

(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2017-531434

(P2017-531434A)

(43) 公表日 平成29年10月26日(2017. 10. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-518903 (P2017-518903)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月7日 (2015. 10. 7)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月26日 (2017. 5. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/054569
 (87) 国際公開番号 W02016/057726
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016. 4. 14)
 (31) 優先権主張番号 62/061, 097
 (32) 優先日 平成26年10月7日 (2014. 10. 7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513190449
 カドモン コーポレーション, リミティド
 ライアビリティ カンパニー
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 1001
 6, ニューヨーク, イースト トウエンテ
 イナインス ストリート 450
 (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 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト 抗VEGFR-2/KDR 抗体S

(57) 【要約】

本発明はVEGFR-2に結合する抗体に関する。該抗体は、腫瘍性疾患、過剰増殖性疾患、及び血管新生疾患の治療に用いられる。単独で用いても、他の剤との組合せで用いてもよい。

【選択図】なし

```

Kabat 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
No. 1234567890123456789012345 678901234567 67890123
SEQ ID NO. 4 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GTFSSYVWG-- WVRQAAPGK
12 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GTFSSYVWG-- WVRQAAPGK

Kabat 5 6 7 8 9 10 11 12
No. 4567890 012ARQ3456789012345 67890123456789012ARQ
SEQ ID NO. 4 GLEWVS STFS--SGGATWVADSVK RPTISRDNSKNTLYLQMNSL
12 GLEWVS STFS--SGGATWVADSVK RPTISRDNSKNTLYLQMNSL

Kabat 9 10 11 12
No. 345678901234 567890ARQDFGRITJK12 34567890123
SEQ ID NO. 4 RARDTAVVYCAR GTFSSYVWG-- WVRQAAPGK
12 RARDTAVVYCAR GTFSSYVWG-- WVRQAAPGK

```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト V E G F R 2 に結合する単離された抗体又はその断片であって、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメインを含み、

(i) C D R 1 配列が G F T F S W Y V M G (配列番号 2 3 7) であり、

(ii) C D R 2 配列が、

S I Y P Q G G A T S Y A D S V K G (配列番号 2 3 8)、

S I Y P Q G G A T N Y A D S V K G (配列番号 2 3 9)、及び

S I Y P S G G A T N Y A D S V K G (配列番号 2 4 0)

からなる群より選択され、

(ii) C D R 3 配列が、

G N Y F D Y (配列番号 2 4 1)、

G N Y L D Y (配列番号 2 4 2)、

G P Y L D Y (配列番号 2 4 3)、及び

G S Y L D Y (配列番号 2 4 4)

からなる群より選択され、

但し重鎖可変ドメインは、配列番号 2 4 0 の C D R 2 配列及び配列番号 2 4 1 の C D R 3 配列の両方を含むことはない、抗体又はその断片。

10

【請求項 2】

C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、

(i) C D R 1 配列が R A S Q S V S S N Y F G (配列番号 2 4 5) であり、

(ii) C D R 2 配列が G A S S R A T (配列番号 2 4 6) であり、

(iii) C D R 3 配列が、

Q Q F D S L P L T (配列番号 2 4 7)、

Q Q H D S S P L S (配列番号 2 4 8)、

Q Q F D S S P L S (配列番号 2 4 9)、及び

Q Q F D S S P L T (配列番号 2 5 0)

からなる群より選択される、請求項 1 の抗体又は断片。

20

【請求項 3】

重鎖可変ドメインの C D R 2 が、配列 S I Y P Q G G A T S Y A D S V K G (配列番号 2 3 8) を有し、重鎖可変ドメインの C D R 3 が、配列 G N Y F D Y (配列番号 2 4 1) を有する、請求項 1 の抗体又は断片。

30

【請求項 4】

軽鎖可変ドメインの C D R 3 が、配列 Q Q F D S L P L T (配列番号 2 4 7) を有する、請求項 2 の抗体又は断片。

【請求項 5】

重鎖可変ドメインが、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 8、配列番号 2 1 6、配列番号 2 2 4、及び配列番号 2 3 2 からなる群より選択される配列を有する、請求項 1 の抗体又は断片。

【請求項 6】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 0 4、配列番号 2 1 2、配列番号 2 2 0、配列番号 2 2 8、及び配列番号 2 3 6 からなる群より選択される配列を有する、請求項 2 の抗体又は断片。

40

【請求項 7】

重鎖可変ドメインが配列番号 2 0 0 の配列を有し、軽鎖可変ドメインが配列番号 2 0 4 の配列を有する、請求項 2 の抗体又は断片。

【請求項 8】

アイソタイプ I g G である、請求項 1 ~ 7 の何れか一項の抗体又は断片。

【請求項 9】

s c F v、F v、F a b '、F a b、F (a b ') 2、又は二重特異性抗体である、請

50

求項 1 ~ 7 の何れか一項の抗体又は断片。

【請求項 10】

前記抗体又は断片がヒト VEGFR2 及びマウス hVEGFR2 に結合する、請求項 1 ~ 9 の何れか一項の抗体又は断片。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 の何れか一項の抗体又は断片をコードする単離された核酸。

【請求項 12】

請求項 11 に係る単離された核酸を含む核酸ベクター。

【請求項 13】

請求項 11 に係る単離された核酸を含む原核又は真核宿主細胞。

10

【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 の何れか一項の抗体又は断片と、医薬的に許容可能な担体とを含む組成物。

【請求項 15】

ヒト VEGFR2 又はマウス VEGFR2 の活性化を中和する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 10 の何れか一項の抗体又は断片を細胞と接触させることを含む方法。

【請求項 16】

血管新生を阻害する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 10 の何れか一項の抗体又は断片を対象に投与することを含む方法。

【請求項 17】

腫瘍の成長を低減する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 10 の何れか一項の抗体又は断片を対象に投与することを含む方法。

20

【請求項 18】

対象の腫瘍性疾患を治療する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 10 の何れか一項の抗体又は断片を対象に投与することを含み、ここで腫瘍性疾患が、肺癌、大腸癌、腎細胞癌、膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、多発性骨髄腫、非小細胞肺癌、及び膵臓癌から選択される、方法。

【請求項 19】

有効量の上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) アンタゴニストを対象に投与することを更に含む、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

30

【請求項 20】

有効量の fms 様チロシンキナーゼ受容体 (fms-like tyrosine kinase receptor : flt-1) アンタゴニストを対象に投与することを更に含む、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

【請求項 21】

有効量の rho 関連キナーゼ 2 (rho associated kinase 2 : ROCK2) アンタゴニストを対象に投与することを更に含む、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

【請求項 22】

有効量のマトリックスメタロプロテイナーゼアンタゴニストを対象に投与することを更に含む、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

40

【請求項 23】

有効量の PDGFRβ 抗体を対象に投与することを更に含む、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

【請求項 24】

有効量の PD-L1 抗体を対象に投与することを更に含む、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

【請求項 25】

患者がヒトである、請求項 16 ~ 18 の何れか一項の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、V E G F R - 2 に結合する抗体に関する。本抗体は、腫瘍性疾患及び過剰増殖性障害を治療するのに用いられ、単独でも他の剤と組み合わせても用いることができる。

【 0 0 0 2 】

本願は、米国特許出願第 6 2 / 0 6 1 , 0 9 7 号 (2 0 1 4 年 1 0 月 7 日出願) に基づく優先権を主張する。当該出願はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。また、本願は、国際特許出願第 PCT / US 2 0 1 3 / 0 6 3 7 5 4 号 (2 0 1 3 年 1 0 月 7 日出願) 及び米国特許出願第 6 1 / 7 1 0 , 4 2 0 号 (2 0 1 2 年 1 0 月 5 日出願) に基づく優先権を主張する。当該出願もその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

血管新生は、新たな血管を形成する極めて複雑なプロセスであり、毛細管内皮細胞の増殖及び遊走、並びに既存の血管からの毛細管内皮細胞の組織浸潤、細胞集合体の細管構造への分化、新たに形成された細管集合体の閉鎖型 (closed-circuit) 血管系への連結、更には新たに形成された毛細血管の成熟等を伴う。

【 0 0 0 4 】

血管新生は、胚発生、卵胞成長、創傷治癒等の正常な生理学的過程にとって重要である。また、過度の血管新生は、腫瘍性疾患や、加齢性黄斑変性症 (age-related macular degeneration : A M D) 、糖尿病性網膜症、血管新生緑内障等の非腫瘍性疾患において、新血管形成を招く。ラニビズマブ (ルセンティス (登録商標®)) を用いた血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : V E G F) を標的とする抗血管新生治療が、A M D の進行を遅延させるのに有効であると報告されている。しかし、新血管形成は複雑な過程であり、複数の血管新生機構が関与している可能性が高い。よって、新血管形成に関連する疾病を治療するための治療剤及び治療法の開発が依然として要請されている。

20

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 5 】

本発明は、V E G F R - 2 (K D R) に結合するヒト抗体及びその断片を提供する。ある態様によれば、当該抗体は V E G F R - 2 へのリガンド結合 (例えば V E G F - A 、 V E G F - C 、 V E G F - D 、又は V E G F - E のうち 1 又は 2 以上) を阻害する。ある態様によれば、当該抗体は V E G F R - 2 の活性化を中和する。当該抗体は、腫瘍性疾患、例えば固形又は非固形腫瘍や、過剰増殖性障害等を治療するのに用いられる。従って、本発明は、K D R の活性化を中和する方法、血管新生関連腫瘍の阻害を含む、腫瘍成長を阻害する方法、及び、血管新生関連障害を治療する方法を提供する。本発明は、V E G R 受容体に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。

30

【 0 0 0 6 】

一態様によれば、本発明は、ヒト V E G F R 2 に結合する単離された抗体又はその断片であって、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメインを含み、

40

(i) C D R 1 配列が G F T F S W Y V M G (配列番号 2 3 7) であり、

(ii) C D R 2 配列が、

S I Y P Q G G A T S Y A D S V K G (配列番号 2 3 8) 、

S I Y P Q G G A T N Y A D S V K G (配列番号 2 3 9) 、及び

S I Y P S G G A T N Y A D S V K G (配列番号 2 4 0)

からなる群より選択され、

(ii) C D R 3 配列が、

G N Y F D Y (配列番号 2 4 1) 、

G N Y L D Y (配列番号 2 4 2) 、

G P Y L D Y (配列番号 2 4 3) 、及び

G S Y L D Y (配列番号 2 4 4)

50

からなる群より選択され、

但し重鎖可変ドメインは、配列番号 240 の CDR 2 配列及び配列番号 241 の CDR 3 配列の両方を含むことはない、抗体又はその断片を提供する。

【0007】

一態様によれば、本発明は、ヒト VEGFR 2 に結合する単離された抗体又はその断片であって、CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、

(i) CDR 1 配列が RASQSVSSNYFG (配列番号 245) であり、

(ii) CDR 2 配列が GASSRAT (配列番号 246) であり、

(iii) CDR 3 配列が、

QQFDSSLPLT (配列番号 247)、

QQHDS S P L S (配列番号 248)、

QQFDSSPLS (配列番号 249)、及び

QQFDSSPLT (配列番号 250)

からなる群より選択される、抗体又はその断片を提供する。

【0008】

本発明の一態様によれば、重鎖可変ドメインの CDR 2 は、配列 SIYPQGGATSYADSVKG (配列番号 238) を有し、重鎖可変ドメインの CDR 3 は、配列 GNYFDY (配列番号 241) を有する。

【0009】

本発明の一態様によれば、軽鎖可変ドメインの CDR 3 は、配列 QQFDSSLPLT (配列番号 247) を有する。

【0010】

本発明の一態様によれば、重鎖可変ドメインは、

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQA
PGKGLEWVSSSIYPQGGATSYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCARGNYFDYW GQGTLVTVSS (配列番号
200)、

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMSWVRQA
PGKGLEWVSSSIYPQGGATNYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCARGNYFDYW GQGTLVTVSS (配列番号
208)、

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQA
PGKGLEWVSSSIYPSGGATNYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCARGNYLDYW GQGTLVTVSS (配列番号
216)、

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQA
PGKGLEWVSSSIYPSGGATNYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCARGPYLDYW GQGTLVTVSS (配列番号
224)、及び

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMGWVRQA
PGKGLEWVSSSIYPSGGATNYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
LQMNSLR AEDTAVYYCARGSYLDYW GQGTLVTVSS (配列番号
232)

からなる群より選択される配列を有する。

【0011】

本発明の一態様によれば、軽鎖可変ドメインは、

DIQMTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQK
PGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDSAVYYCQQFDSSLPLTFFGGGTKVEIKR (配列番号 204)、

DIQMTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSVSSNYFGWYQQK

PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
 PEDSAVYYCQQHDS S P L S F G G G T K V E I K R (配列番号212)、
 DIQMTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSVSSSNYFGWYQQK
 PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
 PEDSAVYYCQQFDSS S P L S F G G G T K V E I K R (配列番号220)、
 DIQMTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSVSSSNYFGWYQQK
 PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
 PEDSAVYYCQQFDSS S P L T F G G G T K V E I K R (配列番号228)、及び

DIQMTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSVSSSNYFGWYQQK
 PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
 PEDSAVYYCQQFDSS S P L T F G G G T K V E I K R (配列番号236)

からなる群より選択される配列を有する。

【0012】

本発明の一態様によれば、重鎖可変ドメインは、配列

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSWYVMGWVRQA
 PGKGLEWVSSSIYPQGATSYADSVKGRFTISRDN SKNTLY
 LQMNSLR AEDTAVYYCARGNYFDYW G Q G T L V T V S S (配列番号200)

を有し、軽鎖可変ドメインは、配列

DIQMTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSVSSSNYFGWYQQK
 PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
 PEDSAVYYCQQFDSS L P L T F G G G T K V E I K R (配列番号204)

