

(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2011-504092

(P2011-504092A)

(43) 公表日 平成23年2月3日(2011.2.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/22 (2006.01)	C O 7 K 16/22	4 B O 6 4
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-530629 (P2010-530629)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月26日 (2008.10.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年5月28日 (2010.5.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2008/001410
 (87) 国際公開番号 W02009/053987
 (87) 国際公開日 平成21年4月30日 (2009.4.30)
 (31) 優先権主張番号 60/982,438
 (32) 優先日 平成19年10月25日 (2007.10.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505341198
 ユニバーシティ オブ ブリストル
 イギリス国 ビーエス8 1ティーエイチ
 , ブリストル, クリフトン, ティン
 ダル アベニュー, セナット ハウス
 (71) 出願人 510115731
 フィロジーン, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
 901, サミット, サミット アベニ
 ュー 174
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管内皮増殖因子 (VEGF) の血管新生誘発性アイソフォームに特異的な抗体

(57) 【要約】

本発明は、血管新生誘発性、透過性誘発性、血管拡張性のアゴニスト VEGF アイソフォームに対する抗体、ならびに該抗体の少なくとも抗原結合部分を有する分子を提供する。開示する抗体および抗体断片は、血管新生誘発性形態の VEGF に結合して中和することができるが、抗血管新生性である VEGF アイソフォームには影響しないことを特徴とする。また、かかる抗体および抗体断片の作製方法ならびに治療および診断における使用も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管新生誘発性 V E G F アイソフォームに結合し得るが、抗血管新生性 V E G F アイソフォームに結合し得ない、V E G F に特異的な抗体または少なくともその抗原結合部分を含む断片。

【請求項 2】

エピトープ C D K P R R (配列番号：1)を含む抗原決定基を認識する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

C D K P R R (配列番号：1)、R C D K P R R (配列番号：3)、C R C D K P R R (配列番号：4)および T C R C D K P R R (配列番号：5)からなる群より選択される抗原決定基を認識するものである、請求項 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

抗原決定基が D R A R Q E K (配列番号：7)を含まない、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 5】

エピトープ S L T R K D (配列番号：2)を含む V E G F アイソフォームを中和することができない、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記 V E G F アイソフォームが V E G F₁₆₅b および V E G F₁₂₁b からなる群より選択される、請求項 5 に記載の抗体。

20

【請求項 7】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

European Collection of Cell Cultures (E C A C C) に寄託された M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 8 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 1 ; M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 1 0 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 2 ; M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 3 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 3 からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生される、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

European Collection of Cell Cultures (E C A C C) に寄託された M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 8 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 1 ; M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 1 0 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 2 ; M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 3 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 3 からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体。

30

【請求項 10】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 11】

前記抗体がヒト抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗体がキメラ抗体である、請求項 7 に記載の抗体。

40

【請求項 13】

前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 14】

F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F d'、F v、d A b、単離された C D R 領域および単鎖抗体からなる群より選択される請求項 1 に記載の抗体断片。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の抗体またはその抗体断片をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 16】

活性成分として、V E G F に特異的であり、エピトープ C D K P R R (配列番号：1)を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片；およ

50

び薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物。

【請求項 17】

処置を必要としている被検体に、VEGF に特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片を投与することを含み、それにより、VEGF の過剰発現と関連している障害または疾患に罹患している被検体が処置される、VEGF の過剰発現と関連している障害または疾患に罹患している被検体の処置方法。

【請求項 18】

前記障害または疾患が、細胞増殖性疾患または障害、過剰透過性疾患または障害、および血管新生に関連している疾患または障害からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記障害または疾患が、血管新生、ネフローゼ症候群、急性呼吸窮迫症候群、癌、増殖性眼疾患、網膜障害、関節リウマチ、および乾癬からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 1 に記載の抗体を、VEGF の抗血管新生性アイソフォームとともに投与することを含む、処置を必要としている被検体の処置方法。

【請求項 21】

前記 VEGF の抗血管新生性アイソフォームが VEGF_{165b} である、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記 VEGF の抗血管新生性アイソフォームが、VEGF_{121b}、VEGF_{145b}、VEGF_{189b} および VEGF_{206b} からなる群より選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

VEGF と関連している障害または疾患の処置のための医薬の調製のための、VEGF に特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片の使用。

【請求項 24】

VEGF と関連している障害または疾患の処置のための、VEGF に特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片の使用。

30

【請求項 25】

血管新生誘発性形態の VEGF と抗血管新生性形態の VEGF の比を測定するための、VEGF に特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片の使用。

【請求項 26】

VEGF に特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片を使用することを含む、試料中の血管新生誘発性 VEGF アイソフォームの存在を検出または定量するための方法。

40

【請求項 27】

i . 試料を、VEGF に特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片とともにインキュベートする工程；

ii . 検出可能なプローブを用いて、結合されたアゴニスト VEGF を検出する工程；

iii . (ii) の量を、既知量の血管新生誘発性 VEGF アイソフォームを含む参照試料で得られた標準曲線と比較する工程；および

iv . 体液試料中の該血管新生誘発性抗体の量を、該標準曲線から計算する工程

50

を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

VEGF に対する抗体であって、エピトープ CDKPRR (配列番号：1) を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片を使用することを含む、血管新生誘発性 VEGF アイソフォームが関連している疾患または障害を診断するための方法。

【請求項 29】

i. 生物学的試料を、VEGF のアゴニストアイソフォームに特異的な抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片とともにインキュベートする工程；

ii. 検出可能なプローブを用いて、結合されたアゴニスト VEGF を検出する工程；

iii. (ii) の量を、既知量の血管新生誘発性 VEGF を含む参照試料で得られた標準曲線と比較する工程；

iv. 体液試料中の該血管新生誘発性抗体の量を、該標準曲線から計算する工程；および

v. (iv) の量を、通常量の血管新生誘発性 VEGF 量と比較する工程

を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

処置を必要としている被検体に、VEGF の抗血管新生性アイソフォームを投与することを含む、腎障害の処置方法。

【請求項 31】

前記 VEGF の抗血管新生性アイソフォームが VEGF_{165b} である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 VEGF の抗血管新生性アイソフォームが、VEGF_{121b}、VEGF_{145b}、VEGF_{189b} および VEGF_{206b} からなる群より選択される、請求項 30 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、血管新生を伴う疾患、例えば、腫瘍および網膜障害の処置に有用な治療用および診断用抗体に関する。特に、本発明は、VEGF の血管新生誘発性アイソフォームに特異的な抗体を提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

血管新生

血管新生は、血管内皮細胞が増殖し、余分なものを取り除き、再編成して、既存の血管網から新たな血管を形成する重要な細胞性事象である。血管分布の発達、正常な増殖性プロセスおよび病理学的増殖性プロセスに不可欠であるという説得力のある証拠がある（非特許文献 1）。酸素および栄養分の送達、ならびに異化生成物の除去は、多細胞生物体において起こる増殖プロセスの大部分において律速段階である。したがって、血管区画は、胚発生中の器官の発生と分化だけでなく、成体の創傷治癒および生殖機能にも必要である。

【0003】

また、血管新生は、さまざまな障害、例えば限定されないが、腫瘍、増殖網膜症、加齢性黄斑変性、関節リウマチ、および乾癬の病因にも関与している。血管新生は、ほとんどの原発腫瘍の増殖およびその後の転移に不可欠である。腫瘍は、単に 1 ~ 2 mm の大きさまで拡散することによって十分な栄養分と酸素を吸収することができ、この大きさの時点では、さらなる増殖に血管分布の同化が必要となる。このプロセスは、近接宿主成熟脈管

10

20

30

40

50

構造の漸増によって新たな毛細血管の発生が開始され、腫瘍塊に向かって成長し、続いて浸潤することを伴うと考えられる。また、腫瘍血管新生は、骨髄からの循環内皮前駆細胞の漸増によって新生血管形成が促進されることを伴う（非特許文献2；非特許文献3）。

【0004】

血管新生の注目すべき生理学および病理学的重要性に鑑み、このプロセスの調節能を有する因子の解明のために、多大な研究が注力されている。血管新生プロセスは、血管新生誘発性分子と抗血管新生性分子との均衡によって調節され、種々の疾患、特に癌では逸脱していることが示唆されている（非特許文献4）。

【0005】

血管内皮増殖因子（VEGF）

血管内皮細胞増殖因子（VEGF）は、正常な血管新生と異常な血管新生の両方の重要な調節因子であると報告されており、その最も一般的な形態は、VEGF-Aすなわち血管透過性因子（VPF）である（非特許文献5）。血管の形成プロセスに寄与している他の増殖因子と比べ、VEGFは、血管系内の内皮細胞に対する特異性が高い点で特殊である。VEGFは、胚の脈管形成および血管新生に不可欠である（非特許文献6；非特許文献7）。さらに、VEGFは、雌の生殖器系における周期的血管増殖ならびに骨の成長および軟骨形成に必要である（非特許文献8；非特許文献9）。ヒトVEGFは、血管拡張、血管透過性の増大および内皮細胞の有糸分裂誘発を媒介する32～42kDaの二量体糖タンパク質である。

【0006】

また、相当な証拠によって、病理学的血管新生を伴う病状または疾患の発生におけるVEGFの非常に重要な役割が示されている。VEGF mRNAは、調査されたヒト腫瘍のほとんどで過剰発現されている。腫瘍増殖の促進における中心的な役割を考慮すると、VEGFによって、治療的介入のための魅力的な標的がもたらされる。実際、VEGFまたはその受容体シグナル伝達系のブロックを目的としたさまざまな治療戦略が、現在、新生物性疾患の処置のために開発中である。これまで、モノクローナル抗体によるVEGF/VEGF受容体のブロックおよびチロシンキナーゼインヒビターによる受容体シグナル伝達の阻害が、最も十分に研究され、臨床的に認められたアプローチである。VEGFR-1リボザイム、VEGF毒素コンジュゲート、および可溶性VEGF受容体もまた研究されている。

【0007】

VEGFシグナル伝達を阻害するためのいくつかの異なる戦略が治療的に使用されているか、または開発中であり、そのようなものとしては、ヒト化中和モノクローナル抗体、可溶性受容体、アンタゴニストVEGF変異型およびペプチド、ならびにVEGF受容体機能のインヒビターが挙げられる。VEGF阻害の概説は、最近、非特許文献10によって公開された。

【0008】

VEGF遺伝子の識別的エキソンスプライシングによって、2つのアイソフォームファミリーがもたらされる：第1のファミリーは、刺激性、アゴニストまたは血管新生誘発性と称されており、第2のものは、阻害性、アンタゴニストまたは抗血管新生性のファミリーであることが知られている。これらの2つのファミリーは構造的に非常に類似しているが、機能的には相違する。mRNA種は主に3種類あり、これらには、VEGF₂₀₆、VEGF₁₈₉、VEGF₁₆₅、VEGF₁₄₅およびVEGF₁₂₁で表される5種類のアゴニスト分泌型アイソフォームがコードされている。したがって、血管新生誘発性VEGFファミリーは、選択的スプライシングのため、121、145、165、189および206個のアミノ酸を有する5種類の異なる形態を有する。VEGF₁₂₁ VEGF₁₄₅およびVEGF₁₆₅は可溶性であり、血管新生を促進し得るものであるが、VEGF₁₈₉およびVEGF₂₀₆は、細胞表面のヘパリン含有プロテオグリカンに結合されている。少数派のスプライスパリアントがいくつか報告されているが、その重要性は未だ不確定である。各アイソフォームは、相違する性質および発現パターンを有する。

VEGFの種々の分子形態が特許文献1に開示されており、これらは、エキソン1～5の110個のアミノ酸からなる共通のアミノ末端ドメインを共有しているが、カルボキシ末端部分の長さが異なっている(図1参照)。

【0009】

抗血管新生性VEGFアイソフォーム

VEGFスプライスバリエント(本明細書においてVEGF_{xxx}bとも表示する)のファミリーの一例は、VEGFの抗血管新生性アイソフォームのものであり、限定されないが、VEGF₁₆₅b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉b、VEGF₂₀₆b(特許文献1に開示)およびVEGF₁₂₁bが含まれ、BatesおよびHarperによって同定された。このバリエントは、識別的にスプライシングされたものであり、エキソン6と8a(以前はエキソン8と称されていた)が欠失しており、アミノ酸配列Ser-Leu-Thr-Arg-Lys-Asp(SLTRKD、配列番号:2)をコードするこれまで未知であったエキソン8b(以前はエキソン9と称されていた)を含む。VEGF₁₆₅b、および他のアゴニストVEGF種(本明細書においてVEGF_{xxx}bとも表示する)は、従来からのVEGFポリペプチドのアンタゴニストであり、BatesおよびHarperによって、抗血管新生活性、抗血管拡張活性、抗透過活性および抗増殖活性を有することが示された(非特許文献11および非特許文献12)。HarperおよびBatesの最近の刊行物(非特許文献13)において、著者らは、VEGF₁₆₅bは結腸直腸腫瘍の増殖を阻害すると結論づけている。さらに、VEGF₁₆₅bは、腫瘍の増殖に対するベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))の効果を低下させる。

10

20

【0010】

非特許文献14には、VEGF₁₆₅のエキソン7コード化ドメインに対応し、VEGF誘導性内皮細胞増殖を阻害するペプチドが記載されている。

【0011】

特許文献2は、一般に、天然のVEGF応答を誘発することなくVEGF受容体に結合して占有することができるVEGFアンタゴニストに関するものである。このVEGFバリエントは、VEGF単量体単位が適正に二量体化する能力に影響を及ぼすアミノ酸修飾を有する。具体的に開示されたバリエントは、該バリエントがジスルフィド結合の形成によって二量体化する能力を阻害する少なくとも1つの修飾システイン残基を有する。

30

【0012】

特許文献3は、VEGFヘテロ二量体を形成することを含む、疾患の処置または予防方法、およびかかるヘテロ二量体を形成し得る新規なVEGFアイソフォームに関する。

【0013】

特許文献4には、ループI内に、野生型二量体の存在下でVEGF受容体の活性化の有意な低減を可能にする配列などの変異を有するVEGF由来分子であるVEGFアンタゴニストが開示されている。

【0014】

特許文献5には、患者に、有効量の抗VEGF抗体を、化学療法剤を含む抗新生物組成物と一緒に投与することを含む、癌の処置方法が開示されている。

40

【0015】

US2006/166878には、VEGF₁₆₅の第7エキソンの一部分が開示されており、この部分は、あらゆるVEGFアイソフォームに対するアンタゴニストとして作用すると主張されている。US2006/166878に開示された抗体は、VEGFのアゴニストアイソフォームならびにアンタゴニストアイソフォームの両方に結合する。

【0016】

抗VEGF抗体

抗VEGF抗体「ベバシズマブ(BV)」は、「rhuma b VEGF」または「AVASTIN(登録商標)」としても知られており、非特許文献15に従って生成される組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体である。AVASTIN(登録商標)は、治療用途に承認されており、種々の癌の処置について、さらに臨床的に研究されている。

50

【 0 0 1 7 】

A V A S T I N (登録商標)は、アゴニスト性またはアンタゴニスト性いずれの場合も、あらゆる V E G F アイソフォームにおいて高度に保存されたエキソン 3 / エキソン 4 接合部配列に対するものである。

【 0 0 1 8 】

特許文献 6 には、抗 V E G F 抗体ならびにその診断的および治療用途が開示されており、一方、W O 9 8 / 4 5 3 3 2 には、ヒト V E G F 抗体ならびにその作製および使用のための方法が開示されている。

【 0 0 1 9 】

特許文献 7 には、V E G F の異なるエピトープに対するモノクローナル抗体を用いて V E G F を検出するための E L I S A 法が開示されている。記載の方法により、1 回のアッセイで、V E G F のあらゆるアイソフォームと一緒に検出することが可能になる。

10

【 0 0 2 0 】

特許文献 8 には、高い親和性と特異性を有する血管内皮増殖因子 (V E G F) に対するヒト化抗体または完全ヒト抗体を設計および選択するための方法が開示されている。特に、高親和性でヒト V E G F に結合し、インビトロで内皮細胞の V E G F 誘導性増殖を阻害し、インビボで V E G F 誘導性血管新生を阻害する能力を有するヒト化またはヒト抗 V E G F モノクローナル抗体が提供されている。このような抗体およびその誘導体は、多種多様な適用用途、例えば、癌、A M D、糖尿病性網膜症などの疾患、および病理学的血管新生によって生じる他の疾患の診断、予防および処置などにおいて使用され得る。

20

【 0 0 2 1 】

特許文献 9 には、タンパク質のアイソフォームと関連している疾患の診断および処置に特異的な抗体の作製およびスクリーニングのための方法が記載されている。この開示内容には、疾患状態と関連している種々のポリペプチドのアイソフォームに特異的な、とりわけ V E G F アイソフォームに特異的なエキソンのスプライス接合部のアミノ酸を認識する抗体の作製およびスクリーニングが教示されている。V E G F _{1 2 1} または V E G F _{1 6 5} いずれかのアイソフォームを認識し得る提案された抗 V E G F 抗体が開示されており、ここで、抗 V E G F _{1 2 1} 特異的抗体は、エキソン 5 と 8 間の接合部のペプチド配列 (配列番号 : 6) に対して生成されるものであり得、抗 V E G F _{1 6 5} 特異的抗体は、エキソン 5 と 7 との間の接合部のペプチドドメインに対して生成されるものであり得る。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 2 2 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 0 3 / 0 1 2 1 0 5 号パンフレット

