジュバント化学療法（例えば、アントラサイクリン及びタキサン系多剤化学療法）、又は標的特異的トラツズマブ、エンドクリン操作あり又はなし、PMRT操作あり又はなし、ビノレルビン）、アドリアマイシン、シクロホスファミド、カペシタビン、ドセタキセル、タモキシフェン及びラロキシフェンなどの選択的エストロゲン受容体モジュレーター、トリロスタンなどのアロステリックエストロゲン受容体モジュレーター、放射線療法（例えば、腸内小線源治療、マンモサイトデバイス、3次元等角外部放射及び術中放射線療法）、全身合成を抑制するアロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール、エクセメスタン及びレトロゾール）、RNAi療法、テムシロリムスなどの免疫抑制があり抗増殖性である静脈内用ラパマイシンアナログ、又はこれらの任意の組合せである。乳癌の三次元in vitro組織培養モデルを実施するための方法の総説は、Kim et al., Breast Cancer Research Treatment 85(3):281-91(2004)によって記載される。癌を試験するための他のin vivo及びin vitroモデルは知られており、本明細書に記載する抗体を試験するために使用することができる。更に別の実施形態では、他の作用物質はVEGF受容体阻害剤である。VEGF受容体阻害剤の非制限的な例には、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ及びパゾパニブがある。任意のこれらの療法に關する用量は当技術分野で知られており、必要に応じて併用療法で調節することができる。

20

30

【0278】

一実施形態では、癌は結腸癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、外科手術、放射線療法、及び化学療法剤（例えば、5-フルオロウラシル、レバミゾール、ロイコボリン又はセムスチン（メチルCCNU））、N-[2-(ジメチルアミノ)エチル]アクリジン-4-カルボキシアミド及び他の関連カルボキシアミド抗癌剤、非トポイソメラーゼII阻害剤、イリノテカン、リボソームトポテカン、タキサンの抗増殖剤（例えば、パクリタキセル又はドセタキセル）、キサンテノン酢酸クラスの化合物（例えば、5,6-ジメチルアンテノン-4-酢酸PMAA）、ラミナリン、部位選択的環状AMPアナログ（例えば、8-クロロアデノシン3',5'-環状リン酸）、Cox-2のピラノインドール阻害剤、Cox-2のカルバゾール阻害剤、Cox-2のテトラヒドロカルバゾール阻害剤、Cox-2のインデン阻害剤、NSAIDsの局所阻害剤（例えば、アンスラニル酸、アスピリン（5-アセチルサリチル酸）、アゾジサルナトリウム、ヘテロ複素環式炭酸、カルプロフェン、クロラムブシル、ジクロフェナク、フェンブフェン、フェンクロフェナク、フェノプロフェン、フルフェナム酸、フルビプロフェン、フルプロフェン、フロセミド、チオマレイン酸ナトリウム金、イブプロフェン、インドメタシン、インドプロフェン、ケトプロフェン、ロナゾラック、ロキソプロフェン、メクロフェナム酸、メフェナム酸、メルファラン、ナプロキセン、ペニシラミン、フェニル酢酸、プロピオン酸、サリチル酸、サラゾスルファピリジン、スリンダク、トルメチン、ピラゾロンブタゾン

40

50

プロパゾンNSAID、メロキシカム、オキシカム、ピロキシカム、フェルデン、ピロキシカムβシクロデキストラン、テノキシカム、エトドラック、及びオキサプロジン）、HER-2/neuの阻害剤、RNAi療法、GM-CSF、モノクローナル抗体（例えば、抗HER-2/neu抗体、抗CEA抗体、A33（HB8779）、100-210（HB11764）及び100-310（HB11028））、セツキシマブ、パニツムマブ、ホルモン療法、ピリミジンアミン、カンプトテシン誘導体（例えば、CPT-11）、フォリン酸（FA）、ゲムシタビン、Ara-C、シスプラチン、カルボプラチン及びオキサリプラチンなどの白金系化学療法剤、cGMP特異的ホスホジエステラーゼ阻害剤、又はこれらの任意の組合せである。一実施形態では、他の療法治療剤は5-フルオロウラシル、ロイコボリン及びオキサリプラチンの組合せ（FOLFOLX）である。一実施形態では、他の療法治療剤は5-フルオロウラシル、イリノテカン及びロイコボリンの組合せ（IFL）である。一実施形態では、他の作用物質はセツキシマブである。一実施形態では、他の作用物質はパニツムマブである。更に別の実施形態では、他の作用物質はVEGF受容体阻害剤である。VEGF受容体阻害剤の非制限的な例には、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ及びパゾパニブがある。任意のこれらの療法に関する用量は当技術分野で知られており、必要に応じて併用療法で調節することができる。

10

【0279】

一実施形態では、癌は膵臓癌であり、1つ若しくは複数の他の療法治療は、療法治療の組合せ、外科手術、放射線療法、5-フルオロウラシル及び放射線治療、全身療法、ステント挿入、ゲムシタビン、ゲムシタビン及び放射線治療、セツキシマブ、エルロチニブ、化学的放射、又はこれらの任意の組合せである。更に別の実施形態では、他の作用物質はVEGF受容体阻害剤である。VEGF受容体阻害剤の非制限的な例には、アフリベルセプト、スニチニブ、ソラフェニブ、アキシチニブ及びパゾパニブがある。

20

【0280】

治療レジメン前、最中、及び後を含めた1回又は多数回の時間地点で、いくつかの兆候又は症状に関して患者を評価することができる。治療は対象の状態の改善をもたらすことができ、1つ又は複数の以下の要因：腫瘍の大きさの低下、細胞増殖の低下、細胞数の低下、新血管形成の低下、アポトーシスの増大、又は細胞増殖障害を含む細胞の少なくとも一部分の生存の低下が発生したかどうか決定することによって評価することができる。1つ又は複数のこれらの発生は、いくつかの場合、癌の部分的又は完全排除及び／又は患者の生存期間の延長をもたらす可能性がある。或いは、末期段階の癌に関して、治療は疾患の停滞、より良い生活の質及び／又は生存期間の延長をもたらす可能性がある。

30

【0281】

組成物を順次に投与するとき、本明細書に記載する抗CD105抗体を含む組成物は、例えば、抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）の前及び／又は後に投与することができる。

【0282】

組成物を同時に投与するとき、抗CD105抗体を含有する組成物は、抗VEGF抗体を含有する組成物と同じ部位、又は異なる部位に投与することができる。

40

【0283】

なお別の実施形態では、細胞分裂促進活性、細胞増殖、腫瘍増殖、新血管形成、又は血管新生活性などの、それぞれCD105又はVEGFの生物活性の1つ又は複数を阻害することができる、抗CD105抗体及び抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）を含有する組成物（医薬品）を本明細書で提供する。

【0284】

治療レジメンは、本明細書に記載するそれぞれの組成物の、単数回又は複数回の投与を含むことができることは理解されよう。組成物は単数回用量又は複数回用量で投与することができる。別個の組成物の投与は、同じ経路又は異なる経路による投与であってよい。

【0285】

50

一実施形態では、6～12サイクル又は腫瘍進行まで1～3週毎に組成物を投与する。この方法は、最大2年間1～12週毎に組成物を投与するステップを更に含むことができる。別の非制限的な例では、抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）の同時投与は第1週で行い、次に第1、2、3又は4週で組成物を追加投与し、この場合同時投与は6～12サイクル又は腫瘍進行まで繰り返し、次に最大2年間1～12週毎に組成物を投与する。

【0286】

患者中の癌を治療するための方法の非制限的な一例では、この方法は、外科手術による癌の除去、及び12カ月間1～3週又は腫瘍進行までの抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）の投与、次に1～12週一定用量での抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）の同時投与を含む。更に、抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）の同時投与は、最大6サイクルで1～3週毎に繰り返すことができる。場合によっては、この方法は、最大2年間1～12週毎に、抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）を投与することを更に含む。治療レジメンを本明細書で提供するモニタリング法と組合せて、更なる用量の抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）を投与する必要があるかどうか、及びいつ投与すべきかを決定することができることは理解されよう。

【0287】

併用療法は相乗及び／若しくは有益効果をもたらすことができ、又は低用量の組合せを与えて高度の安全性をもたらすことができる。本発明は、癌又は他の疾患を予防、管理、治療又は除去するための、抗CD105抗体と抗VEGF抗体（又はその抗原結合断片）の予防又は治療効果を高める治療プロトコルを包含する。

【0288】

一実施形態では、例えば（本明細書に記載する）血管新生阻害剤などの更なる療法治療剤を対象に投与する。このような更なる療法治療剤を含有する組成物は、本明細書に記載する他の組成物と併用して（順次又は同時のいずれかで）投与することができる。

【0289】

本明細書に提供する癌を治療するための1つの非制限的な方法では、更なる療法治療は、外科手術による癌の除去、照射、1つ若しくは複数の化学療法剤、又はこれらの組合せ、及び本明細書に記載する1つ又は複数の組成物の同時投与を含む。一態様では、組成物の投与は、例えば20分の静脈内注入であってよい。

【0290】

血管新生を伴う眼の状態

一態様では、本発明は、治療有効量の本明細書で提供する1つ又は複数の製剤を患者に投与することによって、患者中の糖尿病性網膜症、黄斑変性症、脈絡膜血管新生、黄斑浮腫又は血管新生緑内障を治療するための方法を提供する。

【0291】

黄斑変性症（AMD）は、高い視力を担う黄斑と呼ばれる中心網膜部分の光受容体の消失である。黄斑の変性は、網膜色素上皮と血管脈絡膜との間の膜中の、細胞外マトリクス要素及び他の残骸の異常な堆積と関係がある。この残骸様の物質は硝子小体と呼ばれる。硝子小体は眼底鏡検査で観察される。正常な眼が硝子小体を含まない黄斑を有する可能性はあるが、硝子小体は網膜周辺に多量に存在する可能性がある。黄斑視覚のいかなる消失もない状態での、黄斑中の柔らかい硝子小体の存在は初期段階のAMDであると考えられる。黄斑変性症は、脈絡膜血管新生（CNV）、網膜の網膜色素上皮（RPE）層下の異常な血管の発達によって特徴付けられる。これらの血管はブルッフ膜を介して破裂し、網膜色素上皮を破壊し、出血し、黄斑瘢痕形成を最終的に引き起こし、これが中心視力の顕著な消失をもたらす（円盤状瘢痕形成）。

【0292】

脈絡膜血管新生（CNV）は、他の眼部障害以外に黄斑変性症において一般に生じ、脈絡膜内皮細胞の増殖、細胞外マトリクスの過剰生産、及び線維血管性網膜下膜の形成と関

10

20

30

40

50

係がある。網膜色素上皮細胞増殖及び血管新生因子の生成は、脈絡膜血管新生に影響をもたらすようである。

【0293】

糖尿病性網膜症（DR）は、毛細血管基底膜の肥大が原因で糖尿病において発症する過剰な血管新生、及び毛細血管の周皮細胞と内皮細胞との間の接触の欠如によって特徴付けられる眼部障害である。周皮細胞の消失によって毛細血管の漏出が増大し、血液－網膜関門の破壊をもたらす。糖尿病性網膜症は微小血管網膜の変化の結果である。高血糖誘導性の周皮細胞死及び基底膜の肥大は、血管壁の不全をもたらす。これらの損傷は血液－網膜関門の形成を変え、更に網膜血管をより浸透性が高い状態にする。眼中の血管などの小血管は、低血糖（血中グルコース）調節の影響を特に受けやすい。グルコース及び／又はフルクトースの過剰蓄積は網膜中の小血管に損傷を与える。損傷血管が黄斑に流体及び脂質を漏出するときに、黄斑浮腫が発症する可能性もある。これらの流体が黄斑を膨張させ、それが視界を曇らせる。この損傷は網膜における酸素の欠如を更にもたらす。

10

【0294】

疾患が進行すると、網膜における酸素の欠如は、網膜及び眼の内側を満たす透明な、ゲル様の硝子体液に沿った血管新生を刺激する。適時の治療がない場合、これらの新しい血管は出血し、視界を曇らせ、網膜を破壊する可能性がある。維管束増殖は牽引性網膜剥離を引き起こす可能性もある。新しい血管は前眼房隅角に増殖し、血管新生緑内障を引き起こす可能性もある。

【0295】

20

増殖性硝子体網膜症は、硝子体膜内及び網膜表面上の細胞及び線維膜の細胞増殖と関係がある。網膜色素上皮細胞の増殖及び移動はこの眼部障害に共通である。増殖性硝子体網膜症と関係がある膜は、コラーゲン I、I I、及び I V 型並びにフィブロネクチンなどの細胞外マトリクス要素を含有し、徐々に線維状になる。

【0296】

加齢性黄斑変性症（AMD）及び糖尿病性網膜症は、先進国における 2 つの主な失明の原因である。アフリベルセプト、ラニビズマブ及びペガプタニブは、AMD 患者に利用可能な治療の選択肢を改善した。ラニビズマブは F a b であり、アルフィベリセプト（a l f i b e r c e p t）は融合タンパク質である。これらはいずれも血管内皮増殖因子（V E G F）と結合し、AMD を治療する最も印象的な結果が今日までに実証されているが、しかし、少数の治療患者のみが視力の有意な改善を経験する。V E G F 以外の標的に焦点を当てる抗血管新生療法は、V E G F 経路を標的化する薬剤に関するいくつかの制約を克服することができる。

