

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6797826号
(P6797826)

(45) 発行日 令和2年12月9日 (2020.12.9)

(24) 登録日 令和2年11月20日 (2020.11.20)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 Z N A D
A 6 1 P 11/00 (2006.01) A 6 1 P 11/00
A 6 1 K 39/395 P

請求項の数 30 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2017-552910 (P2017-552910)
(86) (22) 出願日 平成28年4月7日 (2016.4.7)
(65) 公表番号 特表2018-515442 (P2018-515442A)
(43) 公表日 平成30年6月14日 (2018.6.14)
(86) 国際出願番号 PCT/US2016/026420
(87) 国際公開番号 W02016/164567
(87) 国際公開日 平成28年10月13日 (2016.10.13)
審査請求日 平成31年4月4日 (2019.4.4)
(31) 優先権主張番号 62/144,241
(32) 優先日 平成27年4月7日 (2015.4.7)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(73) 特許権者 507159304
シャイアー ヒューマン ジェネティック
セラピーズ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
2 4 2 1 レキシントン シャイアー ウ
エイ 3 0 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 気管支肺異形成症の治療における抗 F l t - 1 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

気管支肺異形成症 (B P D) の治療のための組成物であって、
前記組成物は、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片を含み、
前記組成物は、治療を必要とする個体に投与されることを特徴とし、
前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、表面プラズモン共鳴結合アッセイに
おいて、ヒト F l t - 1 に対して 0.5×10^{-11} M を超える結合親和性を有する、組
成物。

【請求項 2】

前記個体が、B P D に罹患しているか、または B P D に罹患しやすい乳児である、請求
項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記個体が、B P D に罹患しているか、または B P D に罹患しやすい胎児を孕む妊婦で
ある、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、表面プラズモン共鳴結合アッセイに
おいて、 10^{-12} M を超えるヒト F l t - 1 への結合親和性を有する、請求項 1 ~ 3 の
いずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、ヒト F l t - 1 との競合アッセイにお

10

20

いて100 pMより低いIC₅₀で特徴付けられる、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、ヒトFlt-1との競合アッセイにおいて10 pMより低いIC₅₀で特徴付けられる、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、ヒトFlt-1との競合アッセイにおいて1 pMより低いIC₅₀で特徴付けられる、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項8】

前記競合アッセイが、VEGFのヒトFlt-1への結合の阻害である、請求項5～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項9】

前記競合アッセイが、PLGFのヒトFlt-1への結合の阻害である、請求項5～7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、VEGFR2及び/またはVEGFR3に結合しない、請求項1～9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

20

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、マウスまたはサルFlt-1に結合しない、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、マウス及び/またはサルFlt-1に結合する、請求項1～10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、IgG、F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、ScFvs、ダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディからなる群から選択される、請求項1～12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

30

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、IgGである、請求項13に記載の組成物。

【請求項15】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、IgG1である、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、モノクローナル抗体である、請求項14または15に記載の組成物。

【請求項17】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化モノクローナル抗体である、請求項16に記載の組成物。

40

【請求項18】

前記ヒト化モノクローナル抗体が、ヒトFc領域を含有する、請求項17に記載の組成物。

【請求項19】

前記Fc領域が、前記抗体のインビボ半減期が延長されるように、前記Fc領域と前記FcRn領域との間の前記結合親和性を向上させる1つ以上の突然変異を含有する、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記Fc領域が、ヒトIgG1のThr 250、Met 252、Ser 254、

50

Thr 256、Thr 307、Glu 380、Met 428、His 433、及び/またはAsn 434に相当する1つ以上の位置において1つ以上の突然変異を含む、請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

前記組成物が、非経口投与されることを特徴とする、請求項1～20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項22】

前記非経口投与が、静脈内、皮内、髄腔内、吸入、経皮（局所）、眼内、筋肉内、皮下、肺送達、及び/または経粘膜投与から選択される、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】

前記非経口投与が、静脈内投与である、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】

前記組成物が、経口投与されることを特徴とする、請求項1～20のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項25】

前記組成物が、隔月、毎月、3週間毎、隔週、毎週、毎日、または変動時間間隔で投与されることを特徴とする、請求項1～24のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項26】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、肺及び心臓から選択される1つ以上の標的組織に送達される、請求項1～25のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項27】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、肺に送達される、請求項1～26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項28】

前記抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片が、心臓に送達される、請求項1～27のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項29】

前記組成物の前記投与が、健常な肺組織の成長、肺炎症の減少、肺胞形成の増加、血管新生の増加、肺血管床の改善された構造、肺の瘢痕化の低減、改善された肺成長、呼吸不全の低減、改善された運動不耐性、有害神経学的転帰の低減、及び/または対照と比べての改善された肺機能をもたらす、請求項1～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項30】

前記組成物が、界面活性剤、酸素療法、人工呼吸器療法、ステロイド、ビタミンA、一酸化窒素吸入、高カロリー栄養処方物、利尿剤、及び/または気管支拡張剤から選択される少なくとも1つの追加薬剤または療法と同時投与されることを特徴とする、請求項1～29のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年4月7日に出願された米国仮出願第62/144,241号の優先権を主張するものであり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

気管支肺異形成症（BPD）は、主に未熟児に影響を及ぼす重度の慢性肺疾患である。未熟児は、酸素補充及び機械的呼吸補助装置の使用によりそれらの肺が損傷した後にBPDを発症する可能性がある。BPDを患う乳児は、肺に炎症及び瘢痕を有し、重度の症例では、人工呼吸器または酸素補充の長期的の必要性、肺高血圧症、再発性呼吸器感染症、肺機能異常、運動不耐性、遅発性神経発達状態、及びさらには死亡する高いリスクにある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

しかしながら、BPDを患う多くの乳児は時間と共に回復かつ改善するが、これらの子供は、喘息及びウイルス性肺炎を含むさらなる合併症を発症するリスクが高い。そして、大半の乳児は生存するが、非常に重度のBPDの乳児は、数か月のケア後にもこの疾患によって死亡するであろう。

【 発 明 の 概 要 】

【 課 題 を 解 決 す る た め の 手 段 】

【 0 0 0 4 】

本発明は、とりわけ、抗Flt-1抗体療法に基づく、慢性肺障害、特に気管支肺異形成症(BPD)を治療するための改善された方法及び組成物を提供する。以下の実施例に記載するように、本発明は、一部には、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、VEGF及び他のリガンドがFlt-1受容体に結合することを阻害でき、これにより、VEGF及び/またはVEGF受容体に結合するために利用可能な他のリガンドの量を増加させるという発見に基づいている。この増加した結合は、毛細血管密度を増加させ、線維症ならびに炎症の軽減、及びBPDに関連する症状ならびに特徴の軽減を促進する血管新生促進効果を誘起することができる。実際、実施例に示すように、本発明者らは、抗Flt-1抗体の投与が、BPD動物モデルにおける肺病理学の尺度を改善することを実証した。したがって、本発明は、BPDの治療のための安全かつ有効な抗体ベースの療法を提供する。

【 0 0 0 5 】

一態様では、本発明は、抗Flt-1抗体またはその抗原結合性断片の有効量を、治療を必要とする個体に投与することを含む、気管支肺異形成症(BPD)の治療方法を提供する。

【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態において、個体は、BPDに罹患しているか、または、BPDに罹患しやすい乳児である。いくつかの実施形態において、個体は、BPDに罹患しているか、または、BPDに罹患しやすい胎児を孕む妊婦である。

【 0 0 0 7 】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体またはその抗原結合性断片は、表面プラズモン共鳴結合アッセイにおいて、 10^{-9} Mを超える、 10^{-10} Mを超える、または 10^{-12} Mを超える親和性で、ヒトFlt-1に結合する能力によって特徴付けられる。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片は、ヒトFlt-1との競合アッセイにおいて、 100 pMより低い、 10 pMより低い、または 1 pMより低い IC_{50} によって特徴付けられる。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態において、競合アッセイは、VEGFのヒトFlt-1への結合の阻害である。いくつかの実施形態において、競合アッセイは、PLGFのヒトFlt-1への結合の阻害である。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片は、VEGFR2及び/またはVEGFR3に結合しない。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片は、マウスまたはサルFlt-1に結合しない。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体またはその抗原結合断片は、マウス及び/またはサルFlt-1に結合する。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、I g G、F (a b ')₂、F (a b)₂、F a b '、F a b、S c F v s、ダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、I g G である。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、I g G 1 である。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、ヒト化モノクローナル抗体はヒト F c 領域を含有する。いくつかの実施形態では、F c 領域は、抗体のインビボ半減期を延長させるように、F c 領域と F c R n 受容体との間の結合親和性を高める 1 つ以上の突然変異を含む。いくつかの実施形態において、F c 領域は、ヒト I g G 1 の T h r 2 5 0、M e t 2 5 2、S e r 2 5 4、T h r 2 5 6、T h r 3 0 7、G l u 3 8 0、M e t 4 2 8、H i s 4 3 3、及び / または A s n 4 3 4 に相当する 1 つ以上の位置において 1 つ以上の突然変異を含有する。

10

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、非経口投与される。いくつかの実施形態において、非経口投与は、静脈内、皮内、髄腔内、吸入、経皮（局所）、眼内、筋肉内、皮下、肺送達、及び / または経粘膜投与から選択される。いくつかの実施形態において、非経口投与は、静脈内投与である。

20

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、経口投与される。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、隔月、毎月、三週間毎、隔週、毎週、毎日、または変動時間間隔で投与される。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、肺及び心臓から選択される 1 つ以上の標的組織に送達される。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、肺に送達される。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片は、心臓に送達される。

30

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片の投与は、対照と比較して、健全な肺組織の成長、肺炎症の減少、肺胞形成の増加、血管新生の増加、肺血管床の改善された構造、肺の癒痕化の低減、改善された肺成長、呼吸不全の低減、改善された運動不耐性、有害神経学的転帰の低減、及び / または改善された肺機能をもたらす。

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、本発明は、界面活性剤、酸素療法、人工呼吸器療法、ステロイド、ビタミン A、一酸化窒素吸入、高カロリー栄養処方物、利尿剤、及び / または気管支拡張剤から選択される少なくとも 1 つの追加薬剤または療法を同時投与することをさらに含む方法を提供する。

40

【 0 0 2 1 】

本出願で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、等価物として使用される。本出願において約 / およその有無を問わず使用される任意の数字は、関連技術分野の当業者によって認識される任意の通常の変動を網羅することを意味する。

【 0 0 2 2 】

本発明の他の特徴、目的、及び利点は、以下の詳細な説明から明らかである。しかしながら、詳細な説明は、本発明の実施形態を示しているが、例示として供与されているものにすぎず、限定されるものではないことを理解されたい。本発明の範囲内の様々な変更及

50

び修正は、詳細な説明から当業者には明らかになるであろう。

特定の実施形態において、例えば、以下が提供される：

(項目 1)

気管支肺異形成症 (BPD) の治療法であって、
抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片の有効量を、治療を必要とする個体に投与することを含む、方法。

(項目 2)

前記個体が、BPD に罹患しているか、または BPD に罹患しやすい乳児である、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記個体が、BPD に罹患しているか、または BPD に罹患しやすい胎児を孕む妊婦である、項目 1 に記載の方法。

(項目 4)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、表面プラズモン共鳴結合アッセイにおいて、 10^{-9} M を超える親和性でヒト F l t - 1 に結合する能力で特徴付けられる、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、表面プラズモン共鳴結合アッセイにおいて、 10^{-10} M を超えるヒト F l t - 1 への結合親和性を有する、項目 1 または 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、表面プラズモン共鳴結合アッセイにおいて、 10^{-12} M を超えるヒト F l t - 1 への結合親和性を有する、項目 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、ヒト F l t - 1 との競合アッセイにおいて 100 pM より低い IC_{50} で特徴付けられる、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、ヒト F l t - 1 との競合アッセイにおいて 10 pM より低い IC_{50} で特徴付けられる、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 9)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、ヒト F l t - 1 との競合アッセイにおいて 1 pM より低い IC_{50} で特徴付けられる、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 10)

前記競合アッセイが、VEGF のヒト F l t - 1 への結合の阻害である、項目 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

前記競合アッセイが、PLGF のヒト F l t - 1 への結合の阻害である、項目 7 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、VEGFR2 及び / または VEGFR3 に結合しない、項目 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 13)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、マウスまたはサル F l t - 1 に結合しない、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、マウス及び / またはサル F l t - 1

10

20

30

40

50

に結合する、項目 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 15)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、I g G、F (a b ')₂、F (a b)₂、F a b '、F a b、S c F v s、ダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディからなる群から選択される、項目 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 16)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、I g G である、項目 15 に記載の方法。

(項目 17)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、I g G 1 である、項目 16 に記載の方法。

10

(項目 18)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、モノクローナル抗体である、項目 16 または 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記モノクローナル抗体が、ヒト化モノクローナル抗体である、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記ヒト化モノクローナル抗体が、ヒト F c 領域を含有する、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

前記 F c 領域が、前記抗体のインビボ半減期が延長されるように、前記 F c 領域と前記 F c R n 領域との間の前記結合親和性を向上させる 1 つ以上の突然変異を含有する、項目 20 に記載の方法。

20

(項目 22)

前記 F c 領域が、ヒト I g G 1 の T h r 250、M e t 252、S e r 254、T h r 256、T h r 307、G l u 380、M e t 428、H i s 433、及び / または A s n 434 に相当する 1 つ以上の位置において 1 つ以上の突然変異を含有する、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、非経口投与される、項目 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 24)

前記非経口投与が、静脈内、皮内、髄腔内、吸入、経皮 (局所)、眼内、筋肉内、皮下、肺送達、及び / または経粘膜投与から選択される、項目 23 に記載の方法。

(項目 25)

前記非経口投与が、静脈内投与である、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、経口投与される、項目 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 27)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、隔月、毎月、3 週間毎、隔週、毎週、毎日、または変動時間間隔で投与される、項目 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 28)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、肺及び心臓から選択される 1 つ以上の標的組織に送達される、項目 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、肺に送達される、項目 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片が、心臓に送達される、項目 1 ~ 29 の

50

いずれか一項に記載の方法。

(項目 3 1)

前記抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片の前記投与が、健常な肺組織の成長、肺炎炎症の減少、肺胞形成の増加、血管新生の増加、肺血管床の改善された構造、肺の癒痕化の低減、改善された肺成長、呼吸不全の低減、改善された運動不耐性、有害神経学的転帰の低減、及び/または対照と比べての改善された肺機能をもたらす、項目 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

