(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2005-526506
(P2005-526506A)
(43)公表日　平成17年9月8日(2005.9.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 39/395	A61K	39/395	E	4B065
A61K 45/00	A61K	39/395	T	4C084
A61P 35/00	A61K	45/00		4C085
A61P 43/00	A61P	35/00		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 37 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2003-574116 (P2003-574116)
(86)(22)出願日　平成15年3月4日 (2003.3.4)
(85)翻訳文提出日　平成16年10月29日 (2004.10.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2003/006459
(87)国際公開番号　WO2003/075840
(87)国際公開日　平成15年9月18日 (2003.9.18)
(31)優先権主張番号　60/361,783
(32)優先日　平成14年3月4日 (2002.3.4)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500581021
イムクローン　システムズ　インコーポレイティド
アメリカ合衆国，ニューヨーク　１００１４，ニューヨーク，バリック　ストリート　１８０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木　篤
(74)代理人　100077517
弁理士　石田　敬
(74)代理人　100087413
弁理士　古賀　哲次
(74)代理人　100082898
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＫＤＲに特異的なヒト抗体及びその利用

(57)【要約】
本発明は、ヒトＶＥＧＦに匹敵するか又はそれよりも高いアフィニティーをもってＫＤＲに結合し、かつ、ＫＤＲの活性化を中和する抗体を提出する。抗体は、全イムノグロブリン、一価Ｆａｂｓ及び単鎖抗体、多価一本鎖抗体、diabodies、triabodies、及び単一ドメイン抗体を含む。本発明は、上記抗体をコードし、かつ、発現する核酸及び宿主細胞をも提供する。本発明は、さらに、ＫＤＲの活性化を中和する方法、哺乳動物において血管形成を阻害する方法、及び哺乳動物において腫瘍増殖を阻害する方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＫＤＲに選択的に結合する単離されたヒト抗体又はその断片。
【請求項２】
該断片が単一鎖抗体、Ｆａｂ、単一鎖Ｆｖ、diabody、及びtriabodyから成る群から選択されることを特徴とする、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
該抗体又はその断片がＶＥＧＦのＫＤＲとの結合を阻害することを特徴とする、請求項１又は２に記載の抗体。
【請求項４】
該抗体が、ＣＤＲＬ１にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１；ＣＤＲＬ２にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２；ＣＤＲＬ３にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３；ＣＤＲＨ１にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１３；ＣＤＲＨ２にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１４；及びＣＤＲＨ３にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１５によって表される相補性決定領域を含むことを特徴とする、請求項１、２、及び３のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項５】
該抗体が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２６によって表される軽鎖可変ドメイン及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４によって表される重鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項１、２、及び３のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項６】
該抗体が、ＣＤＲＬ１にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８１；ＣＤＲＬ２にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８２；ＣＤＲＬ３にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８３；ＣＤＲＨ１にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１３；ＣＤＲＨ２にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１４；及びＣＤＲＨ３にＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１５によって表される相補性決定領域を含むことを特徴とする、請求項１、２、及び３のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項７】
該抗体が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５３によって表される軽鎖可変ドメイン及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４によって表される重鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項１、２、及び３のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項８】
該抗体が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４、及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１から成る群から選択される重鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項１、２、及び３のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項９】
該抗体が、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２２、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２６、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３９、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４１、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４３、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４９、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５１、及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５３から成る群から選択される軽鎖可変ドメインを含むことを特徴とする、請求項１、２、及び３のいずれか１項に記載の抗体。
【請求項１０】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２２、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２６、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２９、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３１、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３９、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４１、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４３、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４９、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５１、及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５３から成る群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。
【請求項１１】
該ヌクレオチド配列がＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２３であることを特徴とする、請求項１０に

記載のポリヌクレオチド。
【請求項１２】
該ヌクレオチド配列がＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５であることを特徴とする、請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１３】
該ヌクレオチド配列がＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５２であることを特徴とする、請求項１０に記載のポリヌクレオチド。
【請求項１４】
請求項１０～１３のいずれか１項に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
【請求項１５】
請求項１４に記載の発現ベクターを含む組み換え宿主細胞。
【請求項１６】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４を含むポリペプチド及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２６を含むポリペプチドを産生する、請求項１５に記載の組み換え宿主細胞。
【請求項１７】
ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２４を含むポリペプチド及びＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５３を含むポリペプチドを産生する、請求項１５に記載の組み換え宿主細胞。
【請求項１８】
ＫＤＲの活性化を中和する方法であって、効果的な量の請求項１～９のいずれか１項に記載の抗体を投与するステップを含む方法。
【請求項１９】
血管新生を阻害する方法であって、有効量の請求項１～９のいずれか１項に記載の抗体を投与するステップを含む方法。
【請求項２０】
腫瘍の増殖を減少させる方法であって、有効量の請求項１～９のいずれか１項に記載の抗体を投与するステップを含む方法。
【請求項２１】
該抗体がＫＤＲを中和することを特徴とする、請求項１９又は２０に記載の方法。
【請求項２２】
該腫瘍がＫＤＲを過剰発現する（overexpress）ことを特徴とする、請求項２０に記載の方法。
【請求項２３】
該腫瘍が結腸の腫瘍であることを特徴とする、請求項２０に記載の方法。
【請求項２４】
該腫瘍が乳腫瘍であることを特徴とする、請求項２０に記載の方法。
【請求項２５】
該腫瘍が非充実性（non-solid）腫瘍であることを特徴とする、請求項２０に記載の方法。
【請求項２６】
治療有効量の表皮細胞増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）拮抗物質の投与をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２７】
治療有効量のｆｍｓ様チロシンキナーゼ（ｆｌｔ－１）ＶＥＧＦＲ－１の投与をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２８】
化学療法治療剤の投与をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２９】
放射線の投与をさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
発明の属する技術分野
［０００１］ 本発明は、ＫＤＲと結合し、血管内皮増殖因子受容体（ＶＥＧＦＲ）へのＫＤＲの結合をブロックし、ＫＤＲの活性化を中和するヒト抗体に関する。この抗体は、腫瘍性疾患及び過形成障害を治療するために用いられ、単独でも、あるいは他のＶＥＧＦＲ拮抗因子や表皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）拮抗因子と組み合わせても利用できる。
【背景技術】
【０００２】
発明の背景
［０００２］ 血管新生は、すでに存在する血管からの毛管内皮細胞の増殖と移動、及び組織浸潤、管状構造への細胞の集合、閉回路の血管システムへの新しく形成する管状集合体の接合、及び新しく形成された毛細血管の成熟、などが関与する、新しい血管を生成するための高度に複雑なプロセスである。
【０００３】
［０００３］ 血管新生は、胚発生、胞細胞増殖、傷の治癒などの正常な生理的プロセス、並びに腫瘍の増殖などの病理的プロセス、及び血管新生緑内障などの異常血管新生に関わる非腫瘍性疾患、において重要である（Folkman, J. and Klagsbrun, M., Science, 235: 442-7, (1987)）。その他の疾病としては、腫瘍性疾患、例えばそれだけに限定されないが充実性腫瘍、アテローム硬化症及びその他の炎症性疾患、例えば、慢性関節リウマチ、及び眼科疾患、例えば、糖尿病性網膜症及び年齢に関連する黄斑変性、などがあげられるが、それだけに限定されない。永続的な又は制御されない血管新生に基因する症状や疾病は、血管新生依存又は血管新生関連疾患と呼ばれる。
【０００４】
［０００４］ このような疾患及び病理的状態をコントロールする１つの手段は、その疾患又は状態を媒介又は発生することに関わる細胞への血液供給を制限すること、例えば、腫瘍が存在する器官部分に血液を供給している血管を閉塞することによって血液供給を制限することである。このアプローチは、腫瘍部位を同定する必要があり、一般に単一の部位、又は少数の部位、の治療に限定される。血液供給を直接機械的に制限するやり方の欠点は、並行する血管が、多くの場合きわめて速やかに生じて、腫瘍への血液の供給を回復するということである。
【０００５】
［０００５］ 別のアプローチは、血管新生の調節に関与する因子を修飾することに焦点を合わせている。通常は静かにしているが、血管内皮増殖は、血管新生のときでも、強く調節されている。ＶＥＧＦは、in vivoにおける血管新生を調節すると言われている因子である（Klagsbrun, M. and D'Amore, P., Annual Rev. Physiol., 53: 217-39 (1991)）。
【０００６】
［０００６］ 内皮細胞特異的ミトゲンであるＶＥＧＦは、内皮細胞の増殖を特異的に促進することによって血管新生誘発因子として活動する。これは２つの２３ｋＤサブユニットから成るホモダイマーの糖タンパク質である。ｍＲＮＡの別のスプライシングから得られるＶＥＧＦの４つのモノマー・アイソフォームが同定されている。それらは２つの膜結合形態（ＶＥＧＦ２０６とＶＥＧＦ１８９）と２つの可溶形態（ＶＥＧＦ１６５とＶＥＧＦ１２１）である。ＶＥＧＦ１６５は胎盤を除くすべてのヒト組織で最も多いアイソフォームである。
【０００７】
［０００７］ ＶＥＧＦは、胚組織（Breier et al., Development, 114: 521-32 (1992)）、マクロファージ、及び傷が治癒するときの増殖している表皮ケラチノサイト（Brown et al., J. Exp. Med., 176: 1375-9 (1992)）において発現され、炎症に関連した組織浮腫の原因になっている可能性がある（Ferrara et al., Endocr. Rev., 13: 18-32 (1992)）。In situハイブリダイゼーション研究は、多形性膠芽腫、血管芽細胞腫、その他の中

枢神経系新生物及びＡＩＤＳ関連カポジ肉腫など、いくつかのヒト腫瘍系統で高レベルのＶＥＧＦ発現を示した（Plate, K. et al., Nature, 359: 845-8 (1992); Plate, K. et al., Cancer Res., 53: 5822-7 (1993); Berkman, R. et al., J. Clin. Invest., 91: 153-9 (1993); Nakamura, S. et al., AIDS Weekly, 13(1) (1992)）。高レベルのＶＥＧＦ発現は、また、アテローム硬化症病変、プラーク、及び炎症細胞でも見出されている。

【０００８】

［０００８］ ＶＥＧＦは、高い親和性を有するＶＥＧＦ受容体を通してその生物的効果を発揮する。ＶＥＧＦ受容体は、例えば、胚発生（Millauer, B. et al., Cell, 72: 835-46 (1993)）及び腫瘍形成のさいに内皮細胞で選択的に発現され、血管新生及び腫瘍増殖を修飾するとされている。これらの受容体は、細胞増殖に関与する信号経路を開始させるチロシン・キナーゼ・シトゾル・ドメイン（cytosolic domain）を含む。

【０００９】

［０００９］ ＶＥＧＦ受容体は、普通、そのアミノ末端細胞外受容体リガンド結合ドメインに、いくつかの、普通は５又は７つの、免疫グロブリン様ループを有することを特徴とするクラスIII受容体タイプ・チロシンキナーゼである（Kaipainen et al., J. Exp. Med., 178: 2077-88 (1993)）。他の２つの領域は、膜貫通領域と、可変長の親水性インターキナーゼ配列の挿入によって中断されたカルボキシ末端細胞内触媒ドメイン、キナーゼ挿入ドメインと呼ばれるもの、を含む（Terman et al., Oncogene, 6: 1677-83 (1991)）。ＶＥＧＦ受容体としては、Shibuya et al., Oncogene, 5: 519-24 (1990)によって配列が決定された、ｆｍｓ様チロシンキナーゼ（flt-1）又はＶＥＧＦＲ－１, February 20, 1992,に出願されたWO 92/14248及びTerman et al., Oncogene, 6: 1677-83 (1991), に記載され、Matthews et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9026-30 (1991)で配列が決定された、キナーゼ挿入ドメインを含む受容体／胎児肝臓キナーゼ（ＫＤＲ／flk-1）又はＶＥＧＦＲ－２、などがあるが、他の受容体もＶＥＧＦと結合する。別のチロシンキナーゼ受容体、ＶＥＧＦＲ－３（flt-4）、はＶＥＧＦ相同体ＶＥＧＦ－Ｃ及びＶＥＧＦ－Ｄと結合し、リンパ管の生成で重要である。

【００１０】

［００１０］ 腫瘍マスによるＶＥＧＦの放出は隣接する内皮細胞で血管新生を刺激する。腫瘍マスがＶＥＧＦを発現すると、ＶＥＧＦ＋腫瘍細胞に隣接する内皮細胞はＶＥＧＦ受容体、例えば、ＶＥＧＦＲ－１とＶＥＧＦＲ－２，の発現をアップレギュレートする。一般に、ＫＤＲ／ＶＥＧＦＲ－２が、内皮細胞の増殖、移動、分化、管形成、血管透過性の増加、及び血管の完全性の維持、を生ずる主なＶＥＧＦ信号トランスジューサーであると考えられている。ＶＥＧＦＲ－１が有するキナーゼ活性はずっと弱く、ＫＤＲよりもほぼ１０倍高い親和性でＶＥＧＦと結合するけれども、ＶＥＧＦによって刺激されたときにミトゲン応答を発生させることができない。ＶＥＧＦＲ－１は、また、ＶＥＧＦ及び胎盤増殖因子（ＰＩＧＦ）で誘発される単球とマクロファージの移動及び組織因子の産生に関与していると言われている。

【００１１】

［００１１］ 高レベルのＶＥＧＦＲ－２が、例えば、グリオームを浸潤させる内皮細胞によって発現され（Plate, K. et al., (1992)）、ヒト膠芽腫によって産生されるＶＥＧＦによって特異的にアップレギュレートされる（Plate, K. et al., (1993)）。膠芽腫に関連した内皮細胞（ＧＡＥＣ）で高レベルのＶＥＧＦＲ－２が発現されるという所見は、受容体活性が腫瘍形成の際に誘発されるということを示唆する。ＶＥＧＦＲ－２転写は正常な脳の内皮細胞でほとんど検出できず、パラ分泌（paracrine）ＶＥＧＦ／ＶＥＧＦＲループの生成を示している。このアップレギュレーションは、腫瘍のすぐ近くにある血管内皮細胞に限定される。中和する抗ＶＥＧＦモノクローナル抗体（ｍＡｂｓ）によってＶＥＧＦの活性をブロックすると、ヌード・マウスにおけるヒト腫瘍異種移植片の増殖が阻害され（Kim, K. et al., Nature, 362: 841-4 (1993)）、腫瘍に関連した血管新生におけるＶＥＧＦの直接的な役割を示唆する。

【００１２】

［００１２］ このため、血管侵入腫瘍やその他の血管新生疾患を治療するためにＶＥＧＦＲ拮抗因子が開発された。血管内皮細胞で発現されたＶＥＧＦ受容体による信号伝達をブロックして、内皮－依存的なパラ分泌ループによる血管新生を阻止することによって腫瘍の増殖を減少させる中和抗体を含んでいた。例えば、U.S, Patent No. 6,365,157 (Rockwell et al.), WO 00/44777 (Zhu et al.), WO 01/54723 (Kerbel), WO 01/74296 (Witte et al.), WO 01/90192 (Zhu), WO 03/002144 (Zhu), 及びWO 03/000183 (Carmeliet et al.) を見よ。