を有する。

【0013】

本発明の一態様によれば、前記抗体又は断片は、アイソタイプIgGを有する。

【0014】

本発明の一態様によれば、前記抗体又は断片は、scFv、Fv、Fab'、Fab、F(ab')₂、又は二重特異性抗体である。

【0015】

本発明の一態様によれば、前記抗体又は断片は、ヒトVEGFR2及びマウスhVEGFR2に結合する。

【0016】

本発明は、本発明の抗体又は断片をコードする単離された核酸を提供する。

【0017】

本発明は、本発明の抗体又は断片をコードする単離された核酸を含む、核酸ベクターを提供する。

【0018】

本発明は、本発明の抗体又は断片をコードする単離された核酸を含む、原核又は真核宿主細胞を提供する。

【0019】

本発明は、本発明の抗体又は断片と、医薬的に許容可能な担体とを含む組成物を提供する。

【0020】

本発明は、ヒトVEGFR2又はマウスVEGFR2の活性化を中和する方法であって、細胞を有効量の本発明の抗体又は断片に接触させることを含む方法を提供する。

【0021】

本発明は、血管新生を阻害する方法であって、有効量の本発明の抗体又は断片を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0022】

10

20

30

40

50

本発明は、腫瘍成長を減少させる方法であって、有効量の本発明の抗体又は断片を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0023】

本発明は、対象の腫瘍性疾患を治療する方法であって、有効量の本発明の抗体又は断片を対象に投与することを含み、ここで前記腫瘍性疾患が、肺癌、大腸癌、腎細胞癌、膠芽腫、卵巣癌、膀胱癌、胃癌、多発性骨髄腫、非小細胞肺癌、及び膵臓癌からなる群より選択される方法を提供する。

【0024】

本発明の一態様によれば、前記方法は更に、有効量の上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : E G F R) アンタゴニストを、対象に投与することを含む。

10

【0025】

本発明の一態様によれば、前記方法は更に、有効量のfms様チロシンキナーゼ受容体 (fms-like tyrosine kinase receptor : f l t - 1) アンタゴニストを、対象に投与することを含む。

【0026】

本発明の一態様によれば、前記方法は更に、有効量の r h o 関連キナーゼ 2 (rho associated kinase 2 : R O C K 2) アンタゴニストを、対象に投与することを含む。

【0027】

本発明の一態様によれば、前記方法は更に、有効量のマトリックスメタロプロテイナーゼアンタゴニストを、対象に投与することを含む。

20

【0028】

本発明の一態様によれば、前記方法は更に、有効量の P D G F R β 抗体を、対象に投与することを含む。

【0029】

本発明の一態様によれば、前記方法は更に、有効量の P D - L 1 抗体を、対象に投与することを含む。

【0030】

本発明の一態様によれば、前記患者はヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1A】図1A～図1Cは、ファージ提示法により確認された、本発明の抗 V E G F R 2 抗体のヒトの重鎖、 λ 軽鎖、及び κ 軽鎖の可変領域の配列をそれぞれ示す。

30

【図1B1】同上。

【図1B2】同上。

【図1B3】同上。

【図1C1】同上。

【図1C2】同上。

【図1C3】同上。

【0032】

【図2】図2は、本発明の抗体の h V E G F R 2 との結合 (上) ならびに h V E G F R 2 のドメイン2及びドメイン3を含む構築物との結合 (中央) を示す。下図はリガンド (V E G F ₁₆₅) の遮断を示す。

40

【0033】

【図3】図3は、K D R (ヒト V E G F R 2) を過剰発現するブタ大動脈内皮 (P A E) 細胞内で、V E G F - A に刺激される V E G F R 2 、 A K T 、 及び M A P K のリン酸化を本発明のモノクローナル抗体 (M a b) 101 及び 102 が阻害することを示す。

【0034】

【図4】図4は、M a b 104、105、106、及び108による h V E G F R 2 への結合と V E G F ₁₆₅ リガンドの遮断を示す。別々の実験で、M a b 103、107、109、及び110についても同様の結果を得た。これらの M a b は、異なる軽鎖可変ドメ

50

インと組換えた M a b 1 0 1 の重鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 3 5 】

【 図 5 】 図 5 は、K D R (ヒト V E G F R 2) を過剰発現するブタ大動脈内皮 (P A E) 細胞で、V E G F - A に刺激される V E G F R 2 、A K T、及び M A P K のリン酸化を本発明の M a b 1 0 5 及び 1 0 6 が阻害することを示す。

【 0 0 3 6 】

【 図 6 A 】 図 6 A は、配列番号 4 (図にも示す配列) を有する V_H ドメインを含む、M a b 1 3 8 に由来する 5 個の親和性成熟抗体の重鎖アミノ酸配列を示す。

【 図 6 B 】 図 6 A は、配列番号 4 (図にも示す配列) を有する V_H ドメインを含む、M a b 1 3 8 に由来する 5 個の親和性成熟抗体の重鎖アミノ酸配列を示す。

10

【 0 0 3 7 】

【 図 7 】 図 7 A は、本発明の抗体のヒト及びマウスの可溶性 V E G F R 2 に対する結合を、D C 1 0 1 (マウス V E G F R 2 に結合するマウスモノクローナル A b) 及び対照 (ヒト V E G F R 2 のみに結合する抗体) との比較で示す。M a b 1 4 7 は、ヒトとマウス両方の V E G F R 2 に結合する。M a b 1 0 6 は、ヒト V E G F R 2 には結合するが、マウス V E G F R 2 には結合しない。図 7 B は、リガンド遮断実験で得たデータを示す。M a b 1 4 7 は、ヒト V E G F のヒト V E G F R 2 との結合及びマウス V E G F とマウス V E G F R 2 との結合を遮断する。M a b 1 0 6 は、ヒト V E G F のヒト V E G F R 2 との結合を遮断するが、マウス V E G F のマウス V E G F R 2 との結合は遮断しない。

【 0 0 3 8 】

20

【 図 8 】 図 8 A は、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) 及び K D R を過剰発現するブタ大動脈内皮 (P A E) 細胞 (K D R - P A E) 内での M a b 1 0 6 及び M a b 1 4 7 のヒト V E G F R 2 に対する結合を示す。図 8 B は、M a b 1 4 7 は M S 1 マウス内皮細胞で V E G F R 2 に結合するが M a b 1 0 6 は結合しないことを示す。図 8 A 及び図 8 B で、対照は h V E G F R 2 に結合するが m V E G F R 2 には結合しない抗体である。

【 0 0 3 9 】

【 図 9 】 図 9 は、V E G F R 2 が関与するシグナル伝達の M a b 1 0 6 及び M a b 1 4 7 による阻害を示す。M a b 1 0 6 及び M a b 1 4 7 は、K D R - P A E 細胞 (図 9 A) 内及び H U V E C (図 9 B) 内で K D R 及び p 4 4 / 4 2 のリン酸化を投与量に依存して阻害する。

30

【 0 0 4 0 】

【 図 1 0 】 図 1 0 A は、M a b 1 0 6、M a b 1 4 7、及び h V E G F R 2 に結合する対照抗体による K D R - P A E 細胞の増殖の阻害を示す。図 1 0 B は、誘導された細胞移動の阻害を示す。V E G F の勾配 (V E G F 5 0 n g / m l (上)、V E G F 1 0 0 n g / m l (下)) で K D R - P A E 細胞の移動を誘導した。図は、0 . 6 µ g / m l、3 µ g / m l、又は 1 5 µ g / m l の M a b 1 0 6 抗体又は M a b 1 4 7 抗体が存在する場合の細胞数を示す。

【 0 0 4 1 】

【 図 1 1 】 図 1 1 は、V E G F に誘導される K D R - P A E 細胞の移動の M a b 1 4 7 による阻害を示す。

40

【 0 0 4 2 】

【 図 1 2 】 図 1 2 A は、マウス E O M A 細胞内での V E G F R 2 が関与するシグナル伝達の M a b 1 4 7 による阻害を示す。図 1 2 B は、M a b 1 4 7 が E O M A 細胞とより高い結合性を有することを対照抗体との比較で実証する蛍光活性化細胞選別 (F A C S) 試験の結果を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 3 】

一側面では、本発明は、V E G F R 2 に依存するシグナル伝達を阻害するのに有効な新規の V E G F R 2 抗体またはその抗原結合性断片を提供する。本明細書で使用する場合、「受容体を阻害する」は、シグナルを伝達する受容体固有のキナーゼ活性を低減又は不活

50

性化することを意味する。V E G F R 2 阻害に関する信頼性のある試験は、受容体のリン酸化の減少である。

【 0 0 4 4 】

本発明は、何れかの特定の V E G F R 2 阻害の機序によって限定されるものではない。1 つの抗体の機序は別の抗体の機序と必ずしも同じではない。可能性のある一部の機序としては、V E G F R 2 の細胞外結合ドメインとの V E G F リガンドの結合の防止や、受容体の二量体化又は多量体化の防止が挙げられる。ただし、他の機序を除外することはできない。

【 0 0 4 5 】

抗体は、特定の抗原又は物質を認識しそれに結合するタンパク質である。好ましい態様では、本発明の抗体は、少なくとも天然リガンドと同程度の強さで K D R に結合する。抗原と抗体の解離に関する平衡定数で表される親和性 (K_d) は抗原決定基と抗体結合部位との結合の強度の尺度である。結合活性は、抗体とその抗原との結合の強度の尺度である。結合活性は、抗原決定基と抗体の抗原結合性部位との親和性、及び抗体あたりの結合部位の数 (価数) の両方に関連する。たとえば、一価抗体 (たとえば F a b) は特定のエピトープについて 1 個の結合部位を有する。I g G 抗体は 2 個の抗原結合部位を有する。K 値 (解離定数 K_d の逆数) の一般的な値は $10^5 \sim 10^{11}$ リットル / モルである。 10^4 リットル / モル未満の任意の K 値は非特異的な結合を示すと考えられる。

本発明の抗体は V E G F R 2 の活性化を阻害する。V E G F R 2 阻害の 1 つの尺度は受容体のチロシンキナーゼ活性の低下である。チロシンキナーゼの阻害は、受容体の自己リン酸化レベルの測定などの周知の方法で決定できる。V E G F R 2 の阻害は、天然又は合成の V E G F R 2 基質や V E G F R 2 シグナル伝達経路のその他の成分のリン酸化事象の阻害又は調節によっても観察できる。リン酸化は、たとえば、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) 又はウェスタンブロットでリン酸化チロシンに特異的な抗体を用いて検出できる。Panek et al., J. Pharmacol. Exp. Thera., 283: 1433-44 (1997) 及び Batley et al., Life Sci., 62: 143-50 (1998) には、チロシンキナーゼ活性に関するいくつかの試験が記載されている。

【 0 0 4 6 】

生体内での試験も利用できる。たとえば、受容体チロシンキナーゼの阻害は、阻害剤が存在する場合と存在しない場合の、受容体リガンドで刺激した細胞株を用いた細胞分裂促進試験によっても観察できる。たとえば、V E G F で刺激した H U V E C (A T C C) を用いて V E G F R 阻害を試験できる。別の方法は、たとえばマウスに注入したヒト腫瘍細胞を用いて V E G F 発現腫瘍細胞の成長の阻害を試験することを含む。米国特許第 6, 365, 157 号明細書 (Rockwell ら) を参照のこと。

【 0 0 4 7 】

本発明は、抗 V E G F R 2 抗体 (この抗体をコードする核酸、この抗体を含有する組成物を含む) を提供する。一態様では、本発明は、C D R - 1 H、C D R - 2 H、及び C D R - 3 H 配列を含む単離された抗体重鎖可変領域であって、

- (i) 前記 C D R - 1 H 配列は G F T F S W Y X₁ M X₂ (配列番号 185) (ここで、X₁ は V 又は I であり、X₂ は G 又は L である) であり、
 - (i i) 前記 C D R - 2 H 配列は S I X₁ X₂ S G G X₃ T X₄ Y A D S V K G (配列番号 186) (ここで、X₁ は Y 又は G であり、X₂ は P 又は S であり、X₃ は A 又は F であり、X₄ は N 又は D である) であり、
 - (i i i) 前記 C D R - 3 H 配列は G N Y F D Y (配列番号 3) 又は G L A A P R S (配列番号 11) である、
- 重鎖可変領域を提供する。

【 0 0 4 8 】

一態様では、本発明は、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 配列を含む単離された軽鎖可変領域であって、

- (i) 前記 C D R - L 1 配列が X₁ G X₂ X₃ L X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ S (配列番号 18

10

20

30

40

50

7) (ここで、 X_1 は S、Q、又は T であり、 X_2 は D、E、又は Q であり、 X_3 は K、S、N、I、又は A であり、 X_4 は G 又は R であり、 X_5 は D、S、H、E、又は N であり、 X_6 は E、Y、Q、R、又は N であり、 X_7 は Y、F、又は S であり、 X_8 は A 又は S である) であるか、 $S G S X_1 S N X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ (配列番号 188) (ここで、 X_1 は S 又は T であり、 X_2 は I 又は L であり、 X_3 は E 又は G であり、 X_4 は T、S、又は N であり、 X_5 は N 又は Y であり、 X_6 は T、P、A、又は Y であり、 X_7 は V 又は L であり、 X_8 は N、I、又は Y である) であるか、 $X_1 G X_2 S X_3 D X_4 G X_5 Y D Y V S$ (配列番号 189) (ここで、 X_1 は A 又は T であり、 X_2 は S 又は T であり、 X_3 は H、S、又は N であり、 X_4 は I 又は V であり、 X_5 は S 又は A である) であり、

(i i) 前記 CDR-L2 配列が $X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 P S$ (配列番号 190) (ここで、 X_1 は Q、D、T、Y、S、又は A であり、 X_2 は D、N、S、T、又は V であり、 X_3 は D、N、S、T、又は Y であり、 X_4 は Q、K、N、又は L であり、 X_5 は R 又は L である) であり、