界面活性剤、酸素療法、人工呼吸器療法、ステロイド、ビタミン A、一酸化窒素吸入、高カロリー栄養処方物、利尿剤、及び/または気管支拡張剤から選択される少なくとも 1 つの追加薬剤または療法を同時投与することをさらに含む、項目 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図 1】可溶性ヒト F l t - 1 抗原で免疫化されたマウスの抗可溶性ヒト F l t - 1 抗血清力価を示す例示的な結果を示す。

【図 2】E L I S A におけるモノクローナル抗体のヒト可溶性 F l t - 1 との競合的結合を示す例示的な結果を示す。

【図 3】可溶性ヒト F l t - 1 に結合する例示的なモノクローナル抗体を示す。

【図 4】表面プラズモン共鳴 (B I A C O R E) アッセイを介した、モノクローナル抗体の可溶性ヒト F l t - 1 への結合を示す例示的な結果を示す。

【図 5】カニクイザル (c y n o) (サル) F l t - 1 と結合するモノクローナル抗体の交差反応性を示す例示的な結果を示す。

【図 6】E L I S A におけるモノクローナル抗体のヒト可溶性 F l t - 1 との競合結合を示す例示的な結果を示す。市販ベンチマークに対するモノクローナル抗体 0 1 A 0 4 (サブクローン 0 2 B 1 0 - 0 2 G 0 7) の V E G F : s F l t - 1 I C ₅₀ の決定を示す。

【図 7】細胞ベースのアッセイにおける、V E G F の s F l t - 1 への結合の抗 F l t - 1 モノクローナル抗体阻害を示す例示的な結果を示す。

【図 8】治療から 3 日後の肺動脈内皮細胞 (P A E C) の増殖を示す例示的な結果を示す。

【図 9】治療から 3 日後の P A E C の増殖を示す例示的な結果を示す。

【図 10】治療から 24 時間後のチューブ形成を示す例示的な結果を示す。

【図 11】治療から 24 時間後のチューブ形成を示す例示的な結果を示す。

【図 12】ビタミン D の子宮内投与の、ラットの B P D のエンドトキシン (E T X) 誘発性モデルにおける効果を示す例示的な結果を示す。

【図 13】ラットの B P D のエンドトキシン (E T X) 誘導モデルにおける抗 F l t - 1 モノクローナル抗体の子宮内投与の効果を示す例示的な結果を示す。

【図 14】B P D の可溶性 F l t 1 (s F L T) 誘導モデルにおける抗 F l t - 1 モノクローナル抗体の子宮内投与の、ラットの肺血管密度に及ぼす効果を示す例示的な結果を示す。

【図 15】B P D の可溶性 F l t 1 (s F L T) 誘導モデルにおける抗 F l t - 1 モノクローナル抗体の子宮内投与のラットの、ラットの肺血管密度に及ぼす効果を示す例示的な結果を示す。

【図 16】ラットの B P D の可溶性 F l t 1 (s F L T) 誘導モデルにおける抗 F l t - 1 モノクローナル抗体 (a - s F L T) の低用量投与及び高用量投与の効果を示す例示的な結果を示す。

【図 17】ラットの B P D の可溶性 F l t 1 (s F L T) 誘導モデルにおける抗 F l t - 1 モノクローナル抗体 (a - s F L T) の低用量投与及び高用量投与の効果を示す例示的な結果を示す。

10

20

30

40

50

【図18】ラットのBPDの可溶性Flt1 (sFLT) 誘導モデルにおける抗Flt1 - 1モノクローナル抗体 (a-sFLT) の低用量投与及び高用量投与の効果を示す例示的な結果を示す。

【図19】抗Flt1 - 1モノクローナル抗体 (抗sFLT) の1mg/kg及び10mg/kgの出生後投与の、ラットのBPDのエンドトキシン (ETX) 誘導モデルにおける体重に及ぼす効果を示す例示的な結果を示す。

【図20】抗Flt1 - 1モノクローナル抗体 (Mab) の1mg/kg及び10mg/kgの出生後投与の、ラットのBPDのエンドトキシン (ETX) 誘導モデルにおける肺動脈分岐数 (radial alveolar count) (RAC) に及ぼす効果を示す例示的な結果を示す。

10

【図21】抗Flt1 - 1モノクローナル抗体 (抗sFLT) の1mg/kg及び10mg/kgの出生後投与の、ラットのBPDのエンドトキシン (ETX) 誘導モデルにおける右心室肥大 (RVH) に及ぼす効果を示す例示的な結果を示す。

【図22】抗Flt1 - 1モノクローナル抗体 (抗sFLT) の1mg/kg及び10mg/kgの出生後投与の、ラットのBPDのエンドトキシン (ETX) 誘導モデルにおける肺構造に及ぼす効果を示す例示的な結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

定義

本発明をより容易に理解するために、特定の用語を最初に以下に定義する。以下の用語及びその他の用語の追加的な定義は、本明細書の全体を通して記載される。

20

【0025】

動物：本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、動物界の任意の一員を指す。いくつかの実施形態において、「動物」とは、任意の発達段階におけるヒトを指す。いくつかの実施形態において、「動物」とは、任意の発達段階における非ヒト動物を指す。特定の実施形態において、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、及び/またはブタ）である。いくつかの実施形態において、動物には、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、及び/または蠕虫が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、動物は、遺伝子導入動物、遺伝子操作した動物、及び/またはクローンであってもよい。

30

【0026】

抗体：本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、天然であろうが、または完全もしくは部分的に合成により産生されようが、任意の免疫グロブリンを指す。特異的な結合能力を維持するそれらの全ての誘導体も、この用語に含まれる。この用語はまた、免疫グロブリン結合ドメインと相同であるか、またはほとんど相同である結合ドメインを有する任意のタンパク質を網羅する。そのようなタンパク質は、天然源に由来してもよく、または部分的もしくは全体的に合成により産生されてもよい。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであってもよい。抗体は、ヒトクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEのいずれかを含む、任意の免疫グロブリンクラスの一員であってもよい。特定の実施形態において、抗体は、IgG免疫グロブリンクラスの一員であり得る。本明細書で使用される場合、「抗体断片」または「抗体の特徴部」という用語は、互換的に使用され、完全長未満である抗体の任意の誘導体を指す。一般に、抗体断片は、完全長抗体の特異的な結合能力の、少なくとも重要な部分を保持する。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFvダイアボディ、及びFd断片が挙げられるが、これらに限定されない。抗体断片は、任意の手段によって産生することができる。例えば、抗体断片は、完全な抗体の断片化によって酵素的もしくは化学的に産生されてもよく、及び/または部分的な抗体配列をコードする遺伝子から組換え的に産生されてもよい。代替的または追加的に、抗体断片は、全体的もしくは部分的に合成により産生することができる。抗体断片は、任意に、一本鎖抗体断片を含むことがある。代替的または追加的に、抗体断片は、例えば、ジスルフィド結合によって一緒に結合される複数

40

50

の鎖を含んでもよい。抗体断片は、任意に、多分子複合体を含んでもよい。機能的抗体断片は、典型的には、少なくとも約50個のアミノ酸を含み、より典型的には、少なくとも約200個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、抗体はヒト抗体であってもよい。いくつかの実施形態において、抗体はヒト化抗体であってもよい。

【0027】

抗原結合断片：本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」という用語は、抗原（すなわち、F1t-1）と接触かつ結合する免疫グロブリン分子の一部を指す。

【0028】

およそまたは約：本明細書で使用される場合、対象の1つ以上の値に適用される「約」または「およそ」という用語は、記載された基準値と同様である値を指す。特別の実施形態において、「約」または「およそ」という用語は、別段の記載がない限り、または文脈から明らかでない限り、記載された基準値のいずれかの方向（より大きいまたは小さい）に、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満に入る値の範囲を指す（そのような数が可能な値の100%を超える場合を除く）。

【0029】

生物学的に活性：本明細書で使用される場合、「生物学的に活性」という表現は、生物学的系において、特に生物において活性を有する任意の作用物質の特性を指す。例えば、生物に投与されるときに、その生物に対して生物学的効果を有する作用物質は、生物学的に活性であるとみなされる。特定の実施形態において、ペプチドが生物学的に活性である場合、ペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を共有するそのペプチドの一部は、典型的には「生物学的に活性」部分と呼ばれる。特定の実施形態において、ペプチドは固有の生物活性を有さないが、1つ以上のVEGFリガンドの結合を阻害することから、生物学的に活性であるとみなされる。

【0030】

担体または希釈剤：本明細書で使用される場合、「担体」及び「希釈剤」という用語は、医薬製剤の調製に有用な、医薬上許容される（例えば、ヒトへの投与に対して安全かつ非毒性の）担体または希釈物質を指す。希釈剤の例には、滅菌水、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー溶液またはデキストロース溶液が挙げられる。

【0031】

投与形態：本明細書で使用される場合、「投与形態」及び「単位投与形態」という用語は、治療される患者のための治療用タンパク質（例えば、抗体）の物理的に別個の単位を指す。各単位は、所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性物質を含有する。しかしながら、組成物の総投与量は、主治医によって、健全な医学的判断の範囲内で決定されることが理解されるであろう。

【0032】

機能的等価物または誘導体：本明細書で使用される場合、「機能的等価物」または「機能的誘導体」という用語は、アミノ酸配列の機能的誘導体という観点で、元の配列のものと実質的に同様である生物学的活性（機能または構造のいずれか）を保持する分子を示す。機能的誘導体または等価物は、天然誘導体であってもよく、または合成により調製される。例示的な機能的誘導体には、タンパク質の生物学的活性が保存されているという条件で、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するアミノ酸配列が含まれる。置換アミノ酸は、望ましくは、置換アミノ酸のものと類似する化学-物理的性質を有する。望ましい類似する化学-物理的性質には、電荷、嵩高さ、疎水性、親水性、その他同種類のものが含まれる。

【0033】

融合タンパク質：本明細書で使用される場合、「融合タンパク質」または「キメラタンパク質」という用語は、2つ以上の元々は別々のタンパク質、またはその一部の結合を通

10

20

30

40

50

じて生成されるタンパク質を指す。いくつかの実施形態において、各タンパク質間にリンカーまたはスペーサーが存在するであろう。

【 0 0 3 4 】

半減期：本明細書で使用される場合、「半減期」という用語は、タンパク質濃度または活性など量が、ある期間の開始時に測定されるその値の半分に低下するのに必要な時間である。

【 0 0 3 5 】

肥大：本明細書で使用される場合、「肥大」という用語は、その構成細胞の拡大に起因する器官または組織の体積の増加を指す。

【 0 0 3 6 】

改善する、増加させる、または低減させる：本明細書で使用される場合、「改善する」、「増加させる」または「低減させる」という用語、もしくは文法的に等価な用語は、本明細書に記載される治療の開始前に同じ個体での測定、または本明細書に記載される治療の不在下での（または複数の対照被験体）における測定などの、ベースライン測定値に関連する値を示す。「対照被験体」とは、治療される被験体とほぼ同じ年齢である、治療される被験体と同じ型の疾患に罹患した被験体である。

【 0 0 3 7 】

インビトロ：本明細書で使用される場合、「インビトロ」という用語は、例えば、多細胞生物内よりはむしろ、試験管または反応容器、細胞培養などの人工的な環境において発生する事象を指す。

【 0 0 3 8 】

インビボ：本明細書で使用される場合、「インビボ」という用語は、ヒト及び非ヒト動物などの多細胞生物内で発生する事象を指す。細胞ベースシステムの観点において、この用語は、（例えば、インビトロ系とは対照的に）生きている細胞内で発生する事象を指すために使用することができる。

【 0 0 3 9 】

リンカー：本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、融合タンパク質において、天然タンパク質の特定の位置に出現するもの以外のアミノ酸配列を指し、一般に、柔軟性のあるように、または2つのタンパク質部分間の - ヘリックスなどの構造を挿入するように設計されている。リンカーはスペーサーとも呼ばれる。リンカーまたはスペーサーは、典型的には、それ自体で生物学的機能を有さない。

【 0 0 4 0 】

製薬上許容される：本明細書で使用される場合、「製薬上許容される」という用語は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、人間及び動物の組織との接触で使用するのに適し、妥当な利益／リスク比に見合った物質を指す。

【 0 0 4 1 】

ポリペプチド：本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合を介して一緒に結合されたアミノ酸の連続鎖を指す。この用語は、任意の長さのアミノ酸鎖を指すために使用されるが、当業者は、この用語が長い鎖に限定されるものではなく、ペプチド結合を介して一緒に連結された2つのアミノ酸を含む最小の鎖を指すことができることを理解するであろう。当業者に既知であるように、ポリペプチドは処理及び／または修飾されてもよい。

【 0 0 4 2 】

予防：本明細書で使用される場合、「予防する」または「予防」という用語は、疾患、障害、及び／または病態の発生に関連して使用されるとき、疾患、障害及び／または病態を発症するリスクを低減することを指す。「リスク」の定義を参照されたい。

【 0 0 4 3 】

タンパク質：本明細書で使用される場合、「タンパク質」という用語は、別個の単位として機能する1つ以上のポリペプチドを指す。単一のポリペプチドが別個の機能単位であ

10

20

30

40

50

り、別個の機能単位を形成するために他のポリペプチドとの永続的または一時的な物理的会合を必要としない場合、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、互換的に使用されてもよい。別個の機能単位が、互いに物理的に会合する複数のポリペプチドから構成される場合、「タンパク質」という用語は、物理的に結合され、別個の単位として一緒に機能する複数のポリペプチドを指す。

【0044】

リスク：文脈から理解されるように、疾患、障害、及び/または病態の「リスク」は、特定の個体が疾患、障害及び/または病態（例えば、BPD）を発症する可能性を含む。いくつかの実施形態において、リスクはパーセンテージとして表される。いくつかの実施形態において、リスクは0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90から最大100%までである。いくつかの実施形態において、リスクは、基準試料または基準試料の群に関連するリスクに対するリスクとして表される。いくつかの実施形態において、基準試料または基準試料の群は、疾患、障害、病態及び/または事象（例えば、BPD）の既知のリスクを有する。いくつかの実施形態において、基準試料または基準試料の群は、特定の個体に匹敵する個体からのものである。いくつかの実施形態において、相対リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上である。

【0045】

被験体：本明細書で使用される場合、「被験体」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または霊長類など）を指す。ヒトには、出生前及び出生後の形態が含まれる。多くの実施形態において、被験体はヒトである。被験体は患者であってもよく、患者は疾患の診断または治療のために医療提供者に提示するヒトを指す。「被験体」という用語は、本明細書では「個体」または「患者」と互換的に使用される。被験体は、疾患または障害に罹患しているか、または罹患しやすい可能性があるが、疾患または障害の症状を示していなくてもよい。