【００１３】

［００１３］ ＶＥＧＦ受容体はまた、いくつかの非内皮細胞でも、例えば、ＶＥＧＦを産生する腫瘍細胞でも見出され、そこでは内皮に依存しない自己分泌（autocrine）ループが腫瘍の増殖を支えるために発生する。例えば、ＶＥＧＦは、全ての確立された白血病細胞系統、及び新たに単離されたヒト白血病でほとんど常に発現される。さらに、ＶＥＧＦＲ－２とＶＥＧＦＲ－１はいくつかのヒト白血病で発現される。Fielder et al., Blood 89: 1870-5 (1997); Bellamy et al., Cancer Res. 59728-33 (1999)。ＶＥＧＦ／ヒトＶＥＧＦＲ－２自己分泌ループがin vivoでの白血病細胞の生存と移動を媒介することが示されている。Dias et al., J. Clin. Invest. 106: 511-21 (2000); 及びWO 01/74296 (Witte et al.)。同様に、ＶＥＧＦの産生とＶＥＧＦＲの発現は、また、in vitroのいくつかの充実性腫瘍細胞ラインについて報告されている。（Sato, K. et al., Tohoku J. Exp. Med., 185: 173-84 (1998); Ishii, Y., Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 47: 133-40 (1995); 及びFerrer, F. A. et al., Urology, 54: 567-72 (1999), を見よ）。さらに、ＶＥＧＦＲ－１ Ｍａｂｓは、乳癌細胞におけるＶＥＧＦＲ／ヒトＶＥＧＦＲ－１自己分泌ループを阻害することが示されている。Wu, et al., “ＶＥＧＦＲ１に対するモノクローナル抗体はflt1陽性のＤＵ４４７５ヒト乳腫瘍の増殖を抗血管新生活性及び腫瘍細胞増殖阻害活性に関わる二重のメカニズムによって阻害する”、AACR NCI EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Oct. 29-Nov. 2, 2001, Abstract #7。

【００１４】

［００１４］ 例えば、パラ分泌及び／又は自己分泌ＶＥＧＦ／ＶＥＧＦＲループを阻害して病理的な血管新生又は腫瘍増殖を阻害することによってＶＥＧＦ受容体依存疾患又は疾病を治療又は予防するために、ＶＥＧＦ受容体活性を阻害する物質が依然として必要とされている。

【発明の開示】

【００１５】

発明の要約

［００１５］ 本発明は、ＫＤＲと結合し、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）のＫＤＲとの結合をブロックし、ＫＤＲの活性を中和するヒト抗体、又はその部分、を提供する。これらの抗体は、例えば、充実性及び非充実性腫瘍を含む腫瘍性疾患を治療するために用いられる。これらの抗体はまた、過形成障害の治療にも用いることができる。したがって、本発明は、ＫＤＲの活性を中和する方法、腫瘍に関連した血管新生を含めて腫瘍増殖を阻害する方法、及び血管新生に関連した他の疾患を治療する方法、を提供する。本発明は、ＶＥＧＦ受容体と結合するヒト抗体又は抗体断片を有するキットを提供する。

【００１６】

［００１６］ この抗体は、単独で用いることも、又は他のＶＥＧＦＲ拮抗物質及び／又は血管新生阻害物質、例えば、表皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）拮抗物質、と組み合わせて用いることもできる。本発明はまた、この抗体をコードする核酸分子を提供する。

【００１７】

［００１７］ 略語－ＶＥＧＦ、血管内皮増殖因子；ｂＦＧＦ、基本線維芽細胞増殖因子；ＫＤＲ、キナーゼ挿入ドメイン含有受容体（ＶＥＧＦ受容体２とも呼ばれる）；FLK-1、胎児肝臓キナーゼ１；ｓｃＦｖ、単一鎖Ｆｖ；ＨＵＶＥＣ、ヒト臍静脈内皮細胞；ＰＢＳ、０．０１Ｍリン酸緩衝生理食塩水（ｐＨ７．２）；ＰＢＳＴ、０．１％Ｔｗｅｅｎ－

２０を含むＰＢＳ；ＡＰ、アルカリ・ホスファターゼ；ＥＧＦ、表皮増殖因子；V_H及びV_L、それぞれ、免疫グロブリンの重鎖と軽鎖の可変領域。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１８】

発明の詳細な説明

［００２８］ 本発明は、ＶＥＧＦＲ－２（ＫＤＲ）の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体を提供する。これらの抗体は、ヒトV_H及びV_Lフレームワーク領域（ＦＷｓ）、並びにヒト相補性決定領域（ＣＤＲｓ）を含む。好ましくは、V_H及びV_L可変ドメイン全体はヒト配列（human sequences）であるか、又はヒト配列から導かれる。例えば、本発明の可変ドメインは、再配置された可変領域遺伝子を含む末梢血液リンパ球から得られる。あるいはまた、ＣＤＲ及びＦＷ領域などの可変ドメイン部分は異なるヒト配列から得られる。別の例では、ヒトV_H可変ドメインはヒトV_H遺伝子セグメントとＣＤＲ３Ｈ領域の合成配列（すなわち、合成D_H－J_H遺伝子セグメント）によってコードされる。同様に、ヒトV_L可変ドメインはヒトV_L遺伝子セグメントとＣＤＲ３Ｌ領域の合成配列（すなわち、合成J_L遺伝子セグメント）によってコードされる。

【００１９】

［００２９］ 本発明の抗体はまた、結合特性が、直接突然変異、親和性（affinity）成熟の方法、ファージ・ディスプレー、又はチェーン・シャッフリング、によって改善されたものを含む。親和性及び特異性は、ＣＤＲｓに突然変異を誘発して所望の特性を有する抗原結合部位に関してスクリーニングすることにより、修飾又は改善される（例えば、Yang et al., J. Mol. Biol., 254: 392-403 (1995) を見よ）。ＣＤＲｓにはいろいろな仕方で突然変異が誘発される。一つの方法は、個々の残基又は残基の組み合わせをランダム化して、他の部分が同一の抗原結合部位の集団で、特定位置に２０のアミノ酸が全部見出されるようにすることである。あるいはまた、ある範囲のＣＤＲ残基にエラーが生じ易いＰＣＲ法によって突然変異を誘発する（例えば、Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) を見よ）。例えば、重鎖と軽鎖可変領域遺伝子を含むファージ・ディスプレー・ベクターをＥ．ｃｏｌｉのミューテーター系統で増殖させる（例えば、Low et al., J. Mol. Biol., 250: 359-368 (1996)を見よ）。これらの突然変異誘発方法は、当業者に公知の多くの方法を例示しただけである。

【００２０】

［００３０］ これらの抗体は、ＫＤＲと結合し、例えば、受容体の二量体化及び／又はＶＥＧＦ結合をブロックすることによって、活性化を中和する。本発明の抗体は、ＶＥＧＦ受容体の細胞外ドメインと結合することによってin vitro及びin vivoでＶＥＧＦＲの活性化を中和するのに用いることができる。ＶＥＧＦ受容体の細胞外ドメインは、例えば、受容体の細胞外部分にリガンド結合ドメインを含む。In vivoで、これらの抗体は血管新生を阻害及び／又は腫瘍増殖を減少させる。

【００２１】

［００３１］ 抗体は、特定の抗原又は物質を認識してそれと結合するタンパク質である。本発明の抗体は、ＫＤＲに、少なくとも天然のリガンドと同じ程度に強く結合する。抗体に対する抗原の解離の平衡定数（Kd）で表される親和度（affinity）は、抗原決定因子と抗体結合部位との結合強度を示す。結合力（avidity）は、抗原との抗体と結合の強度を表す。結合力は、あるエピトープと抗体上の抗原結合部位との間の親和度、及び抗体の価（valence）の両方に関係する。価とは、ある特定エピトープに対して免疫グロブリンが有する抗原結合部位の数を指す。例えば、単価の抗体は、ある特定エピトープに対して１つの結合部位を有する。抗原決定因子、すなわちエピトープ、とは、ある抗体が結合する抗原上の部位である。Ｋの典型的な値は、10^5から10^{11}リットル／ｍｏｌである。10^4リットル／ｍｏｌよりも小さいＫの値は、非特異的な結合を示すと見なされる。Ｋの逆数はK_dと表される。（K_dも解離定数と呼ばれることがある。）K_dの値が小さいほど、抗原決定因子と抗体結合部位の間の結合強度は強い。

【００２２】

[００３２] ＫＤＲの天然のリガンドはヒトＶＥＧＦである。ＶＥＧＦはＫＤＲに約０．９３ｎＭという親和度（K_d）で結合する。ＶＥＧＦとＫＤＲの結合を妨げるためには、抗ＫＤＲ抗体はＫＤＲに少なくともＶＥＧＦと同じ程度に強く結合しなければならない。言い換えると、抗ＫＤＲ抗体は、ＫＤＲとの結合に関してＶＥＧＦと競合できる必要がある。本発明の抗体は、好ましくは、ＫＤＲと約４ｎＭ以下という親和度、さらに好ましくは約３ｎＭ以下という親和度、最も好ましくは約２ｎＭ以下という親和度、そしてオプションとして約１ｎＭ以下という親和度、で結合する。二価（bivalent）の抗体の結合力（avidity）は、もちろん、この親和度よりも大きい。二価の抗体は、好ましくは、ＫＤＲに０．５ｎＭより大きな、さらに好ましくは０．２５ｎＭより大きな、オプションとして０．１ｎＭより大きな結合力でＫＤＲと結合する。

【００２３】

[００３３] 本発明の抗体はＫＤＲを中和する。（実施例を見よ。）本明細書では、ある受容体を中和するということは、信号を導入する受容体の固有のキナーゼ活性を減少及び／又は不活性化することを意味する。ＫＤＲの中和の信頼できる測定は、受容体のリン酸化の阻害である。

【００２４】

[００３４] 本発明は、ＫＤＲ中和の特定メカニズムによって制限されない。ある抗体が従うメカニズムは別の抗体が従うメカニズムと必ずしも同じではない。可能なメカニズムとしては、ＫＤＲの細胞外結合ドメインへのＶＥＧＦリガンドの結合を妨げること、及び受容体の二量体化又はオリゴマー化を妨げること、などがある。しかし、他のメカニズムの可能性も排除できない。

【００２５】

[００３５] 本発明の抗体は、天然に発生する抗体、$(Fab')_2$などの二価の断片、Ｆａｂなどの一価の断片、単一鎖抗体、単一鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体、多価単一鎖抗体、などを含むがそれだけに限定されない。抗原に特異的に結合するdiabodies, triabodies, などを含むが、それだけに限定されない。

【００２６】

[００３６] 一価の単一鎖抗体（すなわち、ｓｃＦｖ）は、抗体の可変重鎖断片（V_H）が抗体の可変軽鎖断片（V_L）に、２つの断片が関連して機能的な抗原結合部位を形成できるようにペプチド・リンカーによって結ばれたものを含む（例えば、U.S, Patent No.4,946,778 (Lander et al.), WO 88/09344, (Huston et al.) を見よ）。WO 92/01047 (McCafferty et al.) は、バクテリオファージなど、可溶組み換え遺伝子ディスプレー・パッケージの表面でのｓｃＦｖ断片のディスプレーを記載している。リンカー（Ｌ）を有する単一鎖抗体はV_L－Ｌ－V_H又はV_H－Ｌ－V_Lと表すことができる。

【００２７】

[００３７] 本発明の抗体の各ドメインは、完全な抗体重鎖又は軽鎖可変ドメインであることも、天然に見られるドメインの機能的等価物、又は突然変異体、又は誘導体であることも、又は、例えば、WO 93/11236 (Griffiths et al.) に記載されているような方法によってin vitroで構成された合成ドメインであることもある。例えば、少なくとも１つのアミノ酸を欠失している抗体可変ドメインに対応するドメインを接合することもできる。重要な特徴は、各ドメインが相補的なドメインと結びついて抗原結合部位を形成できることである。したがって、“可変重／軽鎖断片”という用語は、本発明が働く仕方に実質的な効果を有しない変異体（variant）を排除していると解釈してはならない。

【００２８】

[００３８] 本発明の機能的等価物は、ＫＤＲ抗体全長の可変又は超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。“実質的に同じ”アミノ酸配列とは、本明細書では、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-8 (1988) によるＦＡＳＴＡ探索法で測定して、別のアミノ酸配列と少なくとも７０％、好ましくは少なくとも約８０％、さらに好ましくは少なくとも約９０％、の相同性を有する配列と定義される。

【００２９】
［００３９］ 単一ドメイン抗体は、効率的に抗原と結合する単一可変ドメインを有する。結合の親和度と特異性に、主として可変領域の一方又は他方が寄与している抗体の例は当業者には公知である。例えば、Jeffrey, P. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10310-4 (1993) を見よ。これは、ジゴキシンに主として抗体の重鎖によって結合する抗ジゴキシン抗体を開示している。したがって、ＶＥＧＦ受容体に良く結合する単一抗体ドメインを同定することができる。このような抗体ドメインは、例えば、天然に生ずる抗体、又はＦａｂ又はｓｃＦｖファージ・ディスプレー・ライブラリー、から得られる。V_H及びV_Lドメインを含む抗体から単一ドメイン抗体を作るには、ＣＤＲ領域の外側でいくつかのアミノ酸置換が、結合、発現、又は溶解度を高めるために望ましいことがあることは理解されるであろう。例えば、V_H-V_L界面に埋められそうなアミノ酸残基を変更することが望ましいかもしれない。
【００３０】
［００４０］ 最近では、重鎖のホモダイマーである抗体がラクダ類（ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ）で発見された。これらの重鎖抗体は、軽鎖及び第一定常領域を欠いている。（例えば、Muyldermans, S., 2001, J. Biotechnol. 74: 277-302 を見よ）小さなサイズの抗原結合断片はバクテリアで良く発現され、抗原と高い親和度で結合し、非常に安定である。単一ドメイン抗体（すなわち、軽鎖又は重鎖可変ドメインである単一可変ドメインを有する抗体）のファージ・ディスプレー・ライブラリーを作成し、ｓｃＦｖ及びＦａｂライブラリーと同様の仕方でスクリーニングすることがいる。でこのような単一ドメイン抗体の骨組は修飾されたマウス又はヒト可変ドメインであってよい。単一抗体ドメインは抗原にいろいろな抗原結合モードで結合できることに注意したい。すなわち、一次的な抗体－抗原相互作用は抗体を含むV_H-V_LのＣＤＲｓに対応するアミノ残基に限定されず、このような抗体の結合特性を最適化するときにＣＤＲ残基の外側の結合相互作用を考慮することができる。
【００３１】
［００４１］ 単一鎖抗体は、それが導出された抗体全体の定常ドメインの一部又は全部を欠いている。したがって、単一鎖抗体は、抗体全体を使用することに関連した問題のいくつかを解決できる可能性がある。例えば、単一鎖抗体は、重鎖定常領域と他の生物分子との間の望ましくない相互作用から自由になるだろう。さらに、単一鎖抗体は、抗体全体よりもかなり小さく、抗体全体よりも透過性が大きく、したがって、標的の抗原結合部位に効率的に局在し結合することが可能になる。また、単一鎖抗体は、原核細胞で比較的大規模に生成することができ、生産が容易になる。さらに、単一鎖抗体のサイズが比較的小さいため、抗体全体に比べて、レシピエントに望まれない免疫応答を誘発する可能性が小さくなる。
【００３２】
［００４２］ 単一鎖抗体を生成するために用いられるペプチド・リンカーは、フレキシブルなペプチドであって、V_HとV_Lドメインがリンクされたときにそれらの三次元的な折れ曲がりが適切に生じて、抗ＫＤＲ抗体の全長が有する標的分子との結合特異性が維持されるように選ばれる。一般に、V_L又はV_H配列のカルボキシル末端がこのようなペプチド・リンカーによって相補的なV_H又はV_L配列のアミノ酸末端に共有結合で連結される。リンカーは、一般に、１０乃至５０アミノ酸残基から成る。好ましくは、リンカーは１０乃至３０アミノ酸残基から成る。さらに好ましくは、リンカーは１２乃至３０アミノ酸残基から成る。最も好ましくは、リンカーは１５乃至２５アミノ酸残基から成る。このようなリンカー・ペプチドの例としては、$(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_3$があげられる。
【００３３】
［００４３］ それぞれが第一のペプチド・リンカーによって共有結合でリンクされた１つのV_Hと１つのV_Lドメインを有する複数の単一鎖抗体を、少なくともう１つのペプチド・リンカーによって共有結合でリンクして多価の単一鎖抗体を形成することができる。