30

【0297】

本明細書に記載する抗 C D 1 0 5 抗体を使用して、黄斑変性症、C N V、糖尿病性網膜症、又は増殖性硝子体網膜症を治療又は予防することができる。本明細書に記載する抗体の投与によって、黄斑変性症、C N V、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫又は増殖性硝子体網膜症を治療又は予防する方法を本明細書に記載する。本明細書に記載する抗 C D 1 0 5 抗体は、血管を収縮する、眼部疾患と関係がある内皮細胞増殖を阻害する、出血の兆候若しくは症状を除去する、不透明な視界を治療する、視力喪失の停止をもたらす、視覚を改善する、及び／又は血管漏出を防ぐこともできる。本明細書に記載する抗 C D 1 0 5 抗体は、黄斑変性症、C N V、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫又は増殖性硝子体網膜症を治療するための医薬品において使用することもできる。

40

【0298】

更に、本明細書に記載する抗 C D 1 0 5 抗体を、黄斑変性症、C N V、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫又は増殖性硝子体網膜症を治療するための知られている治療剤及び／又は化合物と併用して使用することもできる。このような化合物の例には、ラニビズマブ、アフリベルセプト及びペガプタニブが含まれるが、これらだけには限られない。本明細書に記載する投与形態以外に、硝子体内経路によって抗 C D 1 0 5 抗体を投与することができる。硝子体内投与形態の非制限的な例には、硝子体内注射、及び硝子体内移植の使用がある。

50

【0299】

治療に対する改善及び応答性に関して患者を評価することができる。治療は、黄斑浮腫の減少、CNV領域の減少、及び視力の増大を含むが、これらだけには限られない。兆候又は症状の測定は当技術分野で知られており、以下の実施例中で更に記載する。

【0300】

本明細書に記載する実施形態によれば、本明細書に記載する製剤は、単独で、又は1つ若しくは複数の更なる活性剤若しくは不活性剤と併用して投与することができる。併用を使用するとき、抗CD105抗体及び抗VEGF抗体（その抗原結合断片）の同時又は連続投与を使用することができる。

【0301】

10

機能アッセイ

本明細書に記載する製剤は、様々な*in vitro*、*in vivo*及び*ex vivo*アッセイ中で評価することができる。当技術分野で知られている任意の適切なアッセイを使用して、このような影響をモニタリングすることができる。いくつかのこのような技法は本明細書に記載する。

【0302】

CD105のシグナル伝達及び機能に関するアッセイ

CD105（エンドグリン）は増殖内皮細胞によって発現されるTGF- β 受容体ファミリーのメンバーであり、正常レベルのCD105が内皮細胞増殖に必要とされる。CD105は固形腫瘍の血管新生脈管構造中で強く発現され、血管新生／血管発達に関与し、補助的形質転換増殖因子 β （TGF- β ）受容体である。CD105は、白血病細胞及び内皮細胞において発現されるホモ二量体細胞膜糖タンパク質である。それらの細胞質尾部のアミノ酸配列が異なる、2つのアイソフォームのCD105、L-エンドグリン（170 kDa）及びS-エンドグリン（160 kDa）が特徴付けされている。

20

【0303】

CD105の発現は、低酸素誘導因子-1- α （HIF-1- α ）の生成を介した細胞の低酸素状態によって増大し、アポトーシスから低酸素細胞を保護する。CD105は、TGF- β 受容体（TGF- β R）、アクチビン受容体様キナーゼ（ALK）及びアクチビン受容体を含めた、TGF- β スーパーファミリーの多数のキナーゼ受容体複合体のシグナル伝達を調節するために作用する。CD105の不在下において、TGF- β 受容体の活性化は、内皮細胞増殖を阻害するSMADタンパク質のリン酸化をもたらす。しかし、TGF- β によるCD105の活性化は、SMADタンパク質のリン酸化を調節する。最終結果は、内皮細胞に対するTGF- β 受容体活性化の増殖阻害効果の表れである。

30

【0304】

抗CD105抗体によるCD105活性化の防止は、TGF- β と共同作用して内皮細胞の増殖を抑制する。TGF- β は、内皮細胞中とは逆の効果で2つの異なるI型受容体／SMADシグナル伝達経路を刺激することができる。TGF- β ／ALK5シグナル伝達経路（A）は細胞の増殖及び移動の阻害をもたらす、一方TGF- β ／ALK1経路（B）は内皮細胞の増殖及び移動を誘導する。血管新生中に高度に発現されるCD105、補助的TGF- β 受容体は、ALK1シグナル伝達に必要不可欠である。CD105の不在下では、TGF- β ／ALK5シグナル伝達経路が主要であり、静止状態の内皮を維持する。高いCD105発現はALK1経路を刺激し、ALK5シグナル伝達を間接的に阻害し、したがって血管新生の活性化状態を促進する。

40

【0305】

非制限的な一実施形態では、血管新生の阻害及び内皮細胞増殖に関して、抗体を評価することができる。抗CD105抗体とHUVECの結合が、TGF- β とHUVECの後の結合を妨げることはない。したがって、抗CD105抗体による内皮細胞増殖の直接抑制は、それによって抗血管新生及び腫瘍抑制効果が*in vivo*で観察される根底メカニズムの1つを表す。別の実施形態では、Smad1／5／8リン酸化及び／又はシグナル伝達の予防による血管新生の遮断に関して、抗体を評価することができる。CD105

50

は $TGF-\beta / ALK1$ のシグナル伝達を介した血管新生の促進に関与し、したがってこれは $Smad2/3$ タンパク質のリン酸化の低下及び／又は遮断と関係する。更に別の実施形態では、 $Smad2/3$ リン酸化及び／又はシグナル伝達の増大による血管新生の遮断に関して、抗体を評価することができる。

【0306】

$TGF-\beta / ALK1$ シグナル伝達経路及び／又は $Smad1/5$ のリン酸化に対する本明細書で提供する抗体の遮断又は阻害効果をアッセイするための方法及び技法には、知られている分子学的技法があるが、これらだけには限られない。例えば、 $TGF-\beta / ALK5$ 又は $TGF-\beta / ALK1$ 経路中の任意のタンパク質に特異的な抗体を用いるウェスタンブロッティングを使用して、 $TGF-\beta / ALK5$ 又は $TGF-\beta / ALK1$ 経路 10 に対する本明細書で開示する抗 $CD105$ 抗体の阻害及び／又は刺激効果を決定することができる。同様に、 $TGF-\beta / ALK5$ 又は $TGF-\beta / ALK1$ 経路に関与するタンパク質の $mRNA$ の検出又は $mRNA$ の制御を使用して、本明細書で開示する抗体の阻害及び／又は刺激効果をアッセイすることができる。 $TGF-\beta / ALK5$ 又は $TGF-\beta / ALK1$ 経路に関する細胞のシグナル伝達をアッセイするための他の方法は当技術分野で知られており、本明細書において企図する。

【0307】

本明細書で開示する抗 $CD105$ 抗体の活性は、当技術分野で認められているアッセイを使用して、例えば $ELISA$ 、競合 $ELISA$ などの結合アッセイ、表面プラズモン共鳴、及び以下でより詳細に記載する $HUVEC$ 細胞に対する影響によって評価することができる。 20

【0308】

SCID／ヌードマウス

腫瘍増殖をアッセイするための1つの方法は、以下のように $SCID$ マウスを利用する。半密集状態のヒト $M21$ メラノーマ細胞を採取し、洗浄し、滅菌 PBS (1 mL 当たり 20×10^6) 中に再懸濁する。 $SCID$ マウスには、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の $M21$ ヒトメラノーマ細胞 (2×10^6) 懸濁液を皮下注射する。腫瘍細胞注射後3日で、マウスは未治療状態であるか、或いは1つ又は複数の対照又は試験製剤で静脈内又は腹腔内治療する (例えば、 $100\text{ }\mu\text{g}$ / マウス)。マウスは24日間一日一回治療する。腫瘍の大きさはカリパスで測定し、体積は式 $V = (L \times W^2) / 2$ を使用して測定し、前式で V は体積に等しく、 L は長さに等しく、且つ W は幅に等しい。 30

【0309】

腫瘍増殖をアッセイするための1つの方法は、以下のようにヌードマウスを利用する。 $MDA-MB-435$ 腫瘍細胞 (0.4×10^6 細胞 / マウス)、 $50\text{ }\mu\text{l}$ PBS 中を、メスヌードマウス (5～6週齢) の乳腺脂肪体中に正所移植する。腫瘍が約 $50 \sim 80\text{ mm}^3$ の平均体積に達したとき、マウスをランダムに処理し (少なくとも10 / 群)、1週間当たり2回の、1つ又は複数の抗体、投与当たり $1\text{ }\mu\text{g}$ ($0.05\text{ mg} / \text{kg}$)、 $10\text{ }\mu\text{g}$ ($0.5\text{ mg} / \text{kg}$)、 $100\text{ }\mu\text{g}$ ($5\text{ mg} / \text{kg}$) 又は $200\text{ }\mu\text{g}$ ($10\text{ mg} / \text{kg}$)、又は $100\text{ }\mu\text{g}$ 対照抗体、 $100\text{ }\mu\text{l}$ PBS 中、又は賦形剤 PBS $100\text{ }\mu\text{l}$ を用いた静脈内又は腹腔内治療を開始し、いくつかの試験では、未治療群も評価することができる。腫瘍の大きさはカリパスで測定し、体積は式 $V = (L \times W^2) / 2$ を使用して測定し、前式で V は体積に等しく、 L は長さに等しく、且つ W は幅に等しい。 40

【0310】

BALB／c 同系マウスモデル

或いは、 $BALB/c$ 同系マウスモデルを利用して、抗体により、又は例えば $Tsujie et al., Int. J. Oncology, 29:1087-1094 (2006)$ によって例証され本明細書に記載するように、腫瘍増殖及びその阻害を評価することもできる。

【0311】

マウス

10

20

30

40

50

別のアッセイはキメラマウス：ヒトマウスモデルにおける血管新生を測定し、キメラマウスアッセイと呼ばれる。このアッセイは他者によって詳細に記載されており、本明細書で更に記載して血管新生、新血管形成、及び腫瘍組織の退行を測定する。Yan, et al. (1993) J. Clin. Invest. 91: 986-996を参照。

【0312】

キメラマウスアッセイは、移植皮膚片が組織学的に正常なヒトの皮膚と非常に似ているので、*in vivo*血管新生の有用なアッセイモデルであり、全組織の新血管形成が起こり、この場合実際のヒト血管は、移植したヒトの皮膚から、移植したヒトの皮膚の表面上のヒト腫瘍組織に増殖する。ヒト移植片への新血管形成の起源は、ヒト特異的内皮細胞マーカーを用いた新血管の免疫組織化学的染色によって実証することができる。

10

【0313】

キメラマウスアッセイは、新血管増殖の退行の量と程度の両方に基づいて、新血管形成の退行を実証する。更に、腫瘍組織などの移植片皮膚上に移植した任意の組織の増殖に対する影響を、モニタリングすることは容易である。最後に、アッセイシステム中に毒性に関する内部対照が存在するので、このアッセイは有用である。キメラマウスは任意の試験試薬に曝し、したがってマウスの健康状態は毒性の指標である。本明細書に記載し当技術分野で知られている他の動物モデルも、本明細書に記載する方法中で利用することができる。

【0314】

ウサギの眼のアッセイ

20

血管新生の別の測定法は*in vivo*ウサギの眼モデルであり、ウサギの眼のアッセイと呼ばれる。ウサギの眼のアッセイは他者によって詳細に記載されており、D'Amato et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(9): 4082-4085によって例証されたように、これを使用して血管新生阻害剤の存在下で血管新生と新血管形成の両方が測定されている。

【0315】

ウサギの眼のアッセイは*in vivo*血管新生の認められているアッセイモデルである。角膜の縁から角膜に増大するウサギの血管によって例証される新血管形成プロセスは、本来透明な眼の角膜によって容易に見ることができるからである。更に、新血管形成又は新血管形成の退行の刺激又は阻害の程度と量の両方を、経時的に容易にモニタリングすることができる。

30

【0316】

最後に、ウサギは任意の試験試薬に曝し、したがってウサギの健康状態は試験試薬の毒性の指標である。

【0317】

簡単に言うと、ニワトリ絨毛尿膜 (CAM) アッセイを実施し、脈管構造発達に対する影響を、1つ又は複数の対照又は試験化合物を含有する0.5%カルボキシメチルセルロースペレットの移植後48時間で記録する。角膜の新血管形成は、スクラルフェート (シヨ糖硫酸エステルアルミニウム塩; Bukh Meditec, Copenhagen) と結合した650 ngの強力な血管新生タンパク質塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を含有するポリ (ヒドロキシエチルメタクリレート) (Hydron; Interferon Sciences, New Brunswick, NJ) の移植ペレットによって誘導する。ペレットへのスクラルフェートの添加はbFGFが分解するのを妨げ、その徐放をもたらし、したがってbFGF/Hydron単独によって誘導される血管新生より顕著な絶えず攻撃性のある血管新生をもたらす。スクラルフェート/Hydronを含有するペレットからのbFGFの放出は、Hydronのみを有するペレットのわずか1日と比較して、ペレット形成後最大4日間*in vitro*で検出することができる。ペレットは12 µgの組換えbFGF (Takeda, Osaka) を含有する110 µlの生理食塩水と40 mgのスクラルフェートを混合することによって作製し、この懸濁液を80 µlの12% (wt/vol) Hydron、エタノール中に加える。次いでこの