【0046】

実質的に：本明細書で使用される場合、「実質的に」という用語は、対象の特徴または特性の、全体またはほぼ全体の程度または度合いを示す質的条件を指す。生物学的技術分野における当業者であれば、生物学的及び化学的現象が完了する、及び/または完全に進む、または、絶対的な結果を達成するかまたは回避することはあるにしても極めて稀であることを理解するであろう。したがって、「実質的に」という用語は、本明細書では、多くの生物学的及び化学的現象に固有の完全性の潜在的な欠如を捕らえるために使用される。

【0047】

実質的に相同：本明細書で使用される「実質的に相同」という表現は、アミノ酸または核酸配列間の比較を指す。当業者であれば理解されるように、2つの配列は、それらが対応する位置に相同残基を含有する場合、一般的に「実質的に相同」とであるとみなされる。相同残基は同一残基であってもよい。あるいは、相同残基は、適切な類似の構造的及び/または機能的特徴を備える非同一の残基であってもよい。例えば、当業者に周知のように、特定のアミノ酸は、典型的には、「疎水性」または「親水性」アミノ酸として分類され、及び/または「極性」または「非極性」側鎖を有するものとして分類される。同じ型の別のものに対する1つのアミノ酸の置換は、しばしば「相同」置換とみなされる場合がある。

【0048】

当該技術分野で周知のように、アミノ酸配列または核酸配列は、ヌクレオチド配列用のBLASTN、及びアミノ酸配列用のBLASTP、ギャップドBLAST、ならびにPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較することができる。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, et al., basic local alignment

10

20

30

40

50

search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul, et al., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及び Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に記載されている。10
相同配列を同定することに加えて、上述のプログラムは、典型的には、相同性の度合いの指標をもたらす。いくつかの実施形態において、それらの対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が、残基の関連するストレッチにわたって相同である場合、2つの配列は、実質的に相同であるとみなされる。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは、完全な配列である。いくつかの実施形態では、関連するストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、20
325、350、375、400、425、450、475、500個、またはそれ以上の残基を含む。

【0049】

実質的に同一：本明細書で使用される場合、「実質的に同一」という表現は、アミノ酸または核酸配列間の比較を指すために使用される。当業者であれば理解されるように、2つの配列は、それらが対応する位置に同一の残基を含む場合、一般に「実質的に同一」とであるとみなされる。当該技術分野で周知のように、ヌクレオチド配列用のBLASTN、及びアミノ酸配列用のBLASTP、ギャップドBLAST、ならびにPSI-BLASTなどの市販のコンピュータプログラムで利用可能なものを含む、様々なアルゴリズムのいずれかを用いて比較することができる。例示的なそのようなプログラムは、Altschul, et al., Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol., 215(3):403-410, 1990; Altschul, et al., Methods in Enzymology; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Baxevanis, et al., Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; 及び Misener, et al., (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1999に記載されている。同一配列を同定することに加えて、上述のプログラムは、典型的には、同一性の度合いの指標をもたらす。40
いくつかの実施形態において、その対応する残基の少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上が、残基の関連するストレッチにわたって同一である場合、2つの配列は実質的に同一であるとみなされる。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは完全な配列である。いくつかの実施形態において、関連するストレッチは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500個、またはそれ以上の残基である。50

【0050】

罹患している：疾患、障害、及び／または病態に「罹患している」個体は、その疾患、障害、及び／または病態の1つ以上の症状を有するかまたは示すと診断されている。

【0051】

罹患しやすい；疾患、障害、及び／または病態に「罹患しやすい」個体は、疾患、障害、及び／または病態を有すると診断されていない。いくつかの実施形態において、疾患、障害、及び／または病態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、及び／または病態の症状を示さない場合がある。いくつかの実施形態において、疾患、障害、病態、または事象（例えば、BPD）に罹患しやすい個体は、以下の1つ以上の項目によって特徴付けることができる：（1）疾患、障害、及び／または病態の発症に関連する遺伝子変異、（2）疾患、障害、及び／または病態の発症に関連する遺伝子多型、（3）疾患、障害、及び／または病態に関連するタンパク質の発現及び／または活性の増加ならびに／もしくは減少、（4）疾患、障害、病態、及び／または事象の発症に関連する習慣ならびに／もしくはライフスタイル、及び／または（5）移植を、受けているか、受けると計画しているか、または必要としているかである。いくつかの実施形態において、疾患、障害、及び／または病態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、及び／または病態を発症するであろう。いくつかの実施形態において、疾患、障害、及び／または病態に罹患しやすい個体は、疾患、障害及び／または病態を発症しないであろう。

10

【0052】

標的組織：本明細書で使用される場合、「標的組織」という用語は、BPDなどの治療される疾患によって影響を受ける任意の組織を指す。いくつかの実施形態において、標的組織には、疾患関連病理、症状、または特徴を示す組織が含まれ、これらには、肺の炎症、肺癒痕化、肺の成長障害、早期肺傷害、長期の呼吸不全、肺感染症、運動不耐性、及び有害な神経学的転帰が挙げられる、これらに限定されない。

20

【0053】

治療有効量：本明細書で使用される場合、治療剤の「治療有効量」という用語は、疾患、障害、及び／または病態に罹患している、または罹患しやすい被験体に投与したときに、疾患、障害、及び／または病態の症状（複数可）の発症を治療、診断、予防、及び／または遅延させるのに十分である量を意味する。当業者であれば、治療有効量が、典型的には、少なくとも1つの単位用量を含む投与計画を介して投与されることを理解されるであろう。

30

【0054】

治療：本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、または「治療すること」という用語は、特定の疾患、障害、及び／または病態の、1つ以上の症状または特徴の部分的もしくは完全な軽減、改善、緩和、阻害、予防、発症の遅延、重症度の軽減、及び／または発生率の低下に使用される任意の方法を指す。治療は、疾患の兆候を示さない及び／または疾患の早期兆候のみを示す被験体に、疾患に関連する病理を発症するリスクを低下させる目的で施すことができる。

【0055】

特定の実施形態の詳細な説明

40

本発明は、とりわけ、抗F1t-1抗体、またはその抗原結合断片の使用に基づく、慢性肺疾患、特に気管支肺異形成（BPD）を治療するための方法及び組成物を、BPDを治療するための治療剤として提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、BPDに罹患しているか、またはBPDに罹患しやすい個体に対して、BPDの少なくとも1つの症状または特徴を、強度、重症度、または頻度において低減させるか、または発症を遅延させるように、F1t-1抗体またはその抗原結合断片の有効量を投与することを含むBPDの治療方法を提供する。

【0056】

本発明の様々な態様は、以下のセクションで詳細に説明される。セクションの用途は、本発明を限定することを意味するものではない。各セクションは、本発明の任意の態様に

50

適用可能である。本出願において、「または」の使用は、他に記載がない限り、「及び／または」を意味する。

【0057】

気管支肺異形成症（BPD）

界面活性剤療法、母体ステロイド、新しい人工呼吸器戦略、動脈管閉存症の積極的な管理、改善された栄養、及び他の治療の導入により、RDSを有する未熟児の臨床経過及び転帰は、過去30年間にわたって劇的に変化している。BPDを発症する乳児の約3分の2が、出生時に軽度の呼吸困難のみを呈することが最近立証されている。これは、肺損傷の発症時期がBPDの病因において重要な因子であることを示唆している。

【0058】

この疫学的及び臨床的变化パターンと平行して、BPDにおける肺組織学の重要な特徴も変化した。早産後の持続性肺疾患を有する乳児は、この前界面活性剤期間中にBPDで死亡した乳児で従来観察されたものとは異なる臨床経過、及び病理を有するという認識が現在高まっている。BPDを最初に特性評価した古典的な進行期は、臨床管理の変更によりしばしば不在であり、また、BPDは、主に急性肺傷害の重篤度によって定義されるものから、主に遠位肺の成長の崩壊によって定義されるその現在の特性評価まで明確に変化している。したがって、界面活性剤形成後期間のいわゆる新規BPDは、肺構造、成長、及び、遠位の気腔ならびに脈管構造の機能の変更を伴う肺発生の障害を表す。生理学的には、これは、肺胞 - 毛細血管表面積の著しい減少を示唆し、運動不耐性、肺高血圧症、及び急性呼吸器感染症の耐性悪化のリスク増加による、ガス交換障害に潜在的に寄与する。

【0059】

BPDの病因

BPDは、肺の成長の重要な期間、すなわち、気腔中隔形成及び血管発生が劇的に増加する期間である管状期（ヒトでは17～26週）の間の損傷に対する肺の応答を表している。いくつかの実施形態において、早産新生児のBPDの発症への罹患しやすさを増加させる因子には、界面活性剤欠乏症、抗酸化防御の低下、上皮イオンならびに水の送達機能障害、及び肺構造の未成熟が挙げられる。いくつかの実施形態において、早産後の肺損傷及びその後の肺成長の停止は、防御が不十分な発達中の肺の炎症、高酸素症、機械的換気、及び感染症を含む、複数の有害な刺激間の複雑な相互作用から生じる。いくつかの実施形態において、母体絨毛羊膜炎によるTNF- α 、IL-6、IL-8などの炎症誘発性サイトカインへの出生前の曝露は、子宮内の肺成熟を向上させるが、BPDのリスクを増加させる。

【0060】

高酸素症、及びオキシダントストレスは、BPDの発症に重要な因子である。いくつかの実施形態において、早産新生児の、正常な胎児の低酸素圧環境から子宮外生活の相対的な高酸素状態への移行は、肺胞形成の減少及び異型脈管構造を伴う、BPDのリスクを増加させる。いくつかの実施形態において、酸素環境の早過ぎる変化は、正常な上皮 - 間葉相互作用を妨げ、毛細血管系における内皮細胞の生存、分化、及び組織化の変化につながる。いくつかの実施形態において、未熟児は、早産後に適切な抗酸化物質の欠如のために、活性酸素種（ROS）誘発損傷に特に罹患しやすい。いくつかの実施形態において、酸化防止酵素[例えば、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、カタラーゼ、及びグルタチオンペルオキシダーゼ]は、妊娠後期に著しく増加する。いくつかのさらなる実施形態において、高酸素に応答する抗酸化酵素の合成を増加させる能力は、早産の動物において減少し、そのため、早産は、早期の出生後生活中にも持続する抗酸化物質の、正常な上方制御よりも先に起こる可能性がある。いくつかの実施形態において、内皮細胞及び肺胞II型細胞は、高酸素症及びROS誘発性損傷に極めて罹患しやすく、浮腫の増加、細胞機能障害、及び細胞生存ならびに増殖の障害につながる。

【0061】

いくつかの実施形態において、重力または容量損傷の明白な兆候がない場合でも、未熟児の機械的換気による治療は、炎症及び浸透性浮腫を伴う肺損傷を起こしかつ促進し、ま

10

20

30

40

50

たBPDに寄与する。いくつかの実施形態において、人工呼吸器関連肺損傷(VALI)は遠位気道上皮及び毛細血管内皮を引き伸ばすことに起因し、これにより、浸透性浮腫を増加させ、界面活性剤の機能を阻害し、及び複雑な炎症性カスケードを引き起こす。いくつかの実施形態において、分娩室における蘇生中などの短時間の正圧換気でさえ、進行性の炎症及び損傷のきっかけをもたらす、肺における細気管支上皮及び内皮の損傷を引き起こし得る。

【0062】

肺炎症は、出生前に誘起されようが(絨毛羊膜炎から)、出生後の早期(高酸素症またはVALIによるもの)に誘起されようが、BPDの発症において大きな役割を果たす。いくつかの実施形態において、BPDのリスクは、気管液好中球数、活性化マクロファージ、高濃度の脂質生成物、オキシダント不活性化 - 1 - アンチトリプシン活性、及び、IL - 6 及び IL - 8 を含む炎症誘発性サイトカインの持続的増加、ならびに IL - 10 レベルの低下に関連する。いくつかの実施形態において、TNF - 、IL - 1 、IL - 8、及び TGF - などの初期応答サイトカインのマクロファージによる放出、及び可溶性接着分子(すなわち、セレクチン)の存在は、他の細胞に影響を及ぼして、好中球を動員し、炎症反応を増幅する化学誘引物質を放出する可能性がある。いくつかの実施形態において、抗炎症性生成物(すなわち、IL - 10)の減少に伴う炎症誘発性サイトカインの濃度上昇は、生後数時間以内の胎児の気管吸引液に現れ、その後BPDを発症する。いくつかの実施形態において、活性化された好中球からのエラスターゼ及びコラゲナーゼ放出の増加は、肺のエラスチン及びコラーゲン骨格を直接破壊し、コラーゲン及びエラスチン分解のマーカーを、BPDに罹患している乳児の尿中で回収することができる。いくつかの実施形態において、ウレアプラズマ・ウレアリチカム(Ureaplasma urealyticum)による気道コロニー形成などの比較的低い病毒性生物からの感染は、炎症反応を増大させ、さらにBPDのリスクを増加させる可能性がある。いくつかの実施形態において、栄養失調など他の因子、及びビタミンAならびにEの欠乏症または界面活性剤タンパク質の一塩基多型変異体などの遺伝因子は、それぞれ、一部の早産新生児のBPDのリスクを増加させる可能性が高い。

【0063】

BPDにおける肺循環

気道及び遠位気腔への有害な影響に加えて、急性肺傷害はまた、早産後の発達途上の肺循環の成長、構造、及び機能を害する。いくつかの実施形態において、内皮細胞は、特に高酸素症または炎症を通してオキシダント障害に罹患しやすい。いくつかの実施形態において、小さな肺動脈の媒体は、平滑筋細胞の増殖、未成熟間葉系細胞の成熟平滑筋細胞への早熟、及び血管壁への線維芽細胞/筋線維芽細胞の組込みを含む著しい変化を受ける。いくつかの実施形態において、肺血管系の構造変化は、血管直径の狭小化及び血管コンプライアンスの低下を通して高い肺血管抵抗(PVR)に寄与する。いくつかの実施形態において、これらの構造変化に加えて、肺循環は、PVRも増加させる異常な血管反応性によってさらに特徴付けられる。いくつかの実施形態において、血管形成の低下は、血管表面積を制限する可能性があり、特に運動またはストレスによる高い心拍出量にตอบสนองして、PVRのさらなる上昇を引き起こす。