多価の単一鎖抗体は抗体全体の特異性と結合力を有し、全長抗体の定常領域を欠いている抗体断片の構築を可能にする。

【００３４】

［００４４］ 多価抗体は、単一特異的又は多重特異的である。特異性という用語は、ある特定抗体が結合できる、異なるタイプの抗原決定因子の数を指す。抗体が１つのタイプの抗原決定因子としか結合しない場合、その抗体は単一特異的である。抗体がいろいろなタイプの抗原決定因子と結合する場合、その抗体は多重特異的である。

【００３５】

［００４５］ 例えば、二重特異的な多価単一鎖抗体は、２つの異なるタイプのエピトープの認識を可能にする。エピトープは、両方ともＫＤＲ上にあってもよい。あるいはまた、一方のエピトープはＫＤＲ上にあり、他方のエピトープは別の抗原にあってもよい。

【００３６】

［００４６］ 多価単一鎖抗体の各鎖は可変軽鎖断片と可変重鎖断片を含み、ペプチド・リンカーによって少なくとも１つの他の鎖と連結されている。ペプチド・リンカーは少なくとも１５のアミノ酸残基から成る。ある好ましい実施形態では、V_L及びV_Hドメインの数は等しい。好ましくは、V_LドメインとV_Hドメインを結合して１つの鎖を形成するペプチド・リンカー（L_1）と２つ以上の鎖を結合して多価ｓｃＦｖを形成するペプチド・リンカー（L_2）は、実質的に同じアミノ酸配列を有する。

【００３７】

［００４７］ 例えば、二価単一鎖抗体は次のように表される：$V_L－L_1－V_H－L_2－V_L－L_1－V_H$；又は$V_L－L_1－V_H－L_2－V_H－L_1－V_H$；又は$V_H－L_1－V_L－L_2－V_H－L_1－V_L$；又は$V_H－L_1－V_L－L_2－V_L－L_1－V_H$

【００３８】

［００４８］ 三価以上の多価単一鎖抗体は、１つ以上の抗体断片が別のペプチド・リンカーによって二価単一鎖抗体に結合される。三価単一鎖抗体の一例は次のようなものである：$V_L－L_1－V_H－L_2－V_L－L_1－V_H－L_2－V_L－L_1－V_H$

【００３９】

［００４９］ ２つの単一鎖抗体を結合して、二価ダイマーとも呼ばれるdiabodyを形成することができる。Diabodiesは２つの鎖と２つの結合部位を有し、単一特異的又は二重特異的である。Diabodyの各鎖はV_HドメインとV_Lドメインが結合されたものを含む。これらのドメインは、同じ鎖のドメイン間でのペア形成を妨げるのに十分短いリンカーで結合され、異なる鎖の相補ドメイン間で２つの抗原結合部位を生ずるペア形成が促進される。すなわち、二重特異的なdiabodyの一方の鎖は第一の特異性のV_Hと第二の特異性のV_Lを含み、第二の鎖は第二の特異性のV_Hと第一の特異性のV_Lを含む。ペプチド・リンカーは少なくとも５つ、１０を超えないアミノ酸残基を含む、例えば、（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）、$（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）_3$．（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１９．）Diabody構造は、硬く、コンパクトである。抗原結合部位は分子の反対向きの端にある。

【００４０】

［００５０］ ３つの単一鎖抗体を結合して三価トリマーとも呼ばれるtriabodiesを形成することができる。TriabodiesはV_L又はV_Hドメインのアミノ酸末端をV_L又はV_Hドメインのカルボキシル末端に直接融合して、すなわち、リンカー配列なしで構成される。Triabodyは３つのＦｖヘッドを有し、ポリペプチドがサイクリックに、頭と尾をつなぐ形で配置されている。Triabodyの１つの可能な形態は平面的で、３つの結合部位が平面内で互いに１２０度の角度で配置されている。Triabodiesは単一特異的、二重特異的、又は三重特異的である。

【００４１】

［００５１］ 本発明の抗体は、抗体全体の６つの相補性決定領域全部を含むことが好ましいが、これらの領域全部よりも少ない領域、例えば、３つ、４つ、又は５つのＣＤＲｓを含む抗体でも機能する。

【００４２】
［００５２］ ＶＥＧＦ受容体に結合する抗体の免疫原性をできるだけ小さくするために、本発明はヒト可変及び定常ドメイン配列を含む抗体を提供する。抗体はヒトの源に由来し、ＫＤＲの細胞外ドメインと結合してこの受容体の活性化を中和する。ヒト抗体をコードするＤＮＡは、ヒト定常領域をコードするＤＮＡとヒトに由来する可変領域をコードするＤＮＡを組み換えて調製される。例えば、本発明の抗体は、ヒト軽鎖及び重鎖可変ドメインの組み合わせから成るライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。抗体が発現される核酸は、体細胞突然変異した配列、又はナイーブＢ細胞から導かれる生殖細胞系の配列が可能である。
【００４３】
［００５３］ ヒト抗体をコードするＤＮＡは、実質的に又は全て、対応するヒト抗体領域から得られる、ＣＤＲｓ以外のヒト定常及び可変領域をコードするＤＮＡ、及びヒトから得られるＣＤＲｓをコードするＤＮＡを組み換えることによって調製できる。
【００４４】
［００５４］ 抗体の断片をコードするＤＮＡｓの適当な源としては、全長の抗体を発現する細胞、例えばハイブリドーマや脾臓細胞など、があげられる。別の源は、当業者に公知のファージ・ディスプレー・ライブラリーから生成される単一鎖抗体である。
【００４５】
［００５５］ 本発明の抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、又はＩｇＥなどの免疫グロブリンのクラス、及びそのサブクラス、のメンバーであっても、その組み合わせであってもよい。
【００４６】
［００５６］ ＶＥＧＦＲＥと結合する本発明の抗体を同定するために用いられるタンパク質は通常ＫＤＲであり、普通、ＫＤＲの細胞外ドメインに限定される。ＫＤＲ細胞外ドメインは、自由であっても別の分子と接合していてもよい。
【００４７】
［００５７］ 以下の実施例では、ＫＤＲへのＶＥＧＦの結合をブロックする高親和度の抗ＫＤＲ抗体が、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子から構成されたファージ・ディスプレー・ライブラリーから単離された。３ラウンドの選別後に回収されたクローンの９０％以上がＫＤＲ特異的である。スクリーニングされたＦａｂｓのＫＤＲに対する結合親和度はｎＭ領域にあり、これはハイブリドーマ・テクノロジーを用いて生成されたいくつかの二価抗ＫＤＲモノクローナル抗体の親和度と同程度に高い。
【００４８】
［００５８］ 本発明の抗体は、別のアミノ酸残基に融合させることができる。そのような残基は、多分単離を容易にするためのペプチド・タグであるか、又は、合成されたときにポリペプチドを宿主細胞から分泌するための信号配列である。シトゾルからのポリペプチドの移動を導くためにポリペプチドのＮ－末端に結合されたアミノ酸である分泌リーダー・ペプチドを用いるのが適当である。
【００４９】
［００５９］ 本発明は、また、本発明によるポリペプチドをコードする配列を含む核酸、及びそのような核酸の多様なレパートリーを提供する。
【００５０】
［００６０］ 本発明の抗体はＫＤＲの活性化を中和する。ＫＤＲ中和の１つの尺度は、受容体のチロシンキナーゼ活性の阻害である。チロシンキナーゼ阻害は周知の方法を用いて決定できる。本発明の抗体は、一般に、リン酸化の発生を阻害又は調節する。したがって、本発明の文脈で有用な抗体を判定するのにリン酸化分析が有用である。チロシンキナーゼ阻害は組み換えキナーゼ受容体の自己リン酸化（autophosphorylation）レベル、及び／又は天然又は合成基質のリン酸化を測定することによって決定できる。リン酸化は、例えば、ＥＬＩＳＡ分析又はウエスタン・ブロットでホスフォチロシンに特異的な抗体を用いて検出できる。チロシンキナーゼ活性の測定法については、Panck et al., J. Pharm

acol. Exp. Thera., 283: 1433-44 (1997) and Batley et al., Life Sci., 62: 143-50 (1998) に記載されている。

【００５１】

［００６１］ その他に、タンパク質発現を検出する方法が、測定されるタンパク質がＫＤＲチロシンキナーゼ活性によって調節される場合に利用できる。そのような方法としては、タンパク質の発現を検出するための免疫組織化学（ＩＨＣ）、遺伝子増幅を検出するための蛍光in situハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、競合的放射性リガンド結合測定、ノーザン及びサザン・ブロットなどの固形マトリックス・ブロッティング法、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応法（ＲＴ－ＰＣＲ）及びＥＬＩＳＡ、などがある。例えば、Grandis et al., Cancer, 78: 1284-92. (1996); Shimizu et al., Japan J. Cancer Res., 85: 567-71 (1994); Sauter et al., Am. J. Path. 148: 1047-53 (1996); Collins, Glia, 15: 289-96 (1995); Radinsky et al., Clin. Cancer Res. 1: 19-31 (1995); Petrides et al., Cancer Res. 50: 3934-39 (1990); Hoffmann et al., Anticancer Res. 17: 4419-26 (1997); Wikstrand et al., Cancer Res. 55: 3140-48 (1995) を見よ。

【００５２】

［００６２］In vivo分析も利用できる。例えば、受容体チロシンキナーゼ阻害は、阻害物質の存在下及び不在下で受容体リガンドによって刺激された細胞ラインを用いてミトゲン分析（mitogenic assay）によって観測できる。例えば、ＶＥＧＦで刺激されたＨＵＶＥＣ細胞（ＡＴＣＣ）を用いてＶＥＧＦＲ阻害を測定できる。別の方法は、例えばマウスに注射されたヒト腫瘍細胞を用いて、ＶＥＧＦを発現する腫瘍細胞の増殖阻害をテストすることである。U.S, Patent No. 6,365,157 (Rockwell et al.) を見よ。

【００５３】

［００６３］ 本発明の方法では、治療に効果的な量の本発明の抗体がそれを必要とする哺乳類に投与される。本明細書で用いられる場合、“投与”という用語は、本発明の抗体を求められている結果を達成できる何らかの方法によって哺乳類に供給することを意味する。それらは、例えば、静脈内に又は筋肉内に投与できる。本発明のヒト抗体はヒトに投与するのに特に有用であるが、他の哺乳類にも投与することができる。本明細書で用いられる場合、“哺乳類”という用語は、ヒト、実験動物、家庭ペット及び農場動物を含むモノとするが、それだけに限定されない。“治療に効果的な量”とは、哺乳類に投与したとき、キナーゼ活性を阻害するなど、所望の治療的効果を生ずるのに効果的な本発明の抗体の量である。

【００５４】

［００６４］ 特定のメカニズムに拘束されるつもりはないが、本発明の方法によって治療又は予防できる疾病や疾患は、例えば、病理的な血管新生や腫瘍増殖がＶＥＧＦＲパラ分泌及び／又は自己分泌ループによって刺激されるようなものである。

【００５５】

［００６５］ 内皮細胞又は非内皮細胞、例えば腫瘍細胞、におけるＶＥＧＦ受容体の活性化の中和は、in vitro又はin vivoで行うことができる。ＶＥＧＦ受容体を発現している細胞のサンプルでＶＥＧＦ受容体のＶＥＧＦ活性化を中和することは、細胞を拮抗物質、例えば本発明の抗体、と接触させることを含む。細胞は、細胞サンプルにＶＥＧＦを加える前、それと同時に、又はその後で、in vitroで拮抗物質、例えば抗体、と接触させられる。

【００５６】

［００６６］ In vivoでは、本発明の抗体は、哺乳類、好ましくはヒト、への投与によってＶＥＧＦ受容体と接触させられる。In vivo中和法は、哺乳類における腫瘍増殖、腫瘍増殖に関連した血管新生、又は血管新生に関連した他の病理状態、を防止するのに有用である。したがって、本発明の抗体は、抗血管新生、抗腫瘍免疫治療剤である。

【００５７】

［００６７］ 治療できる腫瘍は、原発腫瘍及び転移腫瘍、並びに難治性腫瘍である。難治性腫瘍は、化学療法物質だけ、抗体だけ、放射線だけ、又はそれらの組み合わせ、によ

る治療に応答しない、すなわち、抵抗する腫瘍である。難治性腫瘍はまた、これらによる治療で抑えられたように見えるが、治療がうち切られてから５年までに、ときには１０年までに、又はそれより後に再発する腫瘍である。

【００５８】

［００６８］ 本発明の抗体は、ＶＥＧＦ受容体、特にＫＤＲを発現する腫瘍を治療するのに有用である。このような腫瘍は、その環境に存在するＶＥＧＦに特徴的に敏感であり、自己分泌刺激ループでさらにＶＥＧＦを産生しＶＥＧＦによって刺激される。したがって、この方法は血管化しない、又はまだ実質的に血管化していない充実性腫瘍又は非充実性腫瘍を治療するのに効果的である。このように治療できる充実性腫瘍の例としては、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、グリオーム、及びリンパ腫、があげられる。それらの癌の例としては、類上皮癌、頭や頚の癌などの扁平上皮癌、結腸直腸癌、前立腺癌、乳癌、小細胞及び非小細胞肺癌などの肺癌、膵臓癌、甲状腺癌、卵巣癌、及び肝臓癌、などがある。その他の例としては、カポジ肉腫、ＣＮＳ腫瘍、神経芽細胞腫、毛細血管性血管腫、髄膜腫と大脳転移、黒色腫、胃腸及び腎の癌と肉腫、横紋筋肉腫、膠芽腫、好ましくは多形膠芽腫、及び平滑筋腫、などがある。本発明の拮抗物質が効果的である血管化皮膚癌としては、扁平上皮癌、基底細胞癌、及び悪性ケラチノサイトの増殖を抑えることで治療できる皮膚癌、例えば、ヒト悪性ケラチノサイト、などがある。

【００５９】

［００６９］ 非充実性腫瘍の例としては、白血病、多発性骨髄腫、及びリンパ腫などがあげられる。白血病の例としては、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、赤血球性白血病、及び単球白血病、があげられる。リンパ腫の例としては、ホジキン病及び非ホジキン・リンパ腫があげられる。

【００６０】

［００７０］ 以下で述べる実験結果は、本発明の抗体が、ＶＥＧＦで誘発される白血病細胞におけるＫＤＲ（ＶＥＧＦＲ－２）の刺激を特異的にブロックすることを示している。以下で述べるin vivo研究も、この抗体がヌード・マウスにおける腫瘍の増殖を顕著に抑制できることを示している。