(i i i) 前記 CDR-L3 配列が $Q X_1 W X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ (配列番号 191) (ここで、 X_1 は A 又は T であり、 X_2 は D 又は G であり、 X_3 は R 又はアミノ酸不在であり、 X_4 は S、F、又は N であり、 X_5 は S、T、又は N であり、 X_6 は S、T、又は P であり、 X_7 は A、V、L、I、又は Y であり、 X_8 は V 又は L である) であるか、 $A X_1 W D D X_2 L X_3 X_4 X_5 X_6$ (配列番号 192) (ここで、 X_1 は A、S、又は T であり、 X_2 は N 又は S であり、 X_3 は N、I、又は G であり、 X_4 は G 又は S であり、 X_5 は P、W、又は V であり、 X_6 は V 又は L である) であるか、 $M Y S T I T X_1 L L$ (配列番号 193) (ここで、 X_1 は A 又は T である) である、
軽鎖可変領域を提供する。

【0049】

一態様では、本発明は、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3 配列を含む分離された軽鎖可変領域であって、

(i) 前記 CDR-L1 配列が $R A S X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 Y X_8 X_9$ (配列番号 194) (ここで、 X_1 は Q、E、又は H であり、 X_2 は S、R、又は N であり、 X_3 は V、I、又は L であり、 X_4 は S、R、G、又は N であり、 X_5 は S 又は N であり、 X_6 は S、N、W、又は D であり、 X_7 は G 又はアミノ酸不在であり、 X_8 は L 又は F であり、 X_9 は A、G、M、又は S であり、

(i i) 前記 CDR-L2 配列が $G A S X_1 R A T$ (配列番号 195) (ここで、 X_1 は S、T、I、又は N である) であり、

(i i i) 前記 CDR-L3 配列が $Q Q X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8$ (配列番号 196) (ここで、 X_1 は F 又は Y であり、 X_2 は D、G、又は Y であり、 X_3 は S、T、又は N であり、 X_4 は S、L、又は W であり、 X_5 は P 又はアミノ酸不在であり、 X_6 は P 又は T であり、 X_7 は L、I、V、P、W、又は Y であり、 X_8 は T 又は S である) である、

軽鎖可変領域を提供する。

【0050】

本発明の一態様では、上記の軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインの CDR 配列のうち 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、又は 6 個を含む重鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。

【0051】

VEGFR2 結合性抗体の配列の例(ただし、これらに限定されるものではない)を記載する。本明細書に記載のとおり、ヒト Fab ファージ提示ライブラリーから、ヒト VEGFR2 に結合し、リガンド VEGF-A の hVEGFR2 との結合を遮断し、かつ VEGF-A に刺激される VEGFR2 のリン酸化及び下流のシグナル伝達を阻害する 2 個の中和抗体を確認した。表 1 は、それらの抗体の CDR 及び可変ドメインのアミノ酸配列を示す。Mab101 及び Mab102 の K_d 値は、それぞれ約 6.6 nM 及び 1.7 nM

10

20

30

40

50

である。

【 0 0 5 2 】

【 表 1 】

表 1 : 抗体のアミノ酸配列 (配列番号による)								
Mab	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	V _H ドメイン	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L ドメイン
101	1	2	3	4	5	6	7	8
102	9	10	11	12	13	14	15	16

10

【 0 0 5 3 】

M a b 1 0 1 の重鎖を κ 軽鎖遺伝子 (κ ライブラリー) 及び λ 軽鎖遺伝子 (λ ライブラリー) で再組換えした。ヒト V E G F R 2 とマウス V E G F R 2 の両方に対して λ ライブラリーをパニングすることにより、20 個の固有の λ 軽鎖変異体を見出した。ヒト V E G F R 2 とマウス V E G F R 2 の両方に対して κ ライブラリーをパニングすることにより、22 個の固有の κ 軽鎖変異体を見出した。表 2 は軽鎖の C D R 及び可変ドメインのアミノ酸配列を示す。M a b 1 0 5、1 0 6、及び 1 0 7 の K_d 値は約 10 倍増加した (それぞれ 0.24 nM、0.22 nM、0.12 nM)。親抗体と同様、これらの抗体は V E G F R 2 に結合して V E G F - A の V E G F R 2 との結合を遮断し、V E G F - A に刺激される V E G F R 2、A K T、及び M A P K のリン酸化を阻害する (図 4)。

20

【 0 0 5 4 】

抗体のうちいくつか (M a b 1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 6 など) は、マウス V E G F R 2 とも交差反応する。これらの抗体も、V E G F R 2 及び下流シグナル伝達分子 (M A P K など) の V E G F - A が刺激するリン酸化を阻害した。

【 0 0 5 5 】

【表 2】

表2： κ 軽鎖及び λ 軽鎖（配列番号による）											
Mab	軽鎖	配列番号				Mab	軽鎖	配列番号			
		CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L			CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L
103	λ	17	18	19	20	124	K	101	102	103	104
104	λ	21	22	23	24	125	K	105	106	107	108
105	λ	25	26	27	28	126	K	109	110	111	112
106	λ	29	30	31	32	127	K	113	114	115	116
107	λ	33	34	35	36	128	K	117	118	119	120
108	λ	37	38	39	40	129	K	121	122	123	124
109	λ	41	42	43	44	130	K	125	126	127	128
110	λ	45	46	47	48	131	K	129	130	131	132
111	λ	49	50	51	52	132	K	133	134	135	136
112	λ	53	54	55	56	133	K	137	138	139	140
113	λ	57	58	59	60	134	K	141	142	143	144
114	λ	61	62	63	64	135	K	145	146	147	148
115	λ	65	66	67	68	136	K	149	150	151	152
116	λ	69	70	71	72	137	K	153	154	155	156
117	λ	73	74	75	76	138	κ	157	158	159	160
118	λ	77	78	79	80	139	κ	161	162	163	164
119	λ	81	82	83	84	140	κ	165	166	167	168
120	λ	85	86	87	88	141	κ	169	170	171	172
121	λ	89	90	91	92	142	κ	173	174	175	176
122	λ	93	94	95	96	143	κ	177	178	179	180
123	κ	97	98	99	100	144	κ	181	182	183	184

【0056】

本発明は、表 1 及び表 2 に記載の配列から選択される 1 個、2 個、又は 3 個の重鎖 C D R と 1 個、2 個、又は 3 個の軽鎖 C D R とを含む、単離された V E G F R 2 抗体とその V E G F R 2 結合性断片を提供する。本発明の抗体では、2 個以上の C D R が表 1 及び表 2 に示す配列から選択される場合、それらの別々の C D R はこれらの表に示す同じモノクローナル抗体から選択される必要はなく、表に示す 2 個以上の抗体可変ドメインから選択されてもよい。特定の態様には以下が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の一態様では、単離された V E G F R 2 抗体は、配列番号 1、配列番号 2、及び配列番号 3 を有する 1 個、2 個、又は 3 個の重鎖 C D R を含む。本発明の一態様では、抗体は、配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 7 を有する 1 個、2 個、又は 3 個の軽鎖 C D R を含む。別の態様では、抗体は、表 1 又は表 2 に示す配列を有する 1 個、2 個、又は 3 個の軽鎖 C D R を含む。抗体の例としては、配列番号 25、配列番号 26、及び配列番号 27 のうちの 1 個以上、配列番号 29、配列番号 30、及び配列番号 31 のうちの 1 個以上、又は配列番号 33、配列番号 34、及び配列番号 35 のうちの 1 個以上を含む軽鎖可変領域が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の態様では、V E G F R 2 抗体は、配列番号 4 又は配列番号 12 を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の態様では、V E G F R 2 抗体は、配列番号 8、配列番号 16、配列番号 27、配列番号 31、又は配列番号 35 を含む軽鎖可変ドメインを含む。特定の態様では、抗体は、上記の重鎖可変ドメインのうちの 1 個と上記の軽鎖可変ドメインのうちの 1 個を含む。特定の態様では、V E G F R 2 抗体又はその結合性断片は、表 1 又は表 2 に示す C D R 及び可変ドメインの配列

と少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、又は少なくとも 99% 同一であるアミノ酸配列を有する、1 個以上の CDR 又は 1 個以上の可変ドメインを含む。特定の態様では、本発明の抗体は、本明細書に開示するものと同じ CDR アミノ酸を有し、少なくとも 85%、少なくとも 90%、又は少なくとも 95% 同一のフレームワークを有する。

【0057】

「同一性」は、2 つの配列を最適に整列するために導入する必要があるギャップの数と各ギャップの長さを考慮した、2 つのアミノ酸配列又は核酸配列が共有する同一の位置の数又は割合を指す。「実質的に同一」は、保存的アミノ酸置換（たとえば 1 個のアミノ酸を同じ分類の別のアミノ酸で置換すること（たとえば、バリンをグリシンで置換、アルギニンをリシンで置換、など））、あるいはタンパク質の機能を損なわない、アミノ酸配列の位置での 1 個以上の非保存的置換、欠失、又は挿入のみが異なるアミノ酸配列を意味する。アミノ酸配列は別のアミノ酸配列と少なくとも 80% 類似しているのが好ましく、少なくとも 85% 類似しているのがより好ましく、少なくとも 90% 類似しているのが最も好ましい。配列の類似性を決定するための方法やコンピュータプログラムは公開されており、GCG プログラムパッケージ（Devereux et al., Nucleic Acids Research 12: 387, 1984）、BLASTP、BLASTN、FASTA（Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)）、及び ALIGN プログラム（バージョン 2.0）などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。周知の Smith Waterman アルゴリズムも類似性の決定に使用できる。BLAST プログラムは NCBI やその他の情報源から一般に利用できる（BLAST Manual, Altschul, et al., NCBI NLM NIH, Bethesda, Md. 20894; BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)）。配列を比較する際、これらの方法は様々な置換、欠失、及び他の改変を考慮する。保存的置換には一般に以下の各群の中での置換が含まれる：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；リシン、アルギニン；フェニルアラニン、チロシン。

【0058】

本発明の抗体は、直接変異、親和性成熟法、ファージ提示法、または鎖の組換えによって結合特性が改善された抗体も含む。親和性及び特異性は、CDR を変異させ、所望の特性を有する抗原性結合部位について選別することによって変更又は改善できる。CDR の変異は様々な方法で行われる。1 つの方法は、同一の抗原結合部位の集合において、特定の位置に 20 種類すべてのアミノ酸が見いだせるように、個々の残基又は残基の組み合わせをランダム化することである。あるいは、ある範囲の CDR 残基に対してエラーブローン PCR 法（複製エラーを利用した遺伝子変異導入法）で変異を誘導する（たとえば、Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) を参照のこと）。たとえば、重鎖及び軽鎖の可変領域遺伝子を含むファージ提示ベクターを大腸菌（*E. coli*）の変異誘発株で増殖させてもよい（たとえば、Low et al., J. Mol. Biol., 250: 359-368 (1996) を参照のこと）。これらの変異誘発法は当業者に公知の多くの方法の例である。

【0059】

VEGF 受容体に結合する抗体の免疫原性を最小にするため、本発明はヒトの可変ドメイン及び定常ドメイン配列を含む抗体を提供する。この抗体は免疫グロブリンの任意のクラス（IgG、IgM、IgA、IgD、又は IgE など）及びそのサブクラスの抗体であってもよいし、それらの組み合わせでもよい。抗体のクラスは、天然抗体のエフェクター機能（たとえば、補体依存性細胞傷害（CDC）及び抗体依存性細胞傷害（ADCC））を最適化するように選択してよい。

【0060】

本発明の特定の態様は、VEGFR2 結合性抗体断片の使用を含む。Fv は、6 個の超可変ループ（CDR）をすべて含む完全な重鎖及び軽鎖可変ドメインを含む最小の断片である。定常ドメインがない場合、可変ドメインは非共有結合で会合する。V_H ドメインと V_L ドメインが会合して抗原結合部位を形成するのを可能にするリンカーを用いて重鎖と

軽鎖を連結して単鎖のポリペプチド鎖（「単鎖Fv」又は「scFv」）としてもよい。本発明の一態様では、リンカーは（Gly - Gly - Gly - Gly - Ser）₃である。scFv断片は全抗体のうち定常ドメインがないため、全抗体よりもかなり小さい。また、scFv断片には通常为重鎖定常ドメインと他の生体分子との相互作用（特定の態様では望ましくない場合がある）がない。

【0061】

V_H、V_L（及び必要に応じてC_L、C_H1、又は他の定常ドメイン）を含む抗体断片も使用できる。パepsin消化により生成される一価の抗体断片はFabと呼ばれ、重鎖ヒンジ領域を持たない。pepsin消化により生成される断片はF（ab'）₂と呼ばれ、重鎖ヒンジを保持し、二価である。このような断片を組換えにより作製してもよい。他に多くの有用な抗原結合性抗体断片が当技術分野で公知であり、二量体型抗体（diabody）、三量体型抗体（triabody）、単ドメイン抗体、その他の一価及び多価の形態が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

【0062】

本発明は、抗体、その抗原結合性断片、抗体の抗原結合部分の全体又は一部を含むタンパク質の形態であってよい（ただし、これらに限定されるものではない）多価の抗原結合性タンパク質をさらに提供する。多価の抗原結合性タンパク質は、単一特異性、二重特異性、又は多重特異性であってよい。特異性という用語は、特定の分子が結合できる異なる型の抗原決定基の数を指す。免疫グロブリン分子が1つの型の抗原決定基にのみ結合する場合、その免疫グロブリン分子は単一特異性であり、異なる型の抗原決定基に結合する場合は多重特異性である。

20

【0063】

たとえば、二重特異性の多価単鎖抗体は、2つの異なる型のエピトープを認識できる。両方のエピトープが同じ抗原（たとえばVEGFR2）に存在してもよいし、一方はある抗原（たとえばVEGFR2）に、第2のエピトープは別の抗原に存在してもよい。