【0064】

全体的に、肺循環の早期傷害は、肺高血圧症の急速な発症につながり、重度のBPDの罹患率及び死亡率に著しく寄与する。いくつかの実施形態において、高い死亡率は、長期的な人工呼吸器による補助を必要とするBPD及び肺高血圧症の乳児で生じる。いくつかの実施形態において、肺高血圧症はより進行したBPDのマーカーであり、PVRの上昇もまた、右心室機能不良、心拍出量の障害、酸素供給の制限、肺浮腫の増加、及び、恐らくは、突然死のより高いリスクも引き起こす。いくつかの実施形態において、急性低酸素症に対する顕著な血管収縮反応によって証明されるように、BPDにおける肺循環の生理学的異常には、PVRの上昇及び異常な血管反応性が含まれる。いくつかの実施形態において、軽度の低酸素症でさえ、中程度の肺高血圧症の基礎レベルを有する乳児において、

肺動脈圧の著しい上昇を引き起こす。いくつかの実施形態において、92～94%を超える酸素飽和度の治療レベルは、効果的に肺動脈圧を低下させる。いくつかの実施形態において、肺動脈圧を低下させるか、または肺血管系への損傷を制限するための戦略は、BPDにおけるその後の肺高血圧症の発症を制限し得る。

【0065】

最終的に、肺高血圧症及び右心機能は、BPDを罹患している乳児において主要な臨床的問題として残っている。いくつかの実施形態において、BPDにおける肺血管疾患はまた、ガス交換障害の生理学的異常、ならびにBPDの実際の病因に寄与する、成長障害による肺動脈密度の低下も含む。いくつかの実施形態において、血管形成障害は、肺胞化を妨げ、内皮細胞の生存、増殖及び機能を保存及び高める戦略は、BPDの予防のための治療的アプローチを提供する。

10

【0066】

BPDにおける血管形成因子の変更されたシグナル伝達

複数の増殖因子及びシグナル伝達系は、正常な肺血管増殖において重要な役割を果たす。いくつかの実施形態において、早産、及び酸素分圧、炎症性サイトカイン、ならびに他のシグナルの変化は、正常な増殖因子の発現ならびにシグナル伝達、及びしたがって肺/肺血管の発達を変更させる。いくつかの実施形態において、増殖因子はVEGFである。VEGFシグナル伝達の障害は、臨床現場におけるBPDの病因と関連付けられている。いくつかの実施形態において、VEGFは、BPDをその後発症する早期新生児の気管液試料において、慢性肺疾患を発症していないものよりも低いことが見出されている(185)。いくつかの実施形態において、高酸素症は、肺のVEGF発現を下方制御し、VEGFシグナル伝達の薬理的阻害は、肺血管成長を害して、肺胞形成を阻害する。血管成長の減少及び肺胞形成障害につながるVEGFシグナル伝達の障害に関する生物学的根拠は、十分に確立されている。

20

【0067】

血管成長及び肺胞形成

上記のように、気道と血管との間の緊密な連携は、正常な肺の発達にとって不可欠である。いくつかの実施形態において、肺成長の重要な期間(発達の嚢状または肺胞期)における肺血管成長の不全は、中隔形成を減少させ、最終的にBPDを特徴付ける肺形成不全に寄与する。いくつかの実施形態において、血管形成は肺の発達中の肺胞形成に関与し、肺血管の成長を損ないかつ阻害する機序は、早産後の肺胞の成長を妨げる可能性がある。いくつかの実施形態において、出生後肺成長の重要期間中の肺血管成長の阻害は、肺胞形成を害する。

30

【0068】

Flt-1受容体

血管内皮増殖因子受容体1としても知られるFlt-1受容体は、FLT1遺伝子によってコードされる受容体である。シグナル糖タンパク質の血管内皮増殖因子(VEGF)ファミリーは、胚形成及び出生後成長中の血管形成の強力なプロモーターとして作用する。具体的には、VEGF-AリガンドのVEGF受容体との結合は、血管浸透性を改善し、内皮細胞の移動、増殖、及び生存を誘発することが示されており、新たに形成された内皮細胞は、新しい脈管構造の基本構造をもたらす。血管形成のための主要なVEGFシグナル分子であるVEGF-Aは、VEGF受容体-1(VEGFR-1、Flt-1としても知られる)及びVEGF受容体-2(VEGFR-2、Flk-1としても知られている)を介してそのシグナルを媒介する。Flt-1(sFlt-1)の可溶性形態も存在するが、細胞内シグナル伝達ドメインを欠くため、それに結合するVEGF-Aまたは他のリガンドを隔離することによる調節能力でのみ役立つと考えられる。sFlt-1及び細胞内のシグナル伝達経路に結合していないFlt-1結合部位を含有する他の分子は、「デコイ受容体」と呼ばれる。Flt-1受容体及びFlk-1受容体は、細胞外VEGF-A結合ドメイン及び細胞内チロシンキナーゼドメインを含み、両方とも、血管芽細胞及び内皮細胞系統における、発達段階及び組織再生中の発現を示す。Flt-1は、F

40

50

Flk-1と比較して、VEGF-A (K_d が約 $2 \sim 10 \text{ pM}$)に対して約10倍高い結合親和性を有するが、より弱いチロシンキナーゼドメインは、VEGF-AのFlt-1への結合後の血管形成シグナル伝達が、Flk-1シグナルよりも比較的弱いことを示す。このように、ホモ接合型Flt-1遺伝子ノックアウトマウスは、内皮細胞の過剰産生及び血管の破壊により胎形成期に死亡する。逆に、ホモ接合型Flk-1遺伝子ノックアウトのマウスは、胚形成中の卵黄嚢血島形成の欠如のために、組織化された血管の発達の欠陥によって死亡する。Flt-1及びFlk-1受容体の両方は、正常な発達に必要であるが、VEGF-A濃度の選択的増大は、Flk-1受容体へのより大きな結合を可能にし、また毛細血管密度を増加させ、線維症ならびに炎症の軽減、及びBPDに関連する症状ならびに特徴の緩和を促進する血管新生促進効果を誘起させることができる。

10

【0069】

本明細書中で使用される場合、「Flt-1受容体」という用語は、可溶性及び膜結合性の両方のFlt-1受容体、またはその機能的断片を指す。

【0070】

抗Flt-1抗体

本明細書で使用される場合、「抗Flt-1抗体」という用語は、Flt-1受容体（例えば、可溶性または膜結合Flt-1受容体）に結合する任意の抗体、またはその抗原結合抗体を指す。いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体はFlt-1受容体との高い親和力での結合により生産される。理論により拘束されることを望むものではないが、Flt-1受容体に結合する抗Flt-1抗体は、1つ以上の内因性リガンドが、Flt-1に結合することを阻害し、これによって大量の利用可能なりガンドがFlk-1受容体などの他のVEGF受容体と結合することを可能にすると考えられている。Flk-1受容体の活性化の増加は、毛細血管密度を増大させて、線維症ならびに炎症の軽減、及びBPDに関連する症状ならびに特徴の軽減を促進する。いくつかの実施形態において、Flt-1受容体に結合する抗体は、他のVEGF受容体に結合するために利用可能なVEGFの量を増加させる。いくつかの実施形態において、Flt-1受容体に結合する抗体は、他のVEGF受容体に結合するために利用可能な胎盤増殖因子(PLGF)の量を増加させる。

20

【0071】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、約 10^{-9} M を超える、約 10^{-10} M を超える、約 $0.5 \times 10^{-10} \text{ M}$ を超える、約 10^{-11} M を超える、約 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ を超える、約 10^{-12} M を超える、または $0.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ を超える親和性でヒトFlt-1に結合する。Flt-1抗体の親和性は、例えば、BIACOREアッセイなどの表面プラズモン共鳴アッセイで測定されてもよい。

30

【0072】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、ヒトFlt-1との競合アッセイにおいて、 100 pM より低い、 10 pM より低い、または 1 pM より低い IC_{50} によって特徴付けられる。

【0073】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、Flt-1受容体におけるVEGFの結合及び/または活性を阻害する。いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、競合アッセイにおけるヒトFlt-1へのVEGFの結合の阻害について、 100 pM より低い、 10 pM より低い、または 1 pM より低い IC_{50} によって特徴付けられる。

40

【0074】

いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、Flt-1受容体におけるPLGFの結合及び/または活性を阻害する。いくつかの実施形態において、抗Flt-1抗体、またはその抗原結合断片は、競合アッセイにおけるヒトFlt-1へのPLGFの結合の阻害について、 100 pM より低い、 10 pM より低い、ま

50

たは 1 pM より低い IC_{50} によって特徴付けられる。

【0075】

いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、 $\text{Flt} - 1$ に選択的に結合し、他の VEGF 受容体への最小の、またはわずかな結合を有する。いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、 $\text{Flt} - 1$ に選択的に結合し、 $\text{VEGFR2}(\text{Flk} - 1)$ 及び/または $\text{VEGFR3}(\text{Flt} - 4)$ 受容体への最小の、またはわずかな結合を有する。

【0076】

いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、 $\text{Flt} - 1$ に選択的に結合し、他の哺乳動物 $\text{Flt} - 1$ 受容体への最小の、またはわずかな結合を有する（例えば、 10^{-7} M または 10^{-6} M 未満の結合親和性で）。いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、ヒト $\text{Flt} - 1$ に選択的に結合し、サル $\text{Flt} - 1$ には結合しない。いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、ヒト $\text{Flt} - 1$ に選択的に結合し、マウス $\text{Flt} - 1$ には結合しない。

【0077】

いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、ヒト $\text{Flt} - 1$ ならびにサル $\text{Flt} - 1$ に結合する。いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、ヒト $\text{Flt} - 1$ ならびにマウス $\text{Flt} - 1$ に結合する。

【0078】

いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、 IgG 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 $\text{F}(\text{ab})_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 ScFvs 、ダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディからなる群から選択される。

【0079】

いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、 IgG である。いくつかの実施形態において、抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体、またはその抗原結合断片は、 IgG1 である。

【0080】

いくつかの実施形態において、適切な抗 $\text{Flt} - 1$ 抗体は、 FcRn 受容体に結合する Fc ドメインまたはその一部を含む。非限定的な例として、適切な Fc ドメインは、 IgG などの免疫グロブリンのサブクラスから誘導することができる。いくつかの実施形態において、適切な Fc ドメインは、 IgG1 、 IgG2 、 IgG3 、または IgG4 から誘導される。特に適切な Fc ドメインには、ヒトまたはヒト化抗体由来のものが含まれる。

【0081】

Fc ドメインと FcRn 受容体との間の結合の改善は、血清半減期の延長をもたらすと考えられる。したがって、いくつかの実施形態において、適切な Fc ドメインは、 FcRn への結合の改善につながる、1つ以上のアミノ酸突然変異を含む。 FcRn への結合の改善に影響する Fc ドメイン内の種々の突然変異は、当該技術分野において既知であり、本発明を実施するために適合可能であり得る。いくつかの実施形態において、適切な Fc ドメインは、ヒト IgG1 の $\text{Thr} \ 250$ 、 $\text{Met} \ 252$ 、 $\text{Ser} \ 254$ 、 $\text{Thr} \ 256$ 、 $\text{Thr} \ 307$ 、 $\text{Glu} \ 380$ 、 $\text{Met} \ 428$ 、 $\text{His} \ 433$ 、及び/または $\text{Asn} \ 434$ に相当する1つ以上の位置に、1つ以上の突然変異を含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、抗 $\text{FLT} - 1$ 抗体または抗原結合断片は、スペーサーを含有し、及び/または別の実体に結合される。いくつかの実施形態において、リンカーまたはスペーサーは、 $\text{GAPGGGGGAAAAAGGGGGGAP}$ （配列番号1）（ GAG リンカー）と少なくとも50%（例えば、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一である配列を含む。いくつかの実施形態において、リンカーまたはスペー

10

20

30

40

50

サーは、G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G
G A P (配列番号2) (G A G 2 リンカー) と少なくとも50% (例えば、少なくとも5
5%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、9
7%、98%、99%、または100%) 同一である配列を含む。いくつかの実施形態に
おいて、リンカーまたはスペーサーは、G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P G
G G G G A A A A A G G G G G G A P G G G G G A A A A A G G G G G G A P (配列番号
3) (G A G 3 リンカー) と少なくとも50% (例えば、少なくとも55%、60%、6
5%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、9
9%、または100%) 同一である配列を含む。

【0083】

抗 F l t - 1 抗体及び抗原結合断片の産生

本発明に適した組換え抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片は、任意の利用可能な手段
によって産生することができる。例えば、組換え抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片は
、組換え抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片をコードする核酸を発現するように操作さ
れた宿主細胞系を利用することによって、組換え的に産生することができる。

【0084】

抗体が組換え的に産生される場合、任意の発現系を使用することができる。本の数例を
挙げれば、既知の発現系には、例えば、卵、バキュロウイルス、植物、酵母、または哺乳
動物細胞が挙げられる。

【0085】

いくつかの実施形態において、本発明に適した組換え抗 F l t - 1 抗体または抗原結合
断片は、哺乳動物細胞において産生される。本発明により使用することができる哺乳動物
細胞の非限定的な例には、B A L B / c マウス骨髄腫株 (N S O / 1、E C A C C No
: 8 5 1 1 0 5 0 3)、ヒト網膜芽細胞 (P E R . C 6、C r u C e l l、L e i d e n
、T h e N e t h e r l a n d s)、及び S V 4 0 (C O S - 7、A T C C C R L
1 6 5 1) により形質転換されたサル腎臓 C V 1 株が挙げられる。

【0086】

いくつかの実施形態において、本発明は、ヒト細胞から産生された組換え抗 F l t - 1
抗体または抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、C H O から
産生された抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片を提供する。

【0087】

医薬組成物及び投与

本発明は、本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片、及び生理学的
に許容される担体または賦形剤を含有する医薬組成物を提供する。

【0088】

適切な医薬上許容される担体には、水、塩溶液 (例えば、N a C l)、生理食塩水、緩
衝生理食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアゴム、植物油、ベンジ
ルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトースなどの炭水化物、アミロ
ースもしくはデンプン、マンニトール、スクロースなどの糖類、デキストロース、ステア
リン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロ
キシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど、ならびにこれらの組み合わせが挙げ
られるが、これらに限定されない。医薬製剤は、必要に応じて、活性化化合物と有害に反応
しないか、または活性を妨害しない補助剤 (例えば、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、
乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、緩衝剤、着色剤、香味剤及び/または芳香物質など)
と混合することができる。好ましい実施形態において、静脈内投与に適した水溶性担体が
使用される。

【0089】

適切な医薬組成物または医薬品は、必要に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、また
はpH緩衝剤を含有することもできる。組成物は、液体溶液、懸濁液、エマルジョン、錠
剤、丸薬、カプセル、徐放性製剤、または粉末とすることができる。組成物はまた、トリ