【 特許文献 2 】 国際公開第 9 8 / 1 6 5 5 1 号パンフレット

【 特許文献 3 】 国際公開第 0 1 / 5 3 3 4 5 号パンフレット

【 特許文献 4 】 国際公開第 0 1 / 1 2 8 0 9 号パンフレット

【 特許文献 5 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 0 9 0 0 号パンフレット

【 特許文献 6 】 国際公開第 9 8 / 4 5 3 3 1 号パンフレット

【 特許文献 7 】 国際公開第 2 0 0 1 / 0 3 6 9 7 2 号パンフレット

40

【 特許文献 8 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 5 4 2 7 3 号パンフレット

【 特許文献 9 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 0 7 1 9 8 号パンフレット

【 非特許文献 】

【 0 0 2 3 】

【 非特許文献 1 】 F o l k m a n および K l a g s b r u n 1 9 8 7 , S c i e n c e 2 3 5 , 4 4 2 - 4 4 7

【 非特許文献 2 】 K e r b e l 2 0 0 0 , C a r c i n o g e n e s i s , 2 1 , 5 0 5 - 5 1 5

【 非特許文献 3 】 L y n d e n 5 , 2 0 0 1 , N a t . M e d . 7 , 1 1 9 4 - 1 2 0 1

【 非特許文献 4 】 C a r m e l i e t および J a i n 2 0 0 0 , N a t u r e 4 0 7

50

, 249 - 257

【非特許文献5】FerraraおよびDavis - Smyth, 1997, Endocrine Rev. 18, 4 - 25

【非特許文献6】Carmelietら, 1996, Nature 380, 435 - 439

【非特許文献7】Ferraraら, 1996, Nature 380, 439 - 442

【非特許文献8】Ferraraら 1998, Nature Med. 4, 336 - 340

【非特許文献9】Gerberら, 1999, Nature Med., 5, 623 - 628

【非特許文献10】Moreiraら, Anti - Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2007, 7, 223 - 245

【非特許文献11】Woolardら, Cancer Research 2002, 62, 4123 - 4131

【非特許文献12】Woolardら, Cancer Research 2004, 64, 7822 - 7835

【非特許文献13】Vareyら, British J. Cancer 2008, 1 - 14

【非特許文献14】Sokerら, J. Biol. Chem. 1997, 272, 50, 31582 - 31588

【非特許文献15】Prestaら, 1997, Cancer Res., 57, 4593 - 4599

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

VEGFの血管新生誘発性形態が共有しているアミノ酸配列を認識する既知の抗体では、いずれも、この増殖因子の血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態が識別され得ない。したがって、血管新生誘発性アイソフォームと抗血管新生性アイソフォームを識別するために診断的に使用され得、血管新生誘発性VEGFアイソフォームのみを阻害するために治療的に使用され得る、VEGFに対する抗体の提供という、まだ対処されていない必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0025】

発明の概要

本発明は、VEGFに対する現在利用可能な抗体は、VEGFのアゴニスト形態を中和するだけでなく、VEGFのアンタゴニスト（抗血管新生性）形態も中和し、したがって、組織中に存在するVEGFアイソフォームのバランスに応じて臨床応答を伴って混合型アンタゴニスト - アゴニストとして作用するという概念に基づくものである。したがって、本発明は、血管新生誘発性バリエーションと抗血管新生性バリエーションとを識別することができ、前者のアイソフォームのみを中和することができる、血管新生誘発性VEGFに特異的な抗体を初めて提供するものである。また、本発明は、かかる抗体を得るための方法、その作製方法、ならびにその治療的および診断的使用を提供する。

【0026】

VEGFの特定のペプチド配列、例えばエキソン8aにコードされた配列、例えば配列CDKPRR（配列番号：1）は、ほとんどの血管新生誘発性VEGFバリエーションに存在しているが、VEGFアンタゴニストバリエーションには存在せず、これは、エキソン8bにコードされた配列SLTRKD（配列番号：2）を含む。本発明により、VEGFの血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態を識別することができる、エキソン8aにコードされた配列を含む抗原決定基に対する抗体が提供される。

【0027】

10

20

30

40

50

一態様によれば、本発明は、血管新生誘発性 V E G F アイソフォームに結合し得るが、抗血管新生性の V E G F の形態には結合し得ない、V E G F のアゴニストアイソフォームに対する抗体（本明細書において抗 V E G F x x x 抗体とも表示する）を提供する。

【0028】

一実施形態によれば、該抗体は、V E G F に特異的であり、エピトープ C D K P R R（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片である。

【0029】

具体的な実施形態によれば、該抗体は、C D K P R R（配列番号：1）、R C D K P R R（配列番号：3）、C R C D K P R R（配列番号：4）、および T C R C D K P R R（配列番号：5）からなる群より選択される抗原決定基を認識するものである。

10

【0030】

また別の実施形態によれば、該抗体は、配列 S L T R K D（配列番号：2）を含む V E G F アイソフォームに結合しない。具体的な実施形態によれば、配列 S L T R K D を含む V E G F アイソフォームは、V E G F_{1 6 5} b および V E G F_{1 2 1} b、V E G F_{1 4 5} b、V E G F_{1 8 9} b、V E G F_{2 0 6} b である。

【0031】

別の実施形態によれば、該抗体は、配列 C D K P R R（配列番号：1）を含む V E G F アイソフォームに結合し得るものであり、前記抗体の抗原決定基は D R A R Q E K（配列番号：7）を含まない。

20

【0032】

本発明の一実施形態によれば、該抗体はモノクローナル抗体である。具体的な一実施形態によれば、モノクローナル抗体は、ヒト化抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、および抗体の少なくとも抗原結合部分を含む抗体断片からなる群より選択される。具体的な一実施形態によれば、該抗体断片は、F a b、F a b'、F（a b'）₂、F d、F d'、F v、d A b、単離された C D R 領域、単鎖抗体、「ダイアボディ」および「線状抗体」からなる群より選択される。

【0033】

具体的な一実施形態によれば、モノクローナル抗体は、European Collection of Cell Cultures（E C A C C）に寄託された M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 8 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 1；M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 1 0 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 2；M R 9 3 A 2 6 クローン 1 3 - 8 - 3 受託番号 0 8 1 0 1 4 0 3 からなる群より選択されるハイブリドーマ細胞株によって産生されるものである。

30

【0034】

別の実施形態によれば、該抗体はポリクローナル抗体である。

【0035】

また、アゴニスト V E G F アイソフォームに対する親和性と特異性を有する本発明による抗体をコードする核酸分子も本発明の範囲に含まれる。

【0036】

この態様により、V E G F のアゴニストアイソフォームに特異的な抗体またはその抗体断片をコードする単離されたポリヌクレオチドを開示する。具体的な一実施形態によれば、V E G F のアゴニストアイソフォームに特異的な抗体、または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片は、エピトープ C D K P R R（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する。

40

【0037】

別の態様によれば、本発明は、V E G F と関連している疾患または障害の予防、減弱または処置に有用な医薬組成物に関する。本発明による医薬組成物は、血管新生誘発性の V E G F の形態に結合し得るが抗血管新生性の V E G F の形態には結合し得ない抗体の治療有効量；および薬学的に許容され得る担体を含む。

50

【0038】

一実施形態によれば、医薬組成物は、アゴニストVEGFに特異的な抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片の治療有効量を含む。具体的な一実施形態によれば、アゴニストVEGFに特異的な抗体、または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片は、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する。

【0039】

具体的な一実施形態によれば、医薬組成物は、CDKPRR（配列番号：1）、RCDKPRR（配列番号：3）、CRCDKPRR（配列番号：4）、およびTCRCDKPRR（配列番号：5）からなる群より選択される抗原決定基を認識し、アゴニストVEGFに特異的な抗体またはその抗体断片の治療有効量を含む。

10

【0040】

一部の特定の実施形態によれば、アゴニストVEGFと関連している疾患または障害は、細胞増殖性、過剰透過性であるか、または血管新生に関連している疾患または障害（例えば、限定されないが、ネフローゼ症候群および急性呼吸窮迫症候群、ARDS）である。他の実施形態によれば、細胞増殖性疾患または障害は、限定されないが、癌、目の細胞増殖性疾患（眼疾患）、網膜障害、関節リウマチ、および乾癬を含む群から選択される。

【0041】

網膜障害としては、例えば、脈絡膜新生血管膜（Choroidal Neovascular Membrane）（CNVM）、糖尿病性網膜症、黄斑浮腫、血管閉塞、加齢性黄斑変性（AMD）、および未熟児網膜症（ROP）が挙げられる。

20

【0042】

また別の態様において、本発明は、処置を必要としている被検体に、アゴニストのVEGFアイソフォームに特異的な抗体の治療有効量；および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物を投与することを含む、血管新生または血管内皮細胞増殖と関連している疾患または障害の予防、減弱または処置方法に関する。

【0043】

一部の実施形態によれば、アゴニストVEGFの過剰発現と関連している疾患または障害は、血管新生性または細胞増殖性の疾患または障害である。

【0044】

本発明による医薬組成物は、単独の処置剤として、または任意のVEGFアンタゴニスト（例えば、限定されないが、抗血管新生性VEGFアイソフォーム）での処置に加えて投与され得る。具体的な一実施形態によれば、本発明による抗体は、処置を必要としている被検体に、処置レジメンの一部として、少なくとも1種類の抗血管新生性アイソフォームとともに投与される。具体的な一実施形態によれば、VEGFアンタゴニストアイソフォームは、VEGF₁₆₅b、VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉bまたはVEGF₂₀₆b、およびこれらの任意の組合せからなる群より選択される。本発明による医薬組成物は、VEGFアンタゴニストと一緒に、または別々に投与され得る。

30

【0045】

本発明による医薬組成物は、抗新生物組成物と一緒に投与され得る。具体的な一実施形態によれば、抗新生物組成物は少なくとも1種類の化学療法剤を含むものである。本発明による抗体と一緒に、または別々に投与され得る化学療法剤は、抗癌活性を示す当該技術分野で知られた任意のかかる薬剤、例えば限定されないが：ミトザントロン、トポイソメラーゼインヒビター、紡錘体毒ピンカ：ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン（タキソール）、パクリタキセル、ドセタキセル；アルキル化剤：メクロレタミン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド；メトトレキサート；6-メルカプトプリン；5-フルオロウラシル、シタラビン、ゲムシタビン；ボドフィロトキシン：エトポシド、イリノテカン、トポテカン、ダカルバジン；抗生物質：ドキシソルピシン（アドリアマイシン）、ブレオマイシン、マイトマイシン；ニトロソ尿素：カルムスチン（BCNU）、ロムスチン、エピルピシン、イダルピシン、ダウノルピシン；無機イオン：シスプラチン、カルボプラチン；インターフェロン、アスパラギナーゼ；ホルモ

40

50

ン：タモキシフェン、ロイプロリド、フルタミド、および酢酸メゲストロールを含むものであり得る。

【0046】

具体的な一実施形態によれば、化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体および関連インヒビター、ビンカアルカロイド類、エピポドフィロトキシン、抗生物質、L-アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼインヒビター、インターフェロン、白金配位錯体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤 (adrenocortical suppressant)、腎皮質ステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン、および性腺刺激ホルモン放出ホルモン類似体からなる群より選択される。別の実施形態によれば、化学療法剤は、5-フルオロウラシル (5-FU)、ロイコボリン (LV)、イレノテカン (irinotecan)、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセルおよびドキシタキセルからなる群より選択される。2種類以上の化学療法剤をカクテルにて使用し、抗VEGF抗体の投与と併用して投与してもよい。好ましい併用化学療法剤の一例は、フルオロウラシルを主成分とし、5-FUと1種類以上の他の化学療法剤を含むものである。

10

【0047】

具体的な一実施形態によれば、本発明は、被検体に、有効量の抗アゴニストVEGF抗体を抗新生物組成物と一緒に投与することを含む、被検体の癌の処置方法を提供する。

20

【0048】

本発明による処置で修正可能な (amendable) 癌としては、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性腫瘍が挙げられる。かかる癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌、肺癌 (例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌)、腹膜の癌、肝細胞癌、胃 (gastric/stomach) 癌 (例えば、胃腸の癌)、膵臓癌、グリア芽腫、頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮の癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌および種々の型の頭頸部癌、ならびにB-細胞リンパ腫 (例えば、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL) ; 小リンパ性 (SL) NHL ; 中悪性度/濾胞性NHL ; 中悪性度びまん性NHL ; 高悪性度免疫芽球性NHL ; 高悪性度リンパ芽球性NHL ; 高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL ; 巨大腫瘍病変NHL ; マントル細胞リンパ腫 ; AIDS関連リンパ腫 ; およびワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症) ; 慢性リンパ性白血病 (CLL) ; 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) ; ヘアリーセル白血病 ; 慢性骨髄芽球性白血病 ; および移植後リンパ増殖性障害 (PTLD)、ならびに母斑症と関連している異常な血管増殖、浮腫 (脳腫瘍と関連しているものなど)、およびメグズ症候群が挙げられる。好ましくは、癌は、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫 (NHL)、腎細胞癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、軟組織肉腫、カボジ肉腫、類癌腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、および多発性骨髄腫からなる群より選択される。より好ましくは、癌は結腸直腸癌である。本発明による処置で修正可能な癌性状態としては転移性癌が挙げられる。本発明の方法は、血管新生した腫瘍の処置に特に好適である。

30

40

【0049】

別の態様において、本発明は、被検体に、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体を含む組成物の有効量と、抗新生物組成物を投与することを含み、前記抗新生物組成物が少なくとも1種類の化学療法剤を含み、それにより、抗VEGF抗体と抗新生物組成物の共投与によって生存期間が有効に長くなる、癌を有する被検体の生存期間を長くするための方法を提供する。

【0050】

また別の態様において、本発明は、被検体に、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体を含む組成物の有効量と、抗新生物組成物を投与することを含み、前記抗新生物組成物が少なくとも1種類の化学療法剤を含み、それにより、VEGFのアゴニスト

50

アイソフォームに特異的な抗体と抗新生物組成物の共投与によって進行なしの生存期間が有効に長くなる、癌を有する被検体の進行なしの生存を延ばすための方法を提供する。

【0051】

さらに、本発明は、被検体に、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体を含む組成物の有効量と、抗新生物組成物を投与することを含み、それにより、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体と抗新生物組成物の共投与によって被検体群において応答発生数が有効に増加する、癌を有する被検体の処置方法を提供する。

【0052】

また別の態様において、本発明は、被検体に、VEGFのアゴニストアイソフォームに対する抗体を含む組成物の有効量と、抗新生物組成物を投与することを含み、前記抗新生物組成物が少なくとも1種類の化学療法剤を含み、それにより、VEGFのアゴニストアイソフォームに対する抗体と抗新生物組成物の共投与によって応答期間が有効に長くなる、癌を有する被検体の応答期間を長くするための方法を提供する。

【0053】

本発明の別の態様は、細胞増殖性であるか、または血管新生に関連している疾患または障害の処置のための治療用組成物の製造のための、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体またはその抗体断片の使用に関する。

【0054】

一実施形態によれば、本発明によれば、VEGFの血管新生性形態の過剰発現と関連している障害または疾患、例えば限定されないが、血管新生に関連している疾患または障害の処置のための医薬の調製のための、VEGFに特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片の使用が提供される。

【0055】

別の態様によれば、本発明により、VEGFの血管新生性形態と関連している障害または疾患の処置のための、VEGFに特異的であり、エピトープCDKPRR（配列番号：1）を含む抗原決定基を認識する抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片の使用が提供される。一実施形態によれば、該疾患または障害は血管新生性または細胞増殖性の疾患または障害である。

【0056】

血管新生誘発性VEGF（本明細書においてVEGFxxxと表示する）は、有足突起生存因子であり、血管新生誘発性であり、腎臓の糸球体の透過性を増大させて糸球体漏出性となる。

【0057】

VEGFの抗血管新生性形態（本明細書においてVEGFxxx bと表示、VEGF165 bが例示される）は、有足突起生存因子であり、抗血管新生性であり、ヒト糸球体の透過性を低下させる。

【0058】

VEGFスカベンジャー（AVASTIN（登録商標）など）、およびVEGR遮断薬（チロシンキナーゼインヒビター、TKI）（SUTENT（登録商標）など）は、蛋白尿および腎臓障害を誘発する。

【0059】

本発明の原理によると、TKI（SUTENT（登録商標）など）または抗体（AVASTIN（登録商標）など）によって誘発される腎炎性障害および/または糸球体損傷が、血管新生誘発性VEGFxxxのみに特異的な抗体での処置によって回避または改善され得ることが想定される。

【0060】

本発明の原理によると、TKI（SUTENT（登録商標）など）または抗体（AVASTIN（登録商標）など）によって誘発される腎炎性障害および/または糸球体損傷が、VEGF165 bでの処置によって減弱され得ることが想定される。したがって、本発