40

50

混合物のアリコート（10 μl）をテフロンペグにピペットで加え、放置乾燥させて、約17ペレットを生成する。

【0318】

縁から2mmの麻酔済みメスニュージールランドホワイトウサギのそれぞれの眼の角膜マイクロポケットにペレットを移植し、次に角膜の表面上にエリスロマイシン軟膏を1回局所施用する。数日連続の組織学的検査は、角膜中ペレットでの段階的な血管増殖を実証し、わずかな炎症細胞のみが見られる。この血管新生応答が全身照射による重度の免疫抑制によって変わることはなく、スクラルフェートのみを有するペレットが血管新生を誘導することはない。新しい血管は、炎症によってではなくbFGFによって主に誘導される。0.5%カルボキシメチルセルロース又は賦形剤単独に懸濁した1つ又は複数の化合物を用いる胃洗浄による移植後2日から、動物には毎日エサを与える。免疫抑制動物には、ペレットの移植直前に6分間6Gyの全身照射を与える。この照射線量は、顕著な白血球減少、並びに第2日までに80%超及び第3日までに90%超の白血球数の減少、以前の報告と一致する結果をもたらす。

【0319】

同じ角膜専門家（M. S. L.）によって一日おきに、密閉状態においてスリットランプで動物を調べる。角膜新血管形成の領域は、レティキュールで縁からの血管長（L）、及び関連縁の実働時間数（C）を測定することによって決定する。式： $C / 12 \times 3.1416 [r^2 - (r - L)^2]$ を使用して環状帯分節領域を決定し、この場合 $r = 6 \text{ mm}$ 、測定したウサギの角膜の径である。ペレット近辺の新血管形成の均一な隣接帯を測定し、したがって新血管形成の全体的阻害を評価することができる。

【0320】

マウスマトリゲルプラグ血管新生アッセイ

血管新生に対する製剤の影響を確認するために、マウスマトリゲルプラグ血管新生アッセイを使用することができる。様々な増殖因子（例えば、IGF-1、bFGF又はVEGF）（250 ng）及びヘパリン（1mL当たり0.0025単位）を、以前に記載されたように（Montesano, et al., J. Cell Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson, et al., J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141）低増殖因子マトリゲルと混合する。本明細書に記載する製剤又は対照抗体は、1つ又は複数の用量群の動物を利用してマトリゲル調製物に含めることができる。対照実験では、マトリゲルは増殖因子の不在下で調製する。マウスには0.5mLのマトリゲル調製物を皮下注射し、1週間インキュベーションする。インキュベーション時間後、マウスを屠殺し、重合マトリゲルプラグは外科手術によって除去する。マトリゲルプラグ内の血管新生は、免疫組織化学的分析及びヘモグロビン含有量（Furstenberger, et al., Lancet. 2002, 3:298-302; Volpert, et al., Cancer Cell 2002, 2(6):473-83; 及びSu, et al., Cancer Res. 2003, 63:3585-3592）を含めた、2つの確立した方法によって定量化する。免疫組織化学的分析用に、マトリゲルプラグはOCT中に包埋し、急凍結し、4 μm切片を調製する。凍結切片はメタノール/アセトン（1:1）中に固定する。凍結切片はCD31を対象とするポリクローナル抗体で染色する。20倍高倍（200X）顕微鏡視野内の微小血管密度数によって血管新生を定量化する。

【0321】

ヘモグロビン含有量は、以前に記載されたように（Schnaper, et al., J. Cell Physiol. 1993, 256:235-246; Montesano, et al., J. Cell Biol. 1983, 97:1648-1652; Stefansson, et al., J. Biol. Chem. 2000, 276:8135-8141; 及びGigli, et al., J. Immunol. 1986, 100:1154-1164）定量化することができる。マトリゲルインプラントはドライアイス上で急凍結し、一晚凍結乾燥させる。乾燥したインプラントは1時間1.0%サボニ

ン0.4mL (Calbiochem) 中に再懸濁し、強度のピペット処理で破壊する。調製物は14,000Xgで15分間遠心分離して、いかなる粒子も除去する。次いで上清中のヘモグロビン濃度を、405nmでの吸光度を測定することによって直接決定し、精製ヘモグロビンの標準濃度と比較する。

【0322】

細胞移動をアッセイする方法

細胞移動に関するアッセイは文献中で、例えばBrooks, et al., J. Clin. Invest. 1997, 99:1390-1398によって記載されており、細胞移動を測定するための方法は当業者に知られている。本明細書に記載する細胞移動を測定するための一方法では、トランスウエル移動チャンバーからの膜を基質（ここでは、CD105及び／又はVEGF）でコーティングし、トランスウエルを洗浄し、非特異的結合部位はBSAで遮断する。半密集状態の培養物由来の腫瘍細胞を採取し、洗浄し、アッセイ抗体の有無の下で移動バッファー中に再懸濁する。コーティングしたトランスウエル膜の下側に腫瘍細胞を移動させた後、膜の上側に残存する細胞を除去し、下側に移動した細胞はクリスタルバイオレットで染色する。次いで細胞移動は、顕微鏡視野当たりの直接細胞数によって定量化する。

10

【0323】

細胞増殖をアッセイする方法

細胞増殖は当業者に知られている方法によってアッセイすることができる。本明細書に記載するように、半密集状態のヒト内皮細胞（HUEC）を、ECV又はECVL細胞由来のCM（25μL）の有無の下で低濃度（5.0%）血清を含有する増殖バッファー中に再懸濁することができ、内皮細胞は24時間増殖することができる。市販のWST-1アッセイキット（Chemicon）を使用してミトコンドリアデヒドロゲナーゼ活性を測定することによって、増殖を定量化することができる。更に、本明細書に記載するように、標準的な方法を使用して³Hの取込みを測定することによって、増殖を定量化することができる。（Sheet al., Int. J. Cancer, 108:251-257 (2004)）。

20

【0324】

細胞増殖を評価する他の方法は当技術分野で知られており、本明細書において企図する。更なる非制限的な例は実施例中でより詳細に記載する。

30

【0325】

CDC、ADCC及びオプソニン作用を誘導する方法

様々な療法が、形質転換細胞に対する身体の本来の免疫応答を高めることを対象としている。従来のエフェクター法には、補体依存性細胞溶解反応（CDC）、抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）及びファゴサイトーシス（標的細胞を免疫グロブリンでコーティングした後の細網内皮系による除去）がある。抗体の存在下では、抗体のFc領域に対する表面結合受容体を有するリンパ球細胞などの特定のエフェクター細胞は、標的細胞に対する抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）反応を仲介することが知られている。ADCCによって、これらのエフェクター細胞は、このような標的細胞に対して細胞溶解活性を発揮する。

40

【0326】

2つの型のADCC反応がin vitroで実証されている。古典的ADCC反応では、エフェクター細胞は抗体コーティング標的細胞と結合し、後に標的細胞の細胞溶解を引き起こす（A. H. Greenberg et al., 「Characteristics Of The Effector Cells Mediating Cytotoxicity Against Antibody-Coated Target Cells」、Immunology, 21, p. 719 (1975)）。エフェクターと標的細胞の間のこの結合は、標的細胞コーティング抗体のFc領域とエフェクター細胞のFc受容体の相互作用に起因する。この型のADCC反応の1つの欠点は、エフェクター細胞のFc受容体に対する標的細胞結合抗体と競合し様々な疾患に関与することが多い

50

循環抗原－抗体複合体によって、それが妨害される可能性があることである（I. C. M. MacLennan, 「Competition For Receptors For Immunoglobulin On Cytotoxic Lymphocytes」、Clin. Exp. Immunol., 10, p. 275 (1972)）。古典的ADCCのこの欠点のため、第二の型のADCC反応、抗体対象ADCCを利用することができる。抗体対象ADCCでは、標的特異的抗体がエフェクター細胞と最初に結合し、次いで生成した複合体が、標的細胞表面上のその特異的抗原に対する抗体によって「対象にされる」。有利なことに、抗体対象ADCCが、宿主系を循環する抗原－抗体複合体の存在によって影響を受ける可能性はない。Fc領域／Fc受容体結合を介した抗体とエフェクター細胞の間の相互作用は通常弱い。更に、いくつかの場合、標的細胞の溶解を可能にするほど十分な時間の間、抗体はエフェクター細胞との結合状態を保たない。この潜在的な問題を鑑みて、ポリエチレングリコールとフタル酸油の混合物を用いた前処理を使用して、抗体とエフェクター細胞を結合させている（J. F. Jones and D. M. Segal, J. Immunol., 125, pp. 926－33 (1980)）。しかし、*in vivo*治療に関するこの方法の適用性は、抗体－エフェクター細胞複合体上の任意のポリエチレングリコールとフタル酸油残基が身体に対して有し得る毒性効果によって低下する可能性がある。

10

【0327】

或いは、細胞傷害性薬剤を用いたアジュバント化学療法によって、抗体対象ADCCを高めるための方法が提案されている（I. R. Mackay et al., Cancer Immunol. Immunother., 16, pp. 98－100 (1983)）。例えば米国特許第5, 756, 097号などの、ADCCを試験するためのアッセイは当技術分野でよく知られている。

20

【0328】

したがって、本発明のいくつかの実施形態は、その新血管形成又は血管新生において役割を有し、ファゴサイトーシスを高め細胞を殺傷し、それによって*in vivo*での防御を高めることができる、細胞と結合することができる抗体を提供する。このような抗体と結合することができ同じ効果を有する、結合部位又はエピトープと免疫反応、特異的に結合、又は優先的に結合する、他の抗体及びその機能断片も提供する。

【0329】

更に抗体はオプソニン性である可能性があり、又は新血管形成又は血管新生において役割を有する細胞（例えば、内皮細胞）に対するオプソニン活性を示す可能性がある。当業者が理解しているように、「オプソニン活性」は、抗原又は細胞受容体と結合して、食細胞と抗原又は細胞受容体の結合を促進し、それによってファゴサイトーシスを高める、オプソニン（一般に、抗体又は血清因子C3bのいずれか）の活性を指す。オプソニン抗体でコーティングしたとき、及び血中からのそれらのクリアランス率が著しく高まるときに、特定の細胞は好中球及びマクロファージなどの食細胞に非常に誘引された状態になる。例えば米国特許第6, 610, 293号中に記載されたような任意の従来形式で、オプソニン活性を測定することができる。

30

【0330】

別の非制限的实施形態において、血管新生障害又は血管新生依存性障害を有する患者は、血管新生から抗原／ペプチド（例えばCD105）を除去する。これらの抗原／ペプチドは「腫瘍関連抗原」であってよい。このような患者には抗原／ペプチド（例えばCD105）に対する抗体を全身投与することができ、本明細書に記載する経路のいずれかを開始して、CDC、ADCC、オプソニン作用、又は任意の他の型の細胞伸介型殺傷を誘導することができる。

40

【0331】

他のアッセイ

例えば以下の実施例中に記載するアッセイなどの、当技術分野で知られている他のアッセイを使用して、本明細書に記載する製剤の影響を試験することもできる。

50

【実施例】

【0332】

本出願は、本出願の例示的な実施形態として与える以下の非制限的な実施例を参照することによって、より良く理解することができる。以下の実施例は例示的な実施形態をより完全に例示するために表すが、しかし、決して本出願の広範囲を制限するものとして解釈すべきではない。本出願の特定の実施形態を本明細書で示し記載しているが、このような実施形態は単なる例によって与えられることは明らかであろう。多くの変更、変化、及び置換が存在する可能性があり、本明細書に記載する実施形態に対する様々な実施形態を、本明細書に記載する方法を実施する際に利用することができることは理解されるはずである。

10

【0333】

(例1)

投与のための例示的用量スケジュール

本明細書に記載する抗体及びその抗原結合断片の投与の最適な用量スケジュールは、当該分野で認識される方法を使用して、上記のように決定され得る。

【0334】

非制限的な一実施形態では、本明細書に記載する抗体は、様々な時間枠で対象に投与することができる。抗体又はその抗原結合断片の用量（単数又は複数）は、1週間に2回、毎週、2週間毎、3週間毎、4週間毎、6週間毎、8週間毎、12週間毎又はそれらの間の任意の週間の組合せで投与され得る。例えば抗体投与、4週間の間週に1回又は2回、次に2週間治療なしなどの、投与サイクルも企図される。例えば本明細書に記載する用量及び週サイクルの異なる組合せを含めた、別の投与サイクルも本明細書で企図される。

20

【0335】

(例2)