【0064】

一態様では、多価単鎖抗体は、可変重鎖断片に連結し（scFvと同様）、可変重鎖断片はさらに別のペプチドリンカーで少なくとも1つの抗原結合ドメインと連結した可変軽鎖断片を含む。一般に、このペプチドリンカーは約15個のアミノ酸残基で構成される。好ましい態様では、V_LドメインとV_Hドメインの数は同じである。たとえば、二価単鎖抗体は、V_L-L₁-V_H-L₂-V_L-L₃-V_H、V_L-L₁-V_H-L₂-V_H-L₃-V_L、V_H-L₁-V_L-L₂-V_H-L₃-V_L、又はV_H-L₁-V_L-L₂-V_L-L₃-V_Hと表すことができる。三価以上の多価単鎖抗体は、1つ以上の抗体断片が追加のペプチドリンカーによって二価単鎖抗体に連結されている。三価単鎖抗体の一例はV_L-L₁-V_H-L₂-V_L-L_I-V_H-L₂-V_L-L_I-V_Hである。

30

【0065】

2つの単鎖抗体を結合して二量体型抗体（二価二量体ともいう）を形成することもできる。二量体型抗体は2本の鎖を有する。二量体型抗体の各鎖は、V_Hドメインが約5～10アミノ酸残基の短いリンカー（たとえば、（Gly - Gly - Gly - Gly - Ser）、（Gly - Gly - Gly - Gly - Ser）₂）によりV_Lドメインと連結されている。このようなリンカーは、同一鎖上のドメイン間の鎖内対形成を防止するのに十分に短く、そのことにより、異なる鎖上の相補ドメイン間の鎖間対形成を引き起こし、2個の抗原結合部位を再形成する。二量体型抗体の構造は強固で小さく、抗原結合部位は分子の互いに反対側の末端にある。二量体型抗体は単一特異性でも二重特異性でもよい。

40

【0066】

3つの単鎖抗体を結合して三量体型抗体（三価三量体）を形成することもできる。態様によっては、V_L又はV_Hドメインのカルボキシ末端をV_H又はV_Lドメインのアミノ末端に直接（すなわちリンカー配列なしで）融合した三量体型抗体を構築する。三量体型抗体にはFvの頭部が3個あり、それらのポリペプチドは環状に、互いに頭-尾形式で配置されている。三量体型抗体分子の可能な立体配座は平面状で、3つの結合部位が互いに1

50

20度の角度で平面内に位置する。三量体型抗体は、単一特異性でも二重特異性でも三重特異性でもよい。

【0067】

なお、本発明の抗VEGFR2抗体は、予防又は治療の目的で哺乳動物に使用される場合、医薬的に許容される担体をさらに含む組成物の形態で投与されることは自明である。医薬的に許容される適切な担体としては、たとえば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノールなど及びそれらの組み合わせのうち1種以上が挙げられる。医薬的に許容される担体は、抗体の有効期間を延長、又は有効性を増強する微量の補助物質（たとえば、湿潤剤又は乳化剤、保存剤又は緩衝剤）をさらに含んでもよい。

10

【0068】

本発明の方法では、治療に有効な量の本発明の抗体を、それを必要とする哺乳動物に投与する。本明細書で使用する「投与」という用語は、所望の結果を達成し得る任意の方法で本発明の抗体を哺乳動物に送達することを意味する。本発明の抗体は、たとえば静脈内又は筋肉内に投与されてもよい。本発明のヒト抗体は、ヒトへの投与に特に有用であるが、他の哺乳動物にも投与されてもよい。本明細書で使用する「哺乳動物」という用語は、ヒト、実験動物、愛玩動物、及び家畜を包含するものとする（ただし、これらに限定されるものではない）。「治療に有効な量」は、哺乳動物に投与されたときにキナーゼ活性の阻害などの所望の治療効果をもたらすのに有効な本発明の抗体の量を意味する。たとえば、疾患に応じて、抗体の場合、それには0.1mg/kg、1.0mg/kg、3.0mg/kg、6.0mg/kg、又は10.0mg/kgが必要となる可能性がある。分子質量が150,000g/molのIgG（2つの結合部位）の場合、これらの用量は、5Lの血液量に対して約18nM、180nM、540nM、1.08μM、1.8μMの結合部位に相当する。

20

【0069】

本発明の抗体は、腫瘍成長、腫瘍成長に関連する血管新生、又は血管新生に関連する他の病的状態を阻害するのに有用である。治療できる腫瘍には、原発性腫瘍、転移性腫瘍、及び難治性腫瘍が含まれる。難治性腫瘍としては、化学療法剤単独、抗体単独、放射線単独、又はそれらの組み合わせによる治療に反応がないか耐性がある腫瘍が含まれる。難治性腫瘍はさらに、そのような作用因子によって阻害されられると思われるが治療を中断してから5年、場合によっては10年以上までの間に再発する腫瘍を包含する。この抗体は、血管形成した腫瘍にも血管形成していないか実質的に血管形成していない腫瘍の治療にも有効である。

30

【0070】

したがって、治療できる固形腫瘍の例としては、乳癌、肺癌、大腸癌、膵臓癌、神経膠腫及びリンパ腫が挙げられる。このような腫瘍の例としては、類表皮腫瘍、扁平上皮腫瘍（頭頸部腫瘍など）、大腸腫瘍、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、肺腫瘍（小細胞肺腫瘍と非小細胞肺腫瘍を含む）、膵臓腫瘍、甲状腺腫瘍、卵巣腫瘍、及び肝臓腫瘍が挙げられる。他の例としては、カポジ肉腫、中枢神経系（CNS）腫瘍、神経芽腫、毛細血管芽腫、髄膜腫及び脳転移、黒色腫、胃腸・腎臓の癌及び肉腫、横紋筋肉腫、膠芽腫（多形膠芽腫が好ましい）、及び平滑筋肉腫が挙げられる。本発明のアンタゴニストが有効な血管形成した皮膚癌の例としては、扁平上皮癌、基底細胞癌、及び悪性角化細胞（ヒトの悪性角化細胞など）の増殖を抑制することにより治療できる皮膚癌が挙げられる。

40

非固形腫瘍の例としては、白血病、多発性骨髄腫、及びリンパ腫が挙げられる。白血病のいくつかの例としては、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）、赤芽球性白血病、単球性白血病が挙げられる。リンパ腫のいくつかの例としては、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫が挙げられる。

【0071】

本発明の抗体は、たとえば血管新生及び/又は炎症を含む過剰な血管新生を特徴とする

50

病的状態（アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ（RA）、血管腫、血管線維腫、及び乾癬など）の治療又は予防にも使用できる。非腫瘍性の血管新生疾患のその他の例は、未熟児網膜症（後水晶体線維増殖症）、角膜移植片拒絶反応、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、重症筋無力症、クローン病、自己免疫性腎炎、原発性胆汁性肝硬変、急性膵炎、同種移植片拒絶反応、アレルギー性炎症、接触皮膚炎及び遅延型過敏反応、炎症性腸疾患、敗血症性ショック、骨粗鬆症、変形性関節症、神経細胞の炎症による認知欠陥（cognition defect）、オスラー・ウェーバー症候群、再狭窄、ならびに真菌、寄生虫、及びウイルス感染症（サイトメガロウイルス感染症など）であるが、これらに限定されるものではない。

【0072】

過剰な血管新生を特徴とする眼疾患としては、新生血管緑内障、増殖性網膜症（増殖性糖尿病性網膜症を含む）、及び黄斑変性が挙げられる。本発明は、眼の疾患及び障害を治療するための方法及び化合物を提供する。一態様では、本発明は、「乾性」及び「湿性」の形態で起こる加齢性黄斑変性（AMD）の治療を提供する。AMDの「湿性」形態は、異常な血管成長（新生血管）による失明を引き起こす。これらの網膜血管からの出血、漏出、及び瘢痕により、最終的には光受容体への不可逆的な損傷が起こる。乾性形態は網膜色素上皮層の萎縮から始まり、眼の中心部にある光受容体（杆体と錐体）の喪失を経て、失明を引き起こす。別の態様では、本発明は、脈絡膜新生血管（CNV）を治療する方法を提供する。脈絡膜新生血管は、新しい血管が脈絡膜でブルッフ膜を貫通して成長し、網膜下腔に侵入する過程であり、他にも原因はあるが特に加齢性の黄斑変性、近視、及び眼

【0073】

本発明の抗体及び抗原結合性断片は、それを必要とする患者に第2の作用因子と共に投与でき、有利である。たとえば、態様によっては、本発明のVEGFR2抗体を抗腫瘍剤と共に対象に投与する。態様によっては、VEGFR2抗体を第2の血管新生阻害剤と共に対象に投与する。態様によっては、本発明のVEGFR2抗体を抗炎症剤又は免疫抑制剤と共に投与する。

【0074】

抗腫瘍剤としては、細胞傷害性化学療法剤、標的小分子及び生体分子、ならびに放射線が挙げられる。化学療法剤の例としては、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、イリノテカン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、ビンブラスチン、ピンクリスチン、プレオマイシン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテール）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、クラドリビン、ダカルバジン、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシ尿素、イホスファミド、インターフェロン α 、リユープロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、プリカマイシン、ミトタン、ペガスバルガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、プリカマイシン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテバ、ウラシルマスタード、ピノレルビン、クロランブシル、タキソール、及びそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0075】

標的小分子及び生体分子としては、シグナル伝達経路の成分の阻害剤（チロシンキナーゼの調節剤及び受容体チロシンキナーゼの阻害剤など）、及び腫瘍特異的抗原に結合する作用物質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。腫瘍形成に關与する成長因子受容体の例としては、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）、インスリン様成長因子受容体（IGFR）、神経成長因子受容体（NGFR）、線維芽細胞成長因子受容体（FGFR）、及び上皮成長因子受容体ファミリーの受容体（EGFR（erbB1）、HER2（erbB2）、erbB3、erbB4など）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0076】

EGFRアンタゴニストは、EGFR又はEGFRリガンドに結合してリガンド結合及び/又は受容体活性化を阻害する抗体を含む。たとえば、この作用物質は、受容体二量体又は他のEGFRファミリーメンバーとのヘテロ二量体の形成を阻止できる。EGFRのリガンドとしては、たとえば、EGF、TGF- α 、アンフィレグリン、ヘパリン結合性EGF（HB-EGF）、及びベータセルリンが挙げられる。EGFRアンタゴニストは外部でEGFRの細胞外部分に結合するか（それによってリガンドの結合が阻害されてもよいし阻害されなくてもよい）、内部でチロシンキナーゼドメインに結合することができる。EGFRアンタゴニストとしては、たとえばEGFRシグナル伝達経路の成分の機能を阻害することによって、EGFRに依存するシグナル伝達を阻害する作用物質がさらに挙げられる。EGFRに結合するEGFRアンタゴニストの例としては、EGFRに特異的な抗体（及びその機能的同等物）などの生体分子や、EGFRの細胞質ドメインに直接作用する合成キナーゼ阻害剤などの小分子が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

20

【0077】

小分子阻害剤及び生体由来の阻害剤としては、上皮成長因子受容体（EGFR）の阻害剤（ゲフィチニブ、エルロチニブ、及びセツキシマブなど）、HER2の阻害剤（たとえば、トラスツズマブ、トラスツズマブエムタンシン（トラスツズマブ-DM1；T-DM1）、及びペルツズマブ）、抗VEGF抗体及び断片（たとえばベバシズマブ）、CD20を阻害する抗体（たとえば、リツキシマブ、イブリツモマブ）、抗VEGFR抗体（たとえば、ラムシルマブ（IMC-1121B）、IMC-1C11、及びCDP791）、抗PDGFR抗体、ならびにイマチニブが挙げられる。小分子キナーゼ阻害剤は特定のチロシンキナーゼに特異的であってもよいし、2種以上のキナーゼの阻害剤であってもよい。たとえば、化合物N-（3，4-ジクロロ-2-フルオロフェニル）-7-（{〔（3aR，6aS）-2-メチルオクタヒドロシクロペンタ〔c〕ピロール-5-イル〕メチル}オキシ）-6-（メチルオキシ）キナゾリン-4-アミン（XL647、EXEL-7647、KD-019としても知られる）は、いくつかの受容体チロシンキナーゼ（RTK）（EGFR、EphB4、KDR（VEGFR）、FLT4（VEGFR3）、及びerbB2などが挙げられる）の生体外阻害剤であり、さらに、特定のチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）に対する腫瘍の非応答性を引き起こす経路に關与するSRCキナーゼの阻害剤でもある。本発明の一態様では、必要のある対象の治療は、式IのRho-キナーゼ阻害剤の投与とKD-019の投与を含む。

30

40

【0078】

ダサチニブ（BMS-354825；Bristol-Myers Squibb，New York）は、経口的に生体利用できATP部位と競合する別のSrc阻害剤である。ダサチニブは、Bcr-Abl（慢性骨髄性白血病（CML）又はフィラデルフィア染色体陽性（Ph⁺）急性リンパ性白血病（ALL）の患者への使用がFDAに認可されている）、さらにはc-Kit、PDGFR、c-FMS、EphA2、及びSrcファミリーキナーゼ（SFK）も標的とする。Src及びBcr-Ablの別の2種類の経口チロシンキナーゼ阻害剤は、ボスチニブ（SKI-606）及びサラカチニブ（AZD0530）である。