10

20

30

40

50

明の別の態様によれば、VEGF 165bにより、既知のVEGFスカベンジャーおよびVEGFR遮断薬によって誘発される損傷が減弱され得る。

【0061】

別の態様によれば、本発明により、本発明による血管新生誘発性のVEGFの形態に特異的な抗体を、VEGFの抗血管新生性アイソフォームとともに投与することを含む、処置を必要としている被検体の処置方法が提供される。

【0062】

具体的な一実施形態によれば、VEGFの抗血管新生性アイソフォームはVEGF₁₆₅bである。他の実施形態によれば、VEGFの抗血管新生性アイソフォームは、VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉bおよびVEGF₂₀₆bからなる群より選択される。

10

【0063】

また別の態様によれば、本発明により、処置を必要としている被検体に、VEGFの抗血管新生性アイソフォームを投与することを含む、腎障害の処置方法が提供される。

【0064】

具体的な一実施形態によれば、VEGFの抗血管新生性アイソフォームはVEGF₁₆₅bである。他の実施形態によれば、VEGFの抗血管新生性アイソフォームは、VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉bおよびVEGF₂₀₆bからなる群より選択される。

20

【0065】

本発明の別の態様によれば、血管新生誘発性のVEGFの形態の存在を検出または定量するための方法が提供される。したがって、本発明により、VEGFのアゴニストアイソフォームに対する抗体を用いて、アゴニストVEGFアイソフォームのレベルの上昇と関連している病状を診断するための方法もまた提供される。本発明による診断方法は、具体的な実施形態により、インビトロまたはエキソビボで行なわれ得る。本発明による抗体はまた、スクリーニング方法を構成するためにも使用され得る。例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を使用し、当該技術分野で知られた標準的な方法により、分泌された、または細胞と会合したポリペプチドレベルを測定するためのELISAアッセイが構築され得る。

【0066】

30

一実施形態によれば、

i. 試料を、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片とともにインキュベートする工程；

ii. 検出可能なプローブを用いて、結合されたアゴニストVEGFを検出する工程；

iii. (ii)の量を、既知量の血管新生誘発性VEGFを含む参照試料で得られた標準曲線と比較する工程；および

iv. 体液試料中の該血管新生誘発性抗体の量を、該標準曲線から計算する工程を含む、血管新生誘発性のVEGFの形態の存在を検出または定量するための方法が提供される (is provides)。

【0067】

40

別の実施形態によれば、

i. 生物学的試料を、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片とともにインキュベートする工程；

ii. 検出可能なプローブを用いて、結合されたアゴニストVEGFを検出する工程；

iii. (ii)の量を、既知量の血管新生誘発性VEGFを含む参照試料で得られた標準曲線と比較する工程；

iv. 体液試料中の該血管新生誘発性抗体の量を、該標準曲線から計算する工程；および

v. (iv)の量を、通常量の血管新生誘発性VEGF量と比較する工程を含む、血管新生誘発性のVEGFの形態と関連している疾患または障害の診断方法が提

50

供される。

【0068】

本発明の抗体はまた、患者の血管新生誘発性／抗血管新生性の比率の評価のため、および抗VEGF療法剤（既知の抗VEGF抗体など）での処置（例えば、AVASTIN（登録商標）での処置）の有効性の予測のためのスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。本発明の抗体を用いたスクリーニングアッセイにより、VEGFの血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態の比率の測定が可能となり、したがって、処置の結果の予測および適切な処置レジメンの計画が可能となり得る。特異的抗体によって測定されるVEGFの血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態の比率は、どの患者がAVASTIN（登録商標）または他の抗pan VEGF処置（例えばVEGF-トラップ）の恩恵を被り得るかを評価するための予測ツールとして使用され得る。

10

【0069】

本質的に、抗血管新生性／アンタゴニストVEGFに関する先行技術において既知または想定される使用はすべて、本発明の抗体を用いて行われ得る。このような使用としては、診断的、予防的および治療的手法が挙げられる。

【0070】

本発明のさらなる実施形態および充分な適用範囲は、本明細書において以下に示す詳細な説明から自明となろう。

【図面の簡単な説明】

【0071】

20

【図1】図1は、A) ヒトVEGF遺伝子のエキソンマップ、およびB) 異なるVEGFアイソフォームをもたらすエキソンスプライシングパターンの概略図である。

【図2】図2は、エキソン8aまたはエキソン8bに対するアフィニティ精製された単一特異性ポリクローナル抗体を用いた組換えVEGF₁₆₅およびVEGF_{165b}のウエスタンブロット解析を示す。

【図3】図3は、エキソン8aに対する単一特異性ポリクローナル抗体の濃度を増大させることによるVEGF₁₆₅媒介性HUVEC遊走の阻害を示す。

【図4】図4Aおよび4Bは、VEGF_{165b}、エキソン8aに対する単一特異性ポリクローナル抗体または両者の組合せの存在下で測定されたHUVEC遊走を示す。

【図5】図5は、VEGF₁₆₅、エキソン8aに対する単一特異性ポリクローナル抗体またはLucentis、またはエキソン8aに対するポリクローナル抗体とVEGF_{165b}の組合せの存在下で、上記のようにして測定されたHUVEC遊走を示す。

30

【図6】図6は、VEGFのエキソン8aに対して生成させたモノクローナル抗体が、VEGF₁₆₅による刺激に应答したECV304内皮細胞の遊走を阻害することを示す。

【図7】図7は、アゴニストVEGFアイソフォーム(isoform) VEGF₁₆₅に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を試験した内皮細胞遊走アッセイの結果を示す。

【図8】図8は、VEGF_{165b}が血清飢餓状態のヒト有足突起の生存因子であることを示す。

【図9】図9は、100 μgのVEGF_{165b}の全身投与を受けた後、糸球体の有足突起においてVEGF_{165b}を過剰発現するトランスジェニックマウスの尿中クレアチニン／タンパク質比を示すグラフである。

40

【図10】図10は、VEGF_{165b}により慢性糸球体の透過性が低下することを示す。ヒト条件的不死化糸球体内皮細胞を2時間血清飢餓状態にし、次いで、何もなし（対照）、1 nMのVEGF₁₆₅、1 nMのVEGF_{165b}または1 nMのVEGF₁₆₅と1 nMのVEGF_{165b}の組合せのいずれかに应答した培養単層状態の糸球体内経内皮電気抵抗を測定した。結果は、対照と比べた平均増加倍数である（すなわち、時間点0分、SEM）。n = 5、プリズムによるデータ解析：p ± < 0.0001、一元配置ANOVA、反復測定、ボンフェローニポストテストによる。対照対VEGF₁₆₅ p < 0.001、対照対VEGF_{165b} p, 0.01、対照対両者 p > 0.05、VEGF

50

165対VEGF165bと両者 $p < 0.001$ 、VEGF165b対両者 $p < 0.01$ 。SSPSを用いたデータ解析、全般的な p 値 > 0.0005 一元配置ANOVA、反復測定、ポストホックボンフェローニ対照対VEGF 0.001、対他のNSVEGF対他の3つの群 すべて有意 165対両者 0.037。

【図11】図11は、ネフリンVEGF165b過剰発現トランスジェニックマウスにおけるインタクトなエキソピボ系球体のLpA/Viを示す。

【発明を実施するための形態】

【0072】

発明の詳細な説明

本発明は、VEGFの有害な形態に特異的であるが、該タンパク質の有益なアンタゴニスト形態は中和することができない抗体を初めて提供するものである。これは、VEGFの抗血管新生性/アンタゴニスト形態と血管新生誘発性/アゴニスト形態の構造の違いにより可能となった。例えば、天然のVEGFである抗血管新生性/アンタゴニストVEGF₁₆₅bは、エキソン8aにコードされた配列が欠損しているが、該配列は、ほとんどのVEGFの血管新生誘発性形態には存在している。

【0073】

エキソン8aに対して生成される抗体は、血管新生誘発性アイソフォームVEGF₁₆₅に結合して阻害するが、抗血管新生性形態VEGF₁₆₅bに対してはそうでないことが示された。また、このような抗体は、VEGF₁₆₅媒介性HUVEC遊走を用量依存的に阻害する。

【0074】

VEGFは、多面的因子として作用することがわかっている。これは、血管新生を調節するだけでなく、体内の多くの細胞および組織（ニューロン、網膜色素細胞、腎臓内の有足突起または正常および成熟血管など）に対して生存因子としての機能も果たす。VEGFが完全に欠損すると（例えば、VEGFの血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態を識別しない抗体およびVEGFR遮断薬によってもたらされる）により、患者は、網膜損傷、出血および蛋白尿および腎臓障害、ならびにさらなる重篤な有害事象に曝露され得る。

【0075】

VEGFの血管新生誘発性形態に対して標的化される抗体は、VEGFの血管新生誘発性形態を排除してVEGFの抗血管新生性形態がVEGFR1とVEGFR2に結合して抗血管新生と細胞保護をもたらすことを可能にするため、より安全でより有効であることが予測される。

【0076】

AVASTIN（登録商標）は、現在治療に使用されている抗VEGF抗体であるが、これは、VEGFの両方（血管新生誘発性および抗血管新生性）の形態に、同じ親和性で無差別に結合する。これにより、有効性の限界と低安全性プロファイルが説明され得る。有意なレベルのVEGF₁₆₅bを発現している腫瘍を有する患者をAVASTIN（登録商標）で処置することは、この抗VEGF抗体の効果がVEGF₁₆₅bによって阻害されるため、有効でないことがあり得る。本発明による特異的抗体によって測定されるVEGFの血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態の比率は、どの患者がAVASTIN（登録商標）または他の抗pan-VEGF処置（VEGF-トラップなど）の恩恵を被り得るかを予測するための予測ツールとして使用され得る。

【0077】

定義

用語「VEGF」は、（限定されないが）121-、145-、165-、189-、および206-アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子（Leungら Science, 1989, 246, 1306, およびHouckら Mol. Endocrin., 1991, 5, 1806に記載）ならびにその天然に存在する対立遺伝子形態およびプロセッシングされた形態をいうために用いる。用語「VEGF」は、あらゆる形態のVEGF-A、例えば、VEGFファミリーである165-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子のアミノ

10

20

30

40

50

酸 8 ~ 1 0 9 または 1 ~ 1 0 9 を含むポリペプチドの切断型形態、ならびに抗血管新生性形態 V E G F_{1 6 5 b}、V E G F_{1 2 1 b} および一連の全 V E G F_{x x x b} をいうために用いる。

【 0 0 7 8 】

用語「V E G F アゴニスト」、「アゴニスト V E G F」または「V E G F のアゴニスト」は、V E G F の血管新生誘発活性、すなわち、血管新生および / または透過性が促進または加速され得る V E G F の形態をいう。例示的なアゴニスト V E G F の形態は、エキソン 8 a にコードされた配列 C D K P R R を含むものである。

【 0 0 7 9 】

用語「V E G F アンタゴニスト」または「V E G F のアンタゴニスト」は、抗血管新生性分子として作用するが、血管新生の促進能はない V E G F の形態をいう。例示的なアゴニスト V E G F の形態は、エキソン 8 a にコードされた配列 C D K P R R ではなく、エキソン 8 b にコードされた配列 S L T R K D を含むものである。

【 0 0 8 0 】

V E G F のアゴニスト形態およびアンタゴニスト形態は、典型的には、エキソン 8 a によって発現される配列を有すること（アゴニスト V E G F の形態）またはエキソン 8 a が欠失し、エキソン 8 b 発現配列を有することによって識別されるが、それでもなお、他の形態のアゴニスト V E G F およびアンタゴニスト V E G F が存在し得、このようなアゴニスト形態とアンタゴニスト形態とを識別する抗体もまた、本発明の範囲に含まれる。「抗 V E G F 抗体」は、V E G F に十分な親和性と特異性で結合する抗体である。好ましくは、本発明の抗 V E G F 抗体は、V E G F 活性が関与している疾患または病状の標的化および介入において治療用薬剤として使用され得る。抗 V E G F 抗体は、通常、他の V E G F ホモログ（V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D もしくは V E G F - E など）または他の増殖因子（P L G F、P D G F もしくは b F G F など）には結合しない。抗 V E G F 抗体は、組換えヒト化抗 V E G F モノクローナル抗体であり得る。

【 0 0 8 1 】

「抗原」は、抗体形成が誘発され得、抗体に結合される分子または分子の一部である。抗原は、1 つまたは 1 つより多くのエピトープを有するものであり得る。上記の特異的反応は、抗原が、その対応する抗体と高度に選択的な様式で反応するが、他の抗原によって誘発され得る他の抗体群とは結合しないことを示すものとする。本発明による抗原は、V E G F のアゴニスト形態またはその断片である。

【 0 0 8 2 】

本発明による用語「抗原決定基」または「エピトープ」は、特定の抗体と特異的に反応する抗原分子の領域をいう。

【 0 0 8 3 】

抗体または免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって一緒に連結された 2 つの重鎖と、2 つの軽鎖を含み、各軽鎖がそれぞれの重鎖に、ジスルフィド結合によって「Y」字型形状の構造に連結されている。抗体のタンパク質分解性消化により、F_v（可変部断片）と F_c（結晶性断片）ドメインが得られる。抗原結合ドメインである F_{a b} は、ポリペプチド配列が種々である領域を含む。F（a b'）₂ という用語は、ジスルフィド結合によって一緒に連結された 2 つの F_{a b}' アームを表す。抗体の中心軸は F_c 断片と称される。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン（V_H）、続いていくつかの定常ドメイン（C_H）を有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン（V_L）および他方の末端に定常ドメイン（C_L）を有し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでおり、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第 1 の定常ドメイン（C_{H1}）と並んでいる。軽鎖と重鎖の各ペアの可変ドメインは抗原結合部位を形成している。軽鎖および重鎖上のドメインは同じ一般構造を有し、各ドメインは 4 つのフレームワーク領域を含み、その配列は、比較的保存されており、相補性決定領域（C D R 1 ~ 3）として知られている 3 つの超可変ドメインによって接合されている。これらのドメインは、抗原結合部位の特異性と親和性に寄与している。重鎖のアイソタイプ（ 、 、 、 または μ）によって、免疫グロブリンのクラス

10

20

30

40

50

(それぞれ、I g G、I g A、I g D、I g EまたはI g M)が決定される。軽鎖は、すべての抗体クラスに見られる2つのアイソタイプ(カッパ、またはラムダ、)のいずれかである。

【0084】

用語「抗体」は、は最も広い意味で用いており、モノクローナル抗体(例えば、完全長またはインタクトなモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および抗体断片(所望の生物学的活性を示すものである限り)を包含する。

【0085】

本発明による抗体は、抗体の少なくとも抗原結合部分を含む分子である。本発明による抗体(1種類ならびに複数種)としては、インタクトな抗体(ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体(mAb)など)、ならびにそのタンパク質分解断片(FabまたはF(ab')₂断片など)が挙げられる。さらに、本発明の範囲には、キメラ抗体; ヒト抗体およびヒト化抗体; 組換え抗体および遺伝子操作抗体、ならびにその断片が含まれる。さらに、抗体の可変領域をコードするDNAを、他の抗体をコードするDNAに挿入してキメラ抗体を作製してもよい。単鎖抗体もまた本発明の範囲に含まれる。

【0086】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部のみ、一般的には、例えば、インタクトな抗体の抗原結合部位のみを含み、したがって抗原との結合能を保持しているものである。本定義に包含される抗体断片の例としては、(i) Fab断片(VL、CL、VHおよびCH1ドメインを有する); (ii) Fab'断片(これは、CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有するFab断片である); (iii) Fd断片(VHおよびCH1ドメインを有する); (iv) Fd'断片(VHおよびCH1ドメインならびにCH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有する); (v) Fv断片(抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインを有する); (vi) dAb断片(Wardら, Nature 1989, 341, 544-546)(これはVHドメインからなる); (vii) 単離されたCDR領域; (viii) F(ab')₂断片(ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結された2つのFab'断片を含む二価断片); (ix) 単鎖抗体分子(例えば、単鎖Fv; scFv)(Birdら, Science 1988, 242, 423-426; およびHoustonら, PNAS (USA) 1988, 85, 5879-5883); (x) 「ダイアボディ」(2つの抗原結合部位を有し、同じポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された重鎖可変ドメイン(VH)を含む)(例えば、EP 404, 097; WO 93/11161; およびHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448参照); (xi) 「線状抗体」(1対のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む、これは、相補軽鎖ポリペプチドと一緒に1対の抗原結合領域を形成する)(Zapataら Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; および米国特許第5, 641, 870号)が挙げられる。

【0087】

単鎖抗体は、抗原結合能を有し、免疫グロブリン軽鎖および重鎖、すなわち、連結V_H-V_Lまたは単鎖Fv(scFv)の可変領域に相同または相似なアミノ酸配列を含む単鎖複合型ポリペプチドであり得る。

【0088】

「中和抗体」は、本明細書で用いる場合、特異的受容体またはリガンド標的に対する抗原結合部位を有する分子であって、受容体を介して活性またはシグナル伝達を低減または阻害(ブロック)し得る(本明細書どおりに、インビボまたはインビトロアッセイによって判定)ものをいう。

【0089】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で用いる場合、実質的に均一な抗体の集団(すなわち、集団を構成する個々の抗体は、微量に存在し得る起こり得る天然変異以外同一