10

20

30

40

50

グリセリドなどの従来の結合剤及び担体を用いて坐剤として製剤化することもできる。経口製剤は、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。

【0090】

医薬組成物または医薬品は、人間への投与に適合した医薬組成物として、常法に従って製剤化することができる。例えば、いくつかの実施形態において、静脈内投与用の組成物は、通常、無菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要ならば、この組成物はまた、可溶化剤及び注射部位での痛みを和らげるための局所麻酔剤を含んでもよい。一般に、成分は、別々に、または単位投与形態中に一緒に混合されるかのいずれかで、例えば、活性剤の量を表示するアンプルまたは小袋 (sachette) などの密閉型容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。組成物が輸注により投与される場合、これは、滅菌医薬品グレードの水、生理食塩水またはデキストロース/水を含む輸液ボトルで分配され得る。組成物が注射によって投与される場合、成分を投与前に混合することができるように、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができる。

【0091】

投与の経路

本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片 (あるいは、本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片を含む組成物もしくは医薬品) は、適切な経路で投与される。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片タンパク質もしくはそれらを含む組成物は、非経口投与される。非経口投与は、静脈内、皮内、髄腔内、吸入、経皮 (局所)、眼内、筋肉内、皮下、筋肉内、及び/または経粘膜投与であってもよい。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片もしくはそれらを含む組成物は、皮下投与される。本明細書で 사용되는場合、「皮下組織」は、皮膚の直下の疎な不規則な結合組織として定義される。例えば、皮下投与は、大腿部、腹部、臀部、または肩甲部が挙げられるが、これらに限定されない領域に組成物を注射することによって実行することができる。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片もしくはそれらを含む組成物は、静脈内投与される。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体またはその抗原結合断片もしくはそれらを含む組成物は、髄腔内投与される。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片もしくはそれらを含む組成物は、経口投与される。必要に応じて、複数の経路を同時に使用することができる。

【0092】

いくつかの実施形態において、投与は、個体において局所的効果だけをもたらすが、一方他の実施形態においては、投与は、個体の複数の部分の全体にわたる効果、例えば、全身的效果をもたらす。典型的には、投与は、抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片の、肺及び心臓が挙げられるが、これらに限定されない、1つ以上の標的組織への送達をもたらす。

【0093】

投与形態及び投与計画

いくつかの実施形態において、組成物は、治療有効量で、及び/または特定の所望の転帰 (例えば、気管支肺異形成症などの慢性肺障害を治療すること、またはそのリスクを低減することによる) に関連している投与計画に従って投与される。

【0094】

本発明に従って投与される特定の用量または量は、例えば、所望の転帰の性質及び/または程度に、投与の経路及び/またはタイミングの詳細に、ならびに/もしくは1つ以上の特性 (例えば、体重、年齢、既往歴、遺伝的特性、生活様式パラメータ、心臓の欠陥の重症度及び/または心臓の血管のレベルなど、もしくはこれらの組み合わせ) に応じて変化してもよい。このような用量または量は、当業者によって決定することができる。いくつかの実施形態において、適切な用量または量は、標準的な臨床技術に従って決定される

。代替的または追加的に、いくつかの実施形態において、適切な用量または量は、1つ以上のインビトロまたはインビボアッセイの使用を通して決定され、投与される所望のまたは最適な投与範囲もしくは量を特定する助けとなる。

【0095】

様々な実施形態において、抗F1t-1抗体またはその抗原結合断片は、治療有効量で投与される。一般に、治療有効量は、対象にとって有意義な利益を達成する（例えば、基礎疾患または病態を治療し、調節し、治癒し、予防及び/または改善する）のに十分なものである。いくつかの特定の実施形態において、投与されるのに適切な用量または量は、インビトロまたは動物モデル試験システムから導出される用量反応曲線から推定することができる。

10

【0096】

いくつかの実施形態において、提供される組成物は、医薬製剤としてもたらされる。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、気管支肺異形成症などの慢性肺障害の罹病率またはリスクの低減の達成に相関している投与計画に従って、投与のための単位用量または量であるか、またはそれを含む。

【0097】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、単回投与として投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、規則的な間隔で投与される。本明細書で使用される場合の「間隔」での投与は、治療有効量が周期的に（単回投与とは区別して）投与されることを示す。この間隔は、標準的な臨床技術によって決定することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、隔月、毎月、月に2回、3週間毎、隔週、毎週、週に2回、週に3回、毎日、1日2回、またはさらには6時間毎に投与される。単一の個体に対する投与間隔は、固定間隔である必要はなく、個体のニーズに応じて、時とともに変化することができる。

20

【0098】

本明細書で使用される場合、「隔月」という用語は、2ヶ月に1回（すなわち、2ヶ月毎に1回）を意味し、「毎月」という用語は、1ヶ月に1回の投与を意味し、「3週間毎」という用語は、3週間に1回（すなわち、3週間毎に1回）の投与を意味し、「隔週」という用語は、2週間に1回（すなわち、2週間毎に1回）の投与を意味し、「毎週」という用語は、1週間に1回を意味し、及び「毎日」という用語は、1日1回の投与を意味する。

30

【0099】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、規則的な間隔で無期限に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、規則的な間隔で定められた期間の間に投与される。

【0100】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、出生前に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、出生後に投与される。

40

【0101】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、約0.5mg/kg体重、約1.0mg/kg体重、約10mg/kg体重、または約20mg/kg体重の用量で投与される。

【0102】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗F1t-1抗体または抗原結合断片を含む製剤は、約0.5mg/kg体重～約20mg/kg体重、例えば、約1mg/kg体重～約10mg/kg体重の範囲で投与される。

50

【 0 1 0 3 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片を含む製剤は、約 3 5 m g、約 7 0 m g、約 7 0 0 m g、または約 1 4 0 0 m g の単位用量で成体に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片を含む製剤は、約 3 5 m g ~ 約 1 4 0 0 m g、例えば、約 7 0 m g ~ 約 7 0 0 m g の範囲の用量で投与される。

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片を含む製剤は、約 2 m g、約 4 m g、約 4 0 m g、または約 8 0 m g の単位用量で乳児に投与される。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片を含む製剤は、約 2 m g ~ 約 8 0 m g、例えば、約 4 m g ~ 約 4 0 m g の範囲の用量で投与される。

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体、またはその抗原結合断片の投与は、少なくとも 1 つの B P D の兆候または症状の強度、重症度、または頻度を低減し、もしくはその発症を遅延させる。いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体、またはその抗原結合断片の投与は、肺炎症、肺癒痕化、肺成長の障害、早期肺損傷、長期の呼吸不全、肺感染症、運動不耐性、及び有害な神経学的転帰からなる群から選択される少なくとも 1 つの B P D の兆候または症状の強度、重症度、または頻度を低減し、もしくはその発症を遅延させる。

【 0 1 0 6 】

併用療法

いくつかの実施形態において、抗 F l t - 1 抗体または抗原結合断片は、1 つ以上の既知の治療薬（例えば、コルチコステロイド）と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態において、既知の治療薬（複数可）は、その標準的なもしくは承認された投与計画及び/またはスケジュールに従って投与される。いくつかの実施形態において、既知の治療薬（複数可）は、その標準的なもしくは承認された投与計画及び/またはスケジュールと比べて変更されている計画に従って投与される。いくつかの実施形態において、このような変更された計画は、1 つ以上の単位用量が、量で変更されている（例えば、低減または増加されている）という点で、及び/または投与が頻度で変更されているという点で（例えば、単位用量間の 1 つ以上の間隔が、より低い頻度をもたらすように広げられているか、またはより高い頻度をもたらすように狭められているという点で）標準的なもしくは承認された投与計画及び/またはスケジュールとは異なる。

【実施例】

【 0 1 0 7 】

実施例 1 . 高親和性抗 F l t - 1 抗体の生成及び特性評価

抗体 0 1 A 0 4

抗体を、従来のマウスモノクローナル抗体方法論を用いて、可溶性 F l t - 1 に対して生成した。簡単に言うと、B a l b / c マウスを、組換えヒト可溶性 F l t - 1 (A B C A M から購入) で免疫化した。免疫化から 2 0 日後に、動物を、E L I S A により抗 s F l t - 1 について力価測定した (図 1) 。 1 匹のマウスは、高力価レスポンドであることが判明し、この動物を、その後、抗原で追加免疫し、5 日後に殺処分した。この動物からの脾臓及びリンパ節細胞を、マウス黒色腫パートナーに融合させて、ハイブリドーマを生成した。ハイブリドーマの上清を、s F l t - 1 抗原に対してスクリーニングし、陽性レスポンドをスケールアップして、ヒト及びマウス s F l t - 1 の両方への結合、ならびに V E G F 結合に対して s F l t - 1 と競合する能力について再アッセイした。ヒト及びマウス s F l t - 1 の両方に結合することができる交差反応性ハイブリドーマは存在しなかった。しかしながら、ヒト s F l t - 1 反応性ハイブリドーマの中で、数個の s F l t - 1 : V E G F アンタゴニストを、競合 E L I S A によって特定した (代表的な実験については、図 2 を参照されたい) 。これらの最も強力な融合パートナー 0 1 A 0 4 を、3

ラウンドの単一細胞クローニングにかけ、モノクローナル抗体 01A04 を得た。この抗体を、sFlt-1 抗原に対する結合親和性 (ELISA、BIACORE 及び FACS)、sFlt-1:VEGF 競合 ELISA における IC50、及び細胞ベースのアッセイにおける性能についてさらに特性評価した。

【0108】

抗体 01A04 の特性評価 - 結合

融合パートナーの親のクローニング及びサブクローニング後に、01A04 の親の複数のサブクローンが、固定化可溶性 Flt-1 への結合を立証した (図 3)。これらのサブクローンのうちの 1 つのモノクローナル 01A04-02B10-02G07 を、抗原への結合、クローンの形態及び生存能力に基づいて、スケールアップ及び細胞 banking 用に選択した。01A04-02B10-02G07 の sFlt-1 抗原に対する結合定数を、表面プラズモン共鳴方法論 (BIACORE、図 4 を参照) を介して決定した。モノクローナル抗体 01A04-02B10-02G07 は、ヒト sFlt-1 へのサブナノモルバインダーである。

【0109】

抗体 01A04 の特性評価 - 交差反応性

モノクローナル抗体 01A04 の細胞上で発現した Flt-1 受容体への結合を、FACS で試験した。全ての 3 つの細胞株への結合を、これら細胞を抗体と 1 時間インキュベートすることによって試験した。次いで、抗体の細胞への結合を、抗マウス IgG PE 抗体で明らかにした。結果を図 5 に示す。ELISA 及び BIACORE データと一致して、モノクローナル抗体 01A04 は、マウス Flt-1 に結合しない。しかしながら、この抗体は、細胞上で発現したヒト及びカニクイザル (cynomolgus) Flt-1 には結合する。

【0110】

抗体 01A04 の特性評価 - 競合

抗体の有効性を推定するために、ラマの Fab 及び IgG のスクリーニング用の設定である競合 ELISA (ヒト sFlt-1 及び VEGF を使用する) を使用した。10 ~ 0.01 µg/ml の濃度範囲の IgG を試験した。モノクローナル抗体 01A04 を、陰性対照 (精製ポリクローナルマウス IgG) 及び陽性対照 (市販の抗 sFlt-1 モノクローナル抗体 Abcam 56300) 分子の両方に対してアッセイした。半数阻害濃度 (IC50) 値を算出した。結果を図 6 に示す。

【0111】

抗体 01A04 の特性評価 - 細胞ベースのアッセイ

ヒト初代臍帯静脈内皮細胞 (HUEC) を、可溶性 Flt-1 及びモノクローナル抗体 01A04 の存在または不在下において VEGF で刺激した。VEGF に誘導された細胞の活性化を、VEGF R2 受容体のリン酸化状態を決定することによって、アッセイした。可溶性 Flt-1 の存在下では、VEGF は、VEGF に誘導された HUEC 活性は減衰される。モノクローナル抗体 01A04 の添加は、可溶性 Flt-1 を拮抗することによって、細胞活性化を救済する (図 7)。

【0112】

実施例 2 . 抗 Flt-1 抗体のインビトロ有効性

乳児肺動脈内皮細胞の単離

肺動脈内皮細胞 (PAEC) を、135 日目の妊娠後期 (懐胎期間 147 日) の対照ヒツジ胎児の近位肺動脈から採取した。標準内皮マーカーを用いた免疫組織化学法は、細胞の表現型を確認した。次いで、低継代の PAEC (p4 ~ 5) を、ETX、VEGF、sFlt1 または抗 Flt1 の単独に、または組み合わせに曝した。

【0113】

ETX、VEGF、sFlt1 及び抗 Flt1 に曝されている間の PAEC の増殖

胎児 PAEC を、10% の FBS を補充した DMEM 中で 50,000 細胞/ウェルにて 12 ウェルプレートに三通りでプレートし、21% の酸素中で一晩接着させた。翌日に

10

20

30

40

50

(0日目)、細胞をPBSで2回洗浄した。VEGF、ETX、sFlt1、または抗Flt1(単独または組み合わせて)を含む2.5%のFBSで補充したDMEMを添加し、細胞を21%の酸素中でインキュベートした。外因性因子の最終濃度は、次のとおりである: VEGF 50 ng/mL、ETX 1 ng/mL、sFlt1 114 ng/mL、及び抗Flt1 1800 ng/mL。実験培地を毎日交換し、細胞を、0.25%のトリプシンを用いて取り外してから3日後に計数し、細胞カウンター(Beckman Coulter; Fullerton, CA)で計数した。処置による増殖試験を、2.5%のFBSで補充したDMEM中で行い、これは、この濃度が、胎児PAEC生存をいくつかの増殖を伴いながら支援する最低血清濃度であることを決定した以前の研究に基づくものであった。

10

【0114】

PAECチューブ形成アッセイ

インビトロ血管形成をアッセイするために、我々は、0.2%のフラビンモノヌクレオチド及びUV Stratalinker 1800(Stratagene)を用いて、ラットの尾部のコラーゲンを架橋させた。50,000細胞/ウェルを、ETX、VEGF、sFlt1及び抗Flt1(単独または組み合わせて)で補充した無血清DMEM培地に添加し、各条件をそれぞれの動物について三通りで試験した。次いで、PAECを、チューブ形成が21%の酸素と比べて3%でより堅牢であることを決定した以前の研究に基づいて3%の酸素条件下で、12~18時間インキュベートした。分岐点計数を、ウェル当たり3~4の視野を有する3つのウェルのそれぞれからの10倍の倍率下で、盲検