B I A c o r e（表面プラズモン共鳴：S P R）分析

抗体の親和性は、標準的なプロトコールを使用して、例えばB I A c o r e分析を使用して評価することができる。簡単に言うと、抗ヒスチジntag抗体をヒスチジntag組換えヒトC D 1 0 5の捕捉用のB I A c o r eチップとカップリングさせ、次いでそれを使用して抗C D 1 0 5抗体の結合を測定する。S P Rアッセイの進行は、少なくとも2チップの調製バッチ及び8チップの分析バッチで実施する。以下のパラメーターをアッセイの進行中に評価する：

30

【0336】

(a) C M 5チップと抗ヒスチジン抗体のカップリング

E D C / N H Sを使用し従来のアミン化学法によって、抗ヒスチジntag抗体をB I A c o r e C M 5チップにカップリングさせる。反応条件（濃度及びp H）は最適化する。

【0337】

(b) ヒトC D 1 0 5の結合及びバイオセンサーチップの再生

ヒトC D 1 0 5の結合及びチップの再生に関する条件を、（以前の経験に基づき）様々なバッファーを使用し結合抗体を溶出することによって試験する。候補となる再生法を開発した後、1チップ表面の結合能力及びバックグラウンドを少なくとも25サイクルにわたり測定する。目的は、平均でサイクル当たり10 R U未満のバックグラウンドの増大及びサイクル当たり1%未満の能力の低下を得ることである。

40

【0338】

(c) ヒトC D 1 0 5の結合

ヒトC D 1 0 5の用量応答を測定して、最大結合に近づくのに適した濃度を決定する。

【0339】

(d) 抗C D 1 0 5抗体の結合

抗C D 1 0 5抗体の用量応答を測定して、（相対的運動定数、 k_a と k_d の比較、又は平行線法による相対的効力の比較を含み得る）運動又は平衡状態結合実験に適した範囲を

50

決定する。

【0340】

(e) 予備確認実験

結合実験を、異なるときに異なるチップ、異なるフローセルを使用し選択した条件下で少なくとも3回繰り返して、測定 of 精度及び精度に関する予備情報を得る。全ての B I A c o r e 実験は、H B S - E P ランニングバッファー中で 25℃において実施する。

【0341】

(例3)

抗CD105抗体の結合に関するELISA

ELISAを使用してCD105と抗CD105抗体の結合をアッセイすることができる。簡単に言うと、ELISAを以下のステップに従い実施する：

1. 1500 ng/ml、PBS中、100 µl/ウェルでMAB9811-01（モノクローナル抗CD105抗体）を用いてプレートをコーティングする。シーラーでプレートを覆い、4℃で（16～24時間）一晚インキュベートする。

2. （Tweenを含まない）約200 µlのPBSでプレートを2回洗浄する。

3. Tween含有PBS（PBS-T）でプレートを3回洗浄する。

4. PBS-T及び0.1%BSA中100 ng/mlで100 µl/ウェルのCD105を加え、室温で60分間インキュベートする。

5. PBS-Tでプレートを3回洗浄する。

5. 試験ウェル中：100 µl/ウェルの抗CD105抗体を（PBS-T及び0.1%BSA中に希釈し）20、10、4、2、1、0.5及び0.2 ng/mlで加え、室温で60分インキュベートする。陰性対照ウェル中：100 µl/ウェルのアイソタイプ適合対照抗体を加える。

7. PBS-Tでプレートを3回洗浄する。

8. PBS-T及び0.1%BSA中に1：10000希釈した、100 µl/ウェルのHRPと結合したヤギ抗ヒトIgGを全てのウェルに加え、室温で30～60分インキュベートする。

9. PBS-Tでプレートを5回洗浄する。

10. 100 µl/ウェルのTMB基質溶液を加え、15分間暗所において非被覆状態でインキュベートする。

11. 100 µl/ウェルのTMB停止溶液を加えることにより反応を停止させる。

【0342】

サンプルは三連で処理し、光学濃度を読取り標準曲線を構築し、結合定数を決定する。統計解析は、スチューデントのt-検定又は別の標準検定を使用して実施する。

【0343】

同様のプロトコルを使用して、抗体とVEGFの結合に関して試験することができることは理解されよう。

【0344】

(例4)

CD105発現細胞における抗体親和性及び利用可能なエピトープの数

CD105発現細胞における抗体親和性及び利用可能なエピトープの数は、標準的なプロトコルを使用しスキャッチャードプロット解析を利用して評価することができる。

【0345】

簡単に言うと、CD105発現KM-3白血病細胞及び半密集状態の増殖HUVECと放射性標識抗CD105抗体の直接結合の、スキャッチャードプロット解析を実施する。精製抗CD105抗体は、Iodo-Genを使用して当業者に知られている標準的な方法に従い、¹²⁵Iで個別に放射性標識する。放射性標識抗CD105抗体は、IgG分子当たりの平均ヨウ素原子に関してそれぞれアッセイする。滴定実験は一定量（0.1 µg）の各¹²⁵I標識mAb及び2倍連続増量のCD105発現KM-3又はHUVEC細胞を使用して実施し、抗原結合活性を決定する。結合データのスキャッチャードプロット

10

20

30

40

50

ト解析は知られている方法に従い実施する。平衡定数及びm A b結合／細胞の平均最大数はこの解析によって評価する。

【0346】

(例5)

遮断活性に関するウエスタンブロットアッセイ

C D 1 0 5を発現する細胞のC D 1 0 5刺激活性化を遮断する抗C D 1 0 5抗体の能力を、ウエスタンブロットによりアッセイして、C D 1 0 5シグナル伝達経路に關与するタンパク質のリン酸化を検出することができる。

【0347】

知られているウエスタンブロット技法に従い、ウエスタンブロット分析を実施してリン酸化S m a d 1／5／8又はS m a d 2を同定する。P S m a d 1及びP S m a d 2抗体は、非トランスフェクト内皮細胞においてリン酸化S m a d 1／5又はリン酸化S m a d 2を特異的に認識する。S m a d 1、S m a d 2、S m a d 5、I d 1 (S a n t a C r u z) 及びC D 1 0 5に対する一次抗体を利用してサンプル中の分子を検出する。検出は増大した化学発光 (E C L) によって実施する。

【0348】

(例6)

H U V E C増殖の阻害及び³Hーチミジン取込みアッセイ

いくつかのアッセイが細胞増殖の阻害を評価するのに利用可能である。

【0349】

一例では、半密集状態で37℃においてC O₂ インキュベーター中、75cm² フラスコ (F a l c o n、B e c t o n - D i c k i n s o n、F r a n k l i n L a k e s、N J) 内でH U V E Cを培養する。15分間37℃において、ハンクスの平衡塩溶液、及び15mM E D T A、25mM H E P E Sバッファー中、pH7.3とインキュベートすることにより細胞を脱着させる。氷冷P B Sで2回洗浄した後、細胞は25,000細胞／mlの濃度で内皮細胞増殖培地中に再懸濁する。

【0350】

更なる実験では、ヒト臍帯静脈内内皮細胞 (H U V E C) を懸濁し、F B S及びウシ脳抽出物を含まない内皮細胞増殖培地中で培養する。細胞懸濁液のアリコート200μlを、96ウェル培養プレートのそれぞれのウェルに接種する。抗C D 1 0 5抗体、抗V E G F抗体、抗C D 1 0 5抗体と抗V E G F抗体の組合せ、対照I g G又はT G F - β 1を三連で加える前に、一晚C O₂ インキュベーター中で37℃において細胞を培養する。培養プレートは72時間インキュベーター中に保ち、その間に新たな培地及び抗体又は対照を24時間毎に交換する。³Hーチミジン (1μCi) をそれぞれのウェルに加え、プレートは20時間インキュベートする。細胞はP B Sで洗浄し、次に15分間37℃において100μl／ウェルのトリプシンーE D T A (0.05%のトリプシン、0.53mMのE D T A) で処理する。細胞はH a r v e s t e r 96 (T O M T E C、H a m d e n、C T) を使用してグラスファイバーフィルター (W a l l a c P r i n t e d F i l t e r m a t A) 上に採取し、³Hー放射能はT r i l u x 1540 M i c r o B e t a液体シンチレーション及び発光カウンター (W a l l a c、T u r k u、F i n l a n d) において測定する。

【0351】

(例7)

細胞移動の阻害に関するアッセイ

細胞増殖及び活性化の指標としての移動 (化学運動性) を、B o y d e nチャンバーを使用し測定する。

【0352】

簡単に言うと、細胞移動を以下のように評価する。C o s t a rヌクレオポアフィルター (8mm孔) は4℃において一晚フィブロネクチンでコーティングする。チャンバーはリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で洗浄し、下部チャンバーには、血清有り又は無し及び

10

20

30

40

50

TGF- β 3 有り又は無しで DMEM を充填した。細胞はトリプシン処理し、対照抗体、抗 CD105 抗体、抗 VEGF 抗体又はこれらの組合せの存在下において DMEM 中に 50,000 細胞/mL の最終濃度で懸濁する。細胞懸濁液のアリコート 150 μ l を上部チャンバーに加え、37℃でインキュベートする。16 時間後、細胞を洗浄し、上側表面を拭いて非移動性細胞を除去する。膜はメタノール中に固定し、水で洗浄し、染色して下側表面上に存在する細胞数を数える。

【0353】

(例 8)

ADCC アッセイ

本明細書に記載する抗体は、例えば以下のプロトコルを使用して、IL-2 活性化ナチュラルキラー (NK) 細胞を生成し ADCC を誘導するそれらの能力に関して評価することができる。

NK の単離及び IL-2 活性化 NK 細胞の生成

【0354】

PBMC を単離し、10% FBS を含む RPMI 中で 4℃において 24 時間放置する。次いで PBMC は 2% FBS を含む RPMI 中に置き (合計体積 = 50 mL)、10 mL の細胞懸濁液をペトリ皿に平板培養する。PBMC は 37℃で 2 時間インキュベートし、非接着性細胞を回収する。NK 細胞は 48 時間 8×10^6 /mL 及び 1000 U/mL の IL-2 で培養し、次にアッセイ中で使用する前に 5~8 日間通常培養する。

ナチュラルキラー細胞障害性及び ADCC アッセイ

【0355】

NK 細胞を培養物からかき取り、50 mL 円錐形チューブ中に回収する。細胞は RPMI 完全培地で一回洗浄し、10 分間 1200 rpm で遠心分離する。次いで NK 細胞を 5 mL の RPMI 完全培地中に再懸濁し計数する。アッセイを実施する前に、NK 細胞数を 10:1 のエフェクター: 標的比に標準化する。標準化した NK 細胞は平板培養し、10 μ L の抗 CD105 抗体を指定ウェルに加え、37℃で 30 分間インキュベートする。対照サンプルは、未処理又は対照抗体処理した細胞集団を含む。

【0356】

対象の標的細胞を回収し (HUVEC 細胞)、洗浄し、10 分間 1200 rpm で遠心分離し、5 mL の RPMI 完全培地中に再懸濁する。標的細胞を再度洗浄し、 1×10^6 細胞/mL の最終濃度まで無血清 RPMI 中に再懸濁する。次いで標的細胞を 37℃で 1 時間、最終濃度 5 μ g/mL の Calcein AM で標識し、次に RPMI 完全培地で 2 回洗浄する。次いで標的細胞を再懸濁し、NK 細胞ウェルに加える。標的細胞/NK 細胞の組合せを 37℃で 4 時間インキュベートする。インキュベーション後、プレートを 5 分間 1200 rpm で遠心分離し、細胞を洗浄し、DPBS 中に再懸濁する。蛍光は 450/530 nm の励起/発光を使用して読み取り、発光は抗体によって仲介される細胞殺傷の指標である。

【0357】

(例 9)

TRC105 (抗 CD105 抗体) 製剤の安定性評価

本発明者らは、5 mg/mL よりも高い濃度の TRC105 について適切な安定性を提供した製剤を同定した。初期の研究により、任意の見かけの溶解性の問題なしに少なくとも 25 mg/mL まで TRC105 を濃縮できることが示されている。従って、25 mg/mL の TRC105 を、スクリーニング研究の開始濃度として選択した。これらの研究の過程の間、50 mg/mL の高い濃度の TRC105 の製剤を評価した。7 mg/mL の TRC105 及び 100 mg/mL の TRC105 の濃度を有する更なる製剤もまた評価した。

【0358】

手順

紫外線 (UV) 吸光分光法

10

20

30

40

50

UV分光法を使用して、種々の安定性サンプル中のタンパク質濃度を決定した。バルク物質（7.0 mg/mL）の280 nmでの吸光度は、1 mm路長のセルを使用して1.13であることが決定され、1.61 mL/mg * cmの吸光係数が導かれた。この値を、この計画における全ての計算に使用した。更なる測定を、高濃度のサンプルについてより適した0.0096 cmセルを使用して実施した。

【0359】

TRC105 熱安定性サンプルのインキュベーション

各熱安定性製剤を、Luerロックシリンジアタッチメントを備えた0.22ミクロンのMillexフィルタを通過させ、次いで、1 mLの凍結乾燥バイアル中にアリコート化した。各バイアルをブチルストッパーで密封し、アルミニウムキャップで圧着した。サンプルを、示された温度で安定性チャンバー中に置き、週で示されたインキュベーション期間後に取り出した。