【００６１】

［００７１］ モノクローナル抗体などのＶＥＧＦ受容体拮抗物質のカクテルは、腫瘍細胞の増殖を阻害する特に効果的な治療となる。カクテルは、非抗体のＶＥＧＦＲ拮抗物質も含むことができ、受容体拮抗物質が２、３、又は４種と少なくても、６、８、又は１０腫と多くてもよい。

【００６２】

［００７２］ 本発明の別の様態では、抗ＫＤＲ抗体が血管新生を阻害するために用いられる。血管内皮のＶＥＧＦ刺激は血管新生疾患及び腫瘍の血管化に結びつく。普通、血管内皮は、他の源（例えば、腫瘍細胞）からのＶＥＧＦによってパラ分泌の形で刺激される。

【００６３】

［００７３］ したがって、ヒト抗ＫＤＲ抗体は、血管化した腫瘍又は新生物又は血管新生疾患の患者を治療するのに効果的である。そのような腫瘍及び新生物としては、例えば、悪性腫瘍又は新生物、すなわち、芽細胞腫、癌腫又は肉腫、及び高度に血管化した腫瘍及び新生物が含まれる。本発明の方法で治療できる癌としては、例えば、脳，泌尿生殖器、リンパ系、胃、腎臓、結腸、喉頭、及び肺と骨、の癌が含まれる。非限定的な例としては、さらに、類上皮腫、頭や頚の癌などの扁平上皮癌、結腸直腸癌、前立腺癌、乳癌、肺腺癌及び小細胞及び非小細胞肺癌などの肺癌、膵臓癌、甲状腺癌、卵巣癌、及び肝臓癌、などがある。この方法はまた、血管化皮膚癌、例えば、扁平上皮癌、基底細胞癌、及び悪性ケラチノサイトの増殖を抑えることで治療できる皮膚癌、例えば、ヒト悪性ケラチノサイト、などの治療にも用いられる。治療できるその他の癌としては、カポジ肉腫、ＣＮＳ腫瘍、（神経芽細胞腫、毛細血管性血管腫、髄膜腫と大脳転移）、黒色腫、胃腸及び腎の

癌と肉腫、横紋筋肉腫、多形膠芽腫を含む膠芽腫、及び平滑筋腫、などがある。

【００６４】

［００７４］ 本発明の別の様態は、例えば、血管化及び／又は炎症に関わる過剰な血管新生を特徴とする病理的な状態、例えば、アテローム硬化症、慢性関節リウマチ（ＲＡ）、血管新生緑内障、増殖性糖尿性網膜症などの増殖背網膜症、筋萎縮、血管腫、血管繊維増殖症、及び乾癬、などを治療又は予防する方法である。非腫瘍性血管新生疾患のその他の非限定的な例としては、未熟児網膜症、水晶体後部線維増殖症、角膜移植後拒絶反応、インシュリン依存型糖尿病、多発性硬化症、重症筋無力症、Chron病、自己免疫腎炎、原発性胆汁性肝硬変、急性膵炎、アレルギー性炎症、接触皮膚炎、遅延性過敏症、炎症性超疾患、敗血症性ショック、骨粗しょう症、骨関節炎、神経炎症で誘発される認知障害、オスラー－ウエーバー症候群、restinosis、及び菌、寄生虫、及びウイルス感染、例えば、サイトメガロウイルス感染、などがあげられる。

【００６５】

［００７５］ このような疾病の同定は、十分に当業者の能力と知識の範囲内にある。例えば、臨床的に顕著な腫瘍又は血管新生疾患にかかっている、又は臨床的に顕著な症状を発現する危険がある人は、本発明のＶＥＧＦ受容体抗体を投与するのに適している。十分な能力を有する臨床医は、例えば臨床テストを用いて、身体的検査、及び医療／家族歴によって、ある人がこの治療の対象候補であるかどうかを容易に決定できる。

【００６６】

［７６］ さらに、本発明の範囲には、当業者には周知の調査又は診断方法のための本発明の抗体のin vivo及びin vitroでの利用も含まれる。

【００６７】

［７７］ 本発明の抗ＫＤＲ抗体は、腫瘍又は病理的状態を伴う血管新生に苦しむ患者に対する治療処置としてその腫瘍又は病理的状態の進行を予防、抑制、又は低減する二十分な量で投与することができる。進行とは、例えば、腫瘍又は病理的状態の増殖、侵襲、転移、及び／又は再発を含む。これを達成するのに十分な量が、治療的に効果的な用量として定義される。この利用に効果的な量は、疾病の重篤性、及び患者自身の免疫系の全般的状態による。投与スケジュールも疾病の状態と患者の状態によって異なり、１つの丸薬の投与又は連続的な注入から１日に複数回（例えば、４～６時間毎）の投与、又は治療する医師の指示又は患者の状態によって決められるものまで、多様である。しかし、本発明は特定の投与量に限定されないということを注意しておきたい。

【００６８】

［７８］ 本発明のある実施形態では、抗ＫＤＲ抗体は、１つ以上の他の抗癌因子と組み合わせて投与することができる。組み合わせ治療の例としては、例えば、U.S, Patent No. 6,217,866 (Schlessinger et al.)（抗ガン剤と組み合わされた抗ＥＧＦＲ抗体）；WO 99/60023 (Waksal et al.)（放射線と組み合わされた抗ＥＧＦＲ抗体）を見よ。任意の適当な抗癌因子、例えば、化学療法治療剤又は放射線、を用いることができる。化学療法の治療剤の例としては、シスプラチン、ドキソルビシン、パクリタクセル、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、トポテカン、又はそれらの組み合わせ、などがあげられるが、それだけに限定されない。抗癌因子が放射線である場合、放射線の源は、治療される患者の外部にあっても（外部ビーム照射治療－ＥＢＲＴ）、内部にあっても（近接照射療法－ＢＴ）よい。投与される抗癌因子の量は、例えば、抗癌因子のタイプ、治療される腫瘍のタイプと重篤度、及び抗癌因子の投与ルート、など多くの因子に依存する。しかし、本発明は特定の用量に限定されない。

【００６９】

［７９］ さらに、本発明の抗ＫＤＲ抗体は、腫瘍の増殖又は血管新生に関与する他の受容体を中和する抗体と共に投与することができる。そのような受容体の一例は、ＶＥＧＦＲ－１／Ｆｌｔ－１受容体である。本発明のある実施形態では、抗ＫＤＲ抗体はＶＥＧＦＲ－１に特異的に結合する受容体拮抗物質と組み合わせて用いられる。特に好ましいのは、ＶＥＧＦＲ－１の細胞外ドメインに結合してそのリガンド、ＶＥＧＦ及びＰＩＧＦ、の

一方又は両方の結合をブロックする、及び／又はＶＥＧＦＲ－１のＶＥＧＦ又はＰＩＧＦで誘発される活性化を中和する抗原結合タンパク質である。例えば、ｍＡｂ６．１２は可溶な及び細胞表面で発現されるＶＥＧＦＲ－１と結合するｓｃＦｖである。ＳｃＦｖ６．１２はマウス・モノクローナル抗体ｍＡｂ６．１２のV_L及びV_Hドメインを含む。ｍＡｂ６．１２を産生するハイブリドーマ細胞ラインが、特許手続き上微生物寄託の国際承認に関するブダペスト条約及びその下での規制（Budapest Treaty）の規定の下でＡＴＣＣナンバーＰＴＡ－３３４４として寄託されている。

【００７０】

［８０］ このような受容体の別の例はＥＧＦＲである。本発明のある実施形態では、抗ＫＤＲ抗体はＥＧＦＲ拮抗物質と組み合わせて用いられる。ＥＧＦＲ拮抗物質は、ＥＧＦＲ又はＥＧＦＲのリガンドに結合して、ＥＧＦＲとそのリガンドの結合を阻害する抗体であってもよい。ＥＧＦＲのリガンドは、例えば、ＥＧＦ、ＴＧＦ－αアンフィレグリン、ヘパリン結合ＥＧＦ（ＨＢ－ＥＧＦ）及びベタレクルリン、などである。ＥＧＦとＴＧＦ－αは、ＥＧＦＲで媒介される刺激を生ずる主要な内生的リガンドであると考えられているが、ＴＧＦ－αの方がより強力に血管新生を促進することが示されている。ＥＧＦＲ拮抗物質はＥＧＦＲの細胞外部分に外部的に結合し、それはリガンドの結合を阻害することもしないこともあり、又は内部的にチロシンキナーゼ・ドメインと結合することもできる。ＥＧＦＲと結合するＥＧＦＲ拮抗物質の例としては、それだけに限定されないが、生体分子、例えば、ＥＧＦＲに特異的な抗体（及びその機能的等価物）、及び小分子、例えば、ＥＧＦＲの細胞質ドメインに直接作用する合成キナーゼ阻害物質、などがあげられる。

【００７１】

［８１］ 腫瘍発生に関与する増殖因子受容体のその他の例は、血小板由来増殖因子の受容体（ＰＤＧＦＲ）、インシュリン様増殖因子受容体（ＩＧＦＲ）、神経増殖因子受容体（ＮＧＦＲ）、及び繊維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）などである。

【００７２】

［８２］ 別の実施形態では、ＶＥＧＦＲ拮抗物質１つ以上の適当なアジュバントと組み合わせて、例えば、サイトカイン（例えば、ＩＬ－１０及びＩＬ－３）又はその他の免疫刺激物質と組み合わせて投与することができる。例えば、Larrivee et al., 前出、を見よ。しかし、１つの抗ＫＤＲ抗体の投与でも、治療的に効果的な仕方で腫瘍の進行を予防、抑制、又は低減するのに十分であることは理解されるであろう。

【００７３】

［８３］ 組み合わせ治療では、抗ＫＤＲ抗体は、別の作用剤で治療を開始する前、その間、又はその後に投与される。同様に、それらの組み合わせも、抗癌剤治療を始める前及びその間に、その前及びその後に、その間及びその後に、又はその前、その間及びその後に投与される。例えば、抗ＫＤＲ抗体は放射線治療を開始する１～３０日前に、好ましくは３～２０日前に、さらに好ましくは５～１２日前に、投与される。

【００７４】

［８４］ 本発明では、本発明の抗ＫＤＲ抗体を投与し、オプションとして抗癌作用剤及び／又は他の受容体の拮抗物質を投与するのに、どんな方法又はルートを用いることもできる。投与ルートとしては、例えば、経口、静脈内、腹腔内、皮下、又は筋肉内投与などがある。投与される拮抗物質の用量は多くの因子に依存する、例えば、拮抗物質のタイプ、治療されている腫瘍のタイプと重篤度、及び拮抗物質の投与ルート、などに依存する。しかし、本発明は特定の投与方法又はルートに限定されないということを強調しておきたい。

【００７５】

［８５］ 本発明の抗ＫＤＲ抗体は、受容体に特異的に結合し、リガンド－毒素の内在化の後で有毒な、致死的なペイロードを放出する接合体（conjugate）として投与することもできることが注意される。

【００７６】

［８６］ 本発明の抗ＫＤＲ抗体は、予防又は治療のために哺乳類で用いられる場合、医

薬的に受容されるキャリアをさらに含む組成物の形で投与されることは言うまでもない。適当な医薬的に受容されるキャリアとしては、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノール、など、並びにそれらの混合物、があげられる。医薬的に受容されるキャリアは、さらに少量の補助物質、例えば、湿潤剤又は乳化剤、結合するタンパク質の貯蔵寿命又は効力を増強する防腐剤又はバッファー、などを含んでもよい。注射される組成物は、当業者に周知のように、哺乳類への投与の後で活性成分を速やかに、持続的に、又は遅らせて放出するように調剤することができる。

【００７７】

［８７］ 本発明は、また、治療に効果的な量のヒト抗ＫＤＲ抗体を含む、腫瘍増殖及び／又は血管新生を抑制するためのキットを含む。このキットは、さらに、例えば、腫瘍発生又は血管新生に関与する別の増殖因子受容体（例えば、上述のように、ＶＥＧＦＲ－１，／Ｆｌｔ－１、ＥＧＦＲ、ＰＤＧＦＲ、ＩＧＦＲ、ＮＧＦＲ、等）の適当な拮抗物質を含むことができる。あるいはまた、又はそれに加えて、本発明のキットはさらに、抗癌剤を含むこともできる。本発明の文脈で適当な抗癌剤の例は本明細書で記載された。本発明のキットはさらにアジュバントを含むことができるが、その例も上で記載されている。

【００７８】

［８８］ 本発明の別の様態では、本発明の抗ＫＤＲ抗体は１つ以上の抗癌剤又は抗血管新生剤と化学的又は生合成的に結合することができる。

【００７９】

［８９］ 本発明はさらに、標的又はレポーター部分（moieties）が結合されている抗ＫＤＲ抗体を考えている。標的部分は結合するペアの第一の部分である。例えば、抗癌剤がこのペアの第二の部分に接合され、抗ＫＤＲ抗体が結合した部位に導かれる。このような結合ペアのよく見られる例は、アジビン（adivin）とビオチンである。ある好ましい実施形態では、ビオチンが抗ＫＤＲ抗体に接合されて、アビジン（avidin）又はストレプトアビジンと接合された抗癌剤又は他方の部分の標的になる。あるいはまた、ビオチン又は別のそのような部分が本発明の抗ＫＤＲ抗体に結合されて、レポーターとして、例えば、検出可能な信号生成物質がアビジン又はストレプトアビジンに接合された診断システムで用いられる。

【００８０】

［９０］ したがって、本発明の受容体拮抗物質はこのように、in vivo 及びin vitroで、当業者には周知の調査、診断、予防、又は治療方法で利用することができる。もちろん、ここに開示された本発明の原理に対して当業者であればいろいろな変形が可能であることは言うまでもなく、また予期されることであるが、そのような変形は本発明の範囲に含まれるものとする。

【００８１】

［９１］ 本明細書で言及された全ての参照文献はその全体がここに組み込まれる。

【実施例】

【００８２】

実施例

［００９２］ 以下の実施例は、本発明の理解を助けるために示されるものであり、いかなる形でも本発明の範囲を制限する意図はなく、本発明を制限するものと解してはならない。実施例は、ベクターやプラスミドの構築、ポリペプチドをコードする遺伝子のベクターやプラスミドへの挿入、あるいは宿主細胞へのプラスミドの導入、などで用いられる従来の方法についての詳しい記述を含んでいない。それらの方法は、当業者には周知であり、Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ed edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, など多数の文献に記載されている。

【００８３】

実施例I. ヒトＦａｂの生成

実施例Ｉ（ａ）. タンパク質と細胞ライン.