20

様式で行った。ウェルを、Olympus IX71蛍光顕微鏡(Olympus)を用いて画像化した。

【0115】

統計的分析

統計的分析を、Prismソフトウェアパッケージ(v.5.0a、GraphPad)で行った。ボンフェローニ事後検定(Bonferroni post-test)分析による反復測定による一元配置分散分析法(ANOVA)を行った。0.05未満のP値を有意とみなした。

【0116】

抗Flt-1抗体のsFLTに曝されたPAECへの投与

細胞を、組換えヒトVEGF(50 ng/mL)、組換えヒト可溶性Flt-1(sFLT、114 ng/mL)またはヒト可溶性Flt-1に対する抗体(a-sFLT、1800 ng/mL)の単独または組み合わせて処置した。PAECの増殖を処置から3日後に測定し、チューブ分岐点の数を処置から24時間後に計測した。

30

【0117】

結果

図8に示すように、sFLT及びVEGFによる処置は、VEGF処置のみによって処置された細胞と比べてPAECの数を減少させ、sFLTは、VEGFが細胞増殖を促進することを防止することを示唆している。sFLT及びa-sFLTの両方がVEGFと組み合わされたとき、PAECの数は、細胞がVEGFのみで処置された場合にみられるレベルまで引き上げられ、a-sFLTが、細胞増殖におけるsFLTに誘導される減少を阻害することを裏付けている。

40

【0118】

図10に示すように、VEGF単独による処置は、VEGF及びa-sFLTによる処置と同じように、チューブ分岐点の数を増加させた。これとは対照的に、VEGF及びsFLTによる処置は、VEGFのみによって処置された細胞と比べて、分岐点の数を減少させた。sFLT及びa-sFLTの両方がVEGFと組み合わされたとき、分岐点の数は、VEGFのみの群で見られた数と匹敵し、a-sFLTは、分岐点の数のsFLTに誘導される減少を阻害することを裏付けている。

【0119】

50

抗 F l t - 1 抗体の E T X に曝された P A E C への投与

細胞を、V E G F (5 0 n g / m L)、エンドトキシン (E T X、1 n g / m L)、V E G F + E T X、E X T + a - s F L T (1 8 0 0 n g / m L) または E X T + V E G F + a - s F L T のいずれかで処置した。P A E C の増殖を、処置から 3 日後に測定し、チューブ分岐点の数を処置から 2 4 時間後に計測した。

【 0 1 2 0 】

結果

図 9 に示すように、P A E C の増殖は、対照 (C T L) と比べて V E G F の処置後に増加し、E T X での未処置された P A E C は、対照と比べて増殖の減少を示した。V E G F または a - s F L T のいずれかと E T X との組み合わせは、E T X、V E G F 及び a - s F L T による処置と同じように、細胞数を対照群で見られるレベルまで引き上げ、V E G F または a - s F L T のいずれかによる処置が、E T X の P A E C の増殖に及ぼす有害な効果を逆転させることができることを裏付けている。

10

【 0 1 2 1 】

図 1 1 に示すように、分岐点の数は、V E G F のみによる処置後に増加し、E T X でのみ処置された細胞は、対照及び V E G F 処置群の両方と比べて、分岐点の数の減少を示した。V E G F または a - s F L T のいずれかと E T X との組み合わせは、E T X、V E G F 及び a - s F L T による処置と同じように、分岐点の数を対照群で見られたレベルまで引き上げ、V E G F または a - s F L T のいずれかによる処置が、E T X のチューブの分岐点の数に及ぼす有害な効果を逆転させることができることを裏付けている。

20

【 0 1 2 2 】

実施例 3 . B P D の E T X モデルにおける抗 F l t - 1 抗体のインビボ有効性
動物

全ての手順及びプロトコルは、コロラド大学健康科学センター (U n i v e r s i t y o f C o l o r a d o H e a l t h S c i e n c e s C e n t e r) の動物実験委員会 (A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e) によって承認されたものであった。妊娠中のスプラグ・ドーリー (S p r a g u e - D a w l e y) ラットを、C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s (W i l m i n g t o n , M A) から購入し、出産前の少なくとも 1 週間、デンバーの高度で室内気で維持した (1 , 6 0 0 m、大気圧 6 3 0 m m H g、吸入気酸素分圧 1 2 2 m m H g)。動物に不断給餌し、1 2 時間毎に交互に代わる昼夜サイクルに曝した。ラットを、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射 (0 . 3 m g / g 体重 ; F o r t D o d g e A n i m a l H e a l t h , F o r t D o d g e , I A) で殺処分した。

30

【 0 1 2 3 】

動物モデル及び試験デザイン

羊膜内 E T X、ビタミン D 及び抗 s F L T の投与

絨毛羊膜炎の動物モデルを利用した。妊娠 2 0 日目に (懐胎期間 2 2 日) に、妊娠ラットを、羊膜内 (I A) 注射を受けるように準備した。ラットにおける肺発生の後期管状期中の注射のタイミングを、B P D の最高のリスクにある 2 4 ~ 2 6 週の早期新生児におけるヒトの肺発生の同様な段階に匹敵するように選択した。ブプレノルフィンによる前投薬 (0 . 0 1 ~ 0 . 0 5 m g / k g、皮下注射) の後に、フェースマスク (麻酔器 : M i d m a r k による M a t r x、モデル V I P 3 0 0 0) を介しての 1 ~ 2 % のイソフルラン吸入を用いた全身麻酔下で開腹術を行い、低体温症を防止するために、妊娠ラットを加熱パッド上に保持した。妊娠ラットを、1 つの試験において、生理食塩水対照 (C T R)、エンドトキシン (E T X)、または E T X + ビタミン D (v i t D) 群に、もしくは他の試験において、生理食塩水対照 (C T R)、エンドトキシン (E T X) または E T X + 抗 s F L T に無作為に割り付けした。C T R 群は、羊膜囊当たり通常 1 3 6 生理食塩水 5 0 μ l を受容し、E T X 群は、羊膜囊当たり、通常生理食塩水で 5 0 μ l に希釈した大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) 0 5 5 : B 5 5 E T X (S i g m a C h e m i c a l , S t L o u i s , M O) の 1 0 μ g を受容し、E T X + v i t D 群は、

40

50

10 μg の大腸菌055:B55 ETX及び通常生理食塩水で50 μl に希釈された50 pgを受容し、ETX+抗sFLT群は、10 μg の大腸菌055:B55 ETX及び低用量(1 \times モル当量)もしくは高用量(10 \times モル当量)の抗sFlt1抗体を受容した。無菌準備下で、3~4 cmの長さの正中線腹部切開を行って羊膜嚢をIA注射用に露出させた。右卵巣に最も近い羊膜嚢を最初に特定して注射し、その後、反時計回りの順序で各羊膜嚢を特定して、母体当たり最大10個の羊膜嚢に注射した。注射は、IA ETXの蓄積用量による全身毒性に起因する母体死亡を防止するために、10個の羊膜嚢までに制限された。ETXの用量を、ETXが低用量(1~5 μg /嚢)では、14日齢で異常な肺構造を誘導することに失敗するとの以前の研究から確立した。vit Dの用量は、これも、vit Dが高用量(500 ng/gm)で、子ラットにおいて皮下カルシウム沈着を生じることを立証する以前の研究から確立した。腹部切開をナイロン縫合系で閉じた。術後疼痛の制御のために、ブピバカイン(1~2 mg/kg、筋肉内注射)を切創上に適用した。術後10分以内の覚醒を確実にするために、妊娠ラットを注意深く監視し、ラットをケージに戻し、活動及び出血または感染の兆候を監視した。

【0124】

帝王切開

IA注射から2日後に、上述したようなイソフルラン吸入による全身麻酔下で、妊娠ラットで帝王切開を行った。右卵巣に最も近い羊膜嚢内の胎児を娩出させ、その後、反時計回りの順序で残りの胎児を娩出させて、IA注射に曝された胎児を特定した。帝王切開は、羊膜嚢の順序及びそれらの卵巣に関連する解剖学的位置に基づいて、特異的IA注射に曝された胎児を特定するために、経膣分娩の代わりに行った。注射された羊膜嚢内の子ラットの全てを、麻酔の開始から5分以内に娩出させた。次いで、母親ラットをペントバルビタールナトリウムで安楽死させた。新生児ラットを、素早く乾燥させて、加熱パッド上に置き、低体温症を回避させた。子ラットは、出生時には、酸素補充または人工呼吸器を受けさせなかった。出生から30分以内に、子ラットを秤量し、組織学検査用に殺処分にするか、または養母ラットのそばに置き、14日間生育させた。組織学的評価のために、ラットの肺を出生時及び14日齢に採取した。出生から試験期間を通して、乳児ラットの生存を毎日監視し、記録した。生存率を、各所定の同腹子における羊膜内注射を受けた羊膜嚢の数で割られた生存した子ラットの数として算出した。

【0125】

試験の測定

組織学的分析用の組織

動物を腹腔内ペントバルビタールナトリウムで殺処分した。カテーテルを気管内に置き、肺を4%のパラホルムアルデヒドで膨張させて、20 cmのH₂O圧で60分間維持した。結紮を気管の周りで締め付けて圧力を維持し、カニューレを取り外した。肺を、固定化のために、4%のパラホルムアルデヒド中で、室温にて一晚浸漬させた。2 mmの厚さの横断面を、それぞれ、動物ごとに固定した肺の右下葉及び左下葉の中央平面から採取した。各動物からの2つの部分を処置し、試験用にパラフィンワックス中に包埋した。

【0126】

気管支肺胞洗浄

気管支肺胞洗浄を、標準的技術に従って出生日に(0日目に)行い、肺のsFLTレベルを測定した。

肺胞分岐数(RAC)

【0127】

肺胞形成を、Emery及びMithalのRAC法によって、記載されるように評価した(Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1-postnatal lung growth. Thorax 37:572-579, 1982; Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of E

10

20

30

40

50

mery and Mithal: a reappraisal 2 - intra uterine and early postnatal lung growth. Thorax 37: 580 - 583, 1982)。呼吸細気管支を、壁の一部において上皮によって覆われた細気管支として特定した。呼吸細気管支の中心から垂直線を細葉結合組織または中隔もしくは胸膜の縁部まで下ろし、この線で交差された中隔の数を計測した。

【0128】

統計的分析

統計的分析を、Prismソフトウェアパッケージ(v. 5.0a、Graph Pad)で行った。ボンフェローニ事後検定分析による反復測定による一元配置分散分析法(ANOVA)を行った。0.05未満のP値を有意とみなした。

10

【0129】

結果

図12に示すように、sFLTレベルは、対照群と比べて子宮内でETXに曝されたラットで有意に(* $p < 0.05$)増加し、ビタミンDによる処置は、対照群で見られるレベルまでsFLTのレベルを減少させた。これは、ビタミンDによる処置が、肺におけるsFLTのレベルに及ぼすビタミンDの作用を介してBPDを治療するための治療薬として使用することができることを裏付けている。

【0130】

図13に示すように、形態計測的分析によって、RACは、対照群と比べて子宮内でETXに曝されたラットで減少し、ETXに曝されたラットにおける抗sFLTによる子宮内投与は、ETXにのみ曝された群と比べて、RACを有意に(* $p < 0.05$)増加させた。これは、抗sFLTによる治療が、BPDのための治療薬として使用することができることを裏付けている。

20

【0131】

実施例4．BPDのsFLTモデルにおける抗Flt-1抗体のインビボ有効性 動物

全ての手順及びプロトコルは、コロラド大学健康科学センターの動物実験委員会によって承認されたものであった。妊娠中のスプラグ・ドーリー(Sprague-Dawley)ラットを、Charles River Laboratories(Wilmington, MA)から購入し、出産前の少なくとも1週間、デンバーの高度で室内気で維持した(1,600m、大気圧630mmHg、吸入気酸素分圧122mmHg)。動物に不断給餌し、12時間毎に交互に代わる昼夜サイクルに曝した。ラットを、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射(0.3mg/g体重; Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA)で殺処分した。

30

【0132】

試験デザイン

羊膜内sFlt-1の投与

妊娠20日目に(懐胎期間22日)に、妊娠ラットを、羊膜内(IA)注射を受けるように準備した。ラットにおける肺発生の後期管状期中の注射のタイミングを、BPDの最高のリスクにある24~26週の早期新生児におけるヒトの肺発生の同様な段階に匹敵するように選択した。ブプレノルフィンによる前投薬(0.01~0.05mg/kg、筋肉内注射)の後に、フェースマスク(麻醉器: MidmarkによるMatrix、モデルVIP3000)を介しての1~2%のイソフルラン吸入を用いた全身麻醉下で開腹術を行った。麻醉及び開腹術中に、低体温症を防止するために、妊娠ラットを加熱パッド上に保持した。妊娠ラットを、生理食塩水対照またはsFlt-1群に無作為に割り付けし、生理食塩水群は、羊膜嚢当たり通常生理食塩水50 μ lを受容し、sFlt-1群は、羊膜嚢当たり通常生理食塩水で50 μ Lに希釈された組換えヒトsFlt-1-Fc(R&D Systems, Minneapolis, Minnesota)の50 μ gを受容した。一方のsFLT群は、抗sFLTの低用量(1 \times モル当量)の抗sFLTを受容し、他方は、高用量(10 \times モル当量)の抗sFlt1を受容した。無菌準備下で、3~4

40

50

c mの長さの正中線腹部切開を行って羊膜嚢を羊膜内注射用に露出させた。右卵巢に最も近い羊膜嚢を最初に特定して注射し、その後、反時計回りの順序で各羊膜嚢を特定して、母体当たり最大10個の羊膜嚢に注射した。羊膜内物質の胎児及び母体循環への移動を媒介するために、胎盤の胎児面上の胎児脈管構造の微視的ネットワークによって特徴付けられる、羊膜内sFlt-1が膜内経路を通して母体循環に吸収されることを考慮して、対照として機能する羊膜内生理食塩水を個々の母親ラットでsFlt-1の一貫した総用量を達成するために、sFlt-1注射を妊娠ラット当たり10個の羊膜脳に制限した。同様に、膜内経路を通しての羊膜腔と母体及び胎児循環との間の連通を考慮して、羊膜内生理食塩水を対照として機能するように別々の同腹子で提供した。開腹術中に、各母親ラットの羊膜嚢の総数を検査し、記録した。腹部切開をナイロン縫合糸で閉じた。術後疼痛の制御のために、ブピバカイン(1~2 mg/kg、皮下注射)を切創上に適用した。術後10分以内の覚醒を確実にするために、妊娠ラットを注意深く監視し、ラットをケージに戻し、活動、飲食の能力、及び出血または感染の兆候を監視した。