【0360】

TRC105の凍結－解凍及び攪拌

凍結－解凍（F/T）サンプルを、25分間凍結させ、次いで、0回、3回又は5回、25分間解凍した。全ての凍結は－80℃で実施した。解凍したサンプルを、完全な解凍について試験し、その後冷凍室に戻した。各凍結－解凍サンプルは、100 µLの溶液を含み、0.5 mL Eppendorfチューブ中に保存した。各サンプルは、0.1% F68、0.005% Tween 80又は界面活性剤無しを含んだ。

【0361】

攪拌研究サンプルを、バイアル当たり350 mLで調製し、静止状態又は振盪のいずれかとしてラベルした。全てのサンプルを、4℃の低温室に移動した。振盪とラベルしたサンプルを、150 RPMで動作するオービタルシェーカー上に置いた。静止状態サンプルを、オービタルシェーカーの隣の棚に置いた。各サンプルは、0.1% F68、0.005% Tween 80又は界面活性剤無しを含んだ。サンプルを、示された条件で24時間インキュベートした。

【0362】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）

0.2 Mリン酸二水素ナトリウムを含む移動相を調製し、1.0 M水酸化ナトリウムを使用してpH 7.0に調整した。TSK Gel G3000 PWx1カラム（7.8 mm×30 cm、7 µm粒子#P0047-02PN）を全ての分離に使用した。1 mL/分の流速を使用し、検出波長は280 nmに設定した。注入体積は、25 mg/mLサンプルについて2 µL、50 mg/mLサンプルについて1 µLとした。バッファブランクを、各三連サンプル分析の前に流し、これらのクロマトグラムを適切に差し引いた。ピークの全ての積分は、Chromeleon 6.08において実施した。

【0363】

キャピラリーIEF（cIEF）

キャピラリー等電点電気泳動（cIEF）分析を、Beckman Coulterによって刊行されたPA 800 plus Application Guideに記載されるように実施した。より詳細な説明は、Mack et al.（Electrophoresis 2009, 30（23）, 4049-4058）に見出すことができる。全ての分析を、30 cm全長（20 cm有効）の中性キャピラリー（50 µm i.d.）を用いて周囲温度で動作するBeckman Coulter P/ACE（商標）MDQシステム（Beckman Coulter, Inc.; Brea, CA）を使用して実施した。この中性キャピラリーを、Gao et al.（Anal Chem 2004, 76（24）, 7179-7186）に記載される方法を使用して、キャピラリー壁にポリ（アクリルアミド）を固定化することによって調製した。全てのcIEFサンプルを、0.25 mg/mLの対象のタンパク質を、両性電解質、カソード安定剤、アノード安定剤及びpIマーカを含む3 M尿素－cIEFゲルの混合物と混合することによって調製した。サンプルを、キャピラリー中に9.5 psiで4.1分間圧力注入し、

10

20

30

40

50

その後、陽極液と陰極液との間で 25 kV の電圧を 15 分間適用することによって泳動した。このステップの後に、陽極液と化学的可動化剤との間で 30 kV で 30 分間の化学的可動化を行った。pI マーカー及び対象のタンパク質を、この可動化ステップの間に 280 nm における吸光度で検出した。タンパク質の pI を、pI 対 pI 標準から得られた第 1 のピークモーメントの得られた回帰方程式から計算した。

【0364】

結果及び考察

研究 1

TRC105 のサンプルを、5 mg/mL より高い濃度まで首尾よく濃縮した。結果として、研究 1 を、25 mg/mL のタンパク質濃度を使用して実施した。サンプルを、40 °C で 2 週間保存した。15 の製剤を、pH 及びバッファー組成の影響に焦点を当てて調製した（表 2）。これらのサンプルの安定性を評価するために使用した 1 次分析方法は、SEC であった。40 °C で 2 週間の保存後、モノマー含量又は高分子量凝集体の量のいずれにおいても、SEC によって非常に僅かな変化が見られた（表 3）。全ての製剤は、保存後に 99 % よりも多いモノマーをなおも含んでいた。

【表 2】

表 2. 研究 1 で評価した TRC105 製剤の組成

製剤番号	pH	phos (mM)	His (mM)	クエン酸塩 (mM)	酢酸塩 (mM)	NaCl (mM)	トレハロース (mM)
F01	7	20	0	0	0	130	0
F02	6	20	0	0	0	130	0
F03	6	0	20	0	0	130	0
F04	5	0	20	0	0	130	0
F05	6	0	0	20	0	130	0
F06	5	0	0	20	0	130	0
F07	4	0	0	0	20	130	0
F08	5	0	0	0	20	130	0
F09	5	0	20	0	0	0	240
F10	5	0	0	20	0	0	240
F11	5	0	0	0	20	0	240
F12	6	10	0	0	0	0	240
F13	6	0	10	0	0	0	240
F14	6	10	0	0	0	80	120
F15	6	0	10	0	0	80	120

【表 3】

表 3. 研究 1 からの製剤について、開始の時点及び2週間の時点 (t2) で SEC で測定したモノマー及び凝集体レベルの概要

製剤番号	pH	開始 % 凝集体	開始 % モノマー	2週間 % 凝集体	2週間 % モノマー
F01	7	0.32	99.54	0.48	99.52
F02	6	0.19	99.70	0.22	99.71
F03	6	0.19	99.78	0.14	99.82
F04	5	0.14	99.82	0.13	99.85
F05	6	0.19	99.78	0.28	99.71
F06	5	0.13	99.83	0.21	99.77
F07	4	0.11	99.86	0.10	99.88
F08	5	0.11	99.85	0.26	99.72
F09	5	0.16	99.81	0.09	99.90
F10	5	0.13	99.84	0.19	99.79
F11	5	0.15	99.82	0.16	99.82
F12	6	0.19	99.78	0.53	99.45
F13	6	0.21	99.76	0.15	99.81
F14	6	0.20	99.76	0.45	99.52
F15	6	0.21	99.79	0.21	99.77

【0365】

T R C 1 0 5 は非常に安定であることが見出された。

【0366】

研究 2

手もとの研究 1 からの結果を用いて、新たな研究を設計した。研究 2 では、酢酸塩、ヒスチジン及びクエン酸塩を用いた 4. 0 ～ 5. 5 の範囲の pH を評価した。選択した浸透圧調節剤／安定剤は、ソルビトール及びトレハロースであった。最後に、25 mg / ml の製剤に加えて、50 mg / ml の 3 つの製剤を試験した。

10

20

30

【表 4】

表 4. 研究 2 で評価した TRC105 製剤の組成

製剤番号	pH	タンパク質 Mg/ml	His (mM)	クエン酸塩 (mM)	酢酸塩 (mM)	ソルビトール	トレハロース
F01	5.5	25	0	0	20	0	0
F02	4.5	25	0	0	20	0	0
F03	5.5	25	0	20	0	0	0
F04	5.5	25	20	0	0	0	0
F05	4.5	25	0	0	10	0	0
F06	4.0	25	0	0	10	0	0
F07	5.5	25	20	0	0	240	0
F08	5.5	25	20	0	0	0	240
F09	4.0	25	0	0	20	240	0
F10	4.0	25	0	0	20	0	240
F11	5.5	25	0	10	0	240	0
F12	5.5	25	0	10	0	0	240
F13	5.5	25	10	0	0	240	0
F14	5.5	25	10	0	0	0	240
F15	4.0	50	0	0	10	0	0
F16	5.0	50	0	0	20	0	0
F17	5.5	50	20	0	0	240	0

10

20

30

【 0 3 6 7 】

TRC105の安定性を考えて、これらのサンプルを40℃で4週間保存して、製剤をより高い程度まで識別することを試みた。1次スクリーニングツールはSECであった。

【表 5】

表 5. 研究 1 からの製剤について、開始の時点及び4週目の時点で SEC で測定したモノマー及び凝集体レベルの概要

製剤番号	pH	バッファー	開始 % 凝集体	開始 % モノマー	4週間 % 凝集体	4週間 % モノマー
F01	5.5	酢酸塩	0.17	99.83	0.27	99.73
F02	4.5	酢酸塩	0.10	99.90	0.16	99.84
F03	5.5	クエン酸塩	0.14	99.86	0.22	99.78
F04	5.5	His	0.17	99.83	0.13	99.87
F05	4.5	酢酸塩	0.11	99.89	0.14	99.86
F06	4.0	酢酸塩	0.10	99.90	0.12	99.88
F07	5.5	His	0.15	99.85	0.13	99.87
F08	5.5	His	0.23	99.77	0.16	99.84
F09	4.0	酢酸塩	0.14	99.86	0.15	99.85
F10	4.0	酢酸塩	0.15	99.85	0.15	99.85
F11	5.5	クエン酸塩	0.16	99.84	0.30	99.70
F12	5.5	クエン酸塩	0.21	99.79	0.28	99.72
F13	5.5	His	0.19	99.81	0.15	99.85
F14	5.5	His	0.27	99.73	0.16	99.84
F15	4.0	酢酸塩	0.17	99.83	0.16	99.84
F16	5.0	酢酸塩	0.19	99.81	0.85	99.15
F17	5.5	His	0.24	99.76	0.26	99.74

【0368】

研究 1 で見られたのと同様に、ほぼ全ての製剤のモノマー含量は、40℃で1カ月間の後でさえ、99.5%を超えている（表 5）。1つのサンプルは、増加したレベルの凝集を示すように思われ、これは F16 であった；このサンプルは、これが実際の結果であるかどうかを見るための再試験を行わなかった。酢酸塩中 pH 4 又はヒスチジン中 pH 5.5 が、適切且つ匹敵する安定性を提供するように見えることが示されている。クエン酸塩及び刺激を懸念して、これを更なる検討の対象から除外した。

【0369】

これらのサンプルも、キャピラリー等電点電気泳動（cIEF）を使用して分析した。cIEF 電気泳動図の全体の重心を、第 1 のモーメントとして計算した。これらの値を、サンプルの平均 pI 値とみなすことができる（表 6）。

【表 6】

表 6. 開始の時点及び4週目の時点での、研究 2 からの TRC 製剤
についての平均 pI 値

製剤番号	pH	バッファー	開始	4週間
F01	5.5	酢酸塩	8.97	8.88
F02	4.5	酢酸塩	8.76	8.94
F03	5.5	クエン酸塩	8.84	8.88
F04	5.5	His	8.94	8.88
F05	4.5	酢酸塩	8.78	8.87
F06	4.0	酢酸塩	8.86	8.89
F07	5.5	His	8.87	8.88
F08	5.5	His	8.93	8.87
F09	4.0	酢酸塩	8.92	8.90
F10	4.0	酢酸塩	8.92	8.92
F11	5.5	クエン酸塩	8.96	8.87
F12	5.5	クエン酸塩	8.92	8.85
F13	5.5	His	8.91	8.90
F14	5.5	His	8.95	8.92
F15	4.0	酢酸塩	8.90	8.87
F16	5.0	酢酸塩	8.90	8.86
F17	5.5	His	8.95	8.93

10

20

30

【0370】

全体として、任意の製剤についての pI 値における変化は小さく、脱アミド化、即ち荷電した Asp 生成物を形成する Asn 側鎖の加水分解は、比較的緩徐であることを示唆している（表 6）。従って、TRC105 のこれらの製剤は、物理的に安定であり（即ち、凝集がほとんど又はまったくない）、化学的に安定である（即ち、断片化がなく、脱アミド化がほとんど又はまったくない）ようである。

【0371】

他の懸念は、これらのより高い濃度の製剤が、有害な粘度を示し、それによってその臨床利用を制限するかどうかであった。

40

【表 7】

表 7. 酢酸塩及びヒスチジンバッファー中での約25mg/ml 及び
約50mg/ml の TRC105 の動的粘度

製剤	pH	[タンパク質]	粘度 (cSt)
20 mM 酢酸塩	4.0	25.1	1.19 ± 0.01
	4.0	51.8	1.53 ± 0.01
20 mM ヒスチジン	5.5	23.8	1.22 ± 0.01
	5.5	47.6	1.65 ± 0.04

10

【0372】

50 mg/ml であっても、TRC105 は、限定的な取扱い及び投与についての懸念を引き起こすいずれの値も十分に下回る、2 cSt 未満の粘度を示す（表 7 を参照）。

【0373】

攪拌研究

熱ストレスは、異なる安定性の製剤を識別するために有用であるが、これはタンパク質が遭遇し得る唯一のストレスではない。タンパク質の界面損傷は一般的であり、界面ストレスに対する感受性を評価すべきである。これを、攪拌及び反復凍結－解凍（F/T）サイクリングを使用して実施した。

20

【表 8】

表 8. 150rpmで24時間攪拌した TRC105 製剤、及び一致した静止状態サンプル
についての、SEC によるモノマー含量。全てのサンプルを4℃に維持した。

製剤	界面活性剤	タンパク質	モノマー (Q)	モノマー (S)
pH 5, 20 mM 酢酸塩	なし	25	99.84	99.84
	F68	25	99.83	99.83
	PS80	25	99.81	99.82
pH 5, 20 mM 酢酸塩	なし	50	99.82	99.83
	F68	50	99.82	99.82
	PS80	50	99.81	99.83
pH 5.5, 20 mM His	なし	25	99.75	99.76
	F68	25	99.74	99.76
	PS80	25	99.76	99.77
pH 5.5, 20 mM His	なし	50	99.77	99.75
	F68	50	99.76	99.75
	PS80	50	99.76	99.77