［００９３］ 初代培養ＨＵＶＥＣを、Cornell Medical Center, New York, のDr. S. Rafiiから入手して、EBM-2培地（Clonetics, Walkersville, MD）で、３７℃、５％CO_2で維持した。可溶融合タンパク質、ＫＤＲ－アルカリ・ホスファターゼ（ＡＰ）、その免疫グロブリン（Ｉｇ）ドメイン欠失変異体、及びＦｌｋ－１－ＡＰ、が安定に形質移入されたＮＩＨ ３Ｔ３で発現され、細胞培養の上澄みからLu et al., J. Biol. Chem. 275: 14321-30 (2000) に記載されているように、ＡＰに対する固定されたモノクローナル抗体を用いるアフィニティー・クロマトグラフィーによって精製された。$VEGF_{165}$タンパク質はバクロウイルスで発現され、Zhu et al., Cancer Res. 58: 3209-14 (1998) に記載されている手順に従って精製された。白血病細胞ライン、ＨＬ６０とＨＥＬ、は、１０％ウシ胎児血清を含むＲＰＭＩで維持された。

【００８４】

実施例Ｉ（ｂ）．ファージＥＬＩＳＡ

［００９４］ 個々のＴＧ１クローンを採取し、３７℃で９６ウエル・プレートで育成し、上述のようにＭ１３Ｋ０７ヘルパー・ファージによって救出（rescue）した。増幅されたファージ試料は、１／６体積の１８％ミルク／ＰＢＳで１時間、ＲＴでブロックされ、ＫＤＲ－ＡＰ又はＡＰ（１μｇ／ｍｌ×１００μｌ）でコーティングされたMaxi-sorp ９６ウエル・マイクロタイター・プレートに加えられた。ＲＴで１時間のインキュベーションの後、プレートはＰＢＳＴで３回洗浄され、ウサギ抗Ｍ１３ファージ－ＨＲＰ接合体（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）と共にインキュベートされた。プレートは５回洗浄され、ＴＭＢペルオキシダーゼ基質（KPL, Gaithersburg, MD）が加えられ、４５０ｎｍでの吸収がマイクロプレート・リーダー（Molecular Devices, Sunnyvale, CA）を用いて読み取られた。

【００８５】

実施例Ｉ（ｃ）．ＤＮＡ ＢｓｔＮＩパタン分析及びヌクレオチド配列決定.

［００９５］ 各ラウンドの選抜後の抗ＫＤＲ Ｆａｂクローンの多様性が、制限酵素消化パタン（すなわち、ＤＮＡ指紋）によって分析された。個々のクローンのＦａｂ遺伝子インサートが、プライマー：ＰＵＣ１９リバース、
５′ＡＧＣＧＧＡＴＡＡＣＡＡＴＴＴＣＡＣＡＣＡＧＧ３′、及びｆｄｔｅｔ配列、
５′ＧＴＣＧＴＣＴＴＴＣＣＡＧＡＣＧＴＴＡＧＴ３′、を用いてＰＣＲ増幅された。増幅された生成物はfrequent-cutting酵素、ＢｓｔＮＩ、で消化され、３％アガロース・ゲル上で分析された。各消化パタンからの代表的クローンのＤＮＡ配列が、ジデオキシヌクレオチド配列決定法によって決定された。

【００８６】

実施例Ｉ（ｄ）．可溶Ｆａｂ断片の発現と精製.

［００９６］ 個々のクローンのプラスミドを用いて非サプレッサーＥ．ｃｏｌｉホストＨＢ２１５１を変換した。ＨＢ２１５１におけるＦａｂ断片の発現が、細胞を３０℃で、１ｍＭイソプロピル－１－チオ－β－Ｄ－ガラクトピラノシド（IPTG, Sigma）を含む２ＹＴＭ培地で培養することによって誘発された。細胞のペリプラズム抽出物が、２０％（ｗ／ｖ）スクロース、２００ｍＭ ＮａＣｌ、１ｍＭ ＥＤＴＡ及び０．１ｍＭ ＰＭＳＦを含む２５ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．５）に細胞ペレットを再懸濁し、続いておだやかに振とうしながら４℃で１時間インキュベートすることによって調製された。１５，０００ｒｐｍで１５分間遠心分離した後、可溶Ｆａｂタンパク質が、Protein Gカラムをメーカー（Amersham Pharmacia Biotech）の指示に従って用いるアフィニティー・クロマトグラフィーによって上澄みから精製された。

【００８７】

実施例Ｉ（ｅ）．ファージ・ディスプレー・ライブラリーからのヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂの選抜

［００９７］ ３．７×10^{10}クローンを含む大きなヒトＦａｂファージ・ディスプレー・ライブラリー（DeHaard et al., J. Biol. Chem. 274:18218-30(1999)）が、この選抜に用いられた。このライブラリーは、ＰＣＲ増幅された抗体可変軽鎖遺伝子及び可変重鎖

遺伝子を、それぞれ、ヒト定常領域軽鎖遺伝子（κとλ）及びＩｇＧ１重鎖C_H1ドメインをコードするＤＮＡに融合したものから成る。重鎖及び軽鎖の構造（constructs）は、どちらもその前に信号配列－軽鎖にはｐｅｌＢ、重鎖には遺伝子III信号配列－が先行している。重鎖構造はさらに、ファージ・ディスプレーのための遺伝子IIIタンパク質の一部、ヘキサヒスチジン・タグ、及び１１アミノ酸の長さのｃ－ｍｙｃタグ、をコードし、アンバー・コドン（ＴＡＧ）が続いている。ヘキサヒスチジン・タグ及びｃ－ｍｙｃタグは精製又は検出に利用できる。アンバー・コドンは、サプレッサー・ホスト（例えば、ＴＧ１細胞）を用いるファージ・ディスプレー、又は非サプレッサー・ホスト（例えば、ＨＢ２１５１細胞）で変換されたときに、可溶な形のＦａｂ断片の生成を可能にする。

【００８８】

［００９８］ ライブラリー・ストックはlog phaseまで育成されＭ１３－Ｋ０７ヘルパー・ファージで救出（rescue）され、２ＹＴＡＫ培地（１００μｇ／ｍｌのアンピシリンと５０μｇ／ｍｌのカナマイシンを含む２ＹＴ）において一晩３０℃で増幅された。ファージ試料は４％ＰＥＧ／０．５Ｍ ＮａＣｌで沈殿され、５００μｇ／ｍｌのＡＰタンパク質を含む３％脱脂ミルク／ＰＢＳに再懸濁され、３７℃で一時間インキュベートされ、抗ＡＰ Ｆａｂ断片をディスプレーするファージを捕集し、その他の非特異的結合をブロックした。

【００８９】

［００９９］ ＫＤＲ－ＡＰ（ＰＢＳ中で１０μｇ／ｍｌ）がコーティングされたMaxisorp Starチューブ（Nunc, Rosklide, Denmark）が、最初に３％ミルク／ＰＢＳによって３７℃で一時間ブロックされ、次にファージ試料と共にＲＴで１時間インキュベートされた。チューブは、ＰＢＳＴ（０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ）で１０回洗浄され、続いてＰＢＳで１０回洗浄された。結合したファージはＲＴで１０分間１ｍｌの新しく調製された１００ｍＭトリエチルアミン溶液（Sigma, St. Louis, MO）で溶出された。溶出されたファージは、１０ｍｌのmid-log phaseＴＧ１細胞と共に３７℃で３０分間静止及び３０分間振とうしてインキュベートされた。感染したＴＧ１細胞はペレット化され、いくつかの大きな２ＹＴＡＧプレートにプレーティングされ、３０℃で一晩インキュベートされた。プレートに育成された全てのコロニーを３乃至５ｍｌの２ＹＴＡ培地にかき落とし、グリセリン（最終濃度１０％）を混合し、小分けして－７０℃で貯蔵した。次のラウンドの選抜のために、１００μｌのファージ・ストックが２５ｍｌの２ＹＴＡＧ培地に加えられ、mid-log phaseまで育成された。培養は、Ｍ１３Ｋ０７ヘルパー・ファージで救出され、増幅され、沈殿され、上述した手順に従って、免疫チューブに固定されたＫＤＲ－ＡＰの濃度を低くし、結合プロセス後の洗浄の回数を増やして選抜で用いられた。

【００９０】

［０１００］ 固定したＫＤＲで、タンパク質濃度と最初の結合プロセスの後の洗浄の回数を変えて全部で３ラウンドの選抜を行った。各ラウンドの選抜の後、９３のクローンをランダムに採取してファージＥＬＩＳＡによってＫＤＲとの結合をテストした。２回目の選抜の後で採取された９３クローンのうち７０クローン（７５％）、そして３回目の選抜の後で回収されたクローンの９０％よりも多くが、ＫＤＲ結合がポジティブになり、選抜プロセスの効率が高いことが示された。全部で４２の異なるパタンが観測され、単離された抗ＫＤＲ Ｆａｂの優れた多様性が認められた。交差反応性検査は、４２の抗体のうち１９が特異的ＫＤＲ結合物質であることを示したが、残りの２３の抗体は、ＫＤＲにもマウスにおけるその類似体、Ｆｌｋ－１，にも結合した。その後の選抜は、競合的ＶＥＧＦ結合分析で行われ、固定されたＶＥＧＦに対する可溶ＫＤＲの結合が、抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片の存在下と不在下で決定された。この分析によって、ＶＥＧＦとＫＤＲの間の結合をブロックできる４つのＦａｂクローンが同定された。３つはＫＤＲ特異的な結合物質であり、１つはＦｌｋ－１と交差反応した。ＤＮＡ指紋分析と配列決定分析から、ＫＤＲ／ＶＥＧＦをブロックする４つの抗体は全て異なり（図１Ａ）、ＤＮＡ及びアミノ酸配列がユニークであることが確認された。

【００９１】

［０１０１］ ４つのクローンのV_HとV_LのＣＤＲ１，ＣＤＲ２，及びＣＤＲ３のアミノ酸配列を以下の表１に示す。

【００９２】

【表１】

表１－いくつかのＫＤＲ結合ヒトＦａｂのＣＤＲ配列

クローン	ＣＤＲ１	ＣＤＲ２	ＣＤＲ３
軽鎖			
Ｄ２Ｃ６	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 1)	DSSNRAT (SEQ ID NO: 2)	LQHNTFPPT (SEQ ID NO: 3)
Ｄ２Ｈ２	RASQGISSRLA (SEQ ID NO: 4)	AASSLQT (SEQ ID NO: 5)	QQANRFPPT (SEQ ID NO: 6)
Ｄ１Ｈ４	AGTTTDLTYYDLVS (SEQ ID NO: 7)	DGNKRPS (SEQ ID NO: 8)	NSYVSSRFYV (SEQ ID NO: 9)
Ｄ１Ｆ７	SGSTSNIGTNTAN (SEQ ID NO: 10)	NNNQRPS (SEQ ID NO: 11)	AAWDDSLNGHWV (SEQ ID NO: 12)
重鎖			
Ｄ２Ｃ６	GFTFSSYSMN (SEQ ID NO: 13)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	VTDAFDI (SEQ ID NO: 15)
Ｄ２Ｈ２	GFTFSSYSMN (SEQ ID NO: 13)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	VTDAFDI (SEQ ID NO: 15)
Ｄ１Ｈ４	GFTFSSYSMN (SEQ ID NO: 13)	SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 14)	VTDAFDI (SEQ ID NO: 15)
Ｄ１Ｆ７	GGTFSSYAIS (SEQ ID NO: 16)	GGIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 17)	GYDYYDSSGVASPFDY (SEQ ID NO: 18)

【００９３】

V_HとV_L鎖の完全なリストは「配列リスト」で示される。Ｄ１Ｆ７の場合、V_Hのヌクレオチドとアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NOS: 19と20で表され、V_Lのヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 21と22で表される。

【００９４】

［０１０２］ Ｄ２Ｃ６の場合、V_Hのヌクレオチドとアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NOS: 23と24で表され、V_Lのヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 25と26で表される。

【００９５】

［０１０３］ Ｄ２Ｈ２の場合、V_Hのヌクレオチドとアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NOS: 30と31で表され、V_Lのヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 32と33で表される。

【００９６】

［０１０４］ Ｄ１Ｈ４の場合、V_Hのヌクレオチドとアミノ酸配列は、それぞれ、SEQ ID NOS: 27と24で表され、V_Lのヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 28と29で表される。

【００９７】

［０１０５］ 第二のライブラリーは、Ｄ２Ｃ６の単一の重鎖を，元のライブラリーから得られる軽鎖の多様な集団と組み合わせて生成される。さらに１０のＦａｂｓが同定され、ＳＡ１，ＳＡ３，ＳＢ１０，ＳＢ５，ＳＣ７，ＳＤ２，ＳＤ５，ＳＦ２，ＳＦ７，及び１１２１と名付けられた。１０のＦａｂｓのV_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列は

次のように表される。ＳＡ１では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 34と35で表される。ＳＡ３では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 36と37で表される。ＳＢ１０では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 38と39で表される。ＳＢ５では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 40と41で表される。ＳＣ７では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 42と43で表される。ＳＤ２では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 44と45で表される。ＳＤ５では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 46と47で表される。ＳＦ２では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 48と49で表される。ＳＦ７では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 50と51で表される。１１２１では、V_Lに関するヌクレオチドとアミノ酸配列はSEQ ID NOS: 52と53で表される。

【００９８】

［０１０６］　V_LのＣＤＲ配列を以下の表２に示す。

【００９９】

【表２】

表２－ＫＤＲ結合ヒトＦａｂの軽鎖ＣＤＲ配列

クローン	ＣＤＲ１	ＣＤＲ２	ＣＤＲ３
ＳＡ１	TGSHSNFGAGTDV (SEQ ID NO: 54)	GDSNRPS (SEQ ID NO: 55)	QSYDYGLRGWV (SEQ ID NO: 56)
ＳＡ３	RASQNINNYLN (SEQ ID NO: 57)	AASTLQS (SEQ ID NO: 58)	QQYSRTPPT (SEQ ID NO: 59)
ＳＢ１０	TGSSTDVGNYNYIS (SEQ ID NO: 60)	DVTSRPS (SEQ ID NO: 61)	NSYSATDTLV (SEQ ID NO: 62)
ＳＢ５	TGQSSNIGADYDVH (SEQ ID NO: 63)	GHNNRPS (SEQ ID NO: 64)	QSYDSSLSGLV (SEQ ID NO: 65)
ＳＣ７	RASQDISSWLA (SEQ ID NO: 66)	AASLLQS (SEQ ID NO: 67)	QQADSFPPT (SEQ ID NO: 68)
ＳＤ２	RASQSIKRWLA (SEQ ID NO: 69)	AASTLQS (SEQ ID NO: 70)	QQANSFPPT (SEQ ID NO: 71)
ＳＤ５	SGSRSNIGAHYEVQ (SEQ ID NO: 72)	GDTNRPS (SEQ ID NO: 73)	QSYDTSLRGPV (SEQ ID NO: 74)
ＳＦ２	TGSSNIGTGYDVH (SEQ ID NO: 75)	AYTNRPS (SEQ ID NO: 76)	QSFDDSLNGLV (SEQ ID NO: 77)
ＳＦ７	TGSHSNFGAGTDVH (SEQ ID NO: 78)	GDTHRPS (SEQ ID NO: 79)	QSYDYGLRGWV (SEQ ID NO: 80)
１１２１	RASQGIDNWLG (SEQ ID NO: 81)	DASNLDT (SEQ ID NO: 82)	QQAKAFPPT (SEQ ID NO: 83)

【０１００】

実施例II．分析

実施例II（ａ）．ＫＤＲ結合及びＫＤＲ／ＶＥＧＦ相互作用ブロッキングの定量

［０１０７］　直接結合分析では、いろいろな量の可溶Ｆａｂタンパク質が、ＫＤＲをコーティングされた９６ウエルMaxi-sorpマイクロタイター・プレートに加えられ、ＲＴで１時間インキュベートされ、その後プレートはＰＢＳＴで３回洗浄された。次に、プレートは１００μｌのウサギ抗ヒトＦａｂ抗体－ＨＲＰ接合体（Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA）と共にＲＴで１時間インキュベートされた。プレートは