10

20

30

40

50

である)から得られる抗体をいう。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対するものである。さらに、典型的には種々の決定基(エピトープ)に対する種々の抗体が含まれるポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の作製が必要とされるものでない解釈されたい。mAbは、当業者にわかる方法によって得られ得る。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法(最初にKohlerら, Nature 1975, 256, 495により報告)によって作製され得るか、または組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)によって作製され得る。また、「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonら, Nature 1991, 352, 624-628またはMarksら, J. Mol. Biol., 1991, 222: 581-597に記載の手法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離したものであってもよい。

10

20

30

40

50

【0090】

本発明のmAbは、任意の免疫グロブリンクラスのもの(例えば、IgG、IgM、IgE、IgA)、およびその任意のサブクラスのものであり得る。mAbを産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養され得る。高力価のmAbはインビボ生成にて得られ得、この場合、個々のハイブリドーマ由来の細胞を、初回抗原刺激した(pristine-primed)Balb/cマウスに腹腔内注射し、高濃度の所望のmAbを含有する腹水を得る。アイソタイプIgMまたはIgGのmAbは、当業者には充分わかるカラムクロマトグラフィー法を使用し、かかる腹水または培養上清から精製され得る。

【0091】

本明細書におけるモノクローナル抗体としては、具体的には「キメラ」抗体が挙げられ、これは、重鎖および/または軽鎖の一部分は特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一または相同であるが、該鎖(1つまたは複数)の残部は別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応配列と同一または相同な抗体、ならびにかかる抗体の断片(ただし、所望の生物学的活性を示すものとする)である(米国特許第4,816,567号;およびMorrissonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57: 6851-6855(1984))。また、抗体分子の特定の性質(例えば、親和性または特異性)を改変するために、補性決定領域(CDR)グラフトイングを行なってもよい。CDRグラフトイングの非限定的な一例は、米国特許第5,225,539号に開示されている。

【0092】

キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子(マウスmAb由来の可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域とを有するものなど)である。実質的にヒト抗体(アクセプター抗体という)に由来する可変領域フレームワーク残基と、実質的にマウス抗体(ドナー抗体という)に由来する相補性決定領域とを有する抗体は、ヒト化抗体とも称される。キメラ抗体は、主に、適用時の免疫原性を低減するため、および産生収率を増大させるために使用され、例えば、マウスmAbの方がハイブリドーマからの収率が高いが、ヒトにおいて免疫原性が高い場合、結果としてヒト/マウスキメラmAbが使用される。キメラ抗体およびその作製方法は当該技術分野で知られている(例えば、PCT特許出願公開公報WO86/01533、WO97/02671、WO90/07861、WO92/22653ならびに米国特許第5,693,762号、同第5,693,761号、同第5,585,089号、同第5,530,101号および同第5,225,539号)。

【0093】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含むキメラ抗体である。たいてい、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは

非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基で置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基で置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含むものであり得る。このような修飾は、抗体の性能をさらに精密化するために行なわれる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを実質的にすべて含み、ここで、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである。また、ヒト化抗体は、任意選択で、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もの）の少なくとも一部分を含むものである。さらなる詳細については、Jonesら, *Nature* 1986, 321, 522-525; Riechmannら, *Nature* 1988, 332, 323-329; および Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, 2, 593-596を参照のこと。

【0094】

「ヒト抗体」は、ヒトにおいて産生される抗体および/または本明細書に開示した任意のヒト抗体作製手法を用いて作製された抗体のものに対応するアミノ酸配列を有するものである。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。ヒト抗体は、当該技術分野で知られた種々の手法を用いて作製され得る。一実施形態において、ヒト抗体は、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから選択されるものである（Vaughanら *Nature Biotechnology* 1996, 14, 309-314; Sheetsら *PNAS (USA)*, 1998, 95, 6157-6162; HoogenboomおよびWinter, *J. Mol. Biol.*, 1991, 227, 381; Marksら, *J. Mol. Biol.*, 1991, 222, 581）。また、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物に、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が一部または完全に不活化されたマウスに導入することにより作製され得る。抗原刺激すると、あらゆる点で（例えば、遺伝子再編成、集合、および抗体レパートリー）、ヒトにおいて見られるものと非常によく似たヒト抗体の生成が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、ならびに以下の科学系刊行物：Marksら, *Bio/Technology* 10:779-783(1992); Lonbergら, *Nature* 368:856-859(1994); Morrison, *Nature* 365:812-13(1994); Fishwildら, *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996); LonbergおよびHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)に記載されている。あるいはまた、ヒト抗体は、標的抗原に対する抗体を産生するヒトBリンパ球の不活化によって調製され得る（かかるBリンパ球は、個体から収集したものであってもよく、インビトロで免疫化処理したものであってもよい）。例えば、Coleら, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77(1985); Boernerら, *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991); および米国特許第5,750,373号を参照のこと。

【0095】

用語「単鎖可変断片（scFv）」により、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域が短鎖（通常、セリン、グリシン）リンカーによって一緒に連結された融合体を意図する。単鎖抗体は、抗原結合能を有し、免疫グロブリンの軽鎖と重鎖の可変領域に相同または相似なアミノ酸配列を含む単鎖複合ポリペプチドであり得る（連結 $V_H - V_L$ または単鎖Fv（scFv））。 V_H と V_L がともに、天然モノクローナル抗体の配列をコピーしてもよく、該鎖の一方または両方が、米国特許第5,091,513号（その全内容は引用に

10

20

30

40

50

より本明細書に組み込まれる)に記載の型のCDR-FR構築物を含むものであってもよい。軽鎖および重鎖の可変領域に相似な個々のポリペプチドは、ポリペプチドリンカーによって結合されている。かかる単鎖抗体の作製方法は、特に、 V_H 鎖と V_L 鎖のポリペプチド構造をコードするDNAが既知である場合、例えば、米国特許第4,946,778号、同第5,091,513号および同第5,096,815号(各々の全内容は引用により本明細書に組み込まれる)に記載の方法に従って行なわれ得る。

【0096】

「抗体の抗原結合部分を有する分子」は、本明細書で用いる場合、任意のアイソタイプであって、任意の動物細胞株または微生物によって生成されるインタクトな免疫グロブリン分子だけでなく、その抗原結合性の反応性画分、例えば限定されないが、Fab断片、Fab'断片、 $F(ab')_2$ 断片、該分子の重鎖および/または軽鎖の可変部分、Fabミニ抗体(WO93/15210、米国特許出願第08/256,790号、WO96/13583、米国特許出願第08/817,788号、WO96/37621、米国特許出願第08/999,554号(その全内容は引用により本明細書に組み込まれる)参照)、二量体の二重特異性ミニ抗体(Mullerら, 1998参照)ならびにかかる反応性画分が組み込まれたキメラまたは単鎖抗体、ならびにかかる抗体反応性画分が物理的に挿入された任意の他の型の分子または細胞(キメラT細胞受容体もしくはかかる受容体を有するT細胞、またはかかる反応性画分を含む一部分によって治療用部分が送達されるように開発された分子など)も包含することを意図する。かかる分子は、任意の既知の手法、例えば限定されないが、酵素的切断、ペプチド合成または組換え手法によって得られ得る。

10

20

【0097】

本発明による抗体は、アゴニストVEGFもしくはエピトープを有する断片、類似体、または発現細胞を、動物(好ましくは非ヒト)に、常套的なプロトコルを用いて投与することにより得られ得る。モノクローナル抗体の調製には、連続的な細胞株培養によって生成される抗体を得る当該技術分野で知られた任意の手法が使用され得る。例としては、Kohler, G.およびMilstein, C, Nature 256:495-497(1975); Kozborら, Immunology Today 4:72(1983); Coleら, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPYの第77~96頁, Alan R. Liss, Inc. (1985)のものなどの種々の手法が挙げられる。

30

【0098】

抗体をインビボで生成させる慣用的な方法以外に、抗体は、ファージディスプレイ手法を用いてインビトロで生成させることができる。かかる組換え抗体の生成は、慣用的な抗体生成と比べるとずっと速く、膨大な数の抗原に対して生成させることができる。さらに、慣用的な方法を用いた場合、多くの抗原は非免疫原性であるか、または極めて毒性であることが示され、したがって、動物での抗体生成に使用することができない。さらに、組換え抗体の親和性の成熟(すなわち、親和性と特異性の増大)は非常に単純で比較的高速である。最終的に、特異的抗原に対して多数の異なる抗体が1回の選択手順で生成され得る。組換えモノクローナル抗体の生成には、すべて、異なる抗原認識部位を有する抗体の大量プールを得るためのディスプレイライブラリーに基づいた種々の方法が使用され得る。かかるライブラリーは、いくつかの様式で作製され得る。一例では、重鎖生殖細胞系遺伝子プールの合成CDR3領域をクローニングし、したがって大型の抗体レパートリーを作製すること(この中から種々の特異性を有する組換え抗体断片が選択され得る)により合成レパートリーが作製され得る。一例では、抗体ライブラリーの構築の出発材料としてヒトリンパ球プールが使用され得る。ヒトIgM抗体のナイーブレパートリーを構築することが可能であり、したがって、多様性の大きなヒトライブラリーを作出することが可能である。この方法は、種々の抗原に対して多数の抗体を選択するために成功裡に広く使用されている。バクテリオファージライブラリーの構築および組換え抗体の選択のためのプロトコルは、よく知られた参考文献である教科書Current Protocols

40

50

in Immunology, Colliganら(編), John Wiley & Sons, Inc. (1992 - 2000), 第17章、セクション17.1に示されている。

【0099】

非ヒト抗体は、当該技術分野で知られた任意の方法によってヒト化されたものであり得る。一例の方法では、非ヒト相補性決定領域(CDR)が、ヒト抗体またはコンセンサス抗体のフレームワーク配列内に挿入される。次いで、親和性または免疫原性をモジュレートするため、さらなる変更を抗体フレームワーク内に導入してもよい。

【0100】

例えば、Queenらの米国特許第5,585,089号には、ヒト化免疫グロブリンおよびその作製方法が開示されており、該ヒト化免疫グロブリンは、ドナー免疫グロブリン由来の相補性決定領域(CDR)と、ヒトアクセプター免疫グロブリンの重鎖と軽鎖に由来する重鎖と軽鎖の可変領域フレームワークとを含むものであり、前記ヒト化免疫グロブリンは、KabattおよびChothiaのCDRの外側のドナー免疫グロブリンフレームワーク由来のアミノ酸を含み、該ドナーアミノ酸は、アクセプター免疫グロブリンの重鎖または軽鎖のフレームワークの対応するアミノ酸で置き換えられている。

10

【0101】

また、Winterの米国特許第5,225,539号には、改変型抗体またはその抗原結合断片およびその作製方法が開示されており、該抗体または抗原結合断片の可変ドメインは、第1の免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域と、第2の免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインの相補性決定領域とを有し、前記第2の免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインは、前記第1の免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメインと、抗原結合特異性、抗原結合親和性、種、クラスまたはサブクラスが異なる。

20

【0102】

また、本発明の抗体と特異的免疫反応性である抗イディオタイプ抗体も包含される。

【0103】

単鎖抗体の作製のための手法(米国特許第4,946,778号)を、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する単鎖抗体の作製に適合させてもよい。また、トランスジェニックマウス、または他の生物体(他の哺乳動物)を使用し、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して免疫特異的なヒト化抗体を発現させてもよい。

30

【0104】

あるいはまた、ファージディスプレイ手法を使用し、本発明のポリペプチドに対して結合活性を有する抗体遺伝子を、抗VEGFを有することについてスクリーニングされたヒト由来リンパ球のPCR増幅したv-遺伝子のレパトリーまたはライブラリーのいずれかから選択してもよい(McCaffertyら,(1990),Nature 348,552-554;Marksら,(1992)Biotechnology 10,779-783)。また、このような抗体の親和性は、例えば、鎖シャッフリングによって改善され得る(Clacksonら,(1991)Nature 352:628)。

40

【0105】

上記の抗体は、該ポリペプチドを発現するクローンを単離または同定し、該ポリペプチドを、例えばアフィニティークロマトグラフィーによって精製するために使用され得る。

【0106】

本発明はまた、本発明による抗体分子の同類アミノ酸バリエーションを提供する。また、コードされたタンパク質の分子構造全体が保存されている本発明によるバリエーションも作製され得る。開示したタンパク質産物を含む個々のアミノ酸の性質を考慮すると、当業者には、いくつかの合理的な置換が認識されよう。アミノ酸の置換、すなわち「同類置換」は、例えば、関与する残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性および/または両親媒性の類似性に基づいて行われ得る。

【0107】

50

「障害」は、該抗体での処置の恩恵を被り得る任意の状態である。これには、慢性および急性の障害または疾患、例えば、哺乳動物に対して該当する障害の素因を与える病理学的状態が含まれる。本明細書における処置対象の障害の非限定的な例としては、良性および悪性の腫瘍；白血病およびリンパ性腫瘍；ニューロン、グリア、星状細胞、視床下部および他の腺、マクロファージ、上皮、間質および胞胚腔の障害；ならびに炎症性、血管新生性、免疫性の障害または過剰透過性状態が挙げられる。

【0108】

VEGFは、さまざまな病態の重要な構成要素である血管内皮細胞増殖および血管新生を促進させることがわかっており、したがって、本発明による抗体は、腫瘍増殖および転移、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化および動脈硬化症、新生内膜増殖、糖尿病性網膜症および糖尿病の他の合併症、トラコーマ、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性、トラコーマ 血管腫 (haemangioma)、移植角膜組織の免疫拒絶、目の外傷または感染と関連している角膜血管新生、乾癬、歯肉炎などの病状、ならびに血管新生および/または慢性炎症と関連していることがわかっている他の病状に対して使用され得る。用語「治療有効量」は、哺乳動物の疾患または障害が処置されるのに有効な薬物の量をいう。癌の場合、薬物の治療有効量により、癌細胞の数の減少；腫瘍サイズの減少；周辺器官内への癌細胞浸潤の抑止（すなわち、ある程度の遅滞、好ましくは停止）；腫瘍の転移の抑止（すなわち、ある程度の遅滞、好ましくは停止）；ある程度の腫瘍増殖の抑止；および/または障害と関連している1つ以上の症状のある程度の軽減がもたらされ得る。薬物は、既に存在している癌細胞の増殖が抑制および/または既に存在している癌細胞が死滅され得る限り、細胞増殖抑制性であってもよく、および/または細胞傷害性であってもよい。癌治療のため、インビボでの有効性が、例えば、生存期間、疾患進行までの期間 (TTP)、応答速度 (RR)、応答持続期間、および/または生活の質を評価することにより測定され得る。

【0109】

「処置」は、治療的処置、および予防的 (prophylactic/preventative) 手段の両方をいう。処置を必要とする対象としては、既に障害を有する対象、ならびに障害が予防されるべき対象が挙げられる。

【0110】

用語「癌」および「癌性」は、典型的には、無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的状態の言及または説明である。癌の例としては、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。かかる癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（例えば、胃腸の癌）、膵臓癌、グリア芽腫、頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮の癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌および種々の型の頭頸部癌、ならびにB-細胞リンパ腫（例えば、低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL)；小リンパ性 (SL) NHL；中悪性度/濾胞性 NHL；中悪性度びまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性 NHL；巨大腫瘍病変 NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症）；慢性リンパ性白血病 (CLL)；急性リンパ芽球性白血病 (ALL)；ヘアリーセル白血病；慢性骨髄芽球性白血病；および移植後リンパ増殖性障害 (PTLD)、ならびに母斑症と関連している異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍と関連しているものなど）、およびメグズ症候群が挙げられる。

【0111】

用語「抗新生物組成物」は、腫瘍の増殖もしくは機能を抑止もしくは抑制し得る、および/または腫瘍細胞の破壊をもたらし得る少なくとも1種類の活性治療用薬剤を含む、癌の処置に有用な組成物をいう。癌の処置のための抗新生物組成物に適した治療用薬剤としては、限定されないが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、サイトカイン（インターフェ

10

20

30

40

50

ロンなど)、およびサイトカイン、サイトカイン受容体または腫瘍細胞と関連している抗原を標的化するアンタゴニスト性薬剤が挙げられる。例えば、本発明に有用な治療用薬剤は、抗体(抗HER2抗体および抗CD20抗体など)、または小分子チロシンキナーゼインヒビター(VEGF受容体インヒビターおよびEGF受容体インヒビターなど)であり得る。好ましくは、治療用薬剤は化学療法剤である。