30

40

【0374】

攪拌に際してモノマーの特記すべき損失は存在せず、全ての製剤が、99.7%よりも多いモノマーを示し、静止状態対照との顕著な差異は存在しなかった（表 8）。Pluronic F-68 又はポリソルベート 80 などの界面活性剤を加えても、攪拌に際した安定性の役に立つことも損なうこともしないようである。

50

【 0 3 7 5 】

F / T 研究

界面ストレスに対する T R C 1 0 5 の感受性を試験する第 2 の研究は、反復凍結－解凍サイクルへの曝露を含んだ。これは、界面（氷－水界面など）における損傷についての情報を提供するだけでなく、引き続く分析のため又は出荷の間に T R C 1 0 5 サンプルを凍結できるかどうかについての本質的な情報を提供する。

【表 9】

表 9. 0回、3回及び5回のF/Tサイクルに供された TRC105 製剤についての
SEC によるモノマー含量

製剤	界面活性剤	タンパク質 Mg/ml	0 サイクル	3 サイクル	5 サイクル
pH 5, 20 mM 酢酸塩	なし	25	99.86	99.83	99.82
	F68	25	99.84	99.81	99.82
	PS80	25	99.84	99.83	99.80
pH 5, 20 mM 酢酸塩	なし	50	99.81	99.64	99.80
	F68	50	99.81	99.68	99.81
	PS80	50	99.82	99.65	99.80
pH 5.5, 20 mM His	なし	25	99.79	99.74	99.72
	F68	25	99.79	99.75	99.73
	PS80	25	99.76	99.74	99.74
pH 5.5, 20 mM His	なし	50	99.76	99.79	99.75
	F68	50	99.75	99.82	99.73
	PS80	50	99.75	99.79	99.73

【 0 3 7 6 】

反復 F / T サイクリングに際してモノマー含量における変化は事実上存在しない（表 9）。驚くべきことに、Pluronic F-68 又はポリソルベート 80 などの界面活性剤を加えても、反復 F / T サイクリングに際した安定性は変わらなかった。攪拌データと合わせると、界面損傷が懸念される程度までに T R C 1 0 5 が界面活性的であることを示すものはない。従って、界面活性剤は、液体製剤には必要ない。

【 0 3 7 7 】

まとめ

製剤スクリーニング研究を、最大 5 0 m g / m l のタンパク質濃度で T R C 1 0 5 に対して実施した。このタンパク質は非常に安定であり、4 0 °C で 4 週間の保存後でも、SEC によってモノマー含量における小さい減少のみを示した。断片化は SEC では全く見られなかった。その間、c I E F 分析により、全体的な p I における小さな変化だけが観察されたことが示され、脱アミド化が問題の p H 範囲（4. 0 ～ 5. 5）にわたって最小であったことを示唆している。界面損傷に対する感受性に関して証拠は存在しなかったが、界面活性剤が T R C 1 0 5 の液体製剤中では必要なかったことを示している。

【 0 3 7 8 】

リード製剤は、浸透圧調節剤及び安定剤としてのソルビトール又はトレハロースと共に、p H 4. 0 で酢酸塩バッファー又は p H 5. 5 でヒスチジンバッファーを使用した。

【 0 3 7 9 】

(例 1 0)

T R C 1 0 5 製剤の長期安定性評価

長期安定性評価を実施して、研究 1 及び研究 2 における結果を検証した。表 1 0 に示される製剤のサンプルを、5 °C 及び 2 5 °C で保存した。

【表 1 0】

表 10: 検証研究のための製剤

製剤番号	製剤	[タンパク質]
F01	pH 5.5, 20 mM ヒスチジン, 240 mM トレハロース	25 mg/ml
F02	pH 5.5, 20 mM ヒスチジン, 240 mM ソルビトール	25 mg/ml
F03	pH 4.0, 20 mM 酢酸塩, 240 mM ソルビトール	25 mg/ml
F04	pH 5.5, 20 mM ヒスチジン, 240 mM トレハロース	50 mg/ml
F05	pH 4.0, 20 mM 酢酸塩, 240 mM トレハロース	50 mg/ml
F06	pH 5.5, 20 mM ヒスチジン, 240 mM トレハロース	100 mg/ml
F07	pH 4.0, 20 mM 酢酸塩, 240 mM トレハロース	100 mg/ml

10

20

【 0 3 8 0 】

結果及び考察

7 つの試験製剤を、5 °C で 1 年間及び 2 5 °C で 6 カ月間の過程にわたって評価した。5 °C では、全ての製剤が良好な成績であった。この研究の全ての時点における全てのサンプルについての外観は、透明で無色であった。一般に、p H 値は、研究の持続期間にわたって新たな製剤の全てにわたって一定のままであった（表 1 1 及び 1 2 を参照）。値は、標的よりも 0 . 1 ~ 0 . 2 単位僅かに高かったが、安定なままであった。U V によって決定した新たな製剤についての濃度値は、濃度に関わらず、元の標的値の約 3 ~ 4 % 以内で一定のままであった（表 1 1 及び 1 2 を参照）。これらの値は、研究の過程にわたって顕著には変化しなかった。5 °C では S E C による最小のモノマー損失（表 1 3 を参照）、及び c I E F による最小量の化学的分解（表 1 5 及び 1 6 を参照）が存在した。F 0 5 についての開始時の結果を除いて、C D 1 0 5 結合 E L I S A の結果においてある程度の変動性が存在したが、全ての値は参照標準の値と比較して 5 0 % ~ 1 5 0 % の許容基準内であり、E L I S A アッセイの発色の段階と一致していた（表 1 7 を参照）。C E - S D S 試験の結果により、これらのサンプルが、1 年間の過程にわたって 5 °C で参照物質と匹敵していたことが示された（データ示さず）。

30

【 0 3 8 1 】

5 °C で保存したサンプルは、本質的に変化しなかったが、製剤のパラメーターは、2 5 °C のサンプルの安定性に対して影響を有していた。最も顕著なことに、酢酸塩バッファー系を含む製剤（F 0 3、F 0 5、F 0 7）は、ヒスチジンバッファーを含む製剤（F 0 1、F 0 2、F 0 4 及び F 0 6）よりも、パーセントモノマーにおいて高い減少を示した（表 1 4 を参照）。その間、タンパク質濃度における変化は、ほとんど又は全く影響を有さないようである。2 つの 1 0 0 m g / m L 製剤（F 0 6、F 0 7）は、その S E C プロファイル及び c I E F プロファイルに関して、その 5 0 m g / m L 対応物（F 0 4、F 0 5）と匹敵している。

40

【表 1 1】

表 11. 5℃におけるpH及びUV濃度 (mg/mL)

製剤	開始		3カ月間		6カ月間		12カ月間	
	pH	濃度	pH	濃度	pH	濃度	pH	濃度
F01	5.6	25	5.6	24	5.6	27	5.6	24
F02	5.6	24	5.5	23	5.6	25	5.6	25
F03	4.2	25	4.2	25	4.3	27	4.2	26
F04	5.6	50	5.6	51	5.6	54	5.5	52
F05	4.2	50	4.3	52	4.3	54	4.2	52
F06	5.6	98	5.7	99	5.7	104	5.6	105
F07	4.3	99	4.4	102	4.4	108	4.3	102

10

【表 1 2】

表 12. 25℃におけるpH及びUV濃度 (mg/mL)

20

製剤	開始		3カ月間		6カ月間		12カ月間	
	pH	濃度	pH	濃度	pH	濃度	pH	濃度
F01	n/a	n/a	5.6	25	5.6	27	5.6	26
F02	n/a	n/a	5.6	24	5.6	25	5.6	24
F03	n/a	n/a	4.3	25	4.3	27	4.3	26
F04	n/a	n/a	5.8	50	5.6	53	5.6	51
F05	n/a	n/a	4.3	53	4.3	53	4.3	52
F06	n/a	n/a	5.7	100	5.8	105	5.6	105
F07	n/a	n/a	4.4	109	4.5	104	4.4	103

30

【表 1 3】

表 13. 5℃におけるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

製剤	% モノマー			
	開始	3カ月間	6カ月間	12カ月間
F01	99.36	99.36	99.38	99.37
F02	99.37	99.37	99.34	99.37
F03	99.37	99.35	99.31	99.24
F04	99.35	99.33	99.32	99.31
F05	99.38	99.35	99.31	99.24
F06	99.24	99.22	99.19	99.18
F07	99.35	99.29	99.23	99.17

10

【表 1 4】

表 14. 25℃におけるサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

製剤	% モノマー		
	開始	3カ月間	6カ月間
F01	99.36	99.27	96.37
F02	99.37	99.28	96.25
F03	99.37	96.02	93.64
F04	99.35	99.18	96.51
F05	99.38	96.07	93.70
F06	99.24	98.99	96.23
F07	99.35	96.02	93.84

20

30

【表 1 5】

表 15: 5℃における cIEF - 平均 pI

製剤	平均 pI			
	開始	3カ月間	6カ月間	12カ月間
F01	9.0	8.9	9.0	9.0
F02	8.9	8.9	8.9	9.0
F03	8.9	8.9	9.0	9.1
F04	8.9	8.9	8.9	9.0
F05	8.9	8.9	8.9	9.0
F06	8.9	8.9	8.9	9.0
F07	8.9	8.9	8.9	9.0

10

【表 1 6】

表 16: 25℃における cIEF - 平均 pI

製剤	平均 pI		
	開始	3カ月間	6カ月間
F01	9.0	8.9	9.0
F02	8.9	9.0	8.9
F03	8.9	8.9	8.9
F04	8.9	8.9	8.9
F05	8.9	8.9	8.8
F06	8.9	8.9	8.9
F07	8.9	8.9	8.9

20

30

【表 17】

表17: 5°Cにおける CD105 結合 ELISA

製剤	パーセント相対 CD105 結合能		
	開始	6カ月間	12カ月間
F01	101	94	68
F02	90	90	69
F03	124	NT	77
F04	123	97	74
F05	179	NT	96
F06	93	95	115
F07	100	NT	86

10

【0382】

(例 11)

20

4 mg/mL TRC105 製剤の長期安定性評価

安定性研究を、145 mM塩化ナトリウムを含む17 mMリン酸塩バッファー pH 7.2 中 4 mg/mLで製剤化したTRC105に対して実施した (Lot FIN-0536)。36カ月間の安定性データが、推奨された保存条件 (2~8 °C) で利用可能であり、1カ月間のデータが、25 °C/60 %RHの加速条件において利用可能である。この安定性データを以下の表に示す。顕著な変化は、実施した試験のいずれについても観察されなかった。結果として、これらの研究は、145 mM塩化ナトリウムを含む17 mMリン酸塩バッファー pH 7.2 中 4 mg/mLで製剤化したTRC105が、2~8 °Cで保存した場合少なくとも36カ月間安定であることを示している。

【表 18 - 1】

表 18: 2～8℃の推奨された保存条件で保存した TRC105 についての安定性データ

試験	開始	6カ月間	9カ月間	12カ月間
外観及び説明	透明無色溶液。 粒子状の微量の 灰色の塵。	眼に見える粒状 物が存在しない 透明無色溶液。	微量の白色粒 状物が存在する 透明無色溶液。	微量の白色粒 状物が存在する 透明無色溶液。
SDS-PAGE 非還元	参照との比較	参照との比較	参照との比較	参照との比較
SDS-PAGE 還元	98%	96%	97%	98%
IEF	参照との比較	参照との比較	参照との比較	参照との比較
SEC-HPLC	96.62%	96.97 %	96.91 %	96.77 %
ELISA による CD105 結合	結合活性は、 参照標準に対し て 88% である。	結合活性は、 参照標準に対し て 110% である。	結合活性は、 参照標準に対し て 104% である。	結合活性は、 参照標準に対し て 91% である。
UV 吸光度(A ₂₈₀)	4.3 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL
pH	7.2	7.3	7.2	7.2
無菌性	試験せず	試験せず	試験せず	試験せず

10

20

30

【表 18 - 2】

表 18 続葉

試験	18カ月間	24カ月間	30カ月間	36カ月間
外観及び説明	微量の白色粒状物が存在する透明無色溶液。	粒状物が存在しない透明無色溶液。	粒状物が存在しない透明無色溶液。	粒状物が存在しない透明無色溶液。
SDS-PAGE 非還元	参照との比較	参照との比較	参照との比較	参照との比較
SDS-PAGE 還元	97%	96%	97%	96%
IEF	参照との比較	参照との比較	参照との比較	参照との比較
SEC-HPLC	96.32 %	96.86 %	96.60 %	94.04%
ELISA による CD105 結合	結合活性は、参照標準に対して 88% である。	結合活性は、参照標準に対して 136% である。	結合活性は、参照標準に対して 88% である。	結合活性は、参照標準に対して 105% である。
UV 吸光度 (A ₂₈₀)	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL	4.2 mg/mL
pH	7.2	7.2	7.2	7.3
無菌性	試験せず	合格	試験せず	合格