10

【0133】

帝王切開

羊膜内注射から2日後に、上述したようなイソフルラン吸入による全身麻酔下で、妊娠ラットで帝王切開を行った。右卵巢に最も近い羊膜嚢内の胎児を娩出させ、その後、反時計回りの順序で残りの胎児を娩出させて、羊膜内注射に曝された胎児を特定した。各母親ラットの羊膜嚢の総数を、分娩時にさらに確認した。経膈分娩させる代わりに帝王切開を行う主な理由は、羊膜嚢の順序及びそれらの卵巢に関連する解剖学的位置に基づいて、羊膜内注射に曝された胎児を特定することである。注射された羊膜嚢内の子ラットの全てを、麻酔の開始から5分以内に娩出させた。次いで、母親ラットをペントバルビタールナトリウムで安楽死させた。新生児ラットを、加熱パッド上に置き、低体温症を回避させ、ガーゼスポンジで手により乾燥させた。子ラットは、出生時には、酸素補充または人工呼吸器を受けさせなかった。出生から30分以内に、子ラットを秤量し、通常のケージ内で養母ラットのそばに置いた。出生から最初の24時間に、新生児を脂肪または呼吸困難兆候について注意深く監視した。

20

【0134】

ラットの肺を、ウェスタンブロット分析用に出生時に、及び組織学的評価用に14日齢に採取した。心臓を切開し、出生時ならびに7日及び14日齢に秤量した。3~9匹のラットを、各時間点での各測定について、各群で試験を行った。出生から試験期間を通して、乳児ラットの生存を毎日監視し、記録した。生存率を、各所定の同腹子における羊膜内注射を受けた羊膜嚢の数で割られた生存した子ラットの数として算出した。体重を出生時に、及び試験測定のために殺処分される時に測定した。

30

【0135】

試験の測定

組織学的分析用の組織

動物を腹腔内ペントバルビタールナトリウムで殺処分した。カテーテルを気管内に置き、肺を4%のパラホルムアルデヒドで膨張させて、20 cmのH₂O圧で60分間維持した。結紮を気管の周りで締め付けて圧力を維持し、その後、カニューレを取り外した。肺を、固定化のために、4%のパラホルムアルデヒド中で、室温にて24時間浸漬させた。2 mmの厚さの横断面を、それぞれ、動物ごとに固定した肺の右下葉及び左下葉の中央平面から採取し、処置して、パラフィンワックス中に包埋した。

40

【0136】

免疫組織化学

5 µmのパラフィン部分を備えるスライドを、肺胞構造を評価するためにヘマトキシリン及びエオシンで、また血管密度を定量化するために、内皮細胞特異的マーカーであるウィルブランド(Willebrand)(vWF)因子で染色した。

【0137】

肺血管密度

50

肺血管密度を、高倍率視野を通して、 $50\mu\text{m}$ 以下の外径を有するvWF染色された血管を計数することによって決定した。 $>50\mu\text{m}$ の外径を有する大きな気道または血管を含有する視野は避けた。

【0138】

肺胞分岐数(RAC)

肺胞形成を、Emery及びMithalのRAC法によって、記載されるように評価した(Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 1 - postnatal lung growth. Thorax 37: 572 - 579, 1982; Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2 - intrauterine and early postnatal lung growth. Thorax 37: 580 - 583, 1982)。呼吸細気管支を、壁の一部において上皮によって覆われた細気管支として特定した。呼吸細気管支の中心から垂直線を細葉結合組織または中隔もしくは胸膜の縁部まで下ろし、この線で交差された中隔の数を計測した。

10

【0139】

右心室肥大の指標

右心室(RV)及び左心室に加えて中隔(LV+S)を切開し、秤量した。RVのLV+S重量の比(RV/LV+S%)及びRV/体重(RV/BW%)を決定し、右心室肥大(RVH)を評価した。

20

【0140】

統計的分析

統計的分析を、InStat 3.0ソフトウェアパッケージ(GraphPad Software, San Diego, CA)で行った。統計的比較を、有意性についてのニューマン・コイルス(Newman-Keuls)事後分析によるt検定またはANOVAを用いて群間で行った。 $p < 0.05$ を有意とみなした。

【0141】

結果

図14及び15に示すように、肺血管密度は、sFLTデノミ処置された動物のものと比べて、sFLT+抗sFLTで処置された動物で増加した。

30

【0142】

肺胞形成を、肺胞分岐数(RAC)法により評価した。図16に示すように、形態計測分析によって分析するとき、sFLTラットは、対照群(CTL)と比べて、RACを有意に($P < 0.001$)減少させた。低用量のa-sFLTによる処置は、sFLT群と比べて、RACを有意に($P < 0.01$)増加させた。これは、a-sFLTによる処置が、sFLTによって引き起こされる肺胞形成における減少を逆転させることができることを示している。

【0143】

右心室肥大を、右心室(RV)及び左心室に加えて中隔(LV+S)を秤量し、その比を算出することによって評価した。図17に示すように、sFLTに曝された動物は、対照群と比べて、RV/(LV+S)比を有意に($P < 0.05$)増加させた。低用量のa-sFLTによる処置は、sFLT群と比べて、RV/(LV+S)比を有意に($P < 0.05$)減少させた。これは、a-sFLTによる処置が、sFLTによって引き起こされる右心室肥大を逆転させることができることを示している。

40

【0144】

右心室(RV)の体重に対する比を決定して、右心室肥大を評価した。図18に示すように、sFLTに曝された動物は、対照群と比べて、RV/体重比を有意に($P < 0.05$)増加させた。低用量のa-sFLTによる処置は、sFLT群と比べて、RV/体重比を有意に減少させた($P < 0.05$)。これは、a-sFLTによる処置が、sFLT

50

により引き起こされる右心室肥大を逆転させることができることを示している。

【0145】

実施例5．BPDのエンドトキシン（ETX）モデルにおける抗F1t-1抗体のインビ
ボ有効性

試験デザイン

羊膜内sF1t-1及びETX投与

妊娠20日目に（懐胎期間22日）に、妊娠ラットを、羊膜内注射を受けるように準備した。妊娠ラットを、生理食塩水対照またはETX（エンドトキシン）群に無作為に割り付けし、生理食塩水群は、羊膜嚢への通常生理食塩水の注射を受容し、ETX群は、羊膜嚢当たり10μgのエンドトキシンを受容した。羊膜内投与後に、腹部切開を閉じて、術後の覚醒を確実にするために、ラットを注意深く監視した。

10

【0146】

帝王切開及び処置

羊膜内注射から2日後に、上述したように、妊娠ラットで、全身麻酔下で帝王切開を行った。子ラットを1mg/kgの抗sFLTモノクローナル、10mg/kgの抗sFLTモノクローナルまたは10mg/kgのIgG対照（マウスIgG1アイソタイプ対照）で、1週間に2回、2週間にわたって処置した。

【0147】

試験測定

14日目に、形態計測分析用及び組織学的評価用に、ラットの肺を採取した。動物の体重を、出生時及び殺処分時に計測した。肺を、4%のパラホルムアルデヒドの20cm H₂Oによる膨張後に固定化した。遠位気腔構造を、肺胞分岐数（RAC）によって評価した。心臓を採集し、右心室肥大（RV/LS+S重量）を決定した。

20

【0148】

体重

動物の体重を計測し、出生前ETX処置後の出生後抗F1t-1モノクローナル抗体処置が、体重を改善するかどうかを決定した。ETXを子宮内で投与し、続いてIgG（対照）または抗F1t-1 mAb（1mg/kgまたは10mg/kg）で出生後処置した動物を秤量した。ETXのみ、またはETX+IgGを受容した動物は、対照動物よりも有意に少ない重量であった（図19）。ETX+抗F1t-1 mAbのいずれかの用量を受容した動物の体重は、対照動物の体重とは有意差がなかった。これらのデータは、出生後に抗F1t-1 mAbを供与された動物が、BPDのエンドトキシン誘導モデルにおいて成長の利点を有することを示している。

30

【0149】

肺胞分岐数（RAC）

出生前ETX処置後の出生後抗F1t-1モノクローナル抗体処置が、肺胞の増殖を改善するかどうかを決定するために、肺胞分岐数を測定した。ETXを子宮内で投与し、続いてIgG（対照処置）または抗F1t-1 mAb（1mg/kgまたは10mg/kg）で出生後処置した動物の肺について試験した。ETXのみ、またはETX+IgGを受容した動物は、対照動物と比べて、肺胞増殖を有意に低減することを立証した（図20）。ETX+10mg/kgの抗F1t-1モノクローナル抗体を受容した動物の肺胞増殖は、単独のETXを受容した動物の肺胞増殖よりも有意に良好であった。これらのデータは、出生後に抗F1t-1モノクローナル抗体を供与された動物が、BPDのエンドトキシン誘導モデルにおいて改善された肺構造を有することを示している。

40

【0150】

右心室肥大の指標

出生前ETX処置後の出生後抗F1t-1モノクローナル抗体処置が、右心室心臓肥大（RVH）を予防するかどうかを決定するために、右心室を測定した。ETXを子宮内で投与し、続いてIgG（対照処置）または抗F1t-1 mAb（1mg/kgまたは10mg/kg）で出生後処置した動物の心臓について試験した。ETXのみ、またはET

50

X + I g Gを受容した動物は、対照動物と比べて、右心室比を有意に増加させることを立証した（図21）。ETX + 抗F1t - 1モノクローナル抗体のいずれかの用量を受容した動物の右心室比は、対照動物の右心室比とは有意差がなかった。ETX + 抗F1t - 1モノクローナル抗体のいずれかの用量を受容した動物の右心室比は、単独のETXを受容した動物の右心室比とは有意差があった。これらのデータは、出生後に抗F1t - 1モノクローナル抗体を供与された動物が、BPDのエンドトキシン誘導モデルにおいて減少した肺高血圧症を有することを示している。

【 0 1 5 1 】

肺構造

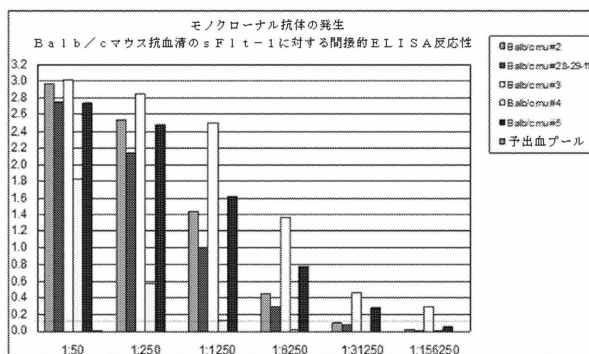
出生前 E T X 処置後の出生後抗 F l t - 1 モノクローナル抗体処置が、肺構造を修復するかどうかを決定するために、肺構造及び肺血管密度を評価した。E T X を子宮内で投与し、続いて I g G (対照処置) または抗 F l t - 1 モノクローナル抗体 (1 m g / k g または 1 0 m g / k g) で出生後処置した動物の心臓について試験した (図 2 2) 。これらのデータは、出生後の抗 s F l t - 1 モノクローナル抗体が、実験的な絨毛羊膜炎において肺構造を修復することを示している。

【 0 1 5 2 】

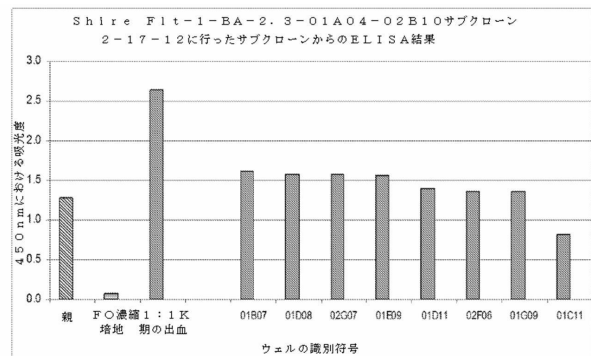
等価物及び範囲

当業者であれば、単なる通常の実験を用いて、本明細書に記載される特定の実施形態の多くの等価物を認識し、または解明することができるであろう。本発明の範囲は、上記説明に限定されることを意図するものではなく、むしろ、以下の特許請求の範囲に記載されるとおりである。