【0112】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化学物質化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤(チオテパおよびCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドなど);スルホン酸アルキル(ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなど);アジリジン(ベンゾドパ、カルボクオン、メツレドパ、およびウレドパなど);エチレンイミンおよびメチラメラミン(例えば、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド(triethylene thiophosphoramidate)およびトリメチロロメラミン;アセトゲニン(特に、プラタシンおよびプラタシノン);カンプトテシン(例えば、合成類似体トボテカン);プリオスタチン;カリスタチン;CC-1065(例えば、そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体);クリプトフィシン(特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8);ドラスタチン;デュオカルマイシン(例えば、合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1);エリユテロピン;パンクラチスタチン;サルコジクチン;スポンジスタチン;ナイトロジェンマスタード(クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン(novembichin)、フェネステリン(phenestherine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど);ニトロソ尿素(カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン(ranimnustine)など);抗生物質(エンジン抗生物質(例えば、カリチアマイシン、特に、カリチアマイシנגamma11)およびカリチアマイシンオメガール(omegal11)(例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 53:183-186(1994)参照)など);ダイネミシン(例えば、ダイネミシンA);ビスホスホネート(クロドロネートなど);エスペラミシン;ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連色素蛋白エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン(chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルピシン(例えば、モルホリノドキソルピシン、シアノモルホリノドキソルピシン、2-ピロリノ-ドキソルピシンおよびデオキシドキソルピシン)、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン(マイトマイシンCなど)、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン(potfiromycin)、プロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン;代謝拮抗薬(メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)など);葉酸類似体(デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなど);プリン類似体(フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど);ピリミジン類似体(アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなど);アンドロゲン(カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど);抗副腎剤(anti-adrenal)(アミノグルテチミド、ミトーテン、トリロスタンなど);葉酸補給薬(フロリン酸(frolinic acid)など);アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド;アミノレプリン酸;エニルウラシル;アムサクリン;ベストラ

10

20

30

40

50

ブシル；ピサントレン；エダトラキセート；デドファミン；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン（*elfornithine*）；酢酸エリブチニウム；エボチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド（マイタンシンおよびアンサマイトシンなど）；ミトグアゾン；ミトザントロン；モピダンモール（*mopidanmol*）；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット（*phenamet*）；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖複合体（*JHS Natural Products, Eugene, Oreg.*）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテシン（特に、T - 2 毒素、ベラクリン（*verracur*）A、ロリジン（*roridin*）A およびアングエイジン（*anguidine*））；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン（*gacytosine*）；アラビノシド（「*Ar* - C」）；シクロホスファミド；チオテバ；タキソイド、例えば、TAXOL（登録商標）パクリタキセル（*Bristol - Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.*）、ABRAXANETM Cremophor - free、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤（*American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Ill.*）、およびTAXOTERE（登録商標）ドキセタキセル（*Rhone - Poulenc Rorer, Antony, France*）；クロラムブシル；GEMZAR（登録商標）ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金配位錯体（シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンなど）；ビンブラスチン；白金；エトボシド（VP - 16）；イホスファミド；ミトザントロン；ピンクリスチン；NAVELBINE（登録商標）ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、CPT - 11）；トポイソメラーゼインヒビターRFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド（レチノイン酸など）；カペシタビン；ならびに上記のものの任意の薬学的に許容され得る塩、酸または誘導体が挙げられる。

【0113】

また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害する作用を行なう抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）、例えば、タモキシフェン（例えば、NOLVADEX（登録商標）タモキシフェン）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびFARESTONTレミフェン；副腎内でエストロゲン生成を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター（例えば、4（5） - イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）酢酸メゲストロール、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタン（*formestanie*）、ファドロゾール、RIVISOR（登録商標）ボロゾール、FEMARA（登録商標）レトロゾール、およびARIMIDEX（登録商標）アナストロゾールなど）；および抗アンドロゲン（フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなど）；ならびにトロキサシタビン（1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与しているシグナル伝達経路内の遺伝子の発現を阻害するもの（例えば、PKC - 、RalfおよびH - Rasなど）；リボザイム（VEGF発現インヒビター（例えば、ANGIOZYME（登録商標）リボザイム）およびHER2発現インヒビターなど）；ワクチン（遺伝子療法剤ワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、およびVAXID（登録商標）ワクチンなど）；PROLEUKIN（登録商標）rIL - 2；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX（登録商標）rmRHなど；ならびに上記のものの任意の薬学的に許容され得る塩、酸または誘導体が

含まれる。

【0114】

薬理学

本発明ではまた、本明細書において種々に記載の病状の処置または予防のための治療用組成物の製造のための、VEGFのアゴニストアイソフォームに特異的な少なくとも1種類の抗体を活性薬剤として含む、ヒトに対する医療的使用のための医薬用製剤が想定される。

【0115】

かかる医薬用製剤および医薬製剤では、活性薬剤は、好ましくは1種類以上の薬学的に許容され得る担体および任意選択で任意の他の治療用成分と一緒に使用される。担体(1種類または複数種)は、製剤のその他の成分と適合性であるが、レシピエントに対して過度に有害でないという意味において薬学的に許容され得るものでなければならない。活性薬剤は、上記のような所望の薬理学的効果が得られるのに有効な量で、および所望の日用量が達成されるのに適切な量で提供される。

【0116】

典型的には、抗体の抗原結合部分を含む、または別のポリペプチド(例えば、ペプチド模倣物)を含む本発明の分子を、治療用途の滅菌生理食塩水溶液中に懸濁させる。あるいはまた、医薬組成物は、活性成分(抗体の抗原結合部分を含む分子)の放出が制御されるように、または患者の系内での存在が長期化されるように製剤化され得る。数多くの好適な薬物送達系が知られており、例えば、埋入用薬物放出系、ヒドロゲル、ヒドロキシメチルセルロース、マイクロカプセル、リボソーム、マイクロエマルジョン、ミクロスフェアなどが挙げられる。制御放出調製物は、本発明による分子を複合体形成させる、または吸着するポリマーの使用によって調製され得る。例えば、生体適合性ポリマーとしては、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)のマトリックス、およびステアリン酸二量体とセバリン(sebaric)酸のポリ無水物コポリマーのマトリックスが挙げられる。かかるマトリックスからの本発明による分子、すなわち抗体または抗体断片の放出速度は、該分子の分子量、マトリックス内の該分子の量、および分散粒子のサイズに依存する。

【0117】

本発明の医薬組成物は、任意の適当な手段、例えば、経口、経表面、鼻腔内、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、関節内、病変内または非経口などによって投与され得る。通常、静脈内(i.v.)、関節内、経表面または非経口投与が好ましい。

【0118】

本発明による分子の治療有効量が、とりわけ、投与計画、投与される分子の単位用量(該分子が他の治療用薬剤と組み合わせて投与されようと、そうでなかろうと)、患者の免疫状態および健康、投与される分子の治療活性、ならびに処置医師の判断に依存することは当業者に自明であろう。本明細書で用いる場合、「治療有効量」は、処置対象の障害と関連する1つ以上の症状の長期間の軽減に必要とされる該分子の量をいう。

【0119】

本発明の分子の適切な投薬量は、投与経路、分子の型(ポリペプチド、ポリヌクレオチド、有機分子など)、患者の年齢、体重、性別、または体調に応じて異なり、最終的には医師によって決定されるべきであるが、経口投与の場合、日投薬量は、一般的には体重1kgあたり、約0.01mg~約500mg、好ましくは約0.01mg~約50mg、より好ましくは約0.1mg~約10mgであり得る。非経口投与の場合では、日投薬量は、一般的には体重1kgあたり、約0.001mg~約100mg、好ましくは約0.001mg~約10mg、より好ましくは約0.01mg~約1mgであり得る。日投薬量は、例えば、1日1~4回個々に投与する典型的なレジメンにて投与され得る。他の好ましい投与方法としては、約0.01mg~約100mg/kg体重の関節内投与が挙げられる。有効量の達成における種々の考慮事項は、例えば、Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 第8版, Pergamon Press, 1990; および Re

mington's Pharmaceutical Sciences, 第17版, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990に記載されている。

【0120】

併用化学療法剤の好適な投与レジメンは当該技術分野で知られており、例えば、Saltzら Proc ASCO 1999, 18, 233aおよびDouillardら, Lancet 2000, 355, 1041-7に記載されている。

【0121】

活性成分としての本発明の分子は、薬学的に許容され得、かつ活性成分と適合性であるよく知られた賦形剤中に溶解、分散または混合される。好適な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組合せである。他の好適な担体は当業者には充分わかる。また、所望により、該組成物には、少量の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などが含まれ得る。

10

【0122】

以下の実施例は、本発明の化合物および方法をどのようにして作製および使用するかを説明することを意図するものであり、なんら限定するものとして解釈されるべきでない。次に、本発明をその具体的な実施形態とともに説明するが、多くの変形例および異形例が当業者に自明であることは明白である。したがって、かかる変形例および異形例はすべて、添付の特許請求の範囲の精神および広義範囲に包含されるものとする。

20

【実施例】

【0123】

実施例

抗体を調製およびキャラクタライズするための手段は、当該技術分野でよく知られている。以下に、本発明による抗VEGF $\times\times\times$ 抗体の作製のための手法に関する例示を記載する。抗体の作製に使用されるVEGF抗原は、VEGFのアゴニスト形態に存在するがアンタゴニスト形態には存在しないVEGF $\times\times\times$ の任意のペプチド配列である。

【0124】

実施例1：ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、動物において、該当する抗原とアジュバントの反復皮下(sc)または腹腔内(ip)注射によって生成させたものである。これは、該当する抗原を、免疫処置対象の種において免疫原性であるタンパク質(例えば、スカシガイヘモシニアン(KLH)、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビター)に、二官能性薬剤または誘導体化剤(例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシニミドエステル(システイン残基によるコンジュゲーション)、N-ヒドロキスクシニミド(リシン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂、またはR¹N=C=NR(式中、RおよびR¹は異なるアルキル基である))を用いてコンジュゲートさせるのに有用であり得る。

30

【0125】

動物を抗原、免疫原性コンジュゲートまたは誘導体に対して、例えば、100 μ gまたは5 μ gの該タンパク質またはコンジュゲート(それぞれ、ウサギまたはマウスの場合)を3容量のフロイント完全アジュバントと合わせ、この溶液を多数の部位に皮内注射することにより免疫処置する。1ヶ月後、元の量の1/5~1/10の該ペプチドまたはコンジュゲートをフロイント完全アジュバントとともに多数の部位に皮下注射することによって動物に追加免疫刺激する。7~14日後、動物から採血し、血清を抗体力価についてアッセイする。動物には、力価が一定になるまで追加免疫刺激する。好ましくは、動物には、同じ抗原のものであるが、異なるタンパク質にコンジュゲートさせた、および/または異なる架橋試薬によってコンジュゲートで、追加免疫刺激する。コンジュゲートはまた、組換え細胞培養物においてタンパク質融合体として産生させたものであってもよい。また、ミョウバンなどの凝集剤も、免疫応答の増強に好適に使用される。

40

50

【0126】

実施例2：VEGF₁₆₅に対する特異的ポリクローナル抗体の作製

血管新生誘発性アイソフォームVEGF₁₆₅に結合して阻害するが、抗血管新生性形態VEGF₁₆₅bにはそうでないポリクローナル抗体を設計した。VEGF₁₆₅の7つのC末端アミノ酸残基を含むペプチドRCDKPRRをKLHに、アミノヘキサン酸スパーサーによってカップリングさせ、ウサギの免疫処置に使用した。ポリクローナル抗体を含有する血清を、免疫処置したウサギから収集した。

【0127】

免疫処置のためのペプチド-KLHコンジュゲートの調製

ペプチドのチオール基は、合成後に減少する傾向を有するため、KLHまたは樹脂いづれかへのカップリング前にペプチドのチオール基を確認した。

10

【0128】

1. 5 mMのエルマン試薬（ジチオ-ビス-2-ニトロ安息香酸）を0.1 MのNaPi (pH 7.2) 中に含む溶液を調製した。

【0129】

2. 約1 mgのペプチドを褐色チューブ内に量り入れた。

【0130】

3. 0.5 mlの試薬を添加した。溶液は明黄色になった。

【0131】

4. 混合物をバッファー中で1/50に希釈した。同じ濃度の試薬に対して、412 nmにおける吸光度を読み取った。

20

【0132】

5. チオール基に対するペプチドの見かけ分子量を、モル吸光係数14,000を用いて計算した。結果を、該ペプチドの予測分子量と比較した。数値は、3桁(factor of three)以内は一致するはずであるが、通常、見かけ分子量の方が大きい。チオール濃度が異常に低い場合、すなわち見かけ分子量が非常に大きい場合、ペプチドに何か不具合がある可能性がある。いずれにせよ、おそらくカップリングが充分ではない。チオール基は、次いで、ペプチドを過剰のDTTで還元し、P2カラムに通すと再生されるはずである。

【0133】

30

KLHとのペプチドのカップリング（2匹のウサギ用、5回注射/ウサギ）：

1. 100 mgのスカシガイヘモシニアン（KLH）を2 mlの水に溶解させ、超音波処理し、ボルテックスし、4 で約4時間、回転装置上に置いた。

【0134】

2. この溶液を、2リットルの0.1 Mリン酸Na (pH 7.8) に対して一晚透析した。これは、混入チオールまたはアミノ化合物（あれば）を除去するためである。

【0135】

3. この溶液を、微量遠心管内で最高速度で10分間スピンさせ、凝集物を除去した。

【0136】

4. -SHおよび-NH₂カップリングのために、KLH溶液を2つのアリコートに分けた。

40

【0137】

5. -NH₂カップリングでは、5 mgのペプチドを一方のアリコートに添加した後、グルタルアルデヒドを最終0.1%まで添加した。ペプチドは、固形物として、またはDMSO中100 mg/mlのストックから添加した。過剰量(glut)を添加した後、pH紙を用いてpHを確認し、NaOHを用いて7.8に調整した。この溶液を、静かに回転させながら4 で8~12時間インキュベートした。

【0138】

6. 微量のNaBH₄を添加して、過剰量を死滅させ（起泡(fizz up)する傾向があるため大型チューブ内で）、溶液を4 で8~12時間インキュベートした(wa

50

s i n c u b a t e) 。

【 0 1 3 9 】

7 . - S H カップリングでは、K L H の他方のアリコート室温まで昇温させた。D M S O 中 1 0 0 m g / m l のヨード酢酸 N - ヒドロキシスクシニミドエステルの容量の 1 / 9 を添加した（ヨードアセトアミド試薬は、光から保護すべきである）。I A A - N H S エステルもまた、S i g m a から購入され得る。

【 0 1 4 0 】

8 . 室温で 1 0 分後、K L H は少し濁り始める。これを、0 . 1 M のリン酸 N a (p H 7 . 8) で平衡化した P - 1 0 カラム内に負荷した（カラムは、試料の少なくとも 1 0 倍容量である）。K L H 含有画分を色によってプールした（いくぶん灰色がかった緑色であった）。5 m g のペプチドを、上記の工程 5 の場合のようにして添加した。この溶液を、静かに回転させながら 4 で少なくとも 8 時間インキュベートした。

【 0 1 4 1 】

9 . この 2 つの手順でカップリングさせたペプチドをプールし、0 . 1 5 M の N a C l で 5 m l に希釈し、激しく超音波処理して分解させた。免疫原を 1 m l のアリコートに分け（各アリコートは、2 匹のウサギの免疫処置のため）、凍結させた。

【 0 1 4 2 】

免疫処置は、以下のようにして行なった。

【 0 1 4 3 】

【 表 1 】

操作	時間
免疫前の試験用採血および第1回目の免疫処置	0
第2回目の免疫処置	7日
第1回目の試験用採血	14日
第3回目の免疫処置	21日
第2回目の試験用採血	28日
第4回目の免疫処置	35日
第3回目の試験用採血	42日
第5回目の免疫処置	63日
収集用採血	70日

プールした血清を、以下のようにして調製したペプチド - K L H カラムにおいてアフィニティ精製し、単一特異性ポリクローナル抗体調製物を作製した。

【 0 1 4 4 】

N H S 活性化樹脂とのペプチド - K L H のカップリング

1 . N H S 活性化 S e p h a r o s e (登録商標) 4 F a s t F l o w は、予備活性化アガアロースマトリックスである。N H S (N - ヒドロキシスクシニミド) カップリングにより、第 1 級アミノ基を含むリガンドとの化学的に安定なアミド結合が形成される。N H S 活性化 S e p h a r o s e (登録商標) 4 F a s t F l o w によりスパーサーアームが提供され、したがって、低分子タンパク質およびペプチドリガンドの固定化に特に好適である。高い安定性とスパーサーアームが、樹脂の高い流動性と安定性という特性と組み合わせられることにより、医薬としての使用に魅力的となる。

【 0 1 4 5 】

2 . カップリングさせたゲルは、特定の物質（例えば、K L H - カップリングペプチド抗原）を単離することができる親和性吸着体を調製するために使用され得（c a n i s ）、単一の工程で非常に高純度が得られる。

【0146】

3. カップリング反応は高速であり、自発的NH₂S活性化Sephacrose 4 Fast Flowは懸濁液として供給される。活性化マトリックスとのリガンドのカップリングは、ゲルの洗浄、その後カップリングを伴う。

【0147】

4. カップリングに使用されるバッファーは、カップリングバッファー：0.2 MのNaHCO₃、0.5 MのNaCl (pH 8.3)、酸性化溶液：1 mMのHCl (低温に維持)、ブロックバッファー：0.5 Mのエタノールアミン、0.5 MのNaCl (pH 8.3)、洗浄バッファー：0.1 Mの酢酸塩、0.5 MのNaCl (pH 4.0)、保存バッファー：20 %エタノール / PBS、平衡バッファー：PBSである。