、ファージＥＬＩＳＡに関して上述した手順に従って、洗浄され、現像（develop）された。競合的ＫＤＲ／ＶＥＧＦブロッキング分析では、いろいろな量のＦａｂタンパク質が一定量のＫＤＲ－ＡＰ（１００ｎｇ）と混合され、ＲＴで１時間インキュベートされた。混合物は次に$VEGF_{165}$（２００ｎｇ／ウエル）で予めコーティングされた９６ウエルのマイクロタイター・プレートに移され、ＲＴでさらに２時間インキュベートされ、その後プレートは５回洗浄され、ＡＰの基質（ｐ－ニトロフェニル・ホスフェート、Sigma）が加えられた。４０５ｎｍでの吸収を測定して、結合したＫＤＲ－ＡＰ分子（８）を定量した。次に、IC_{50}、すなわち、ＶＥＧＦとのＫＤＲ結合の５０％阻害に必要なＦａｂタンパク質の濃度、を計算した。

【０１０１】

[０１０８] ４つのＶＥＧＦ－ブロッキング・クローン（Ｄ２Ｃ６，Ｄ２Ｈ２，Ｄ１Ｈ４，Ｄ１Ｆ７）が可溶Ｆａｂとして発現され、Ｅ．ｃｏｌｉのペリプラズム抽出物からProtein Gアフィニティー・クロマトグラフィーによって精製された。これらのクローンの精製されたＦａｂ収率は６０～４００μｇ／リットル培養という範囲にあった。精製されたＦａｂ試料のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析は、予期された分子サイズの単一タンパク質バンドを生じた（図１Ｂ）。

【０１０２】

[０１０９] 図２は、直接結合ＥＬＩＳＡによって分析された、固定された受容体との抗Ｆａｂ断片の量依存的な結合を示す。クローンＤ２Ｃ６とＤ２Ｈ２がより効率的な結合物質であり、クローンＤ１Ｈ４とＤ１Ｆ７がそれに続く。４つのＦａｂｓは、また、全て固定されたＶＥＧＦとのＫＤＲ結合をブロックする（図２Ｂ）。ＶＥＧＦとのＫＤＲ結合の５０％阻害に必要な抗体濃度は、クローンＤ２Ｃ６、Ｄ２Ｈ２、及びＤ１Ｈ４で約２ｎＭであり、クローンＤ１Ｆ７では２０ｎＭである。Ｄ１Ｆ７だけがＶＥＧＦをＦｌｋ－１との結合からブロックし（図２Ｃ）、IC_{50}は約１５ｎＭである。

【０１０３】

実施例II（ｂ）．可溶ｓｃＦｖのＢＩＡコア分析

[０１１０] 可溶Ｆａｂタンパク質のＫＤＲとの結合の反応速度（kinetics）がＢＩＡコア・バイオセンサ（Pharmacia Biosensor）を用いて表面プラズモン共鳴によって測定された。ＫＤＲ－ＡＰ融合タンパク質がセンサチップに固定され、可溶Ｆａｂタンパク質が１．５ｎＭから１００ｎＭの範囲の濃度で注入された。各濃度でセンサーグラムが得られ、プログラム、BIA Evaluation 2.0、を用いて評価され、速度（rate）定数ｋｏｎとｋｏｆｆが決定された。Ｋｄは、速度定数の比ｋｏｆｆ／ｋｏｎから計算された。

【０１０４】

[０１１３] ＫＤＲ特異的な３つのＦａｂ断片は、全て固定された受容体に２乃至４ｎＭというＫｄで結合する（表３）。交差反応性のクローン、Ｄ１Ｆ７，は、Ｋｄが４５ｎＭで、ＫＤＲ特異的なクローンに比べて約１０乃至１５倍弱い。ＫＤＲ特異的な３つのＦａｂ断片のＫｄは、全体としては同様であるが、これらの抗体の個々の結合反応速度、すなわちｋｏｎとｋｏｆｆ、は大きく異なるということに注意しておきたい。例えば、Ｄ２Ｃ６はｏｎ速度が最も速く、Ｄ１Ｈ４はｏｆｆ速度が最も遅い（表３）。

【０１０５】

【表３】

表３－４つの中和するヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片の結合反応速度

クローン	ｋｏｎ ($10^4 M^{-1} S^{-1}$)	ｋｏｆｆ ($10^{-4} S^{-1}$)	Ｋｄ (ｎＭ)
Ｈｕ－２Ｃ６Ｆａｂ	２７．３±８．６*	５．３８±０．５４	１．９７
Ｈｕ－２Ｈ２Ｆａｂ	１２．４±２．９	４．８７±０．１８	３．９３
Ｈｕ－１Ｈ４Ｆａｂ	５．５５±０．５９	１．５３±０．２２	２．７６
Ｈｕ－１Ｆ７Ｆａｂ	４．１４±１．２１	１８．７±２．１２	４５．２

*全ての数値はＢＩＡコア分析によって決定され、少なくとも３つの別々の測定からの平均±ＳＥを表す。

【０１０６】

実施例II（ｃ）．結合エピトープ・マッピング

［０１１２］ ＫＤＲ細胞外Ｉｇ様ドメイン欠失変異体の生成については以前に記載されている（Lu et al., (2000)）。エピトープ・マッピング分析では、全長のＫＤＲ－ＡＰ、２つのＫＤＲ・Ｉｇドメイン欠失変異体のＡＰ融合物、及びＦｌｋ－１－ＡＰがまず、捕集剤としてウサギ抗ＡＰ抗体（DAKO-immunoglobulins, Glostrup, Denmark）を用いて，９６ウエル・プレート（Nunc）に固定された。次に、プレートはいろいろな抗ＫＤＲ Ｆａｂタンパク質と共にＲＴで１時間インキュベートされ、続いてウサギ抗ヒトＦａｂ抗体－ＨＲＰ接合体と共にインキュベートされた。プレートは前に述べたように洗浄され、現像（develop）された。

【０１０７】

［０１１３］ 抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片が、全長のＫＤＲ及び２つのＫＤＲ Ｉｇドメイン欠失変異体を用いてマップされた。ＫＤＲ（１－３）は、最初の３つのＮ末端Ｉｇドメインを含むＫＤＲ変異体である。ＫＤＲ（３）は、第三のＩｇドメインだけを含む変異体である。図３に示されるように、クローンＤ２Ｃ６とＤ１Ｈ４は、ＫＤＲ、ＫＤＲ（１－３）、及びＫＤＲ（３）に同じように良く結合し、したがって、それらの結合エピトープはＩｇドメイン３の内部にある。クローンＤ２Ｈ２とＤ１Ｆ７は、全長ＫＤＲ及びＫＤＲ（１－３）にずっと効率的に結合し、したがって、ＫＤＲ Ｉｇドメイン１から３までの内部のもっと広い結合エピトープを示唆する。クローンＤ１Ｆ７だけがＦｌｋ－１と交差反応する。

【０１０８】

実施例II（ｄ）．抗ミトゲン分析．

［０１１４］ ＨＵＶＥＣ（５×１０^{3}細胞／ウエル）が９６ウエル組織培養プレート（Wallach, Inc., Gaithersburg, MD）に、ＶＥＧＦ、基礎繊維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、又は表皮細胞増殖因子（ＥＧＦ）を含まないＥＢＭ－２培地２００μｌにプレーティングされ、３７℃で７２時間インキュベートされた。いろいろな量のＦａｂタンパク質が重複したウエルに加えられ、３７℃で１時間、予備インキュベートされ、その後$VEGF_{165}$が最終濃度１６ｎｇ／ｍｌまで加えられた。１８時間のインキュベーションの後、０．２５μＣｉの[^{3}Ｈ]ＴｄＲ（Amersham）が各ウエルに加えられ、さらに４時間インキュベートされた。細胞はＰＢＳで１回洗浄され、トリプシン化され、細胞ハーベスター（Harvester 96, MACH III, TOMTEC, Orange, CT）によってガラス・フィルター（Printed Filtermat A, Walach）上に収穫された。膜はH_2Oで３回洗浄され、空気乾燥された。シンチレーション流体が加えられ、ＤＮＡに取り込まれた放射能がシンチレーション・カウンター（Wallach, Model 1450 Microbeta Scintillation Counter）で決定された。

【０１０９】

[０１１５] ヒト抗ＫＤＲ ＦａｂがＶＥＧＦで刺激されるＨＵＶＥＣでのミトゲン活性をブロックする能力が図４に示されている。４つのヒトＦａｂ断片は全てＨＵＶＥＣにおいてＶＥＧＦで誘発されるＤＮＡ合成を量依存的な仕方で阻害した。ＨＵＶＥＣにおけるＶＥＧＦ刺激された[^{3}Ｈ]ＴｄＲ取り込みを５０％阻害するＦａｂ濃度（$ＥＣ_{50}$）は、クローンＤ２Ｃ６とＤ１Ｈ４では約０．５ｎＭ、クローンＤ２Ｈ２では０．８ｎＭ、そしてクローンＤ１Ｆ７では１５ｎＭである。対照は、ＶＥＧＦのみ（１５００ｃｐｍ）及び単なる培地（６０ｃｐｍ）である。重複したウエルが分析された。示されたデータは少なくとも３つの別々の実験を表している。

【０１１０】

実施例II（ｃ）．白血病移動分析．

[０１１６] ＨＬ６０及びＨＥＬ細胞が血清を含まない素ＲＰＭＩ１６４０媒質で３回洗浄され、この媒質に$１×１０^{6}$／ｍｌで懸濁された。１００μｌの細胞懸濁液のアリクオットが、ＨＬ６０細胞に対する３μｍポアのトランス・ウエル・インサート、又はＨＥＬ細胞に対する８μｍポアのトランス・ウエル・インサート（Costar（商標），Corning Incorporated, Corning, NY）に加えられ、抗ＫＤＲ Ｆａｂタンパク質（５μｇ／ｍｌ）と共に３７℃で３０分間インキュベートされた。次に、インサートは、０．５ｍｌの血清を含まないＲＰＭＩ１６４０を含み、ＶＥＧＦ１６５を含む又は含まない２４ウエル・プレートのウエルに入れられた。移動は、３７℃、５％$ＣＯ_{2}$で、ＨＬ６０細胞では１６－１８時間、ＨＥＬ細胞では４時間行われた。移動した細胞が下方コンパートメントから集められ、Coulterカウンター（Model Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, England）でカウントされた。

【０１１１】

[０１１７] ＶＥＧＦで誘発されるＨＬ６０及びＨＥＬ細胞の量依存的な仕方での移動、最大の刺激が２００ｎｇ／ｍｌで達成される（図５Ａ）。全ての抗ＫＤＲ ＦａｂＨＬ６０及びＨＥＬ細胞のＶＥＧＦで誘発される移動を有意に阻害した（図５Ｂ）。対照として、ＥＧＦ受容体に向けられた抗体であるＣ２２５のＦａｂ断片は、この分析で有意な阻害効果を示さなかった。

【０１１２】

実施例III．ＩｇＧの産生

実施例III（ａ）．ＩｇＧ発現のためのベクターの構成．

[０１１８] ＩｇＧ軽鎖及び重鎖を発現させるための別々のベクターが構成された。クローニングされた$Ｖ_{Ｌ}$遺伝子が消化され、ベクターｐＫＮ１００（ＭＲＣ）に結紮された。ローニングされた$Ｖ_{Ｈ}$遺伝子が消化され、ヒトＩｇＧ Ｉ（γ）重鎖定常ドメインを含むベクターｐＧＩＤ１０５に結紮された。ｐＫＮ１００とｐＧＩＤ１０５はＭＲＣから入手できる。構成物（construct）は制限酵素による消化で調べられ、ジデオキシヌクレオチド配列決定によって検証された。どちらの場合も、発現はＨＣＭＶプロモーターのコントロールの下にあり、人工の終止配列によって終結される。

【０１１３】

[０１１９] 組み立てられた重鎖及び軽鎖遺伝子は、次にLonza GS発現ベクターｐＥＥ６．１及びｐＥＥ１２．１でクローニングされる。重鎖及び軽鎖ベクターは、ＣＨＯ細胞及びＮＳ０細胞の安定な形質移入のために、単一のベクターに組み合わされた。形質移入された細胞は、グルタミン・マイナス培地で培養され、抗体を１ｇ／Ｌという高いレベルで発現した。

【０１１４】

実施例III（ｂ）．ヒト抗ＫＤＲ ＩｇＧの生成と特性決定

[０１２０] ＩＭＣ－２Ｃ６及びＩＭＣ－１１２１の両方が、安定に形質移入され、血清を含まない条件下で培養されたＮＳ０細胞ラインで生成され、Protein Aアフィニティー・クロマトグラフィーを用いてバッチ細胞培養から精製された。抗体試料の純度はＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析され、濃度はＥＬＩＳＡによって、抗ヒトＦｃ抗体を捕集剤（capturing agent）として用い、抗ヒトκ鎖抗体－ホースラディッシュ・ペルオキシダー

ゼ（ＨＲＰ）接合体を検出剤として用いて決定された。臨床グレードの抗体、ＩＭＣ－Ｃ２２５，が校正用の標準として用いられた。各抗体試料のエンドトキシン・レベルを検査して、生成物がエンドトキシンで汚染されていないことを確認した。

【０１１５】

［０１２１］ 抗ＫＤＲ抗体は、ＫＤＲとの結合及びＶＥＧＦ結合のブロッキングに関して評価された。直接結合分析では、いろいろな量の抗体がＫＤＲコーティングされた９６ウエルMaxi-sorpマイクロタイター・プレート（Nunc, Roskilde, Denmark）に加えられ、室温（ＲＴ）で１時間インキュベートされ、その後プレートは０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０（商標）を含むＰＢＳで３回洗浄された。次に、プレートは、１００μｌのウサギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ－ＨＲＰ接合体（Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc., West Grove, PA）と共にＲＴで１時間インキュベートされた。プレートは、上で述べたように洗浄され、現像された。ヒト抗体ＩＭＣ－２Ｃ６とＩＭＣ－１１２１がＩＭＣ－１Ｃ１１（ＫＤＲに特異的なマウス抗体）及びＩＭＣ－Ｃ２２５（ＥＧＦＲに特異的なキメラ抗体）と比較された。抗ＫＤＲ抗体はＫＤＲと量依存的な仕方で結合し、ＩＭＣ－１１２１が最も強い結合物質である（図６Ａ）。

【０１１６】

［０１２２］ ＫＤＲがＶＥＧＦと結合しないように抗ＫＤＲ抗体がブロックする効力が競合分析で測定された。いろいろな量の抗体が固定された量のＫＤＲ－ＡＰ（１００ｎｇ）と混合され、ＲＴで１時間インキュベートされた。次に、混合物は$VEGF_{165}$が予めコーティング（２００ｎｇ／ウエル）されたマイクロタイター・プレートに移され、ＲＴでさらに２時間インキュベートされ、その後、プレートは５回洗浄され、ＡＰの基質（ｐ－ニトロフェニル・ホスフェート、Sigma）が加えられ、４０５ｎｍで吸収を測定して結合したＫＤＲ－ＡＰ分子を定量した。次に、IC_{50}、すなわち、ＶＥＧＦとのＫＤＲの結合の５０％阻害に必要な抗体濃度、が計算された。抗ＫＤＲ抗体はＫＤＲがＶＥＧＦと結合するのを、同じ様な効力（potency）で強くブロックした。IC_{50}は３つの抗体すべてについて約０．８から１．０ｎＭである。対照の抗体、ＩＭＣ－Ｃ２２５（抗ヒトＥＧＦＲ）、はＫＤＲに結合せず、ＫＤＲ／ＶＥＧＦ相互作用をブロックしない。