【0079】

VEGFR2は、血管新生でのVEGFの下流効果の大部分に關与するが、第2の血管

50

新生阻害剤の投与が好都合な場合がある。本発明の抗 V E G F R 2 抗体は、腫瘍成長又は血管新生に關与する他の受容体を中和する抗体と共に投与されてもよい。

【 0 0 8 0 】

V E G F 結合性作用物質の例としては、V E G F 抗体及び V E G F トラップ（すなわち V E G F 受容体のリガンド結合ドメイン）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。抗体（V E G F 結合性抗体断片を含む）を 2 つ例示すると、V E G F - A に結合する抗体であるベバシズマブ（アバスチン）とベバシズマブ由来の F a b であるラニビズマブ（ルセンティス）が挙げられる。一般に、V E G F トラップは 1 種以上の V E G F 受容体タンパク質の V E G F 結合ドメインを含むタンパク質である。V E G F トラップとしては、可溶性 V E G F R 1、可溶性ニューロピリン 1（N R P 1）、可溶性 V E G F R 3（V E G F - C 及び V E G F - D に結合する）、及びアフリベルセプト（Zaltrap；Eylea；VEGF Trap R1R2）（ヒト I g G 1 の定常領域（F c）に融合したヒト血管内皮成長因子受容体 V E G F R 1 と V E G F R 2 の細胞外ドメインのセグメントで構成される）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。Conbercept（K H 9 0 2）は、V E G F R 1（F L T 1）の細胞外ドメイン 2 と V E G F R 2（K D R）の細胞外ドメイン 3、4 をヒト I g G 1 の F c 部分に融合した融合タンパク質である。K D R や F L T 1 の I g 様ドメインを様々な組み合わせで含むいくつかの V E G F トラップが米国特許第 8, 2 1 6, 5 7 5 号明細書に開示されている。DARPin（設計されたアンキリン反復タンパク質（design ed ankyrin repeat protein）の頭字語）は、一般に高特異性かつ高親和性の標的タンパク質結合を示す、遺伝子操作された抗体模倣タンパク質である。DARPin（登録商標）MP01 12 は血管内皮成長因子（V E G F）阻害剤であり、湿性黄斑変性及び糖尿病性黄斑浮腫の治療に關する臨床試験に入っている。

10

20

【 0 0 8 1 】

本発明によれば、V E G F の発現を標的とすることができる。たとえば、V E G F 阻害剤 P T C 2 9 9 は、V E G F メッセンジャー R N A（m R N A）の 5' - 非翻訳領域（U T R）及び 3' - 非翻訳領域に選択的に結合することによって転写後に V E G F を標的とし、それによって V E G F の翻訳を防止する。ペガブタニブ（マクジェン）は V E G F - 1 6 5 に対する R N A アプタマーである。

【 0 0 8 2 】

胎盤成長因子（P l G F）は病的血管新生と関連があるとされている。P l G F は構造的には V E G F に関連し、V E G F R 1 のリガンドでもある。したがって、V E G F R 1 の細胞外ドメインを含む V E G F トラップ（上記参照）は P l G F を標的とするのに有用である。抗血管新生剤は、V E G F R 1 / F L T 1 受容体に結合するものをさらに含む。特定の態様では、V E G F R 1 の細胞外ドメインに結合する抗原結合性タンパク質は、そのリガンドである V E G F 及び P l G F の一方又は両方による結合を遮断し、かつ / あるいは V E G F 又は P l G F に誘導される V E G F R 1 の活性化を中和する。

30

【 0 0 8 3 】

P D G F は、ホモ二量体 P D G F - A A、P D G F - B B、P D G F - C C、P D G F - D D、及びヘテロ二量体 P D G F - A B を形成する 4 本のポリペプチド鎖から構成される。P D G F 受容体（P D G F R） α 及び β は P D G F 機能に關与する。特に、P D G F R α は P D G F - A A、P D G F - B B、P D G F - A B、及び P D G F - C C に結合し、P D G F R β は P D G F - B B 及び P D G F - D D と相互作用する。P D G F に結合する作用物質の例としては、抗 P D G F 抗体及び P D G F トラップが挙げられる。P D G F を標的とする作用物質としては、P D G F - B を標的とするペグ化アプタマーである Fovista（商標）（E10030、Ophthotech）、及び P D G F - B に結合する D N A オリゴヌクレオチドアプタマーである A X 1 0 2（Sennino et al., 2007, Cancer Res. 75(15):7359-67）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 0 8 4 】

本発明の特定の態様では、抗体又はその抗原結合性断片を有効量の P D G F R β 抗体と共に対象に投与する。

50

【0085】

P D G F 受容体を標的とする作用物質としては、抗 P D G F R α 抗体であるラムシルマブ (I M C - 3 G 3、ヒト I g G 1)、P D G F R α 及び P D G F R β の選択的阻害剤 (それぞれに対し I C₅₀ = 0 . 9 n M、I C₅₀ = 1 . 8 n M) であるクレノラニブ (C P - 8 6 8 5 9 6)、ならびに P D G F R α 及び P D G F R β と他のチロシンキナーゼの阻害剤であるニロチニブ (Tasigna (登録商標)) が挙げられる。

【0086】

血管新生阻害剤としては、たとえば V E G F、P D G F、V E G F 受容体又は P D G F 受容体のリガンド、又は補体が関与するシグナル伝達を遮断する細胞内作用因子が挙げられる。血管新生阻害剤を阻害する細胞内作用因子としては以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない。スニチニブ (スーテント ; S U 1 1 2 4 8) は、V E G F R 1 ~ V E G F R 3、P D G F R α 及び P D G F R β 、幹細胞因子受容体 (c - K i t)、F L T 3、及びコロニー刺激因子 1 受容体 (C S F - 1 R) の汎特異的な小分子阻害剤である。アキシチニブ (A G 0 1 3 7 3 6 ; Inlyta) は、V E G F R 1 ~ V E G F R 3、P D G F R、及び c - K i t を阻害する別の小分子チロシンキナーゼ阻害剤である。セジラニブ (A Z D 2 1 7 1) は、V E G F R 1 ~ V E G F R 3、P D G F R β 、及び c - K i t の阻害剤である。ソラフェニブ (ネクサバル) は、いくつかのチロシンタンパク質キナーゼ (V E G F R、P D G F R、及び R a f キナーゼなど) に対する別の小分子阻害剤である。パゾパニブ (ヴォトリエント ; G W 7 8 6 0 3 4) は、V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3、c - K i t、及び P D G F R を阻害する。フォレチニブ (G S K 1 3 6 3 0 8 9 ; X L 8 8 0) はカボザンチニブ (Cometriq ; X L 1 8 4) と同様、V E G F R 2 及び M E T を阻害する。ボナチニブ (アイクルシグ ; A P 2 4 5 3 4) は、V E G F R、P D G F R、及び c - K i t を阻害する。チボザニブ (A V - 9 5 1) は、ピコモル濃度で V E G F R 1、V E G F R 2、及び V E G F R 3 を阻害する。C P - 5 4 7 6 3 2 は V E G F R 2 及び塩基性線維芽細胞成長因子 (F G F) のキナーゼの強力な阻害剤である。E - 3 8 1 0 ((6 - (7 - ((1 - アミノシクロプロピル) メトキシ) - 6 - メトキシキノリン - 4 - イルオキシ) - N - メチル - 1 - ナフトアミド) は、ナノモルの範囲でキナーゼ V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3、F G F R 1、及び F G F R 2 を阻害する。ブリバニブ (B M S - 5 8 2 6 6 4) は、F G F 受容体のシグナル伝達も阻害する V E G F R 2 阻害剤である。C T - 3 2 2 (アドネクチン) は、ヒトフィブロネクチンドメインに基づく小さなタンパク質であり、V E G F R 2 に結合してその活性化を阻害する。バンデタニブ (カプレルサ ; ザクティマ ; Z D 6 4 7 4) は、V E G F R 2、E G F R、及び R E T のチロシンキナーゼの阻害剤である。X - 8 2 (Xcovery) は、成長因子受容体 V E G F R 及び P D G F R によるシグナル伝達の小分子インドリノン阻害剤である。

【0087】

特定の態様では、本発明の抗 V E G F R 抗体をマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤と共投与する。マトリックスメタロプロテアーゼ (M M P) (M M P - 1 4、M M P - 1 6、M M P - 2 4 など) は、細胞外基質 (E C M) と基底膜の成分を切断し、それにより、下位にある間質基質に癌細胞が貫通し浸潤するのを可能にする。さらに、多くの成長因子受容体、細胞接着分子、ケモカイン、サイトカイン、アポトーシスリガンド、及び血管新生因子が M M P の基質である。したがって、M M P 活性は、成長因子の活性化、腫瘍細胞のアポトーシスの抑制、宿主の免疫反応によって生じるケモカイン勾配の崩壊、又は血管新生因子の放出を引き起こすことができる。M M P は、特異的結合タンパク質 (I G F B P) に結合するインスリン様成長因子などの細胞増殖因子の放出を促すことによって腫瘍成長を促進できる (Manes et al., 1997 J. Biol. Chem. 272: 25706-25712)。

【0088】

黒色腫や大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、及び膀胱癌では M M P - 2 などのコラゲナーゼがより高い濃度で見ついている。通常、このように濃度がより高いことは、腫瘍の悪性度と侵襲性がより高いことと相関性がある。M M P - 2 濃度は、転移性肺癌の患者の血

清中では有意に上昇し、濃度の高い患者では化学療法に対する反応が低くなる。p r o M M P - 2 を切断して活性 M M P - 2 を放出する M M P - 1 4 は多くの癌で上昇し、腫瘍の成長、腫瘍塞栓症、癌（たとえば、C N S 腫瘍（たとえば神経膠腫）、頭頸部癌、口腔癌、喉頭癌、軟骨肉腫、乳癌）の移動性、浸潤性、及び転移に寄与する可能性がある。M M P - 1 6 及び M M P - 2 4 も多くの癌で上昇し、腫瘍の成長にも癌（たとえば、乳癌、喉頭癌、卵巣癌、精巣癌、黒色腫、脳腫瘍（たとえば、星細胞腫、膠芽腫、神経膠腫））の浸潤性及び転移にも寄与する可能性がある。

【 0 0 8 9 】

特定の態様では、本発明の抗 V E G F R 抗体を M M P - 1 4 アンタゴニスト（米国特許第 7 , 7 4 5 , 5 8 7 号及び第 8 , 1 0 6 , 1 6 8 号明細書に開示されている抗 M M P - 1 4 抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない）と共に投与する。一態様では、抗体はヒトモノクローナル抗体 D X - 2 4 0 0（Dyax Corp）である。このような抗体との共投与は、ヒトの癌（子宮頸癌、胃癌、肺癌、乳癌、大腸癌、頭頸部癌、悪性脳腫瘍、及び黒色腫）が挙げられるが、これらに限定されるものではない）の治療に適している。

【 0 0 9 0 】

別の態様では、本発明の V E G F R 2 抗体を 1 種以上の適切な補助剤（たとえば、サイトカイン（たとえば I L - 1 0 及び I L - 1 3）又はその他の免疫刺激物質など）と組み合わせて投与できる。しかし、当然であるが、抗 K D R 抗体のみの投与は、治療に有効な形で腫瘍の進行を予防、阻害又は低減するのに十分である。

【 0 0 9 1 】

抗炎症剤及び免疫抑制剤としては、グルココルチコイド（たとえばデキサメタゾン）などのステロイド系薬物、F K 5 0 6（タクロリムス）、シクロスポリン、フィンゴリモド、インターフェロン（I F N β 又は I F N γ など）、腫瘍壊死因子 α （T N F - α ）結合性タンパク質（インフリキシマブ（レミケード）、エタネルセプト（エンブレル）、又はアダリムマブ（ヒュミラ）など）、及びミコフェノール酸が挙げられる。

【 0 0 9 2 】

特定の態様は、本発明の抗体と以下のような第 2 の作用物質を投与することを含む：ドセタキセル（乳癌、尿路癌、腎臓癌などの固形腫瘍）；パクリタキセル（固形腫瘍、胃腺腫）；F O L F R I（すなわち、イリノテカン、フォリン酸、5 - フルオロウラシル）（大腸癌）；カペシタピン（乳癌）；F O L F O X（すなわち、オキサリプラチン、ロイコポリン、5 - フルオロウラシル）（胃癌、食道癌、胃食道癌）；エリブリン（乳癌）；F O L F I R I（すなわち、イリノテカン、レボホリナート、5 - フルオロウラシル）（大腸癌）；カルボプラチン（N S C L C）、ミトキサントロン、及びブレドニゾン（前立腺癌）；O F F（オキサリプラチン、フォリン酸、5 - フルオロウラシル）（大腸癌）；イリノテカン及びセツキシマブ（大腸癌）；ならびにダカルバジン（悪性黒色腫）。

【 0 0 9 3 】

本発明の抗体と抗原結合性断片を、たとえば、細胞傷害性薬物、細胞毒素、酵素、又は放射性同位体などの作用物質に結合させてもよい。この方法は、結合性タンパク質を単独で、又は作用物質（たとえば細胞傷害性薬物）と結合させて、そのような治療を必要とする対象に投与することを含む。たとえば、V E G F R 2 抗体又はその断片を用いて、V E G F R 2 に関連する細胞又は組織（たとえば腫瘍）に毒素などの作用物質を含有するナノ粒子を送達してもよい。

【 0 0 9 4 】

V E G F R 2 結合性タンパク質を生体内で直接使用して天然の補体依存性細胞傷害（C D C）又は抗体依存性細胞傷害（A D C C）によって抗原発現細胞を除去することができる。本明細書に記載の結合性タンパク質は、補体結合性エフェクタードメイン（I g G 1、I g G 2、又は I g G 3 由来の F c 部分、あるいは補体に結合する I g M の相当部分など）を含んでもよい。

【 0 0 9 5 】

本発明の V E G F R 2 抗体を第 2 の作用物質と共に投与する場合、第 1 の作用物質と第

10

20

30

40

50

2の作用物質は、逐次的に投与されても同時に投与されてもよい。各作用物質は1回の投与量でも複数回の投与量でも投与でき、その投与量を任意の計画(1日2回、1日1回、1週間に1回、2週間に1回、1ヶ月に1回などが挙げられるが、これらに限定されるものではない)で投与できる。

【0096】

本発明は補助的投与も含む。補助的投与は、疾患又はその症状を治療するために既に投与されている第1の作用物質に加えて第2の作用物質を患者に投与することを意味する。態様によっては、補助的投与は、第1の作用物質の投与によってその疾患又はその症状が治療されなかったか十分に治療されなかった患者に第2の作用物質を投与することを含む。他の態様では、補助的投与は、第1の作用物質の投与によって疾患が有効に治療された患者に第2の作用物質を投与することを含む。