10

【0148】

アフィニティ精製した血清は、最終的に、Vivaspin装置を用いて限外濾過した。

【0149】

抗体の特異性を、抗体精製画分とVEGF₁₆₅およびVEGF₁₆₅bとのインキュベーションにより、ウエスタンブロット解析によって測定した。

【0150】

ウエスタンブロットプロトコル：

10 %脱脂粉乳 / PBS / 0.05 % tween 中で一晩ブロッキング；

一次抗体 - 2.5 %ブロック溶液中で2時間、1 : 50に希釈したウサギ全血清；

20

二次抗体 - 2.5 %ブロック溶液中で1 : 8000に希釈し、x線に20秒間曝露したヤギ抗ウサギ

図2に示されるように、アフィニティ精製したポリクローナル抗体画分（エキソン8aのRCDKPRRのエピトープに対して生成）は、VEGF₁₆₅を検出するがVEGF₁₆₅bは検出せず（左パネル）、一方、VEGF₁₆₅bに特異的な抗体（エキソン8bのエピトープSLTRKDに対して生成）は、VEGF₁₆₅bを認識するがVEGF₁₆₅は認識しない（右パネル）。

【0151】

この精製抗体は、

ELISA (Perrinら, *diabetologia* 2005, 48, 2422 ; Vareyら, *British J. Cancer* 2008, 1 ;

30

遊走アッセイ (Batesら, *Cancer Research* 2002, 62, 4123に記載) ;

眼血管新生 (Konopatskayaら, *Molecular Vision* 2006, 12, 626に記載) ;

インビボ腫瘍試験 (Rennelら, *Eur. J. Cancer* 2008, 44, 1883に記載) ;

免疫組織化学検査 (Pritchard-Jonesら, *Br. J. Cancer* 2007, 97, 223に記載)

によってさらに評価される。

40

【0152】

実施例3：VEGF₁₆₅に対するポリクローナル抗体は内皮細胞遊走を阻害する

遊走の阻害を、Batesら, *Cancer Research* 2002, 62, 4123 - 4131に記載のようにして試験した。アッセイは、コラーゲンコートポリカーボネート製のフィルター挿入体 (8 m孔径 ; Millipore) を含む変形型24ウェルBoydenチャンバにて行なった。フィルターを、0.5 ml / ウェルのVEGFアイソフォームを4 ~ 80 ng / mlの精製抗体画分とともに、またはなしで入れた24ウェルプレート内に配置した。ヒト臍静脈内皮細胞 (HUEC) を無血清培地中に懸濁させ、25,000個の細胞を各ウェルの上側のチャンバに添加した。プレートを6時間インキュベートして遊走させ、培地を除去し、両方のチャンバをPBSで2回洗浄した。次

50

いで、0.2 mg/ml のチアゾリルブルー (MTT) を両方のチャンバの培地に添加し、37 で3時間インキュベートした。培地を除去し、チャンバをPBSで2回洗浄した。上側のチャンバ内の非遊走細胞の結晶 (青色に染色) を綿棒で取り出し、これを1 ml のDMSOに入れ、MTT生成物を溶解させた。また、遊走細胞結晶 (該挿入体の裏面上) もMTTに溶解させた。試料を一晩放置し、生成物の完全な溶解に可能にさせた。分光測光器を使用し、570 nmの波長で可溶性MTTの吸光度を測定した。次いで、遊走割合を、下側のウェルの強度から両ウェルの全強度に対する割合として計算した。

【0153】

図3に示されるように、ポリクローナル抗体の用量の増大によって、VEGF₁₆₅ 媒介性HUVEC遊走の用量依存的阻害がもたらされる。

【0154】

また、エキソン8aに対する抗体のHUVEC遊走に対する効果を、VEGF₁₆₅ bまたはLucentisTM (AVASTIN (登録商標) のFab抗体断片) と組み合わせることで試験した。図4A、4Bおよび5に示されるように、VEGF₁₆₅ bとLucentisTM は、ともに、エキソン8aに対するポリクローナル抗体の阻害効果を増大させる。さらに、VEGF₁₆₅ bと組み合わせられたエキソン8aに対するポリクローナル抗体の阻害効果は、VEGF₁₆₅ bと組み合わせられたAVASTIN (登録商標) / Lucentisの阻害効果よりも大きかった。

【0155】

実施例4: モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法 (最初にKohlerら, Nature, 1975, 256: 495によって記載) を用いて作製され得るか、または組換えDNA法 (米国特許第4, 816, 567号) によって作製され得る。

【0156】

ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物 (ハムスターまたはマカクザルなど) を、本明細書において上記のようにして免疫処置し、免疫処置に用いた抗原に特異的に結合する抗体を産生する、または産生能を有するリンパ球を誘発させる。あるいはまた、リンパ球は、インビトロでの免疫処置によるものであってもよい。次いで、リンパ球を骨髓腫細胞と、適当な融合剤 (ポリエチレングリコールなど) を用いて融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

【0157】

このようにして作製されたハイブリドーマ細胞を、適当な培養培地 (好ましくは、融合していない親骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1種類以上の物質を含むもの) に播種し、培養する。好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択した抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を補助し、培地 (HAT培地など) に感受性であるものである。このようなもののうち、好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫細胞株、例えば、MOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USAから入手可能) ならびにSP-2またはX63-Ag8-653細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USAから入手可能) に由来するものなどである。ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の作製に関して報告されている (Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0158】

ハイブリドーマ細胞を培養する培養培地は、抗原に対するモノクローナル抗体について

10

20

30

40

50

アッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性が、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ（ラジオイムノアッセイ（RIA）もしくは酵素免疫測定法（ELISA）など）によって測定される。

【0159】

所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されたら、該クローンを限界希釈手順によってサブクロニングし、標準的な方法によって培養してもよい（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)）。この目的に好適な培養培地としては、例えば、D-MEM またはRPMI - 1640培地が挙げられる。また、ハイブリドーマ細胞を、動物において腹水中で腫瘍としてインビボ培養してもよい。

10

【0160】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、培養培地、腹水または血清から、慣用的な免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインA-Sepharose、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィーなど）によって適切に分離される。

【0161】

モノクローナル抗体をコードするDNAは容易に単離され、慣用的な手順を用いて（例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましい供給源として有用である。単離されたら、DNAは発現ベクター内に配置され得、次いで、該ベクターで、トランスフェクトしない場合には免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞（大腸菌細胞、シミアンCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞など）をトランスフェクトし、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。抗体の組換え作製を以下に、より詳細に記載する。

20

【0162】

さらなる一実施形態において、抗体または抗体断片は、McCaffertyら, Nature, 348: 552 - 554 (1990)に記載の手法を用いて作製した抗体ファージライブラリーから単離したものであってもよい。Clacksonら, Nature, 552: 624 - 628 (1991)およびMarksら, J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991)には、それぞれ、ファージライブラリーを用いたマウス抗体およびヒト抗体の単離が記載されている。その後の刊行物では、鎖シャッフリングによる高親和性（nM範囲）ヒト抗体の作製（Marksら, Bio/Technology, 70: 779 - 783 (1992)）、ならびに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてとしてコンビナトリアル感染およびインビボ組換え（Waterhouseら, Nuc. Acids. Res., 27: 2265 - 2266 (1993)）が報告されている。したがって、これらの手法は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ手法に対する実行可能な代替法である。

30

40

【0163】

また、DNAは、例えば、相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列で置換すること（米国特許第4,816,567号；Morrissonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)）、または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部もしくは一部を共有結合させることにより修飾され得る。

【0164】

典型的には、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインの代わりに使用されるか、または抗体の抗原結合部位の1つの可変ドメインの代わりに使用され、抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位と、異なる抗原に対して特異性を有する別

50

の抗原結合部位を含む二価のキメラ抗体が創製される。

【0165】

実施例5：VEGF_{xxx}アイソフォームに対する特異的モノクローナル抗体の作製
VEGF₁₆₅の6アミノ酸および9アミノ酸C末端配列(CDKPRR配列番号：1、TCRC DKPRR配列番号：5)の合成ペプチド断片を、スカシガイヘモシアニン(KLH)(担体分子としての機能を果たす)にカップリングさせ(Department of Biochemistry, University of Bristol, UK)、次いで、6～8週齢の雌Balb/cマウスの免疫処置に使用した。

【0166】

プロトコルの一例に従い、動物に、100μgのペプチド-KLHコンジュゲートをフロイント完全アジュバント(FCA)とともに第1、21および42日に皮下注射し、第63、64および65日に個々にi.p注射によって追加免疫刺激した。翌日、マウスを人道的に致死させ、脾臓を収集した。

【0167】

さらなる免疫処置プロトコルを以下のようにして行なった：10匹の雌Balb/Cマウス(6～8週齢)を注文し、免疫処置の時点までに1週間、動物収容施設内で馴化させた。KLHにコンジュゲートさせた上記の2種類のVEGF₁₆₅ペプチド(TCRC DKPRR配列番号：5)およびCDKPRR配列番号：1)を使用した。

【0168】

最初の注射(時間0)-10匹のマウス(各ペプチドについて5匹)に、100μl(100μg)のペプチド-KHLコンジュゲートを完全フロイントアジュバント(CFA)とともに皮下注射した。

【0169】

2回目の注射(約3週間後)-マウスを、100μl(100μg)のペプチド-KHLコンジュゲートで不完全フロイントアジュバント(IFA)とともに腹腔内(IP)にて免疫処置した。

【0170】

3回目の注射(約3週間後)-マウスを、100μl(100μg)のペプチド-KHLコンジュゲート(PBS中)でIPにて免疫処置した。

【0171】

4回目の注射(1日後)-マウスを、100μl(100μg)のペプチド-KHLコンジュゲート(PBS中)でIPにて免疫処置した。

【0172】

最後の注射(1日後)-マウスを、100μl(100μg)のペプチド-KHLコンジュゲート(PBS中)でIPにて免疫処置した。

【0173】

収集(最後の注射の1日後)-免疫処置したマウスを致死させ、融合のため、Southmead Hospital, National Blood Service(NBS)に移した。

【0174】

脾細胞をNSOマウス骨髓腫細胞株と、ポリエチレングリコールを用いて融合させた。融合細胞を96ウェルプレート内で2週間培養した。ELISAスクリーニングによって決定された陽性ウェルの細胞を、96ウェルプレート内で連続希釈し、10%DMEMおよびハイブリドーマクローニング増強因子中で培養した。各プレートで100%陽性が3回連続して得られるまで、同じ手順を繰り返した。スクリーニングは、ヤギ抗ヒトVEGF抗体(PBS中0.8μg/ml、R&D)をコートしたImmulon II HB Flat wellの96ウェルプレート(Thermo Life Sciences Ltd.)において行なった。PBS/Tで洗浄後、100μlの2ng/ml VEGF₁₆₅または組換えVEGF₁₆₅b(R&D systems)をウェルに添加し、振とうしながら37℃で15分間インキュベートした。洗浄後、ハイブリドーマ細胞で

10

20

30

40

50

の条件培地 100 μ l を添加し、振とうしながら 37 で 15 分間インキュベートした。洗浄後、100 μ l の HRP - コンジュゲートヤギ抗マウス免疫グロブリン (1% BSA / PBS 中 1 : 1000, D A C O) を添加し、振とうしながら 37 で 15 分間インキュベートした。最終洗浄後、O - フェニレンジアミン二塩酸塩 (OPD) 基質 (Sigma Chemical Co., USA) を添加し、492 nm における吸光度を、プレート読取装置を用いて測定した。VEGF₁₆₅ について陽性であるが VEGF_{165b} については陰性である試料を選択した (selected for)。モノクローナル抗体を精製および濃縮するため、選択されたハイブリドーマ細胞クローンを、10% ウシ IgG 枯渇 FCS (Hyclone, USA) を 100 単位のペニシリン、100 μ g のストレプトマイシンおよび 2 mM の L - グルタミンとともに含有する DMEM (Sigma Chemical Co., USA) 中で培養した。モノクローナル抗体を、プロテイン - G Sepharose 4 Fast Flow カラム (Amersham Biosciences, USA) にて精製した。抗体を、ビバスピン 20 (Vivascience AG, Hannover, Germany) を用いて濃縮し、最後に PBS に溶解させた。

10

【0175】

ELISA アッセイを使用し、以下のプロトコルを用いて各モノクローナル抗体クローンを試験した。

【0176】

抗原コート - 6 アミノ酸ペプチドおよび 9 アミノ酸ペプチドの両方に対して：

20

1. VEGF₁₆₅ 遊離ペプチド：10 mg / ml (ストック濃度)、作業濃度 10 μ g / ml。

【0177】

2. VEGF₁₆₅ - BSA ペプチド：5 mg / ml (ストック濃度)、作業濃度 10 μ g / ml。

【0178】

3. VEGF_{165b} (陰性対照)：BSA + ペプチド、ストック濃度、1 mg / ml；作業濃度、炭酸塩コート溶液中 1 μ g / ml (1 : 1, 000)

4. VEGF_{165b} 6 アミノ酸 - BSA、ストック濃度、2.5 mg / ml；作業濃度、1 μ g / ml (1 : 2, 500 希釈)

30

5. ペプチド - myc (骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ)：(陰性対照) myc - BSA、ストック濃度、1.4 mg / ml；作業濃度、炭酸塩コート溶液中 1 μ g / ml (1 : 1, 400)。

【0179】

75 μ l / ウェルを添加し、振とうしながら 37 で 15 分間または 1 時間放置する。

【0180】

ウェルを PBS / Tween で 3 回洗浄する。

【0181】

細胞上清の添加 (おそらくモノクローナル抗体を含む試料)：

75 μ l (24 ウェルプレート由来のもの)、または 75 μ l の希釈試料 (96 ウェルプレート由来のもの) を PBS / Tween 内で添加する (ペプチドは清浄であり、BSA でのブロックは必要でない)。

40

【0182】

ウェルを振とうしながら 37 で 15 分間インキュベートする。

【0183】

二次抗体の添加：

HRP - コンジュゲートヤギ抗マウス免疫グロブリン (Sigma A 0412) の 1 : 2, 500 希釈物を、低バックグラウンドでのペプチド検出のために使用した)。振とうしながら 37 で 15 分間のインキュベーション。

【0184】

50

PBS / Tween で 3 回の洗浄

基質の添加：

クエン酸リン酸バッファー (pH 5 . 0) を室温まで昇温させた。

【 0 1 8 5 】

このクエン酸リン酸バッファー 3 0 m l に、3 0 m g の O P D (S i g m a , N o . - 8 4 1 2) を溶解させ、1 5 μ l の H_2O_2 を使用直前に添加し、室温で 1 5 分間インキュベーションした。

【 0 1 8 6 】

停止：

停止溶液：1 0 0 μ l / ウェルの 1 M の H C l (4 0 m l の濃 H C l を、4 2 4 m l の dH_2O を入れた瓶に添加) を添加した。 10

解析：

4 9 2 n m における吸光度を、プレート読取装置を用いて測定した。

【 0 1 8 7 】

実施例 6：アゴニスト V E G F に特異的なモノクローナル抗体の効力を測定するための遊走アッセイ

V E G F の血管新生誘発性形態に対するモノクローナル抗体の効力を測定するため、E C V 3 0 4 内皮細胞を用いた遊走阻害アッセイを使用した。このアッセイは、抗体が、V E G F _{1 6 5} および / または V E G F _{1 6 5} b による刺激に応答した E C V 3 0 4 内皮細胞の遊走を阻害する能力を測定するものであり、以下のようにして行なわれる。 20

【 0 1 8 8 】

E C V 3 0 4 内皮細胞を無血清培地中で 1 5 ~ 1 6 時間飢餓状態にする。

【 0 1 8 9 】

8 μ m の挿入体を 2 0 0 μ l の結合因子でコートし、4 で一晩または 3 7 で 1 時間超放置する。溶液を除去し、挿入体を細胞培養フード内に放置して風乾させる。

【 0 1 9 0 】

細胞を PBS 中で 2 回洗浄し、5 分間トリプシン処理する (フラスコを注意深く掌ではなくことにより、すべての細胞が剥離したことを確認する) 。

【 0 1 9 1 】

細胞をスピンドウンし、既知の小容量の培地 + 0 . 1 % F C S 中に懸濁させる。 30

【 0 1 9 2 】

細胞を計数し、5 0 0 μ l 中 1 0 0 , 0 0 0 細胞 (2 0 0 , 0 0 0 細胞 / m l) に希釈する。

【 0 1 9 3 】

化学誘引物質溶液 (5 0 0 μ l / ウェル) を調製する。

条件 (1 n M は 4 0 n g / m l V E G F _{1 6 5} である)：

- 1 . 陽性対照 (5 % F C S 、すなわち通常の完全培地)
- 2 . 陰性対照 (0 . 1 % F C S 、すなわち低血清)
- 3 . 0 n M の抗体 + 1 n M の V E G F _{1 6 5}
- 4 . 1 0 n M の抗体 + 1 n M の V E G F _{1 6 5}
- 5 . 2 0 n M の抗体 + 1 n M の V E G F _{1 6 5}
- 6 . 4 0 n M の抗体 + 1 n M の V E G F _{1 6 5}
- 7 . 6 0 n M の抗体 + 1 n M の V E G F _{1 6 5}
- 8 . 8 0 n M の抗体 + 1 n M の V E G F _{1 6 5}