【０１１７】

［０１２３］ 抗体の親和度（affinity）又は結合力（avidity）は、上述のようにＢＩＡコア分析で決定された。抗ＫＤＲ抗体の結合反応速度、すなわち、結合速度定数（ｋｏｎ）と離離速度定数（ｋｏｆｆ）、が測定され、解離定数、Ｋｄ、が計算された（表４）。

【０１１８】

【表４】

表４－抗ＫＤＲ抗体の結合反応速度

抗体	ｋｏｎ（$10^4M^{-1}S^{-1}$）	ｋｏｆｆ（10^4S^{-1}）	Ｋｄ（ｎＭ）
ｐ１Ｃ１１ｓｃＦｖ	７．７±２．１*	１．０±０．０９	１．４±０．３
ＩＭＣ－１Ｃ１１	１３．４±２．９	０．３７±０．１３	０．２７±０．０６
Ｈｕ－２Ｃ６Ｆａｂ	１７．１±５．７	５．５±０．７６	３．６±１．７
ＩＭＣ－２Ｃ６ＩｇＧ	２１．２±８．１	０．４３±０．０３	０．２０±０．０１
Ｈｕ－１１２１Ｆａｂ	２９．６±７．３	０．３１±０．０６	０．１１±０．０２
ＩＭＣ－１１２１ＩｇＧ	４７．９±２．４	０．２５±０．０４	０．０５±０．０１

*全ての数値はＢＩＡコア分析によって決定され、少なくとも３つの別々の決定からの平均±ＳＥを表す。

【０１１９】

ＩＭＣ－１Ｃ１１は固定されたＫＤＲに０．２７ｎＭという解離定数（Ｋｄ）で結合するが、これは相手方のＦａｂに比べて約５倍高い。ＩＭＣ－２Ｃ６のＫｄは０．２ｎＭであり、これは一価のＨｕ－２Ｃ６Ｆａｂに比べて約１８倍高いが、それは主としてｏｆｆ速度が改善されるためである。Ｈｕ－２Ｃ６Ｆａｂの親和度の成熟はＫｄが（３．６ｎＭから０．１１ｎＭへ）３３倍改善されたＨｕ－１１２１Ｆａｂに導いた。Ｈｕ－１１２１Ｆａｂを二価のＩｇＧ、ＩＭＣ－１１２１，に変換すると、全体としての結合力（binding avidity）が約２倍増加した。

【０１２０】

実施例III（ｃ）．細胞へのＶＥＧＦの結合及びＨＵＶＥＣのＶＥＧＦ刺激による有糸分裂誘発

［０１２４］ 細胞ベースの放射免疫分析で、いろいろな量の抗ＫＤＲ抗体が固定された量（２ｎｇ）の^{125}Ｉ標識されたＶＥＧＦ$_{165}$（R&D Systems）と混合され、９６ウエル・マイクロタイター・プレートで育成された８０～９０％コンフルエント単層に加えられた。このプレートはＲＴで2時間インキュベートされ、冷たいＰＢＳで５回洗浄され、内皮細胞に結合した放射能が測定された。図７Ａに示されているように、抗ＫＤＲ抗体はＨＵＶＥＣとの結合に関して、放射生標識されたＶＥＧＦと効率的に競合した。データは、三重複の測定に関する平均±ＳＤを表している。

【０１２１】

［０１２５］ この抗体は、また、ＶＥＧＦ刺激されたＨＵＶＥＣの有糸分裂誘発も量依存的な仕方でブロックした（図７Ｂ）。Ｆａｂｓに関して上で述べたように、いろいろな量の抗ＫＤＲ抗体が、まず増殖因子欠乏ＨＵＶＥＣ（５×１０^{3}細胞／ウエル）と共に３７℃で１時間プレインキュベートされ、その後ＶＥＧＦ$_{165}$が最終濃度１６ｎｇ／ｍｌまで加えられた。１８時間のインキュベーションの後、各ウエルに０．２５μＣｉの[^{3}Ｈ]－ＴｄＲ（Amersham）が加えられ、さらに４時間インキュベートされた。細胞は洗浄され、収穫され、ＤＮＡに取り込まれた放射能がシンチレーション・カウンターで測定された。親和度が最も高い抗体ＩＭＣ－１１２１が最も効力が高い阻害物質であり、ＥＤ$_{50}$，すなわち、[^{3}Ｈ]－ＴｄＲの取り込みの５０％阻害を生ずる濃度、は約０．７ｎＭであったが、これに対してＩＭＣ－１Ｃ１１とＩＭＣ－２Ｃ６のＥＤ$_{50}$，は１．５ｎＭであった。

【０１２２】

実施例IV．白血病細胞と白血病進行の抑制

実施例IV（ａ）．白血病細胞によるＶＥＧＦとＫＤＲの発現

［０１２６］ 我々は３つの骨髄性白血病細胞ライン：ＨＬ６０（前骨髄球性）；ＨＥＬ（骨髄巨核球性）；及びＵ９３７（組織球性）におけるＶＥＧＦ及びＫＤＲ発現を、ＲＴ－ＰＣＲによって調べた。次のプライマーを用いて、ＶＥＧＦ、Ｆｌｔ－１，ＫＤＲ、及び内部対照、α－アクチンを増幅した：ＶＥＧＦ順方向：５′－ＴＣＧＧＧＣＣＴＣＣＧＡＡＡＣＣＡＴＧＡ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８６）、及び逆方向：５′－ＣＣＴＧＧＴＧＡＧＡＧＡＴＣＴＧＧＴＴＣ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８７）；Ｆｌｔ－１順方向：５′－ＴＴＴＧＴＧＡＴＴＴＴＧＧＣＣＴＴＧＣ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８８）；及び逆方向：５′－ＣＡＧＧＣＴＣＡＴＧＡＡＣＴＴＧＡＡＡＧＣ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：８９）；ＫＤＲ順方向：５′－ＧＴＧＡＣＣＡＡＣＡＴＧＧＡＧＴＣＧＴＧ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９０）；及び逆方向：５′－ＣＣＡＧＡＧＡＴＴＣＣＡＴＧＣＣＡＣＴＴ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９１）；α－アクチン順方向：５′－ＴＣＡＴＧＴＴＴＧＡＧＡＣＣＴＴＣＡＡ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９２）；及び逆方向：５′－ＧＴＣＴＴＴＧＣＧＧＡＴＧＴＣＣＡＣＧ－３′（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９３）。ＰＣＲ生成物は１％アガロース・ゲルで分析された。図８Ａに示されているように、３つの細胞ラインはすべてＶＥＧＦ発現に関して陽性（positive）であり、ＨＬ６０とＨＥＬはＫＤＲ発現に関しても陽性であるが、Ｕ９３７は陽性でない。３つの細胞ラインは、ＲＴ－ＰＣＴによって検出されるＦｌｔ－１発現に関しても陽性である。

【０１２３】
［０１２７］　１０％ＦＣＳ又は血清を含まない条件の下で培養された３つの白血病細胞ラインのＶＥＧＦ産生が調べられた。白血病細胞が集められ、素ＲＰＭＩ１６４０媒質で洗浄され、１０％ＦＣＳを加えて又は加えずに、２４ウエル・プレートに5×10^{5}／ｍｌの密度で播種された。細胞は３７℃で７２時間培養され、その後細胞の総数がCoulterカウンター（Model Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, England）を用いてカウントされ、上澄み中のＶＥＧＦ濃度がＥＬＩＳＡキット（Biosource International, Camarillo, CA）を用いて決定された。白血病細胞は、in vitroで培養されたときにかなりの量のＶＥＧＦを分泌し（図８Ｂ）、ＨＬ６０もＵ９３７細胞も血清欠乏条件の下でより多くのＶＥＧＦを産生した。

【０１２４】
実施例IV（ｂ）．白血病細胞のＶＥＧＦで誘発される移動の阻害．
［０１２８］　実施例II（ｅ）で述べたような白血病細胞移動分析が３つの白血病細胞ラインについて行われた。移動は、ＨＬ６０細胞では１６～１８時間、ＨＥＬとＵ９３７細胞では４時間行われた。

【０１２５】
［０１２９］　３つの白血病細胞ラインはすべてＶＥＧＦに応答して移動する（図９）。抗ＫＤＲ抗体と共にインキュベートすると、ＶＥＧＦで誘発されるＨＬ６０とＨＥＬ細胞の移動は量依存的な仕方で阻害されたが（図９Ａと９Ｂ）、ＫＤＲを発現しないＵ９３７細胞の移動には何も影響はなかった（図９Ｃ）。しかし、ＶＥＧＦで誘発されるＵ９３７細胞の移動は、抗ヒトＦｌｔ－１抗体、Ｍａｂ６１２，によって効率的に阻害された（図９Ｃ）。予期されるように、抗ＥＧＦＲ抗体、ＩＭＣ－Ｃ２２５，はＶＥＧＦで誘発されるヒト白血病細胞の移動に何も影響を示さなかった。

【０１２６】
実施例IV（ｂ）．In vivoでの白血病細胞増殖の阻害．
［０１３０］　全ての実験に生後６～８週の性別マッチした（雌）ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスが用いられた。マウスは１３７Ｃｓガンマ線源から約０．９Ｇｙ／分という線量率で３．５Ｇｙ照射され、2×10^{7}ＨＬ６０細胞が接種された。腫瘍接種から３日後、７から９匹のマウスのグループが、週２回、いろいろな用量のＩＭＣ－１Ｃ１１，ＩＭＣ－２Ｃ６，又はＩＭＣ－１１２１抗体で腹腔内注射によって治療された。マウスは毎日、毒性の徴候が見られないか観察され、生存時間が記録された。統計的分析には、ノンパラメトリック片側Mann-Whitney Rank Sum検定法が用いられた。

【０１２７】
［０１３１］　治療されなかった全てのマウスは１７日以内に死んだ（図１０，平均生存時間、１４±３日）。この高い腫瘍負荷で、ＩＭＣ－１Ｃ１１による２００μｇ／マウス／注射での治療はある程度生存時間を延ばしたが、全てのマウスが３５日以内に死んだ（それぞれ、平均生存時間２１±７日；生存時間中央値１９日。対照グループに比べてｐ＝０．０３）。ＩＭＣ－２Ｃ６は、２００μｇ／マウス／注射という同じ用量で、マウスの生存時間を３４±１２日に有意に延ばした（中央値＝２９日。対照と比べて$p<0.01$，ＩＭＣ－１Ｃ１１治療グループに比べてｐ＝０．０１）。最も親和度が高い抗体、ＩＭＣ－１１２１，は、特にＩＭＣ－１Ｃ１１に対して、ずっと強い抗白血病効果を示した。ＩＭＣ－１１２１で治療されたマウスは、６３±１２日生存した（中央値＝６０日。ＩＭＣ－１Ｃ１１及びＩＭＣ－２Ｃ６治療グループの両方に比べて$p<0.001$）。テストされた抗体用量がもっと低い場合（１００μｇ／マウス／注射）、ＩＭＣ－１１２１はやはり効力が高かった。この低い用量のＩＭＣ－１１２１で治療されたマウスは４６±１６日生存した（中央値＝４１日）。実験の間、抗体で治療されたマウスのいずれにおいても明白な毒性は何も認められなかった。

【０１２８】
［０１３２］　本明細書の全体にわたって、いろいろな刊行物、特許、及び特許出願に言及した。それらの刊行物、特許、及び特許出願の教示と開示は、本発明が関わる技術の現

状をより十分に記述するために、本明細書にその全体を援用する。
【０１２９】
［０１３３］ 当業者であれば本明細書に開示された発明の原理にはいろいろな変形を施すことが可能であることは言うまでもなく、かつ予期されるが、そのような変更は本発明の範囲に含まれるものとする。
【図面の簡単な説明】
【０１３０】
【図１】［００１８］ 図１は、ヒト抗ＤＫＲ Ｆａｂ断片の同定と表現を示す。図１Ａ：４つの中和抗ＫＤＲ ＦａｂのＢｓｔＮＩ消化パタン。図１Ｂ：非還元条件下での精製されたＦａｂ断片のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析；レーン１，Ｄ１Ｆ７；レーン２，Ｄ２Ｃ６；レーン３，Ｄ１Ｈ４；レーン４，Ｄ２Ｈ２．
【図２】［００１９］ 図２は、ヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片による、ＫＤＲとの結合、ＫＤＲ／ＶＥＧＦ相互作用のブロッキング、及びFLK-1／ＶＥＧＦ相互作用のブロッキングを示す。図２Ａ：固定されたＫＤＲとのヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂの量依存的な結合。図２Ｂ：抗ＫＤＲ Ｆａｂによる、固定されたＶＥＧＦとＫＤＲの結合の阻害。図２Ｃ：抗ＫＤＲ Ｆａｂによる、固定されたＶＥＧＦとFlk-1の結合の阻害。いろいろな量のＦａｂタンパク質が、固定された量のＫＤＲ－ＡＰ（２Ｂ）又はFlk-1（２Ｃ）と共にＲＴにある溶液内で１時間インキュベートされた。
【図３】［００２０］ 図３は、抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片のエピトープ・マッピングを示す。ＫＤＲ－ＡＰ、そのドメイン欠失－ＡＰ変異体、及びFlk-1－ＡＰが、９６ウエル・プレートに捕捉され、ヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片と共にインキュベートされた。データは、全長ＫＤＲへのＦａｂ断片の結合に対する比で示されている。
【図４】［００２１］ 図４は、ＶＥＧＦによるＨＵＶＥＣ有糸分裂誘発のヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片による阻害を示す。いろいろな量の抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片が重複したウエルに加えられ、３７℃で１時間インキュベートされ、その後ＶＥＧＦがウエルに最終濃度１６ｎｇ／ｍｌまで加えられた。細胞を収穫し、ＤＮＡに取り込まれた放射能が決定された。
【図５】［００２２］ 図５は、ヒト白血病細胞のＶＥＧＦで刺激された移動のヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片による阻害を示す。図５Ａ：ＶＥＧＦはＨＬ６０及びＨＥＬ細胞の移動を量依存的な仕方で促進する。図５Ｂ：ＶＥＧＦ刺激されたヒト白血病細胞の移動の抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片による阻害を示す。固定されたＶＥＧＦに結合したＫＤＲ－ＡＰの量は、プレートをＡＰ基質と共にインキュベートし、Ａ４０５ｎｍの読み取りで定量化した。
【図６】［００２３］ 図６は、ヒト抗ＫＤＲ Ｆａｂ断片によるＫＤＲとの結合及びＫＤＲ／ＶＥＧＦ相互作用の阻害を示す。図６Ａ：固定されたＫＤＲとの抗ＫＤＲの量依存的な結合。いろいろな量の抗体が、ＲＴで１時間、ＫＤＲでコーティングされた９６ウエル・プレートでインキュベートされた。図６Ｂ：固定されたＶＥＧＦとＫＤＲの結合のヒト抗ＫＤＲ抗体による阻害。いろいろな量の抗体がＲＴにおける溶液中の固定された量のＫＤＲ－ＡＰと共に１時間インキュベートされた。
【図７】［００２４］ 図７は、ＶＥＧＦの結合の阻害及びＶＥＧＦで誘発されるＨＵＶＥＣの有糸分裂の阻害を示す。図７Ａ：放射性標識されたＶＥＧＦと細胞表面ＫＤＲとの結合のヒト抗ＫＤＲ抗体による阻害。いろいろな量の抗ＫＤＲ抗体が２ｎｇの^{125}Ｉ標識されたＶＥＧＦ$_{165}$と混合されてＨＵＶＥＣ細胞の８０－９０％コンフルエントな単層に加えられた。細胞はＲＴで２時間インキュベートされ、洗浄され、結合した放射能が測定された。図７Ｂ：ＶＥＧＦによって誘発されるＨＵＶＥＣ細胞分裂のヒト抗ＫＤＲ抗体による阻害。いろいろな量の抗ＫＤＲ抗体がＨＵＶＥＣ細胞と共に１時間インキュベートされ、続いてＶＥＧＦが加えられた。細胞が収穫され、ＤＮＡに組み込まれた放射能が決定された。
【図８】［００２５］ 図８は、ヒト白血病細胞によるＫＤＲとＶＥＧＦの発現を示す。図８Ａ：いろいろなｍＲＮＡレベルがＲＴ－ＰＣＲによって決定された。レーン１：分子量マーカー；１０００，８５０，６５０５００，４００ｂｐ；レーン２：ネガティブ対照；レーン３：ＨＬ６０細胞（前骨髄細胞）；レーン４：ＨＥＬ細胞（骨髄巨核球）；レーン