10

【0097】

本発明の一態様では、抗体又はその抗原結合性断片を注射によって投与し、小分子を経口投与する。そのような一態様では、抗体は1週間に1回、又は1ヶ月に1~2回投与され、小分子は毎日投与される。

【0098】

本発明の一態様では、抗体又はその抗原結合性断片を注射によって投与し、ROCK2阻害剤を経口投与する。好ましい態様では、作用物質を1日に1回投与する。本発明によれば、眼の疾患の治療のためにROCK阻害剤又はVEGF R2抗体を対象に投与する場合、瘢痕を低減又は予防するためにTGF- β アンタゴニストをその対象に投与してもよい。たとえば、本発明の一態様では、眼の障害の治療のためにROCK阻害剤を投与する場合、TGF- β も投与する。別の態様では、目の障害の治療のためにVEGFアンタゴニストを対象に投与する場合、TGF- β アンタゴニストも投与する。本発明の別の態様では、目の障害の治療のためにROCK阻害剤とVEGFアンタゴニストを対象に投与する場合、TGF- β アンタゴニストも投与する。新生血管を伴う眼の疾患では、新たな血管の漏出に続いて瘢痕(たとえば円板状の瘢痕)が形成される。本発明は、眼の疾患での新生血管を治療するためにVEGFアンタゴニスト及びROCK2阻害剤と共にTGF- β アンタゴニストを対象に投与することを含む。

20

【0099】

有用なTGF- β アンタゴニストとしては、以下が挙げられる(ただし、これらに限定されるものではない): (i) 抗TGF- β 抗体とその抗原結合性断片(汎TGF- β 抗体GC-1008(Genzyme)、抗TGF- β_1 抗体メテリムマブ(CAT-192)(Cambridge Antibody Technology)、及びこれらの抗体の抗原結合性断片など); (ii) 可溶性TGF- β 受容体又はそのリガンド結合性断片(TGF- β 受容体IIIの膜近位のリガンド結合性ドメインのアミノ酸730位~743位を含む合成ペプチドであるP144(Esparza-Lopez et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(18):14588-96)、及びTGF- β 受容体II-Fc(IgG₁)融合物(Smith, J. et al., 1999, Circulation Res. 84:1212-22)など); (iii) TGF- β の1つ以上のアイソフォームを遮断するTGF- β 受容体結合性ペプチド(Huang et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:27155-59に開示されている、TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 に由来する25個のアミノ酸からなるTGF- β 受容体結合性ペプチドなど); ならびに(iv) TGF- β の合成を阻害するアンチセンス剤(TGF- β_2 の合成を阻害するオリゴヌクレオチドであるトラベデルセン(Antisense Pharma GmbH)など)。国際公開第2006/052568号、第02/094833号、第04/048382号、第04/048381号、第04/050659号、第04/021989号、第04/026871号、及び第04/026307号パンフレットにはさらにアンタゴニストが開示されている。

30

40

【0100】

本発明の特定の態様では、抗体又はその抗原結合性断片を有効量のPD-L1抗体(米国特許仮出願第61/927,907号及び国際出願PCT/US15/11657号明細書を参照のこと; これらの内容全体を参照により本明細書に援用する)と共に対象に投

50

与する。

【0101】

特定の態様では、化合物又は組成物の1回分の投与量を、毎日、1日おき、2日毎、3日毎、1週間に1回、1週間に2回、1週間に3回、又は2週間に1回、対象に投与する。他の態様では、化合物又は組成物の2回分、3回分、又は4回分の投与量を、毎日、2日毎、3日毎、1週間に1回、又は2週間に1回、対象に投与する。態様によっては、1回分または複数回分の投与量の化合物又は組成物を、2日間、3日間、5日間、7日間、14日間、又は21日間投与する。特定の態様では、1回分の投与量の化合物又は組成物を、1ヶ月間、1.5ヶ月間、2ヶ月間、2.5ヶ月間、3ヶ月間、4ヶ月間、5ヶ月間、6ヶ月間、又はそれ以上、投与する。

10

【0102】

投与方法としては、非経口投与、皮内投与、硝子体内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与、鼻内投与、硬膜外投与、経口投与、舌下投与、鼻内投与、脳内投与、腔内投与、経皮投与、経粘膜投与、直腸投与、吸入投与、又は局所投与（特に、耳、鼻、目、又は皮膚への）が挙げられるが、これらに限定されるものではない。投与の様式は投与を行う者の判断に委ねられる。ほとんどの場合、投与によって血流中に化合物が放出される。眼の疾患の治療の場合、生物由来物質の硝子体内投与が好ましい。

【0103】

特定の態様では、化合物の局所投与が望ましい場合がある。これは、たとえば、局所点滴、局所使用、注射、カテーテル手段、又は留置剤によって達成できるが、これらに限定されるものではない。前記留置剤は、多孔性、非多孔性、又はゼラチン状の物質であり、膜（シラスティック膜など）や繊維を含む。このような場合、投与は、化合物を血流中に実質的に放出することなく、局所組織を選択的に標的とすることができる。

20

【0104】

肺投与（たとえば、吸入器か噴霧器とエアロゾル化剤を含む製剤を使用するか、フルオロカーボン又は合成肺胞界面活性剤での灌流による）も採用できる。特定の態様では、化合物をの従来の結合剤及び溶媒（トリグリセリドなど）と共に坐剤として製剤化する。

【0105】

別の態様では、小胞、特にリボソーム中に化合物を送達する（以下を参照のこと：Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Bacterial infection, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez Berestein (同書)、pp.317-327 (同書全体を参照のこと))。

30

【0106】

別の態様では、徐放システムで化合物を送達する（たとえば、Goodson, Medical Applications of Controlled Release (上記文献), vol. 2, pp. 115 - 138 (1984)を参照のこと）。Langer, 1990, Science 249:1527-1533による概説に記載されている徐放システムの例を用いてもよい。一態様では、ポンプを使用してもよい（Langerの上記文献; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照のこと）。別の態様では、ポリマー材料を用いてもよい（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61を参照のこと; また、Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照のこと）。

40

【0107】

上記の投与計画は、例示のためにのみ示すものであり、限定として解釈されるべきではない。当業者は容易に理解することであるが、あらゆる投与が本発明の範囲に含まれる。

【0108】

50

本明細書に開示された発明の原理の変形が当業者によってなされてもよいことが理解かつ期待されるべきであり、そのような変更も本発明の範囲に含まれるものとする。

【 0 1 0 9 】

本願全体で様々な刊行物が参照されている。これらの刊行物は、本発明が属する技術水準をより完全に説明するために、参照によりその全体が本願に援用される。以下の実施例は本発明をさらに説明するものであり、本発明の範囲を何ら限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【 0 1 1 0 】

(実施例 1)

VEGFRのドメイン 2 及び 3 に結合してリガンド結合を遮断する抗体の確認

【 0 1 1 1 】

表 1 で確認した、ヒト VEGFR 2 に結合してこれを中和する 2 個の抗体をヒト Fab ファージ提示ライブラリーから単離した。これらの抗体は、リガンド VEGF - A の h VEGFR 2 との結合を遮断する (図 2)。これらの抗体はさらに、KDRを発現するブタ大動脈内皮 (PAE) 細胞と結合し、VEGF - A に刺激される VEGFR 2、AKT、及び MAPK のリン酸化を阻害する (図 3)。表 1 は、それらの抗体の CDR 及び可変ドメインのアミノ酸配列を示す。Mab 101 及び Mab 102 の K_d 値は、それぞれ約 6 . 6 mM 及び 1 . 7 nM である。

【 0 1 1 2 】

Mab 101 の重鎖を κ 軽鎖遺伝子 (κ ライブラリー) 及び λ 軽鎖遺伝子 (λ ライブラリー) で再組換えした。ヒト VEGFR 2 とマウス VEGFR 2 の両方に対して λ ライブラリーをパニングすることにより、20 個の固有の λ 軽鎖変異体を見出した。ヒト VEGFR 2 とマウス VEGFR 2 の両方に対して κ ライブラリーをパニングすることにより、22 個の固有の κ 軽鎖変異体を見出した。表 2 は軽鎖の CDR 及び可変ドメインのアミノ酸配列を示す。Mab 105、106、及び 107 の K_d 値は約 10 倍増加した (それぞれ 0 . 24 nM、0 . 22 nM、0 . 12 nM) (表 3)。これらの抗体と、その由来である抗体 Mab 101 は、VEGFR のドメイン 2 及び 3 に結合し、これらのドメインを含む構築物にも結合する。

【 0 1 1 3 】

【表 3】

表 3 : 抗体結合データ			
抗体	k_a $10^4 M^{-1} s^{-1}$	k_d $10^{-4} s^{-1}$	K_D nM
107	55.8	0.934	0.167
109	30.6	3.80	1.24
104	79.2	1.13	0.165
110	44.9	3.10	0.69
108	71.9	1.75	0.244
105	24.3	0.591	0.243
101	29.8	5.93	1.81

【 0 1 1 4 】

親抗体と同様、これらの抗体は VEGFR 2 に結合して VEGF - A の VEGFR 2 との結合を遮断し (図 4)、VEGF - A に刺激される VEGFR 2、AKT、及び MAPK のリン酸化を阻害する (図 5)。

【 0 1 1 5 】

抗体のうちいくつか (M a b 1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 6 など) はマウス V E G F R 2 とも交差反応した。

【 0 1 1 6 】

【 表 4 】

表 4 : 交差反応性						
	hVEGFR2			mVEGFR2		
抗体	k_a $10^4 M^{-1} s^{-1}$	k_d $10^{-4} s^{-1}$	K_D nM	k_a $10^4 M^{-1} s^{-1}$	k_d $10^{-4} s^{-1}$	K_D nM
138	19.7	1.42	0.72	23.4	5.90	2.55
139	14.6	1.75	1.20	13.0	3.17	2.44
106	35.6	0.512	0.144			

10

【 0 1 1 7 】

M a b 1 3 8、1 3 9、及び 1 4 0 は、V E G F - A に刺激される V E G F R 2 及び下流シグナル伝達分子 (M A P K など) のリン酸化を阻害した。

【 0 1 1 8 】

(実施例 2)

生体内での腫瘍成長の阻害

20

【 0 1 1 9 】

6 ~ 8 週齢の性別を一致させた (雌) N O D - S C I D マウスに、 ^{137}Cs ガンマ線源から約 0 . 9 G y / 分の線量率で 3 . 5 G y を照射し、 2×10^7 個の H L 6 0 細胞を静脈内接種する。腫瘍接種の 3 日後、マウスの群を様々な投与量の M a b 1 0 6 で週に 2 回治療し、生存期間について記録する。

治療しなかったマウスは約 2 週間以内にすべて死亡した。腫瘍量が多くても、1 0 m g / k g の M a b 1 0 6 でマウスを治療した場合の生存時間は 2 8 日まで延長される。

【 0 1 2 0 】

(実施例 3)

ヒト患者の大腸癌の治療

30

【 0 1 2 1 】

大腸癌と診断されたヒト対象を処置群に分け、標準の化学療法計画を行う。2 つの患者群を、週に 1 回、5 m g / k g / 週又は 1 5 m g / k g / 週で 4 ヶ月間治療する。対照群には、標準の化学療法計画のみを行う。腫瘍量を磁気共鳴画像法 (M R I) で定期的に評価する。対照群と比較すると、週に 1 回の抗体治療を受けた患者は、抗体治療を受けない患者に比べて腫瘍成長又は腫瘍サイズの有意な低減、より高い進行遅延性又は生存期間の延長を示すと予想される。

【 0 1 2 2 】

M a b 1 0 1 の重鎖を含む M a b 1 3 8 (表 2) (配列番号 4 ; 図 6 A を参照のこと) を親和性成熟のために選択した。軽鎖の C D R 3 と重鎖の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 に変異を導入した。得られたライブラリーをヒト及びマウスの V E G F R 2 に対してパニングした。表 5 は、得られた抗体のうちの 5 個の抗体の重鎖と軽鎖の C D R 及び可変ドメインのアミノ酸配列を示す。図 6 は、M a b 1 3 8 の重鎖 (配列番号 4) 及び κ 軽鎖 (すなわち配列番号 1 6 0) との配列の比較を示す。

40

【 0 1 2 3 】

【表 5】

表 5 : 抗体のアミノ酸配列 (配列番号による)								
Mab番号	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3	V _H ドメイン	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	V _L ドメイン
147 (B1C4_A7)	197	198	199	200	201	202	203	204
148 (B1C4_H9)	205	206	207	208	209	210	211	212
149 (B1C4_E5)	213	214	215	216	217	218	219	220
150 (B1C4_A6)	221	222	223	224	225	226	227	228
151 (B1C4_G3)	229	230	231	232	233	234	235	236

10

【 0 1 2 4 】

ヒト、マウス、及びラットの V E G F R 2 に対する M a b 1 4 7 及び M a b 1 4 9 と親である M a b 1 3 8 の結合定数をBiacore分析により決定した (表 6) 。

20

【表 6】

表 6 : ヒト、マウス、及びラットの V E G F R 2 に対する結合のBiacore分析				
Mab	抗原	k _a	k _d	K _D
138	ラット	4.30E+04	1.34E-03	3.12E-08
	マウス	2.86E+04	2.33E-03	8.17E-08
	ヒト	8.98E+04	6.00E-04	6.68E-09
147	ラット	6.45E+04	8.99E-04	1.39E-08
	マウス	4.38E+04	1.28E-03	2.94E-08
	ヒト	1.13E+05	2.82E-04	2.51E-09
149	ラット	3.32E+04	1.43E-03	4.31E-08
	マウス	2.29E+04	1.81E-03	7.92E-08
	ヒト	8.62E+04	6.59E-04	7.65E-09