10

20

30

【表 19】

表19: 25°C/60%RHの加速保存条件で保存した Lot FIN-0536 についての安定性データ

試験	開始	1カ月間
外観及び説明	透明無色溶液。 粒子状の微量の灰色の塵。	眼に見える粒状物が存在しない透明無色溶液。
SDS-PAGE 非還元	参照との比較	参照との比較
SDS-PAGE 還元	98%	96%
IEF	参照との比較	参照との比較
SEC-HPLC	96.62%	96.45%
ELISA による CD105 結合	結合活性は、参照標準に対して 88% である。	結合活性は、参照標準に対して 91% である。
UV 吸光度(A ₂₈₀)	4.3 mg/mL	4.2 mg/mL
pH	7.2	7.3

40

50

S E C - H P L C 及び U V についての分析手順は例 9 に記載したものと同一である。C D 1 0 5 結合 E L I S A についての分析手順は例 3 に記載したものと同一である。S D S - P A G E 非還元、S D S - P A G E 還元及び I E F についての分析手順は以下に記載する。

【0383】

非還元型タンパク質及びペプチドの S D S - P A G E、クマシー染色

正体及び純度を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を使用して評価する。タンパク質を変性条件下で分離する。プレキャスト 4 ~ 12 % B i s - T r i s S D S 含有ゲルを使用する。S D S は、タンパク質と相互作用して負に荷電した複合体を形成するアニオン性洗浄剤である。これらの複合体は、そのサイズに従ってポリアクリルアミドゲルを移動し、より小さいタンパク質はより大きいタンパク質よりも速く移動する。標準、対照及び試験物を変性させ、ゲル上にロードする。泳動の完了後、ゲルをクマシーブルーで染色する。ゲルを、画像化濃度計を使用して走査する。

10

【0384】

各染色バンドの相対量を、各試験物のレーンについて濃度測定によって決定する。これらの量を、そのレーンについて得られた総バンド量の百分率として表す。試験物バンドの分子量 (k D a) 値を、分子量マーカーとの比較に基づいて決定する。

【0385】

還元型タンパク質の S D S - P A G E、クマシー染色

還元型タンパク質についての S D S - P A G E 法は、還元ステップを追加して (分子間及び分子内ジスルフィド結合を切断して、タンパク質サブユニット及び他の凝集体を放出するため)、非還元サンプルについてセクション 1. 3. 2 (上記) に記載したのと同じである。タンパク質を還元するために、ジチオスレイトール (50 mM) をサンプル及び参照に加え、その後 85 °C で 5 分間加熱する。還元型タンパク質を泳動する場合、抗酸化剤をランニングバッファーに加える。

20

【0386】

水平等電点電気泳動 (I E F)

適用された電気力下のタンパク質上の変動する電荷を利用して、タンパク質を分離する。p H 勾配を、カソードをより高い p H 値にして、カソードとアノードとの間で確立する。タンパク質は両性の性質を有するので、タンパク質は、その p I より下では正に荷電した値を有し、その p I より上では負に荷電した値を有する。電気力の影響下で p H 勾配を確立すると、タンパク質は、その等電点において移動及び集中する。この手順は、水平形式でプレキャストゲルを使用するタンパク質サンプルの等電点電気泳動の使用を含む。電気泳動後、ゲルをクマシー染色する。各バンドの面積を、各サンプルレーンについて濃度測定によって決定する。バンドの面積を、総バンド面積の百分率として計算する。p I 及び R f 値もまた、各バンドについて決定する。

30

【0387】

(例 12)

結腸直腸癌に関する臨床試験

この実施例は、結腸直腸癌を有する患者において抗 C D 1 0 5 抗体の安全性及び有効性の予備アセスメントを与えるために設計した、ランダム化、盲検化、プラセボ対照、多施設、第 I I 相試験を記載する。およそ約 100 ~ 約 800 の患者を登録し、約 50 ~ 約 400 の患者を治療群に割り当て、約 50 ~ 約 400 の患者をプラセボ群に割り当てる。臨床試験は、約 0.1 ~ 約 10 mg / kg で反復用量の抗 C D 1 0 5 抗体の静脈内投与、又は 6 ~ 10 サイクルで 2 週毎にプラセボの静脈内投与を含む。全ての群で化学療法を使用することができる。V E G F 阻害剤は、全ての群で使用することができる。試験の期間は約 6 カ月 ~ 約 5 年で推定し、初期試験の最後に必要を示す応答者には治療を続ける。他の結果測定法は以下の通りである：

40

【0388】

主要評価項目測定：奏功率。この試験の 1 つの目的は、対照 I g G と比較した、抗 C D

50

105抗体による治療からの奏功率の増大を実証することである。

【0389】

評価することができる二次評価項目測定は、奏功期間、腫瘍進行の時間、全体的生存率、重度及び軽度の有害事象を含む。例えば、治療は疾患の進行を予防することができ（即ち安定状態）、又は改善をもたらすことができる。代替的、又は追加的に、以下の1つ又は複数、腫瘍負荷の減少、新血管形成の減少、副作用の低下、有害反応の減少、及び／又は患者のコンプライアンスの向上に関する、他の目的を測定することができる。

【0390】

（例13）

腎臓癌に関する臨床試験

この実施例は、腎細胞癌（腎臓癌）を有する患者において抗CD105抗体の安全性及び有効性の予備アセスメントを与えるために設計した、ランダム化、盲検化、プラセボ対照、多施設、第II相試験を記載する。およそ約100～約800の患者を登録し、約50～約400の患者を治療群に割り当て、約50～約400の患者をプラセボ群に割り当てる。臨床試験は、約0.1～約30mg/kgで反復用量の抗CD105抗体の静脈内投与、又は3～6サイクル若しくは進行まで1～3週毎にプラセボの静脈内投与を含む。インターフェロンも両治療群で使用することができる。VEGF阻害剤は、両治療群で使用することができる。試験の時間枠は約6カ月～約5年で推定し、初期試験の最後に必要を示す応答者には治療を続ける。他の結果測定法は以下の通りである：

【0391】

主要評価項目測定：無増悪生存期間。この試験の1つの目的は、プラセボと比較した、抗CD105抗体による治療後の無増悪生存期間の増大を実証することである。

【0392】

評価することができる二次評価項目測定は、奏功期間、腫瘍進行の時間、全体的生存率、重度及び軽度の有害事象を含む。例えば、治療は疾患の進行を予防することができ（即ち安定状態）、又は改善をもたらすことができる。代替的、又は追加的に、以下の1つ又は複数、腫瘍負荷の減少、新血管形成の減少、副作用の低下、有害反応の減少、及び／又は患者のコンプライアンスの向上に関する、他の目的を測定することができる。

【0393】

（例14）

肝細胞癌に関する臨床試験

この実施例は、肝細胞癌（肝臓癌）を有する患者において抗CD105抗体の安全性及び有効性の予備アセスメントを与えるために設計した、ランダム化、盲検化、プラセボ対照、多施設、第II相試験を記載する。およそ約100～約800の患者を登録し、約50～約400の患者を治療群に割り当て、約50～約400の患者をプラセボ群に割り当てる。VEGF阻害剤は、両群で使用することができる。臨床試験は、約0.1～約30mg/kgで反復用量の抗CD105抗体の静脈内投与、又は1～3週毎に若しくは進行までプラセボの静脈内投与を含む。試験の時間枠は約6カ月～約5年で推定し、初期試験の最後に必要を示す応答者には治療を続ける。他の結果測定法は以下の通りである：

【0394】

主要評価項目測定：無増悪生存期間。この試験の1つの目的は、プラセボと比較した、抗CD105抗体による治療後の無増悪生存期間の増大を実証することである。

【0395】

評価することができる二次評価項目測定は、奏功期間、腫瘍進行の時間、全体的生存率、重度及び軽度の有害事象を含む。例えば、治療は疾患の進行を予防することができ（即ち安定状態）、又は改善をもたらすことができる。代替的、又は追加的に、以下の1つ又は複数、腫瘍負荷の減少、新血管形成の減少、副作用の低下、有害反応の減少、及び／又は患者のコンプライアンスの向上に関する、他の目的を測定することができる。

【0396】

（例15）

10

20

30

40

50

卵巣癌に関する臨床試験

この実施例は、卵巣癌を有する患者において抗CD105抗体の安全性及び有効性の予備アセスメントを与えるために設計した、ランダム化、盲検化、プラセボ対照、多施設、第II相試験を記載する。およそ約100～約800の患者を登録し、約50～約400の患者を治療群に割り当て、約50～約400の患者をプラセボ群に割り当てる。臨床試験は、約0.1～約30mg/kgで反復用量の抗CD105抗体の静脈内投与、又は5サイクルで1～3週毎にプラセボの静脈内投与を含む。化学療法を両治療群で使用することもできる。VEGF阻害剤は、両治療群で使用することができる。試験の時間枠は約6カ月～約5年で推定し、初期試験の最後に必要を示す応答者には治療を続ける。他の結果測定法は以下の通りである：

10

【0397】

主要評価項目測定：無増悪生存期間。この試験の1つの目的は、プラセボと比較した、抗CD105抗体による治療後の無増悪生存期間の増大を実証することである。

【0398】

評価することができる二次評価項目測定は、奏功期間、腫瘍進行の時間、全体的生存率、重度及び軽度の有害事象を含む。例えば、治療は疾患の進行を予防することができ（即ち安定状態）、又は改善をもたらすことができる。代替的、又は追加的に、以下の1つ又は複数、腫瘍負荷の減少、新血管形成の減少、副作用の低下、有害反応の減少、及び／又は患者のコンプライアンスの向上に関する、他の目的を測定することができる。

【0399】

20

（例16）

加齢性黄斑変性症の治療

第一試験

加齢性黄斑変性症の症状を示す患者を、抗CD105抗体又は対照抗体の硝子体内注射により治療して、血管新生、黄斑疾患、及び網膜障害の発生を低減又は予防する。

【0400】

治療の第一ステップとして、患者は完全な眼科検査を受けて眼部健康のベースラインを確定する。眼科検査は、間接的眼底検査、細隙灯生体鏡検、周辺部網膜検査、眼内圧測定、視力（肉眼及び最高矯正）症候学、眼底撮影法、蛍光眼底造影法、光干渉断層法、網膜電図写真及びAスキャン測定を含む。

30

【0401】

予備検査後、前に記載した硝子体内注射を、AMDの症状を示す患者の罹患した眼に与える。両眼が罹患している場合、それらは別々に治療することができる。治療する眼には点眼液を注射する。

【0402】

治療後、患者の眼は第1、2、7、15、30及び60日に、及びその後は2年間にわたり毎月検査する。再発の可能性があるため、患者はその後1カ月単位の定期健診に戻らなければならない。それぞれの検診日に、硝子体液化に関して患者をモニタリングする。更に、間接的眼底検査及び強膜圧迫法を使用して、後部硝子体剥離に関して患者をモニタリングする。最後に、患者によって示されるAMDの程度を、定期的網膜検査、光干渉断層法及び蛍光眼底造影法により絶えずモニタリングして、網膜下液、血液、滲出液、RPE剥離、網膜内嚢胞様変化の存在、又はグレーがかった緑色の網膜下血管新生膜の存在をモニタリングする。再発する血管新生の兆候が観察される場合、別の治療が必要とされる可能性がある。別の治療は1週間又は1カ月単位で与えることができる。好ましい実施形態では、初期治療に1～6カ月間隔の間で二次治療を続ける。

40

【0403】

第二試験

目的：血管新生加齢性黄斑変性症（AMD）を治療するための硝子体内での抗CD105抗体の有効性を実証すること。VEGF阻害剤は、全ての患者で使用することができる。

50

【0404】

方法：AMDが原因である中心眼窩の脈絡膜血管新生（CNV）を有する50～500の患者（50～500の眼）が、承認された場所での試験に参与する。

【0405】

再注射の基準は、黄斑中の流体の存在、少なくとも100ミクロンの増大した中心網膜厚（CRT）、黄斑中の増大した流体に関連した少なくとも5視標の消失、新古典的CNV、又は新黄斑出血である。主要評価項目測定は、12カ月後に15視標未満を失う眼の割合である。最高矯正視力及び眼の臨床検査は、第1週、第1カ月で、及び次いで5～12カ月間月に1回実施する。

【0406】

平均視力及び平均CRTはベースラインと比較して測定する。眼部及び／又は全身副作用を記す。

【0407】

（例17）

ヒト化脱免疫化抗体配列

単離されたヒト化脱免疫化抗CD105抗体は、配列番号11に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号12に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含み得る。

【0408】

配列番号11：

【化1】

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ala Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr
Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe
Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

【0409】

配列番号12：

【化2】

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【0410】

ヒト化脱免疫化重鎖の他の非制限的例には、配列番号13、14、15及び16が含まれるが、これらだけには限られない。

【0411】

配列番号13：

10

20

30

40

【化 3】

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr
 Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe
 Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

10

【0 4 1 2】

配列番号 1 4 :

【化 4】

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Gln Ala Ser Asn His Ala Thr
 Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe
 Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

20

【0 4 1 3】

配列番号 1 5 :

【化 5】

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Glu Ile Arg Ser Arg Ala Ser Asn His Ala Thr
 Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe
 Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

30

【0 4 1 4】

配列番号 1 6 :

【化 6】

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Glu Ile Arg Ser Lys Ala Ser Asn His Ala Thr Tyr
 Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Arg Arg Phe Phe
 Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