溶液は、滅菌されたもの、または滅菌濾過したものであるのがよい。

【 0 1 9 4 】

2 4 ウェルプレート (懸濁用プレート 浮遊培養用の Greiner 、 6 6 2 1 0 2 であって組織用プラスチック製ではない) を使用し、5 0 0 μ l の化学誘引物質溶液 (結合因子 Cascade biologics , s - 0 0 6 - 1 0 0) をウェルの底面に添加する。 50

【0195】

挿入体 (Milli cell - PCF、PI8PO1250) を風乾させ、500 μ l の細胞懸濁液をウェル内に添加する。挿入体の下方で気泡を発生させずに、注意深く挿入体をウェル内に入れる。

【0196】

プレートをインキュベータ内で6時間インキュベートし、遊走を行なわせる。

【0197】

両方の層から培地を除去し、上面と底面をPBSで2回洗浄する。

【0198】

300 μ l の4%パラホルムアルデヒド/PBSを各ウェルに添加し、ウェルを15分間放置する。 10

【0199】

培地を吸引除去し、ウェルをPBSで3回洗浄する。

【0200】

200 μ l のHoechst染料 (5 μ g/ml、ストックをPBS/T中で1:20に希釈) を各ウェルに添加し、ウェルを暗所に30~45分間放置する。

【0201】

ウェルを0.5% PBS/tritonで3回およびPBSで2回洗浄し、非遊走細胞を綿棒で除去する。

【0202】

メスの刃を用いて膜を注意深く切り出し、この膜を、Vectashield liquid mount (Vectashield Vector, H-1000) を用いてスライド上に載せ、マニキュア液で密封する。 20

【0203】

遊走細胞を、40倍の倍率を使用し、10個のランダムな視野において (少なくとも2つの視野は、挿入体の縁から離れている) 計数し、挿入体の縁周囲の非遊走細胞および/または非除去細胞の蓄積 (あれば) を明らかにする。

【0204】

基礎/対照では、15~30細胞/視野を、VEGF₁₆₅では、40 ng/ml 80~150 (対照と比べて4~5倍) を計数する。VEGF₁₆₅b 40 ng/ml それ自体では、約1.5~2倍の増大が得られ、VEGF₁₆₅+₁₆₅bでは、遊走が約3倍に低減される。 30

【0205】

ミリポア挿入体では、遊走%の計算は:

$$[(\text{細胞計数} / \text{挿入体} / 0.0028637) / 1 \times 10^5] \times 100$$

0.0028637 = Falconの5mm直径のMillipore挿入体の場合での視野によって占有される挿入体の面積であり、この値は0.00477である。

【0206】

図6に示されるように、VEGF₁₆₅のエキソン8aに対して生成させたモノクローナル抗体は、遊走を用量依存的に阻害する。図7は、アゴニストVEGFアイソフォーム (is form) VEGF₁₆₅に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を試験した内皮細胞遊走アッセイの結果を示す。 40

【0207】

実施例7: 抗VEGFxxxの安全性薬理学的プロファイルの特性評価

血管新生誘発性VEGFアイソフォーム (VEGFxxx) に対する抗体を単独およびVEGF₁₆₅bとの組み合わせで試験する。動物およびヒトにおけるVEGFxxx特異的抗体の安全性プロファイルは、VEGFスカベンジャーおよびVEGFR遮断薬で見られるものよりも良好であると予測される。

【0208】

VEGFは、多面的因子として作用することがわかっている。これは、血管新生を調節 50

するだけでなく、体内の多くの細胞および組織（ニューロン、網膜色素細胞、腎臓内の有足突起または正常および成熟血管など）に対して生存因子としての機能も果たす。VEGFが完全に欠損すると（例えば、VEGFの血管新生誘発性形態と抗血管新生性形態を識別しない抗体およびVEGFR遮断薬によってもたらされる）により、患者は、網膜損傷、出血および蛋白尿および腎臓障害、ならびにさらなる重篤な有害事象に曝露され得る。

【0209】

VEGFの血管新生誘発性形態に対して特異的に標的化される抗体は、VEGFの血管新生誘発性形態を排除し、抗血管新生性形態に対して寛容であるため、より安全でより有効であることが予測される。これにより、VEGFの抗血管新生性形態がVEGFR1とVEGFR2に結合して抗血管新生と細胞保護をもたらすことが可能になる。血管新生誘発性VEGFアイソフォームに特異的な抗体の安全性プロファイルは、いくつかのアッセイにて特性評価される。

10

【0210】

心血管安全性プロファイル

VEGFの血管新生誘発性形態に対する抗体の心血管安全性プロファイルは、抗VEGFxxxまたはVEGF165bまたはVEGF165またはVEGFRチロシンキナーゼインヒビター（TKI）で処置した動物の血圧の測定によって特性評価する。現在利用可能な治療アプローチでは血圧が上昇するが、血管新生誘発性VEGFアイソフォームに特異的な抗体は、動物およびヒトにおいて、より良好な安全性心血管プロファイルを有すると予測される。

20

【0211】

VEGFインヒビターの重篤な副作用としては、有意な蛋白尿が挙げられる。VEGF₁₆₅bは蛋白尿を誘発しないことが示されており、したがって、VEGFの血管新生誘発性形態に特異的な抗体は、上記の薬物で見られるものよりも良好な腎臓安全性プロファイルを有する。VEGFの血管新生誘発性アイソフォームに特異的な抗体の効果は、糸球体内皮細胞透過性アッセイによってインビトロおよびインビボで確認される。VEGFの血管新生誘発性形態に特異的な抗体は、糸球体内皮細胞内のVEGF₁₆₅によって誘発される透過性を阻害する。

【0212】

血圧の測定は、抗VEGF抗体およびVEGFR TKIとの比較において行なわれる。現在利用可能な治療剤では血圧が上昇するが、血管新生誘発性VEGFアイソフォームに特異的な抗体は、より良好な安全性心血管プロファイルを有すると予測される。

30

【0213】

内皮細胞に関する細胞傷害性アッセイ

VEGFインヒビターは、毛細血管の退縮および内皮細胞死を引き起こすことが示された。VEGF₁₆₅bは、培養状態の内皮細胞に対して細胞傷害性ではなく、対照的に細胞保護的であるが、VEGF₁₆₅b抗体は細胞傷害性を増大させる。細胞の生存に対するVEGFの血管新生誘発性形態に特異的な抗体の効果は、VEGF₁₆₅b、VEGF₁₆₅、VEGFスカベンジャーおよびVEGFR遮断薬の比較によって特性評価する。

【0214】

網膜色素上皮細胞に関する細胞傷害性アッセイ

細胞保護因子であるVEGF₁₆₅bは、潜在的な網膜用眼科治療薬である。VEGF₁₆₅bが網膜色素上皮細胞に対して毒性であるか保護的であるかを調べるため、RPE細胞を血清飢餓状態にし、VEGF₁₆₅bまたはVEGF₁₆₅bに対する抗体で処理し、細胞細胞傷害性をLDHアッセイによって測定した。結果は、VEGF₁₆₅bがRPE細胞の内在性生存因子であることを明白に示す。VEGFの血管新生誘発性形態に特異的な抗体は、血清枯渇によって誘発される網膜色素上皮細胞死の阻害に関して試験される。

40

【0215】

インビトロでのニューロンに関する細胞傷害性アッセイ

50

VEGF₁₆₅bは、他の細胞型に対しても細胞保護的である。新生仔ラット由来の海馬ニューロンは、グルタミン酸化合物による興奮毒性中、VEGF₁₆₅によって細胞死から救済されることが以前に示された。CA1またはCA3ニューロンをVEGF₁₆₅bで処理すると、グルタミン酸化合物誘発性細胞傷害性が低減された。VEGF₁₆₅bに再生効果があるかどうかを調べるため、成体ラット由来の後根神経節を、培養状態で分離させた後にVEGF₁₆₅bに供し、軸索長を測定した。VEGF₁₆₅b処理により軸索長が長くなることが示され、これは、VEGF₁₆₅bが、インビトロで細胞保護特性およびニューロン再生特性を有することを示す。

【0216】

血管新生誘発性VEGFアイソフォームに対する抗体での処置の細胞保護効果は、VEGF₁₆₅bでの同時処置ありまたはなしで、適切なモデルにおいて、細胞保護に対する効果を特性評価するためにVEGFスカベンジャーおよびVEGFR-TKIとの比較において試験される。

【0217】

実施例8：ヒト化抗体およびヒト抗体

ヒト化抗体は、典型的には、非ヒトCDRがグラフティングされたヒトフレームワークを有する。したがって、ヒト化抗体には、非ヒト供給源由来の1つ以上のアミノ酸配列が内部に導入されている。このような非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「輸入(import)」残基と称され、これは、典型的には「輸入」可変ドメインから採用される。ヒト化は、本質的に、Winterおよび共同研究者の方法(Jonesら, Nature, 321:522-525(1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327(1988); Verhoevenら, Science, 239:1534-1536(1988))に従い、齧歯類のCDRまたはCDR配列を、対応するヒト抗体の配列の代わりに使用することにより行なわれ得る。したがって、かかる「ヒト化」抗体は、実質的にあまりインタクトでないヒト可変ドメインが、対応する非ヒト種由来配列で置換されたキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際、ヒト化抗体は、典型的には、一部のCDR残基および場合によっては一部のFR残基が、齧歯類抗体の相似部位由来の残基で置換されたヒト抗体である。

【0218】

ヒト化抗体の作製に使用されるヒト可変ドメイン(軽鎖および重鎖ともに)の選択は、抗原性を低減させるために非常に重要である。「ベストフィット」法によれば、齧歯類抗体の可変ドメイン配列が、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングされる。次いで、齧歯類の配列に最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として採用される(Simsら, J. Immunol., 151:2296(1993); Chothiaら, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。別の方法では、軽鎖または重鎖の特定のサブグループのすべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワークが使用される。いくつかの異なるヒト化抗体に対して同じフレームワークを使用してもよい(Carterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285(1992); Prestaら, J. Immunol., 151:2623(1993))。

【0219】

抗体が、抗原に対する高親和性および他の好都合な生物学的特性を保持するようにヒト化することは、さらに重要である。この目的を達成するため、好ましい方法によれば、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の3次元モデルを使用し、親配列および種々の概念的ヒト化産物の解析プロセスによって作製される。3次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者は熟知している。選択した候補免疫グロブリン配列の推定3次元コンホメーション構造を図示および表示するコンピュータプログラムも利用可能である。このような表示を検討することにより、候補免疫グロブリン配列の機能発揮における該残基の考えられ得る役割の解析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の解析が可能となる。このようにして、FR残基がレシピエント配

10

20

30

40

50

列および輸入配列から選択されて結合され得、その結果、所望の抗体特性（標的抗原（1つまたは複数）に対する親和性の増大など）が得られる。一般に、CDR残基は、抗原結合に対する影響に、直接かつ大部分において関与している。

【0220】

あるいはまた、現在、免疫処置すると、内因性免疫グロブリン産生なしで、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作製することが可能である。例えば、キメラの生殖細胞系変異マウスにおける抗体重鎖連結領域（JH）遺伝子のホモ接合型欠失により、内因性抗体生成の完全な阻害をもたらされることが報告されている。かかる生殖細胞系変異マウスにヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイを導入すると、抗原刺激によってヒト抗体の生成をもたらされる。例えば、Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovitsら, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemannら, Year in Immuno., 7:33 (1993); および Duchosalら Nature 355:258 (1992) を参照のこと。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーに由来するものであってもよい (Hoogenboomら, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughanら Nature Biotech 14:309 (1996))。

【0221】

実施例9：抗体断片

抗体断片の作製のための種々の手法が開発されている。従来より、このような断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化によって誘導されるものであった（例えば、Morimotoら, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) および Brennanら, Science, 229:81 (1985) 参照）。しかしながら、このような断片は、現在、組換え宿主細胞によって直接産生させることができる。例えば、抗体断片は、上記の抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいはまた、Fab'-SH断片を大腸菌から直接回収し、化学的にカップリングさせてF(ab')₂断片を形成することができる (Carterら, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチによれば、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養物から直接に単離することができる。抗体断片の作製のための他の手法は当業者に自明であろう。他の実施形態において、一般的に好まれる抗体は単鎖Fv断片 (scFv) である。

【0222】

実施例10：腎臓安全性プロフィール

本発明は、VEGFの血管新生誘発性のアイソフォームに特異的であるが、VEGFの抗血管新生性形態に対しては寛容である抗体を提供する。有意な蛋白尿は、VEGFスカベンジャーおよびVEGFR遮断薬での処置と関連している。

【0223】

種々の報告によれば、30%を超えるAVASTIN処置患者は蛋白尿に苦しんでおり、これは、前臨床試験およびヒト臨床試験でも観察された。Kabbinnavarら J Clin Oncol 2003; 21:60-65; NEJMの2004 350; 2335-2342; Sugimoto H et al J Biol Chem 2003; 278(15):12605。この現象は、おそらく、同様に内皮生存因子でもあるVEGFが、有足突起のオートクライン生存因子であるためである。抗VEGF抗体は細胞死を増大させるが、これは、VEGF165置換により低減される。ここに、VEGF165bは、血清飢餓状態のヒト有足突起の生存因子であることがわかったことを開示する (図8に図示 (as shown is))。

【0224】

本明細書に開示のように、ここに、VEGF₁₆₅bは蛋白尿を誘発しないこと、およ

び VEGF の血管新生誘発性形態に特異的な抗体は、抗血管新生性形態に対して寛容であり得るため、既知の薬物で見られるものよりも良好な腎臓安全性プロファイルを有することは好都合であることを示す。

【0225】

腎機能は、実験動物から採取した尿において測定した尿中クレアチニン / タンパク質比によって特性評価した。試験対象動物には、100 μ g の VEGF₁₆₅ b の全身投与によって処置したヒト腫瘍を有するマウス；および糸球体の有足突起において VEGF₁₆₅ b を過剰発現するトランスジェニックマウス（図9）；ならびに高血圧が測定された後に 1 mg の VEGF₁₆₅ b を注射したラットを含めた。すべてのモデルにおいて、尿中クレアチニン / タンパク質比によって特性評価した腎機能は正常であることがわかった。

10

【0226】

インビトロでの糸球体内皮細胞の透過性に対する効果

VEGF₁₆₅ は、血管透過性を増大させることがわかっており、VEGF₁₆₅ 発現によって水に対する腎臓の高い透過性が維持され、他の組織における透過性が増大すると考えられるのは、この機構のためである。経上皮電気抵抗アッセイを使用すると、VEGF₁₆₅ b は、糸球体内皮細胞内で VEGF₁₆₅ によって誘導される透過性を阻害することが示された（図10）。ヒト条件的不死化糸球体内皮細胞を2時間血清飢餓状態にし、次いで、何もなし（対照）、1 nM の VEGF₁₆₅、1 nM の VEGF₁₆₅ b または 1 nM の VEGF₁₆₅ & 1 nM の VEGF₁₆₅ b の組合せのいずれかに応答した、培養単層状態の糸球体内経内皮電気抵抗を測定した。結果は、対照（すなわち、時間点0分、SEM）に対する平均増加倍数である。n = 5、プリズムによるデータ解析：p < 0.0001、一元配置ANOVA、反復測定、ボンフェローニポストテストによる。対照対 VEGF₁₆₅ p < 0.001、対照対 VEGF₁₆₅ b p, 0.01、対照対両者 p > 0.05、VEGF₁₆₅ 対 VEGF₁₆₅ b と両者 p < 0.001、VEGF₁₆₅ b 対両者 p < 0.01。SSPSを用いたデータ解析、全般的なp値 > 0.0005 一元配置ANOVA、反復測定、ポストホックボンフェローニ 対照対 VEGF 0.001、対他のNS VEGF 対他の3つの群 すべて有意 165 対両者 0.037。VEGF の血管新生誘発性形態に特異的な抗体が、糸球体内皮細胞内で VEGF₁₆₅ によって誘導される透過性も阻害することは、好都合である。

20

【0227】

インビボでの糸球体の透過性に対する効果

VEGF₁₆₅ は、インビボで、蛋白尿を誘発し、糸球体の透過性を増大させることが示された。VEGF アンタゴニストもまた、インビボで蛋白尿および糸球体の透過性を増大させる。しかしながら、有足突起特異的ネフリンプロモーターの制御下で VEGF₁₆₅ b を18ヶ月発現させているマウスでは、水に対する糸球体の透過性（透水率）の有意な低下がみとめられる（図11）。インビボでの糸球体における VEGF の血管新生誘発性形態に特異的な抗体での連続的処置の効果を調べるため、VEGF₁₆₅ b を18ヶ月発現しているトランスジェニックマウスから単離した糸球体の透過性を測定した。糸球体は、18ヶ月齢の野生型でヘテロ接合型またはホモ接合型の pod - VEGF₁₆₅ b マウスから単離したものであり、透水率は、単位容積あたりの単位面積あたりで測定されたものである（ $L_p A / V_i$ ）。ホモ接合型マウスは、ヘテロ接合体と比べて低い透過性を有し、これは遺伝子量効果を示す。VEGF の血管新生誘発性形態に特異的な抗体での処置の効果は、腎臓安全性プロファイルに対する効果を特性評価するために他の VEGF スカベンジャーおよび VEGFR TKI との比較において同様に試験される。