30

【 0 1 2 5 】

M a b 1 4 7 の受容体結合特性とリガンド遮断特性について E L I S A で試験した。M a b 1 4 7 は、可溶性 h V E G F R 2 と可溶性 m V E G F R 2 の両方に同様の親和性で結合する (図 7 A) 。 M a b 1 4 7 は、h V E G F R 特異的対照抗体と同様に h V E G F R 2 とのリガンド結合を遮断し、さらに m V E G F R 2 特異的対照抗体と同様に m V E G F R 2 とのリガンド結合を遮断する (図 7 B) 。

40

【 0 1 2 6 】

細胞膜で発現された h V E G F R 2 及び m V E G F R 2 との M a b 1 4 7 の結合も確認した。図 8 A は、ヒト臍静脈内皮細胞 (H U V E C) 及び K D R (すなわちヒト V E G F R 2) を過剰発現するブタ動脈内皮 (P A E) 細胞によって発現される h V E G F R 2 との結合を示す。M a b 1 4 7 は、M S 1 マウス内皮細胞によって発現される m V E G F R 2 にも結合した (図 8 B) 。

【 0 1 2 7 】

M a b 1 4 7 は、K D R 及び p 4 2 / 4 4 のリン酸化の減少が示すように、K D R - P

50

A E 細胞 (図 9 A) 及び H U V E C (図 9 B) 内で、V E G F R 2 が関与するシグナル伝達を阻害する。M a b 1 0 6 及び M a b 1 4 7 は、K D R - P A E 細胞の増殖を阻害し (図 1 0 A) 、さらには V E G F に誘導される K D R - P A E 細胞の移動を阻害する (図 1 0 B) 。V E G F に誘導される K D R - P A E 細胞の移動の阻害に対する M a b 1 4 7 の効果も図 1 1 に示す。

【 0 1 2 8 】

M a b 1 4 7 は、m V E G F R 2 のリン酸化の減少が示すように (図 1 2 A) 、V E G F R 2 が関与するシグナル伝達をマウス E O M A 細胞内でも阻害する。F A C S 試験により、M a b 1 4 7 が E O M A 細胞とより高い結合性を有することが対照抗体との比較で実証された (図 1 2 B) 。

10

【 図 1 A 】

Fig.1A

Kabat 番号 配列番号	1	2	3	4
4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSWYVMG--	WVRQAPGK	
12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSWYIML--	WVRQAPGK	

Kabat 番号 配列番号	5	6	7	8
4	GLEWVS	SIYP--SGGATNYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSL	
12	GLEWVS	SIGS--SGGFTDYADSVKG	RFTISRDNKNTLYLQMNSL	

Kabat 番号 配列番号	9	10	11	12
4	RAEDTAVYICAR	GNYP-----DY	WGQGTILVTVSS	
12	RAEDTAVYICAR	GLAAP-----RS	WGQGTILVTVSS	

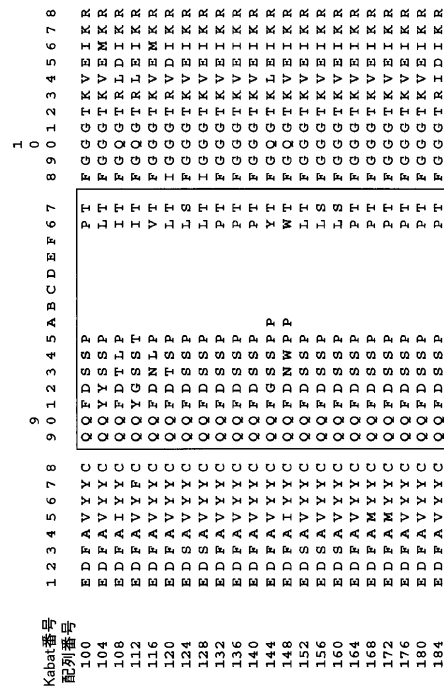
【 図 1 B 1 】

Fig.1B1

Kabat 番号 配列番号	1	2	3	4	5	6	7	8
8	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	QGDSTL	RSYYAS	WYQ				
24	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
28	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	RHEYSS	WYQ				
32	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGEKL	GDEYAS	WYQ				
36	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGEKL	GDEYAS	WYQ				
40	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
44	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
48	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
16	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
20	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
52	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
56	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
60	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
64	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
68	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
72	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
76	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
80	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
84	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
88	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
92	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				
96	QSVLTQDPA--VSVALGQTVRIITC	SGDNL	GDEYAS	WYQ				

【図 1 C 3】

Fig.1C3



【図 2】

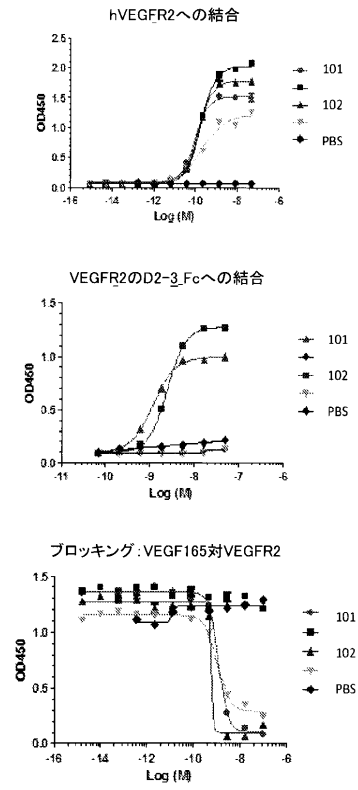


Fig. 2

【図 3】

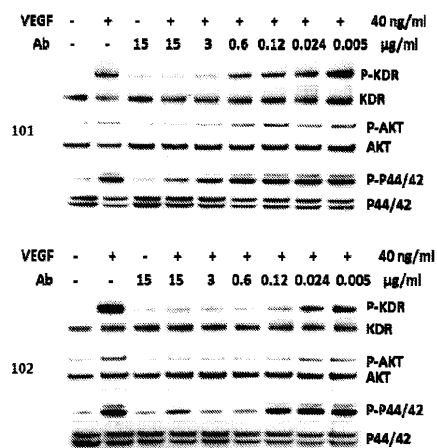


Fig. 3

【図 4】

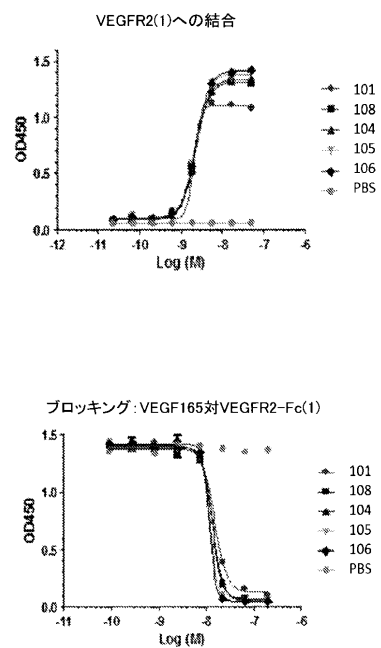


Fig. 4

【図 5】

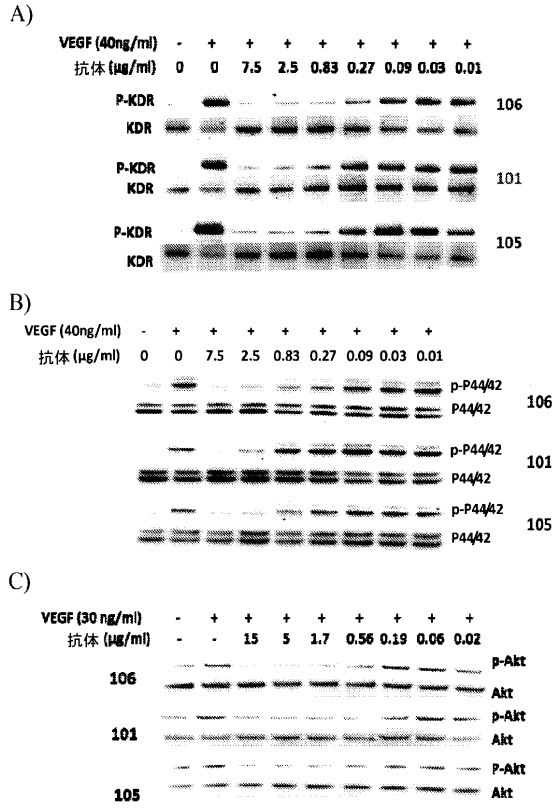
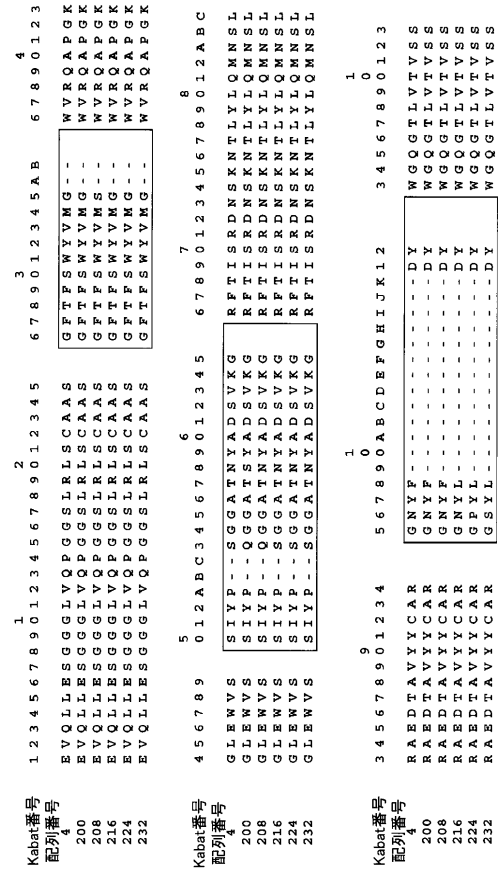