40

【0 4 1 5】

ヒト化脱免疫化軽鎖の他の非制限的例には、配列番号 1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、
 2 2 及び 2 3 が含まれるが、これらだけには限られない。

【0 4 1 6】

50

配列番号 17 :
【化 7】

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

10

【0 4 1 7】
配列番号 18 :
【化 8】

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

20

【0 4 1 8】
配列番号 19 :
【化 9】

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

30

【0 4 1 9】
配列番号 20 :
【化 10】

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

40

【0 4 2 0】
配列番号 21 :

【化 1 1】

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

【0 4 2 1】

10

配列番号 2 2 :

【化 1 2】

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Ser Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

20

【0 4 2 2】

配列番号 2 3 :

【化 1 3】

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ala Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

30

【0 4 2 3】

本明細書に記載する実施形態は、本発明の精神若しくはその本質的特徴から逸脱せずに、他の型で具体化することができ、又は他の方法で実施することができる。したがって本開示は、全態様において制限的ではなく例示的として考えられ、均等性の意味及び範囲内に入る全ての変形はその中に包含されると考えられる。

【図 1】

図 1

A. TRC105 V_L: CDR には下線を引く

QIVLSQSPAILSASPGKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVFVRFSGSGS
GTSYSLTISRVEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK (配列番号: 1)

B. TRC105 C_L:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY
SLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号: 2)

C. TRC105 V_H: CDR には下線を引く

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPKGLWVAEIRSKASNHATYYAESV
KGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLRAEDTGIYYCTRWRREFDSWGQGTTLTVSS (配列番号: 3)

D. TRC105 C_{γ1}

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHTFFFAVLQSSGLYSLS
SVVITPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(配列番号: 4)

E. VL CDR1: RASSSVSYMH (配列番号: 5)

F. VL CDR2: ATSNLAS (配列番号: 6)

G. VL CDR3: QQWSSNPLT (配列番号: 7)

H. VH CDR1: DAWMD (配列番号: 8)

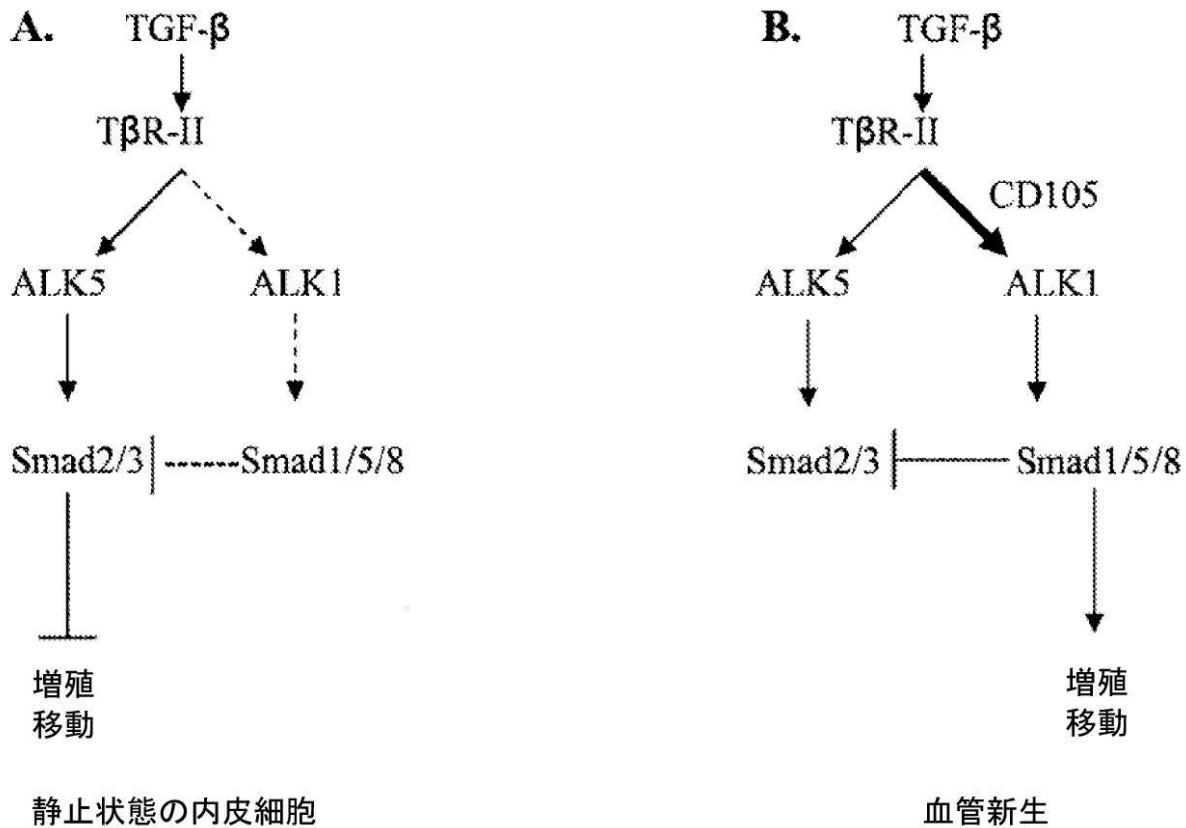
I. VH CDR2: EIRSKASNHATYYAESVKG (配列番号: 9)

J. VH CDR3: WRRFFDS (配列番号: 10)

【図 2】

図2

CD105(エンドグリン)による血管新生の制御のモデル



【配列表】

2015532657000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年4月14日(2015.4.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

約1mg/ml～約150mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片、最大約100mMの緩衝剤、最大約1Mのポリオール及び約4.0～約7.5のpHを含む、製剤。

【請求項2】

抗CD105抗体の少なくとも95%が、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって測定して、少なくとも12カ月間にわたる約2～8℃での保存後にモノマーとして存在する、

抗CD105抗体の少なくとも95%が、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって測定して、少なくとも6カ月間にわたる約25℃での保存後にモノマーとして存在

する、

抗CD105抗体の少なくとも90%が、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって測定して、少なくとも6カ月間にわたる約25℃での保存後にモノマーとして存在する、

抗CD105抗体の平均等電点（pI）が、キャピラリー電気泳動－等電点電気泳動によって測定して、少なくとも12カ月間にわたる2～8℃での保存後に、約8.7～約9.2である、

抗CD105抗体の少なくとも95%が、SECによって測定して、製剤の凍結解凍サイクルの後にモノマーとして存在する、

抗CD105抗体の少なくとも95%が、SECによって測定して、攪拌ストレスにさらされた場合にモノマーとして存在する、

抗CD105抗体又はその抗原結合断片が、少なくとも12カ月間にわたる約2～8℃での保存後に、CD105 ELISA結合アッセイによって約50～150%の結合を示す、

硝子体内投与又は静脈内投与のために製剤化されている、或いは等張又は高張である、

請求項1に記載の製剤。

【請求項3】

前記緩衝剤がヒスチジン、酢酸塩又はリン酸緩衝生理食塩水である、請求項1に記載の製剤。

【請求項4】

緩衝剤が酢酸塩であり、pHが約4である、又は緩衝剤がヒスチジンであり、pHが約5.5である、請求項1に記載の製剤。

【請求項5】

前記抗CD105抗体が、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（V_L）；配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（C_L）；配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（V_H）；及び配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する定常領域（Fc）を含む、又は、

前記抗CD105抗体が、配列番号5に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR1；配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR2；配列番号7に記載のアミノ酸配列を有するV_L CDR3；配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR1；配列番号9に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR2；及び配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するV_H CDR3を含む、

請求項1に記載の製剤。

【請求項6】

約25mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む、

約50mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む、又は

約100mg/mlの抗CD105抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項7】

ポリオールが300mM未満であり、製剤が塩で等張にされる、請求項1に記載の製剤。

【請求項8】

ポリオールが糖である、請求項1に記載の製剤。

【請求項9】

前記糖がトレハロース又はスクロースである非還元糖である、請求項8に記載の製剤。

【請求項10】

糖がソルビトールである、請求項8に記載の製剤。

【請求項11】

界面活性剤を更に含む、請求項1に記載の製剤。

【請求項 1 2】

界面活性剤が、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0 又は P l u r o n i c（登録商標）F 6 8 である、請求項 1 1 に記載の製剤。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 1 2 までのいずれか一項に記載の製剤を含む、静脈内投与又は硝子体内投与に適した、プレフィルドシリンジ。

【請求項 1 4】

血管新生関連疾患の治療のための、請求項 1 から 1 2 までのいずれか一項に記載の製剤。

【請求項 1 5】

前記血管新生関連疾患が癌、転移又は眼科的状态である、請求項 1 4 に記載の製剤。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2013/058265
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPODOC, MEDLINE, WPI: CD105, Endoglin, FLJ41744, HHT1, ORW, ORW1, Osler Rendu Weber syndrome 1 protein, antibody, immunoglobulin, scfv, mab, polyol, poly alcohol, formulaiton, buffer, soloution, histidine, phosphate, saline acetate, sugar, trehalose, sucrose, sorbitol, surfactant, polysorbate, pluronic, storage, store, life, freeze, stability, aggregate monomer, thaw, agitate, cancer, macular degeneration and like terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 October 2013	Date of mailing of the international search report 14 October 2013	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au Facsimile No.: +61 2 6283 7999	Authorised officer Catherine Downes AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262223669	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/058265

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

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

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

2. ☒ Claims Nos.: **102-105**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Supplemental Box

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2013/058265
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/039873 A2 (TRACON PHARMACEUTICALS, INC) 08 April 2010 abstract, [006-7], [0261], [0533], Fig. 5	1-101
X	WO 2011/022339 A1 (TRACON PHARMACEUTICALS, INC) 24 February 2011 [006-8], [0192], [0204], [0264], [0430], SEQ ID NOs. 1-4	1-101
X	WO 2011/041441 A1 (TRACON PHARMACEUTICALS, INC) 07 April 2011 [006-8], [0324], [0596], Fig. 5-1, 5-2	1-101
X	WO 2010/032059 A2 (MEDIMMUNE LLC) 25 March 2010 pg. 4, line 2-7, pg. 6 line 12-22	1-101
A	LOWE D. et al, Aggregation, Stability and Formulation of Human Antibody Therapeutics, ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURAL BIOLOGY, 2011, Vol. 84, pg. 41-61 pg. 54 A	

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2013/058265
Supplemental Box	
Continuation of Box II Claims 102-105 do not comply with Rule 6.2(a) because they relies on references to the description.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/US2013/058265	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2010/039873 A2	08 Apr 2010	TW 201023883 A	01 Jul 2010
		US 2010082438 A1	01 Apr 2010
		US 2010098692 A1	22 Apr 2010
		WO 2010039873 A2	08 Apr 2010
		WO 2010045191 A2	22 Apr 2010
WO 2011/022339 A1	24 Feb 2011	CA 2772240 A1	24 Feb 2011
		CN 102711809 A	03 Oct 2012
		EA 201290104 A1	30 Jan 2013
		EP 2467156 A1	27 Jun 2012
		JP 2013502422 A	24 Jan 2013
		KR 20120108964 A	05 Oct 2012
		US 2012244147 A1	27 Sep 2012
		WO 2011022339 A1	24 Feb 2011
WO 2011/041441 A1	07 Apr 2011	AU 2010300668 B2	17 Jan 2013
		CA 2775810 A1	07 Apr 2011
		CN 102762227 A	31 Oct 2012
		EA 201290173 A1	30 Nov 2012
		EP 2482848 A1	08 Aug 2012
		JP 2013506677 A	28 Feb 2013
		KR 20120108973 A	05 Oct 2012
		US 2011076263 A1	31 Mar 2011
		US 8221753 B2	17 Jul 2012
		US 2012294864 A1	22 Nov 2012
WO 2010/032059 A2	25 Mar 2010	WO 2011041441 A1	07 Apr 2011
		CA 2737667 A1	25 Mar 2010
		CN 102388067 A	21 Mar 2012
		EP 2344541 A2	20 Jul 2011
		JP 2012502649 A	02 Feb 2012
		KR 20110057245 A	31 May 2011
		US 2010196398 A1	05 Aug 2010
		WO 2010032059 A2	25 Mar 2010
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K 47/26
A 6 1 K	47/34	(2006.01)	A 6 1 K 47/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K 47/34
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K 16/28
			C 1 2 N 15/00
			A

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72)発明者 マニング、マーク、コーネル

アメリカ合衆国、コロラド、ジョンズタウン、ソーレル レイン 4 6 3 0

(72)発明者 マーフィ、ブライアン、エム.

アメリカ合衆国、コロラド、フォート コリンズ、オジアンダー ストリート 3 4 5

(72)発明者 リアル、シャロン

アメリカ合衆国、カリフォルニア、サンディエゴ、ユニヴァーシティー センター レイン 8 9
1 0、スウィート 7 0 0

(72)発明者 テウアー、チャールズ

アメリカ合衆国、カリフォルニア、サンディエゴ、ピー. オー. ボックス 9 0 7 2 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 CA20

4C076 AA11 BB13 BB24 CC29 DD09 DD26Z DD38Q DD41Z DD60Z DD67Q

FF36 FF61 FF63

4C085 AA13 AA14 DD13 DD14 DD15 EE01 EE07 GG02 GG10

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA28 FA74