30

40

【0228】

具体的な実施形態の前述の説明は、本発明の一般的な性質を十分に示したものであるため、第三者は、この知識を応用することにより、必要以上に実験を行なうことなく、および本一般概念から逸脱することなく、種々の適用のために、かかる具体的な実施形態を容易に変形および/または適合させることができよう。したがって、かかる適合および変形は、開示した実施形態の均等の意味および均等範囲に包含されるはずであり、包含される

50

ことを意図する。本明細書で用いる語法または専門用語は、説明を目的としたものであり、限定を目的としたものではないことを理解されたい。手段、材料、および開示した種々の機能の実施工程には、本発明から逸脱することなく、さまざまな択一的形態が採用され得る。

【図 1】

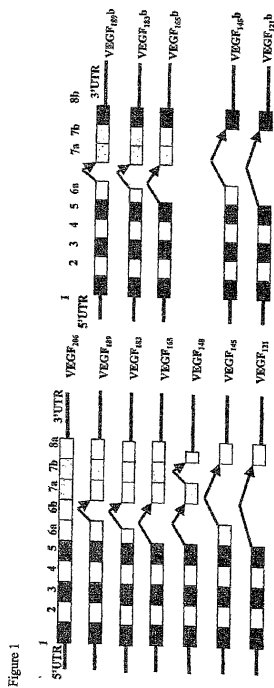
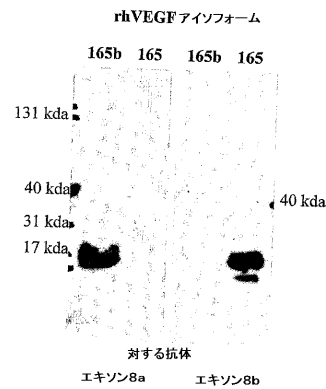


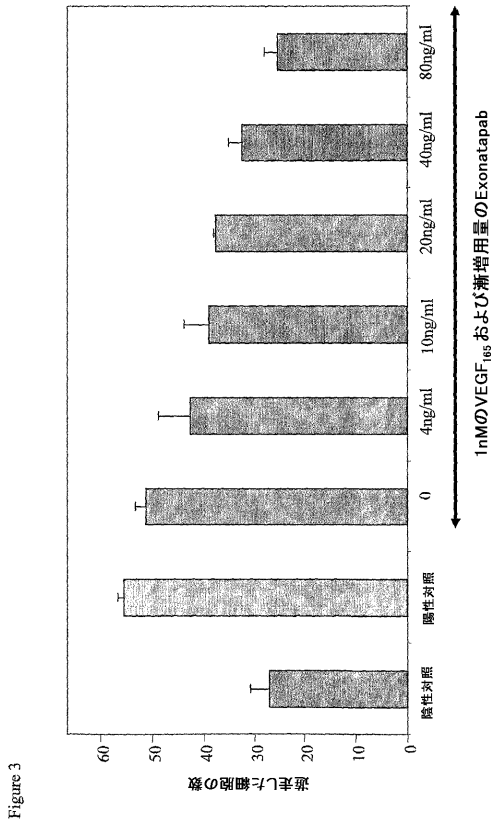
Figure 1

【図 2】

Figure 2



【 図 3 】



【 図 4 】

Figure 4A

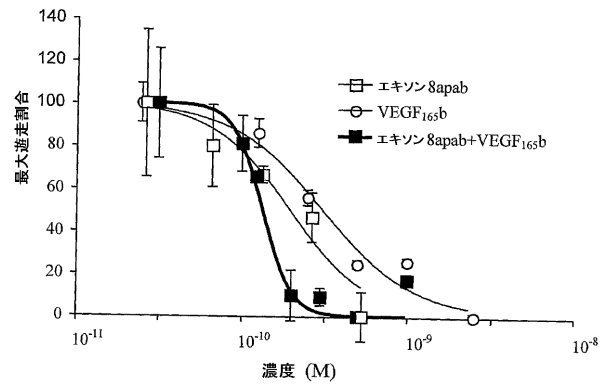
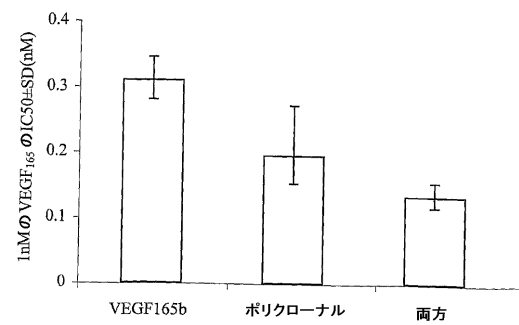
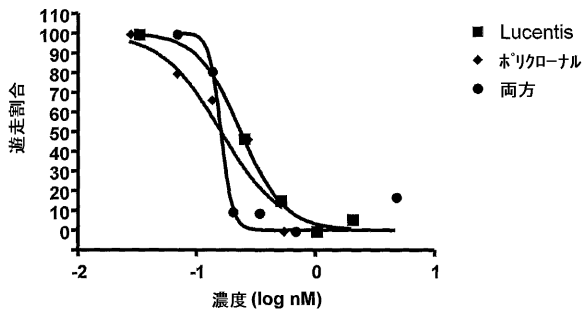


Figure 4B



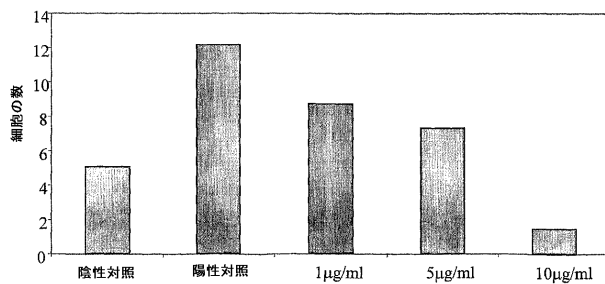
【 図 5 】

Figure 5

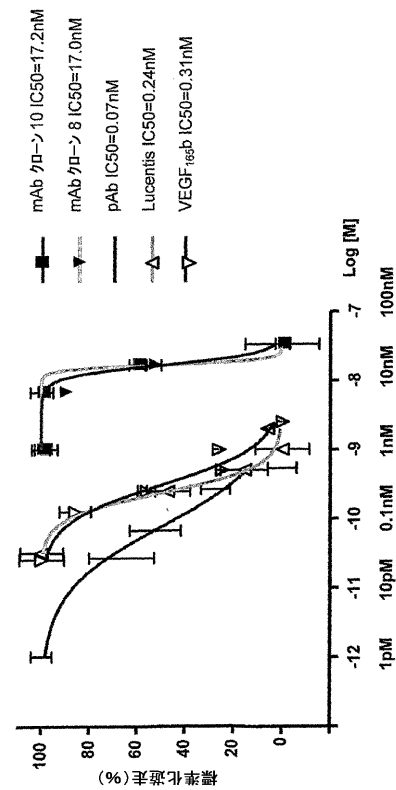


【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】



【 図 8 】

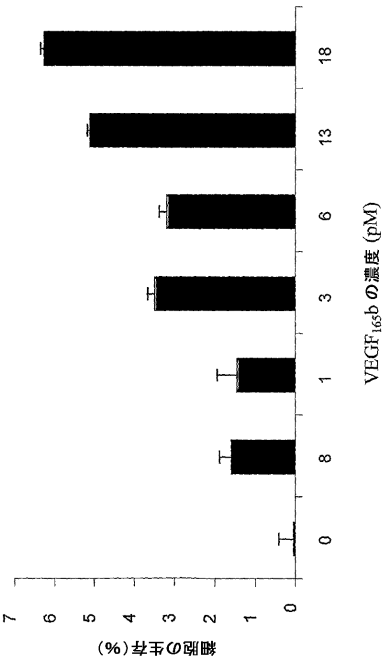


Figure 8

【 図 9 】

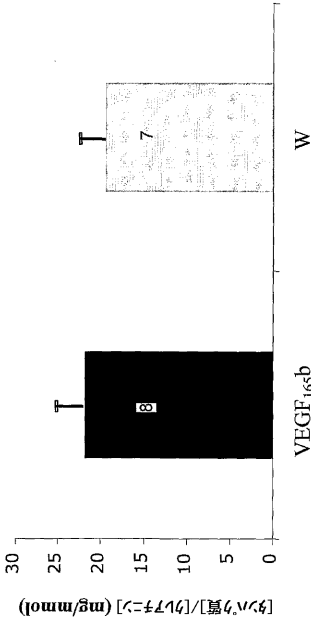


Figure 9

【 図 1 0 】

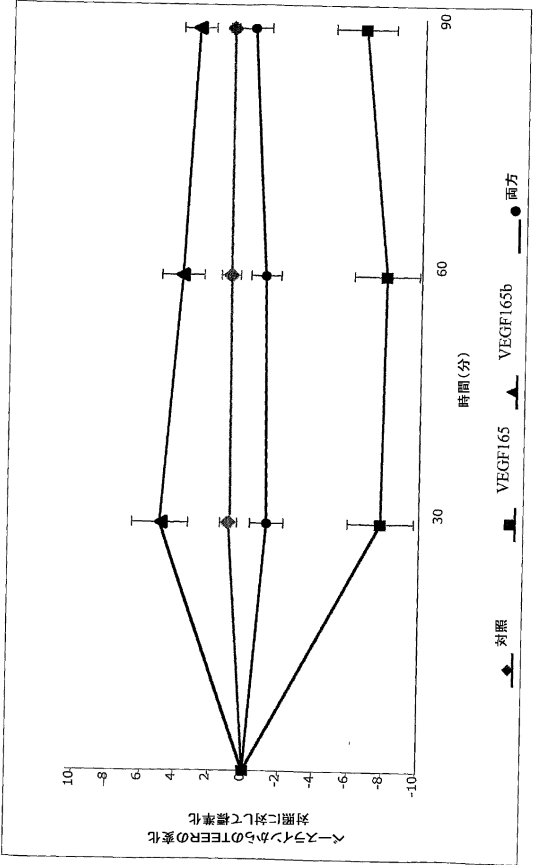


Figure 10

【 図 1 1 】

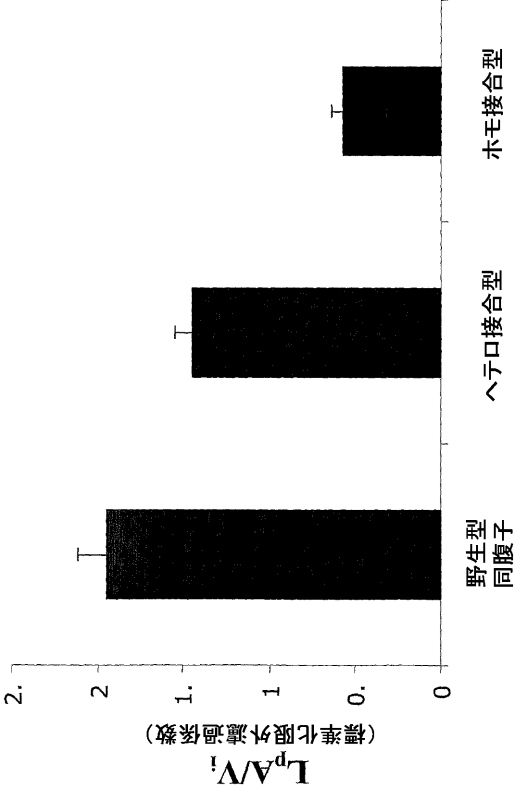


Figure 11

【配列表】

2011504092000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2008/001410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 A61K39/395 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/012105 A (UNIV BRISTOL [GB]; BATES DAVID [GB]; HARPER STEVEN [GB]) 13 February 2003 (2003-02-13) page 18, line 33 - page 19, line 3 page 21, lines 12-19 page 24, lines 5-8 page 31, line 1 - page 37, line 9; example 1 page 48, lines 11-30; example 11 claims 14,16,18	30-32
Y	----- -/--	20-22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 March 2009		20/03/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2008/001410

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WOOLARD J ET AL: "VEGF165b, an inhibitory VEGF splice variant : mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD.; US, vol. 64, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 7822-7835, XP002496287</p> <p>ISSN: 0008-5472</p> <p>abstract</p> <p>page 7822, right-hand column, paragraph 3</p> <p>figure 1</p> <p>page 7824, left-hand column, paragraph 5 - right-hand column, paragraph 1</p> <p>page 7834, right-hand column, paragraph 1</p>	20-22
Y	<p>PERRIN R M ET AL: "Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from antitumor pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor"</p> <p>DIABETOLOGIA ; CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 48, no. 11, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 2422-2427, XP019322378</p> <p>ISSN: 1432-0428</p> <p>abstract</p> <p>page 2427, left-hand column, paragraph 2</p>	20-22
X	<p>PRITCHARD-JONES R O ET AL: "Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma"</p> <p>BRITISH JOURNAL OF CANCER, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 97, no. 2, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 223-230, XP009113319</p> <p>ISSN: 0007-0920</p> <p>abstract</p> <p>page 225, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2</p>	25
X	<p>WO 98/39037 A (BETH ISRAEL HOSPITAL [US]; SINGER DONALD R [US]; DVORAK HAROLD F [US]) 11 September 1998 (1998-09-11)</p> <p>page 14; table 2</p> <p>page 42; table E1</p> <p>page 15, lines 27-29</p> <p>table 4</p> <p>page 21, lines 7-11</p> <p>page 22, line 10 - page 24, line 5</p> <p>page 20, line 34 - page 21, line 2</p> <p>page 8, lines 7-17</p>	1-19, 23, 24, 26, 28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2008/001410

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/007198 A (ATTOGEN INC [US]; CHANG XIAO-JIA [US]) 27 January 2005 (2005-01-27) sequence 4 page 36, line 2 page 60 - page 62; example 1 page 4, lines 4-9 page 32; table 1 page 56, line 30 - page 59, line 3	1,2,5-7, 10-19, 23,24, 26-29
Y	KONOPATSKAYA O ET AL: "VEGF(165)b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice" MOLECULAR VISION, SN, ATLANTA, vol. 12, no. 67-69, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 626-632, XP009113324 ISSN: 1090-0535 abstract page 631, right-hand column, paragraph 1	20-22
A	FOR THE EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER ET AL: "Phase I investigation of recombinant anti-human vascular endothelial growth factor antibody in patients with advanced cancer" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 41, no. 4, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 555-563, XP025297991 ISSN: 0959-8049 [retrieved on 2005-03-01] the whole document	1-32
A	ZHANG W ET AL: "A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model" ANGIOGENESIS, KLUWER, DORDRECHT, NL, vol. 5, no. 1-2, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 35-44, XP002342903 ISSN: 0969-6970 the whole document	1-32
A	WO 2005/054273 A (ABMAXIS INC [US]; ZHONG PINGYU [US]; LUO PEIZHI [US]; WANG KEVIN C [US]) 16 June 2005 (2005-06-16) the whole document	1-32
P,A	WO 2008/110777 A (UNIV BRISTOL [GB]; BATES DAVID [GB]; HARPER STEVEN JAMES [GB]; NOWAK D) 18 September 2008 (2008-09-18) the whole document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2008/001410

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03012105	A	13-02-2003	CA 2455194 A1	13-02-2003
			EP 1414964 A2	06-05-2004
			JP 2005502333 T	27-01-2005
			US 2005054036 A1	10-03-2005
WO 9839037	A	11-09-1998	AU 722722 B2	10-08-2000
			AU 6757098 A	22-09-1998
			CA 2283295 A1	11-09-1998
			EP 0968002 A1	05-01-2000
			JP 2001513111 T	28-08-2001
WO 2005007198	A	27-01-2005	CN 1849137 A	18-10-2006
			EP 1651268 A2	03-05-2006
			US 2007172817 A1	26-07-2007
			US 2005009110 A1	13-01-2005
WO 2005054273	A	16-06-2005	AU 2004295339 A1	16-06-2005
			CA 2547016 A1	16-06-2005
			CN 1946422 A	11-04-2007
			EP 1699484 A2	13-09-2006
			JP 2008504215 T	14-02-2008
			KR 20070036018 A	02-04-2007
			SG 146696 A1	30-10-2008
			US 2004133357 A1	08-07-2004
WO 2008110777	A	18-09-2008	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 17/06	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	P
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
		C 1 2 N 5/00	1 0 2

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

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ベイツ, デイビッド オー.

イギリス国 ビーエス7 8 イーজেイ ビショップストン ブリストル, パイン グローブ
ブレイス 1 0

(72)発明者 ハーパー, スティーブン ジェイ.

イギリス国 エヌピー1 6 6 エスエックス ティンターン グウェント, バルバドス ヒル,
ヘイルウッド コテージ

(72)発明者 マンゲラス, ミリアム ワイ.

イスラエル国 5 8 4 9 2 ホロン, シャレット ストリート 3 5

(72)発明者 ゼーヴィ, メナチェム

イスラエル国 5 2 3 5 5 ラメト ガン, ハーレチャシム ストリート 2 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 CA01 GA11 HA01 HA15

4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA08 CA24 CA25 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 CC02 DD63 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74 GA24 GA26