Fig. 5

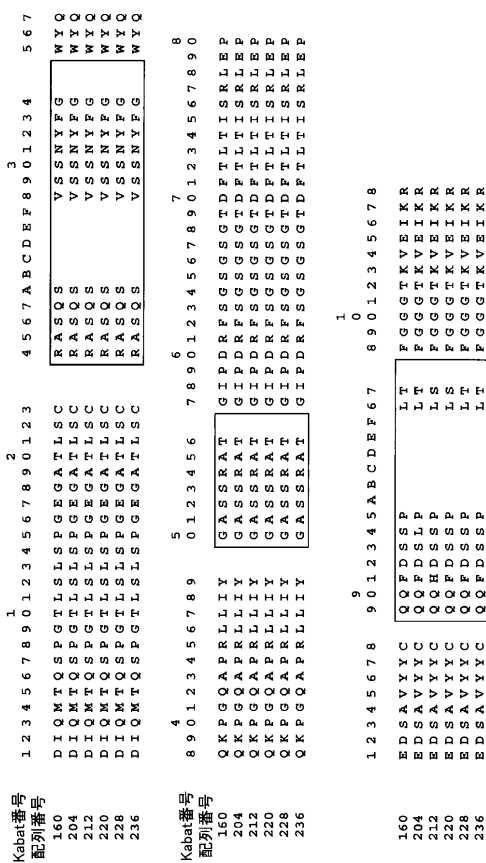
【図 6 A】

Fig.6A



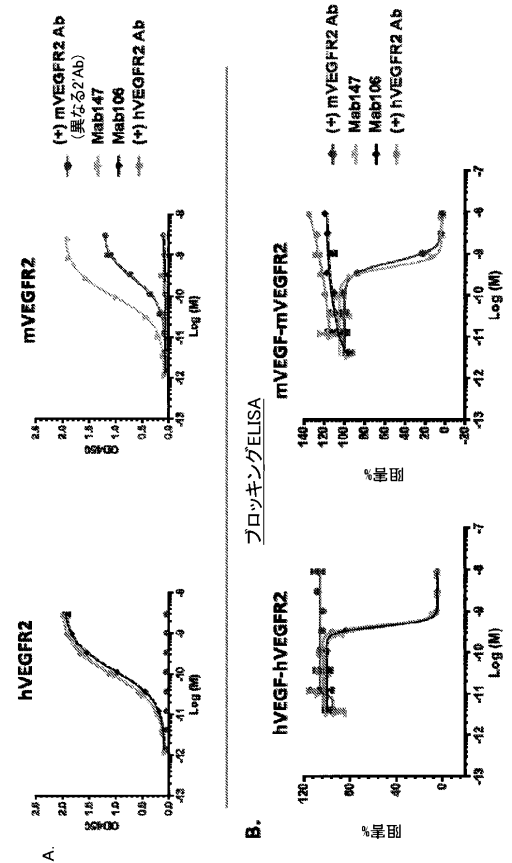
【図 6 B】

Fig.6B

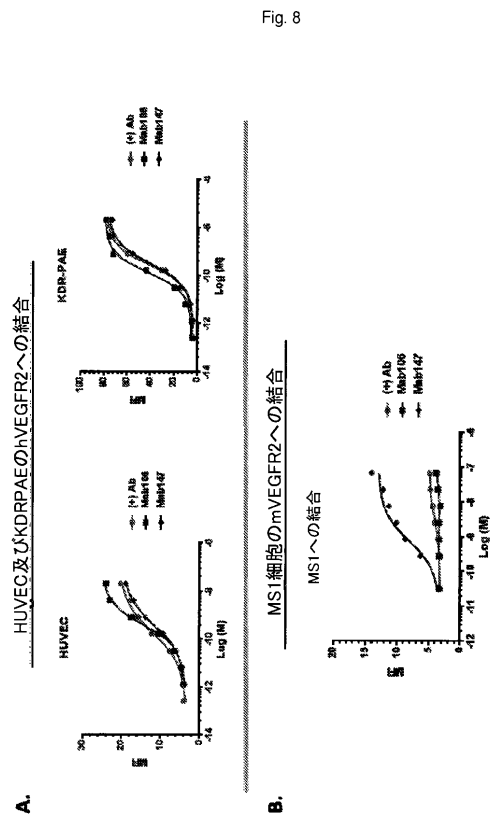


【図 7】

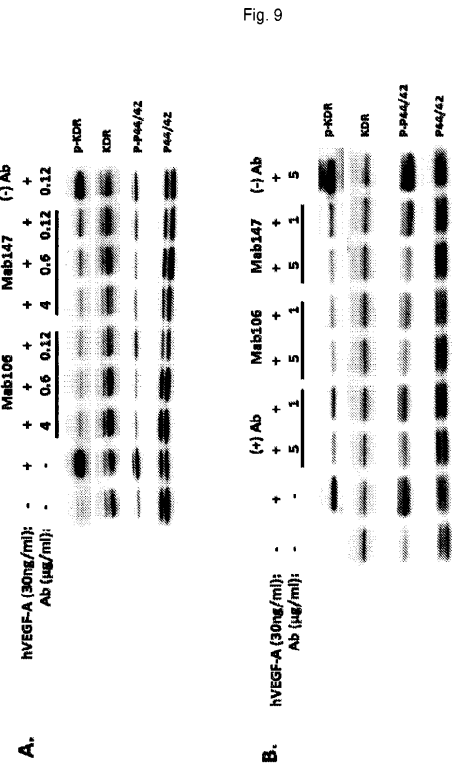
Fig. 7



【図 8】



【図 9】



【図 10】

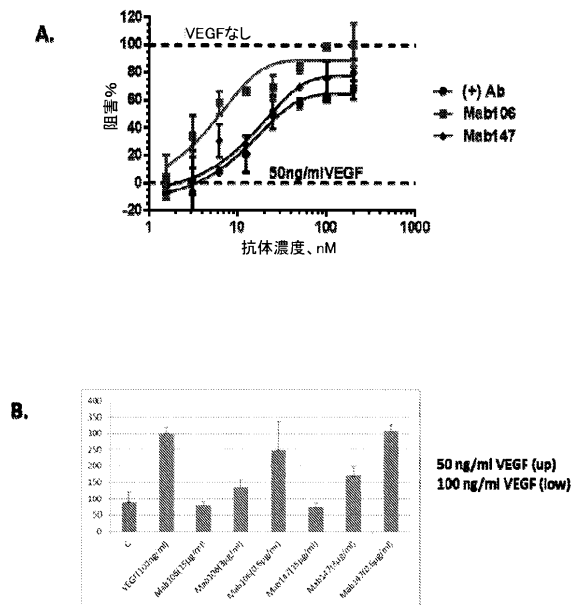


Fig. 10

【図 11】

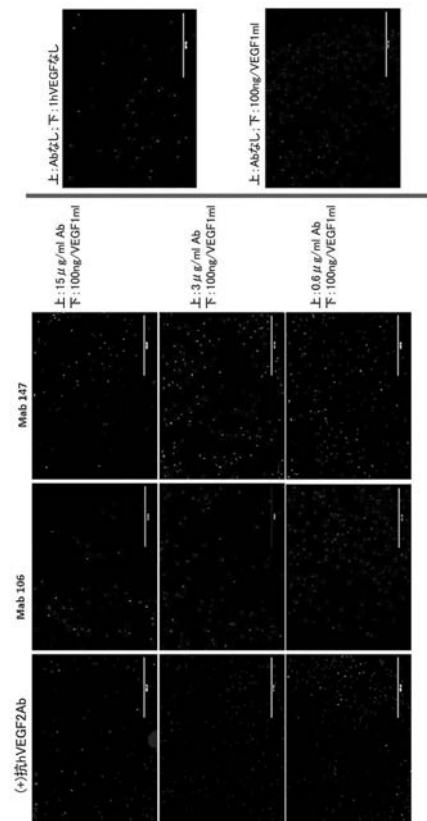
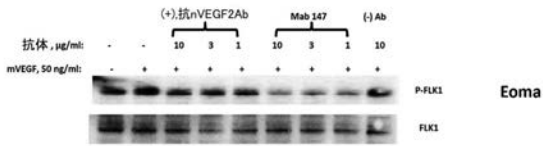


Fig. 11

【 図 1 2 】

A.



B.

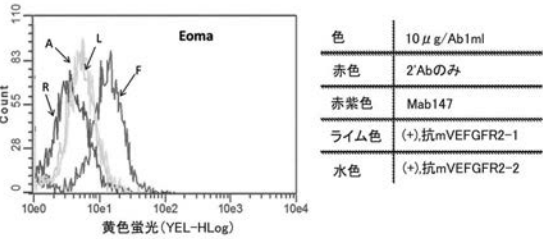


Fig. 12

【 配 列 表 】

2017531434000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US15/54569

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(R) - C07K 16/28; A61K 39/395, 45/06 (2016.01) CPC - C07K 16/2863; A61K 39/395, 45/06 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) IPC(R): C07K 16/28; A61K 39/395, 45/06; A61P 35/00 (2016.01) CPC: C07K 16/2863; A61K 39/395, 45/06 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) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; PubMed; EBSCO Discovery Service; NCBI BLAST; The Lens PatSeq Finder; European Nucleotide Archive; 'vascular endothelial growth factor receptor 2', 'VEGFR-2', 'antibody', 'heavy chain variable domain', 'CDR1', 'CDR2', 'CDR3'																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014/055998 A1 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraphs [0005], [0012], Figure 1A</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014/055999 A2 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraphs [0017], [0033], Figure 11A</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014/055996 A2 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraph [0039], Figure 18A</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012/0316071 A1 (SMIDER, V et al.) December 13, 2012; abstract</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>WO 2015/054317 A1 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; Fig. 6A</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 2014/055998 A1 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraphs [0005], [0012], Figure 1A	1-9	A	WO 2014/055999 A2 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraphs [0017], [0033], Figure 11A	1-9	A	WO 2014/055996 A2 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraph [0039], Figure 18A	1-9	A	US 2012/0316071 A1 (SMIDER, V et al.) December 13, 2012; abstract	1-9	P, X	WO 2015/054317 A1 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; Fig. 6A	1-9
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	WO 2014/055998 A1 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraphs [0005], [0012], Figure 1A	1-9																		
A	WO 2014/055999 A2 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraphs [0017], [0033], Figure 11A	1-9																		
A	WO 2014/055996 A2 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; paragraph [0039], Figure 18A	1-9																		
A	US 2012/0316071 A1 (SMIDER, V et al.) December 13, 2012; abstract	1-9																		
P, X	WO 2015/054317 A1 (KADMON CORPORATION, LLC) April 10, 2014; Fig. 6A	1-9																		
☐ 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 6 June 2016 (06.06.2016)		Date of mailing of the international search report 12 JUL 2016																		
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/54569

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
 ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/54569

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

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
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. ☒ Claims Nos.: 10-25
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

-Please See Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Groups I+, Claims 1-9

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US15/54569

-----Continuation of Box No. III - 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.

Groups I+, Claims 1-9 and SEQ ID NOs: 237, 238, 241, 245, 246, 247, 200 and 204 are directed toward an isolated antibody or fragment thereof that binds to human VEGFR2.

The isolated antibody will be searched to the extent that it encompasses a heavy chain CDR1 sequence encompassing SEQ ID NO: 237 (first exemplary heavy chain CDR1); a heavy chain CDR2 sequence encompassing SEQ ID NO: 238 (first exemplary heavy chain CDR2); a heavy chain CDR3 sequence encompassing SEQ ID NO: 241 (first exemplary heavy chain CDR3); a light chain CDR1 sequence encompassing SEQ ID NO: 245 (first exemplary light chain CDR1); a light chain CDR2 sequence encompassing SEQ ID NO: 246 (first exemplary light chain CDR2); a light chain CDR3 sequence encompassing SEQ ID NO: 247 (first exemplary light chain CDR3); a heavy chain variable region encompassing SEQ ID NO: 200 (first exemplary heavy chain variable region); and a light chain variable region encompassing SEQ ID NO: 204 (first exemplary light chain variable region). Applicant is invited to elect additional CDR(s) with specified SEQ ID NO: for each CDR, with (where applicable) associated VL and/or VH, represented by SEQ ID NOs, to be searched. Additional CDR and/or VL and/or VH sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 6 (in-part), 7 (in-part), 8 (in-part) and 9 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 237 (heavy chain CDR1); SEQ ID NO: 238 (heavy chain CDR2); SEQ ID NO: 241 (heavy chain CDR3); SEQ ID NO: 245 (light chain CDR1); SEQ ID NO: 246 (light chain CDR2); SEQ ID NO: 247 (light chain CDR3); SEQ ID NO: 200 (heavy chain variable region); and SEQ ID NO: 204 (light chain variable region). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a heavy chain CDR2 sequence encompassing SEQ ID NO: 238 (first exemplary elected heavy chain CDR2) and a heavy chain variable region encompassing corresponding SEQ ID NO: 208 (first exemplary elected heavy chain variable region).

Groups I+ share the technical features including: an isolated antibody or fragment thereof that binds to human VEGFR2, comprising a heavy chain variable domain, which comprises a CDR1, a CDR2, and a CDR3 sequence, wherein: (i) the CDR1 sequence is GFTFSWYVMG (SEQ ID NO: 237), (ii) the CDR2 sequence is selected from the group consisting of SIYPGGATSYADSVK (SEQ ID NO: 238), SIYPGGATNYADSVK (SEQ ID NO: 239), and SIYPGGATNYADSVK (SEQ ID NO: 240); and (iii) the CDR3 sequence is selected from the group consisting of GNYFDY (SEQ ID NO: 241), GNYLDY (SEQ ID NO: 242), GPYLDY (SEQ ID NO: 243) and GSYLDY (SEQ ID NO: 244), with the proviso that the heavy chain variable domain does not comprise both the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 240 and the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 241.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO2014/055998 A1 to Kadmon Corporation (hereinafter 'Kadmon') in view of US 2012/0316071 A1 to Smider et al. (hereinafter 'Smider').

Kadmon discloses an isolated antibody or fragment thereof that binds to human VEGFR2 (an isolated antibody or fragment thereof that binds to human VEGFR2; abstract; paragraph [0005]), comprising a heavy chain variable domain which comprises a CDR1, a CDR2, and a CDR3 sequence (comprising a heavy chain variable domain which comprises a CDR1, a CDR2, and a CDR3 sequence; paragraph [0005]), wherein: (i) the CDR1 sequence is GFTFSWYVMG (SEQ ID NO: 237) (wherein the CDR1 sequence is GFTFSWYX1MX2, where X1 is V or I and X2 is G or L (wherein: (i) the CDR1 sequence is GFTFSWYVMG (SEQ ID NO: 237); paragraph [0005], Figure 1A; SEQ ID NO: 4, residues 26-35 are 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 237), (ii) the CDR2 sequence is SIYPGGATNYADSVK (SEQ ID NO: 240) (the CDR2 sequence is SIX1X2SGGX3TX4YADSVK, wherein X1 is Y or G; X2 is P or S, X3 is A or F and X4 is N or D ((ii) the CDR2 sequence is SIYPGGATNYADSVK (SEQ ID NO: 240)); paragraph [0005], Figure 1A; SEQ ID NO: 4, residues 50-67 are 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 240); and (iii) the CDR3 sequence is GNYFDY (SEQ ID NO: 241) (and (ii) the CDR3 sequence is GNYFDY (SEQ ID NO: 241); paragraph [0005], Figure 1A, SEQ ID NO: 3, wherein SEQ ID NO: 3 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 241). Kadmon further discloses wherein the antibody comprises only 1 or 2 of the CDR sequences (wherein the antibody provided comprises a heavy chain comprising one or two of the heavy chain variable domain CDR sequences (wherein the antibody comprises only 1 or 2 of the CDR sequences); paragraph [0025]); as well as wherein the antibody has been improved by affinity maturation (wherein the antibody has been improved by affinity maturation; paragraph [0031]), wherein CDRs are mutated including wherein all 20 amino acids are found at particular positions of a CDR (wherein CDRs are mutated including wherein all 20 amino acids are found at particular positions of a CDR; paragraph [0031]) to improve affinity and specificity for the target (to improve affinity and specificity for the target; paragraph [0031]).

Kadmon does not disclose: with the proviso that the heavy chain variable domain does not comprise both the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 240 and the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 241.

Smider discloses methods of affinity maturation-based antibody optimization (methods of affinity maturation-based antibody optimization; abstract) to improve binding affinity for a target antigen (to improve binding affinity for a target antigen; abstract); wherein the target antigen is VEGFR2 (wherein the target antigen is VEGFR2; paragraph [0019]), including substitutions (including substitutions; paragraph [0174]) in the CDR regions of a light or heavy chain (in the CDR regions of a light or heavy chain; paragraph [0182]), including conservative substitutions of amino acids (including conservative substitutions of amino acids; paragraph [0242]), such as substitution of Met, Leu or Tyr for Phe (such as substitution of Met, Leu or Tyr for Phe; Table 2).

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Kadmon to have included the affinity maturation methods of Smider to have provided affinity maturation of the antibodies disclosed by Kadmon, including substitution of amino acids in the shortest heavy chain CDR disclosed by Kadmon, CDR3, such as substitution of Leu for Phe, as disclosed by Smider, and evaluation of the binding characteristics of the resultant antibodies to produce an antibody wherein the heavy chain variable domain does not comprise both the CDR2 sequence of SEQ ID NO: 240 and the CDR3 sequence of SEQ ID NO: 241; wherein the antibody had improved affinity for the target VEGFR2, as disclosed by Kadmon.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Kadmon and Smider references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 2 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
		A 6 1 K 39/395	N	
		A 6 1 K 39/395	T	

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

(74)代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100141977
弁理士 中島 勝

(72)発明者 ダン ルウ
アメリカ合衆国, ニュージャージー 0 7 6 4 5, モントベール, オールド ウッズ レーン 2
4

(72)発明者 ジェンピーン ジュウ
アメリカ合衆国, ニュージャージー 0 7 6 7 7, ウッドクリフ レイク, モルホーランド ドラ
イブ 1 9

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA01 BA21 CA25 CA44
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB261 ZC20 ZC41 ZC75
4C085 AA14 BB01 BB41 BB43 CC23 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA28 FA74