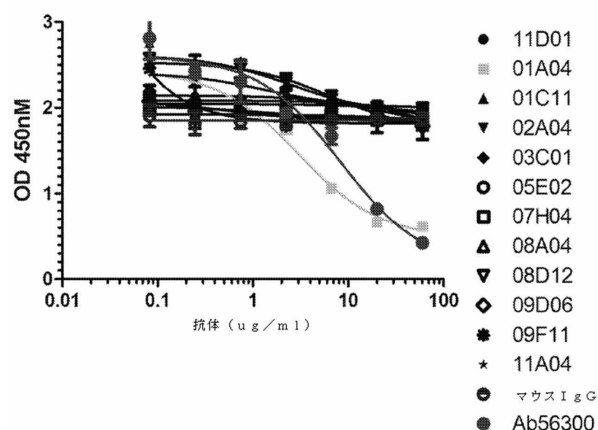
【 図 1 】



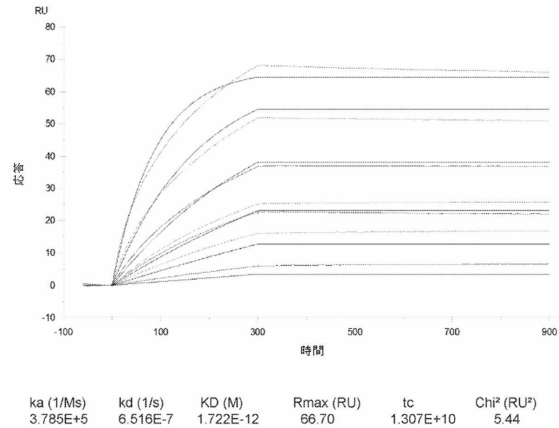
【圖 3】



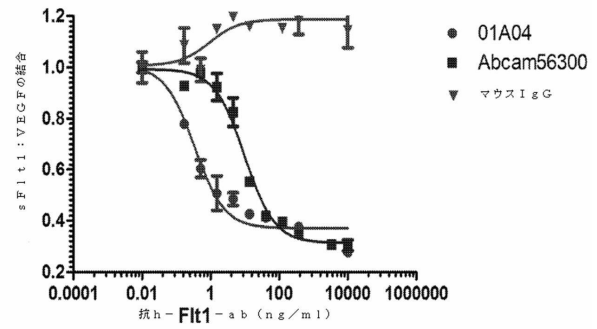
【图 2】



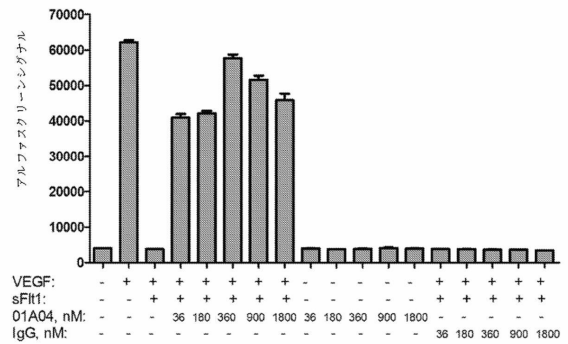
【 図 4 】



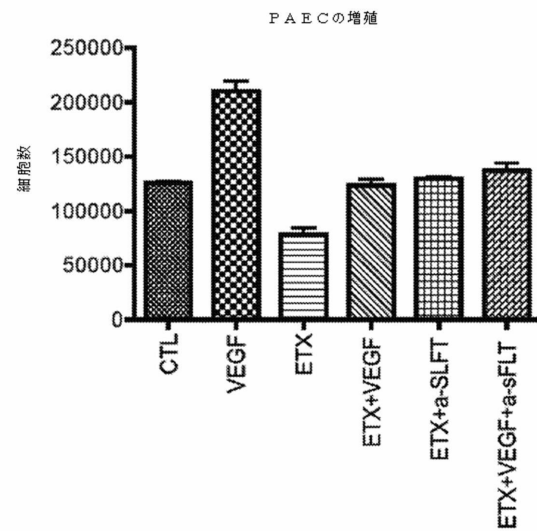
【 図 6 】



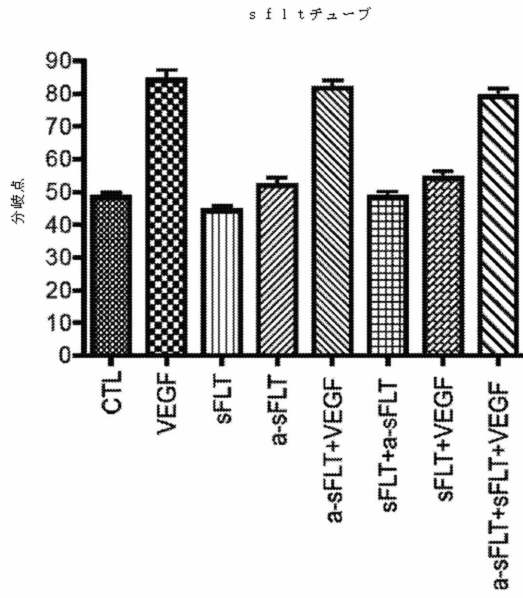
HUV EC VEGF細胞ベースアッセイ



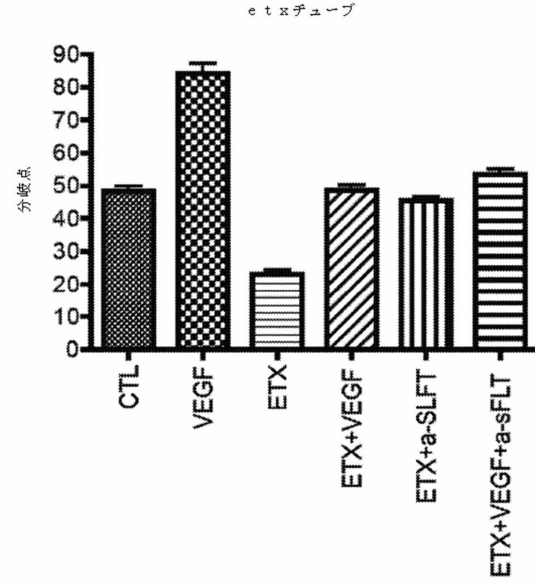
【 図 9 】



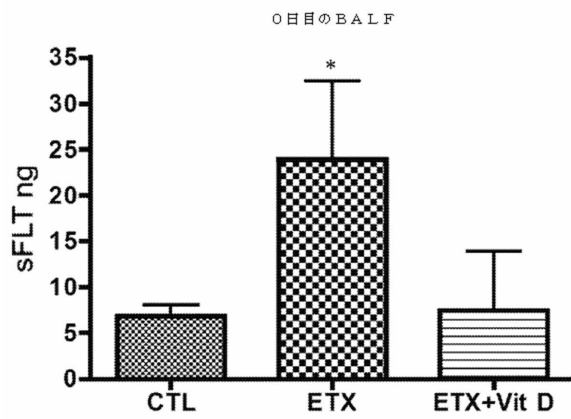
【図10】



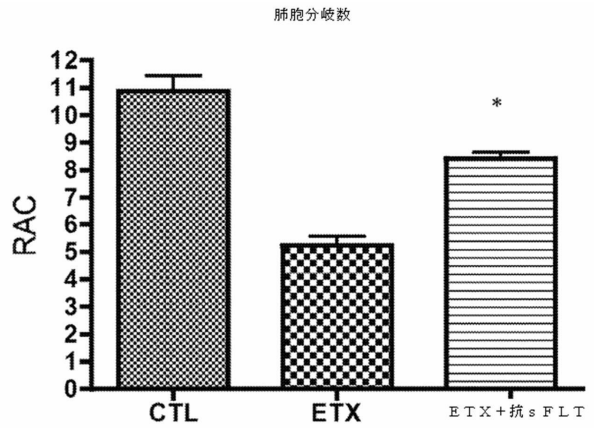
【図11】



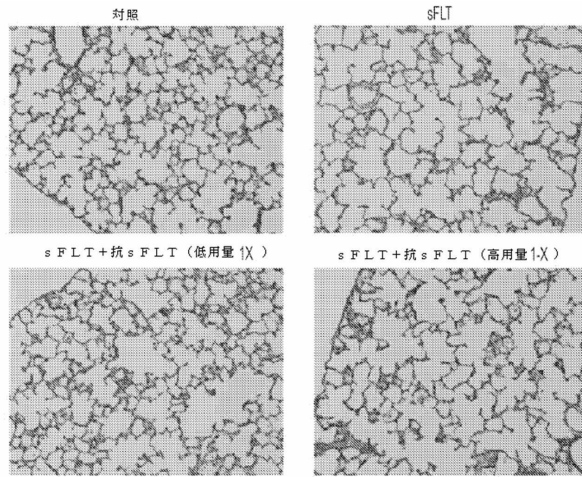
【図12】



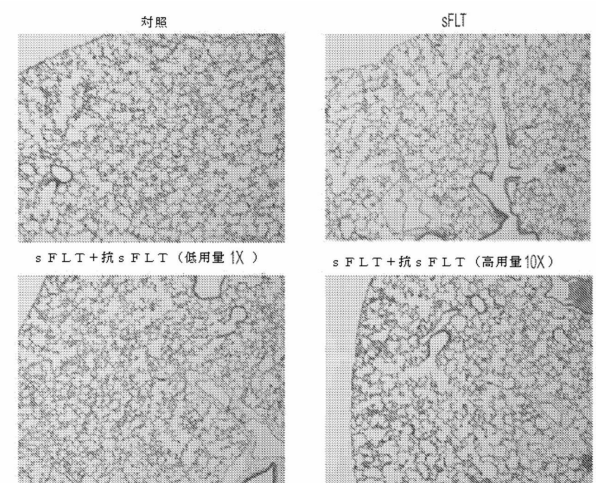
【図13】



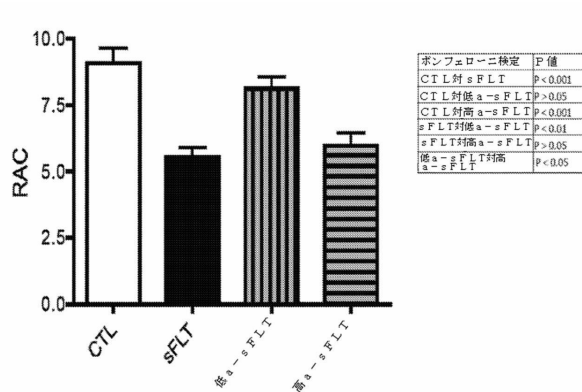
【図 14】



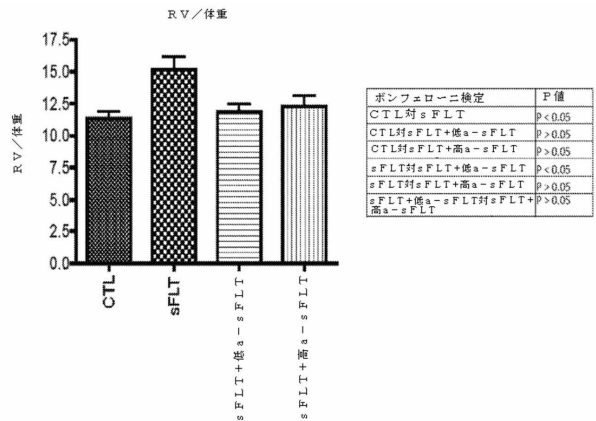
【図 15】



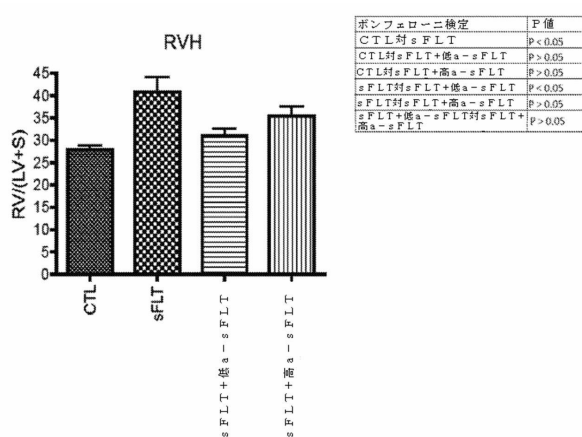
【図 16】



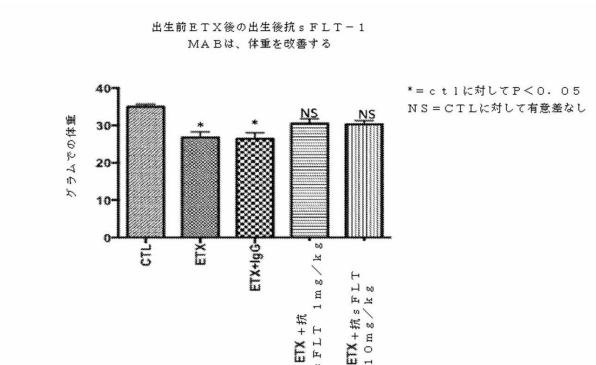
【図 18】



【図 17】

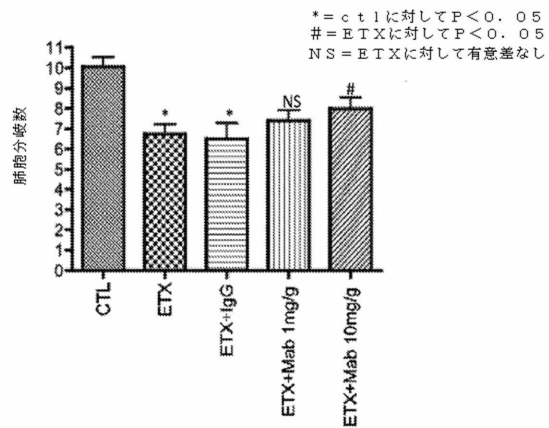


【図 19】



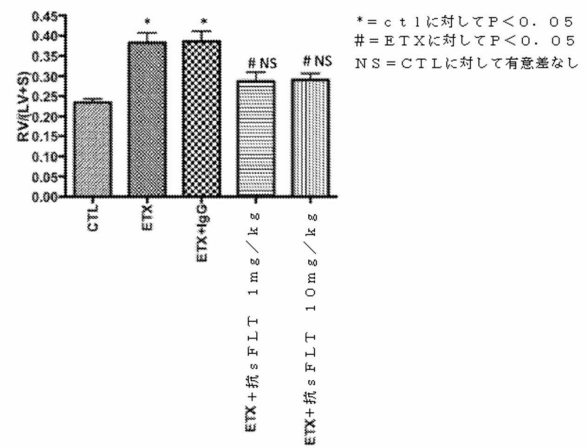
【図 20】

出生前 ETX 後の出生後抗 sFLT-1 Mab 処置は、
肺胞増殖を改善する



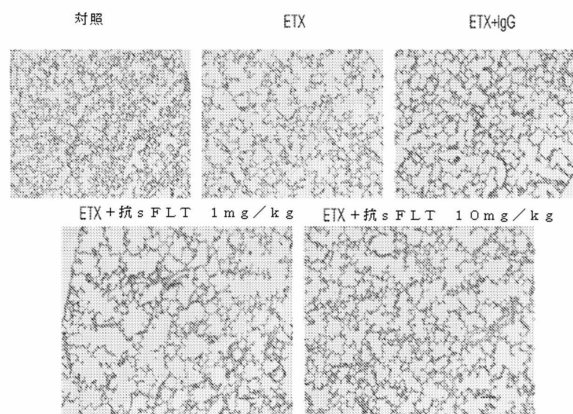
【図 21】

出生前 ETX 後の出生後抗 sFlt-1 Mab 処置は、RVH を防止する



【図 22】

出生後抗 sFlt-1 Mab は、実験的
な絨毛羊膜炎において肺構造を修復する



【配列表】

0006797826000001.app

フロントページの続き

(73)特許権者 308032460

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ コロラド, ア ボディー コーポレート
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, a
body corporate
アメリカ合衆国 コロラド 80203, デンバー, グラント ストリート 1800, 8
ティーエイチ フロアー

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 キーフ, デニス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421, レキシントン, シャイアー ウェイ 30
0, シャイアー ヒューマン ジェネティック セラピーズ インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 アブマン, スティーブン

アメリカ合衆国 コロラド 80045, オーロラ, イー. 17ティーエイチ プレイス
13001, アンスチャツ メディカル キャンパス, ビルディング 500, メール ス
トップ エフ428, ルーム ダブリュー1126, リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
ィ オブ コロラド, グランツ アンド コントラクツ 気付

(72)発明者 セードルフ, グレゴリー

アメリカ合衆国 コロラド 80045, オーロラ, イー. 17ティーエイチ プレイス
13001, アンスチャツ メディカル キャンパス, ビルディング 500, メール ス
トップ エフ428, ルーム ダブリュー1126, リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
ィ オブ コロラド, グランツ アンド コントラクツ 気付

審査官 大西 隆史

(56)参考文献 特表2006-511615(JP,A)

国際公開第2010/075475(WO,A1)

特表2014-511375(JP,A)

特表2007-522457(JP,A)

国際公開第2006/076467(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 35/00-51/12

A61K 31/00-33/44

A61P 1/00-43/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)