５：Ｕ９３７細胞（hisitocytic）；レーン６：ＨＵＶＥＣ．図８Ｂ：１０％ＦＣＳ又は血清を含まない培地で培養されたヒト白血病細胞によるＶＥＧＦの分泌。

【図９】[００２６] 図９は、ＶＥＧＦに刺激されたヒト白血病細胞の移動のヒト抗ＫＤＲ抗体による阻害を示す。図９Ａ：ＨＬ６０細胞。図９Ｂ：ＨＥＬ細胞。図９Ｃ：Ｕ９３７細胞。

【図１０】[００２７] 図１０は、生存率によって決定されたin vivoでの白血病の進行の阻害を示す。致死量よりも低い照射を受けたＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスに2×10^{7}ＨＬ６０細胞細胞を接種し、いろいろな量の１Ｃ１１，２Ｃ６，又はＩＭＣ－１１２１の腹腔内注射によって治療した。

【図１】

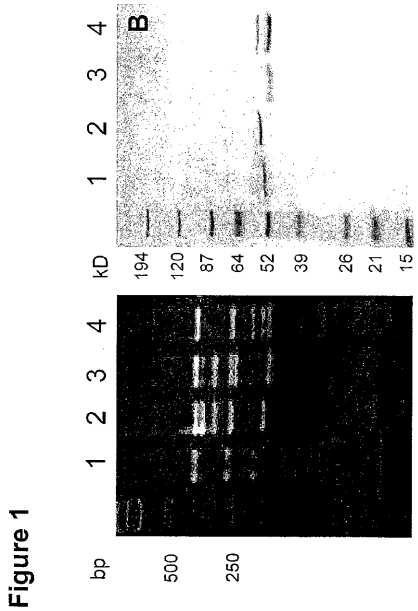
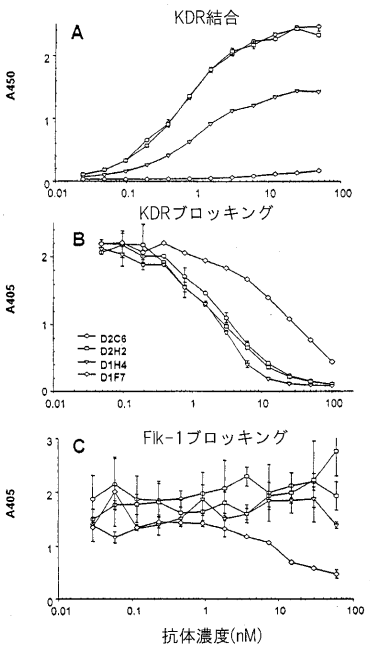


Figure 1

【図２】

Figure 2



【図３】

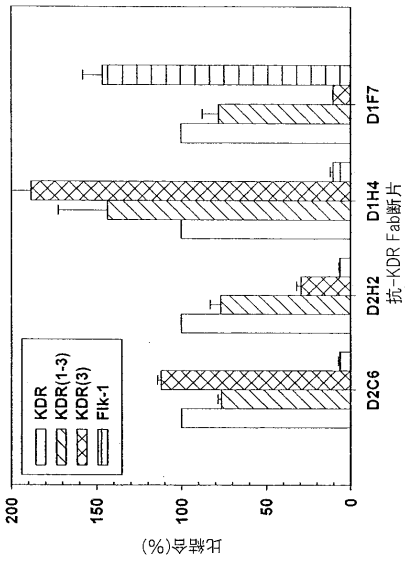


Figure 3

【図４】

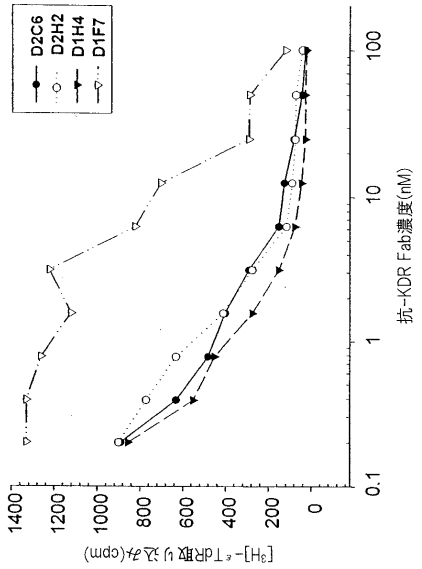


Figure 4

【図５】

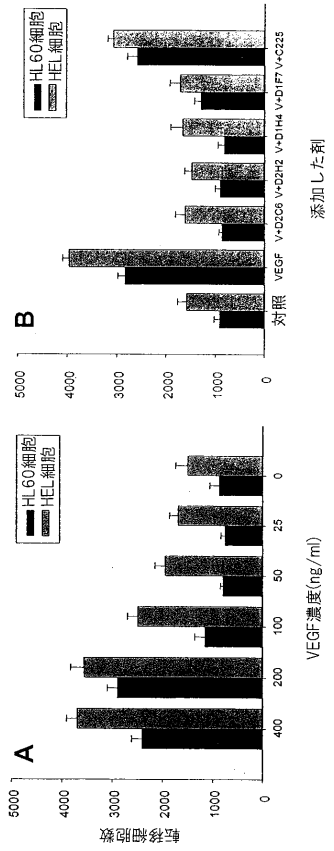


Figure 5

【図６】

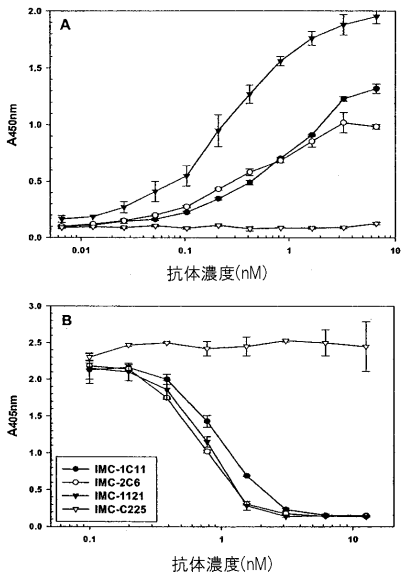


Fig. 6

【図７】

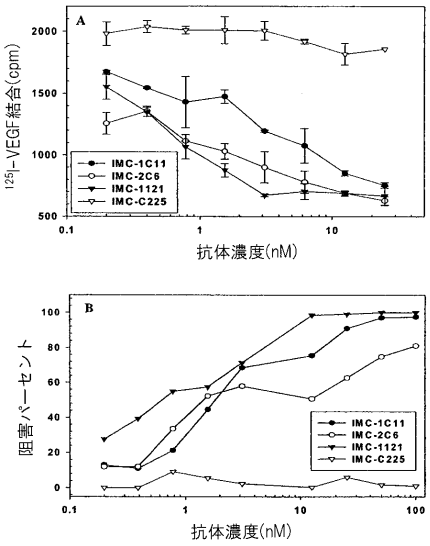


Fig. 7

【図８】

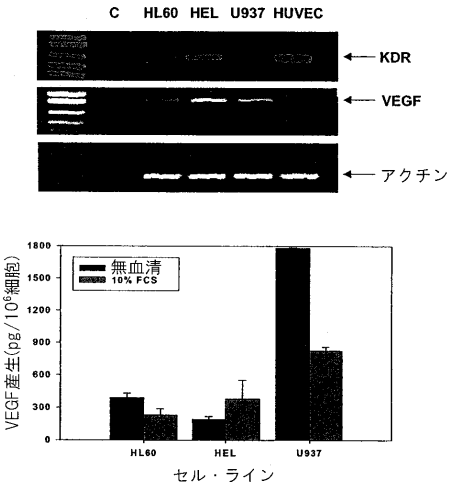


Fig. 8

【図９】

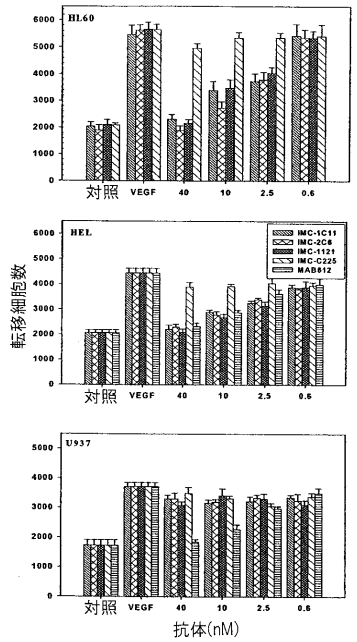


Fig. 9

【図１０】

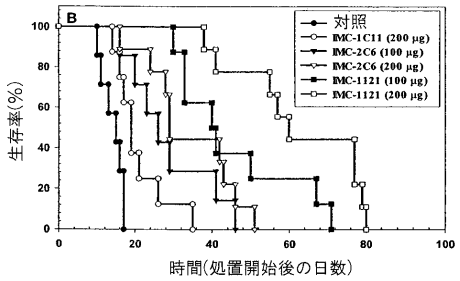


Fig. 10

【配列表】
2005526506000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/06459

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : C07H 21/04; C07K16/00; C12N 15/63, 15/85, 15/86
US CL : 435/320.1, 325; 530/388.15; 536/23.5
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)
U.S. : 435/320.1, 325; 530/388.15; 536/23.5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LU D, et al. Selection of high affinity human neutralizing antibodies to VEGFR2 from a large antibody phage disply library for antiangiogenesis therapy. Int. J. Cancer. January 2002, Vol. 97, pages 393-399; entire document.	1-3
X,E	US 2003/0108545 A1 (ROCKWELL et al.) 12 June 2003 (12.06.2003); entire document, particularly SEQ ID NOs: 24 and 26.	1-5, 8-10, and 14-1E7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 December 2003 (10.12.2003)

Date of mailing of the international search report
10 MAR 2004

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Stephen L. Rawlings, Ph.D.
Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/06459

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

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

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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

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

Remark on Protest
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06459

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-17, drawn to an antibody.

Group II, claim(s) 18, 19, and 21, insofar as the claims are drawn to a method for inhibiting angiogenesis.

Group III, claim(s) 18 and 20-29, insofar as the claims are drawn to a method for reducing tumor growth.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. The species are as follows:

Claims 1 and 18-20 are generic to a plurality of species of invention wherein said antibody is selected from the group consisting of:

An antibody comprising a heavy chain domain and a light chain domain represented by SEQ ID NOs: 24 and 26, respectively;

An antibody comprising a heavy chain domain and a light chain domain represented by SEQ ID NOs: 24 and 53, respectively;

An antibody comprising a heavy chain domain represented by SEQ ID NO: 20;

An antibody comprising a heavy chain domain represented by SEQ ID NO: 31;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 22;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 29;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 33;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 35;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 37;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 39;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 41;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 43;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 45;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 47;

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 49; and

An antibody comprising a light chain domain represented by SEQ ID NO: 51.

Claim 20 is generic to a plurality of species of invention wherein said tumor is selected from the group consisting of:

(a) Tumor of the colon;

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06459

(b) Breast tumor; and

(c) A non-solid tumor.

Claim 20 is further generic to a plurality of species of invention wherein said method further comprises administering an agent selected from the group consisting of:

(1) An epidermal growth factor receptor antagonist;

(2) *fms*-like tyrosine kinase receptor (flt-1) VEGFR-1;

(3) Chemotherapeutic agent; and

(4) Radiation.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Lu et al. (*Int J Cancer. 2002 Jan 20; 97 (3): 393-9*) teach a human antibody that binds selectively to KDR.

The special technical feature of group I is an antibody.

The special technical feature of group II is inhibiting angiogenesis.

The special technical feature of group III is reducing tumor growth.

Groups I-III do not share the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept under PCT Rules 13.1 and 13.2.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of species (a) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 26.

The special technical feature of species (b) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 53.

The special technical feature of species (c) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 20.

The special technical feature of species (d) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 31.

The special technical feature of species (e) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 22.

The special technical feature of species (f) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 29.

The special technical feature of species (g) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 33.

The special technical feature of species (h) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 35.

The special technical feature of species (i) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 37.

The special technical feature of species (j) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 39.

The special technical feature of species (k) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 41.

The special technical feature of species (l) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 43.

The special technical feature of species (m) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 45.

The special technical feature of species (n) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 47.

The special technical feature of species (o) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 49.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/06459

The special technical feature of species (p) of claim 1 is an antibody comprising SEQ ID NO: 51.

Accordingly, the species of invention encompassed by claims 1 and 18-20 do not have the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept.

The special technical feature of species (a) of claim 20 is reducing the growth of a tumor of the colon.

The special technical feature of species (b) of claim 20 is reducing the growth of a breast tumor.

The special technical feature of species (c) of claim 20 is reducing the growth of a non-solid tumor.

Accordingly, the species of invention encompassed by claim 20 do not have the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept.

The special technical feature of subspecies (1) of claim 20 is further administering an epidermal growth factor receptor antagonist.

The special technical feature of subspecies (2) of claim 20 is further administering *fms*-like tyrosine kinase receptor (flt-1) VEGFR-1.

The special technical feature of subspecies (3) of claim 20 is further administering chemotherapeutic agent.

The special technical feature of subspecies (4) of claim 20 is further administering radiation.

Accordingly, the subspecies of invention encompassed by claim 20 do not have the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept.

Continuation of Box II Item 4:
Claims 1-5, 8-10, and 14-16, insofar as the claims are drawn to an antibody comprising SEQ ID NOs: 24 and 26.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
Databases GENESEQ, ISSUED PATENTS, PUBLISHED APPLICATIONS, PRI, SPTREMBL, SWISS PROTEIN: SEQ ID NOs: 24 and26; WEST, MEDLINE: human anti-KDR antibody, D2C6.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ｃ０７Ｋ 16/28	Ａ６１Ｐ 43/00	１１１	
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ０７Ｋ 16/28		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 1/21		
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,HU,IE,IT,LU,MC,NL,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,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ジュー，ツェンピン
アメリカ合衆国，ニュージャージー ０７４３６，オークランド，ボウルダー ラン ９

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11
4B065 AA01X AA57X AA87X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44
4C084 AA01 AA02 AA07 AA19 DC01 MA02 MA52 MA55 MA66 NA14
ZB211 ZB261 ZC711
4C085 AA13 AA14 AA26 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC04 CC05
DD22 DD23 EE01 EE03 FF24 GG01 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 FA74 GA26