

(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2012-521768

(P2012-521768A)

(43) 公表日 平成24年9月20日(2012.9.20)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 N 15/09</b> (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
<b>C 12 N 1/15</b> (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 0 6 4
<b>C 12 N 1/19</b> (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 0 6 5
<b>C 12 N 1/21</b> (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 0 8 4
<b>C 12 N 5/10</b> (2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 1 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-502294 (P2012-502294)	(71) 出願人	511231997 ジモジエネティクス・インコーポレイテッド Z Y M O G E N E T I C S, INC. アメリカ合衆国O 8 5 4 3 ニュージャージー州 一州プリンストン、ルート206アンド・プロビンス・ライン・ロード
(86) (22) 出願日	平成22年3月26日 (2010.3.26)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成23年11月28日 (2011.11.28)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 國際出願番号	PCT/US2010/028877	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 國際公開番号	W02010/111625	(74) 代理人	100170520 弁理士 澤本 真奈美
(87) 國際公開日	平成22年9月30日 (2010.9.30)		
(31) 優先権主張番号	61/164,023		
(32) 優先日	平成21年3月27日 (2009.3.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗体-受容体の組み合わせを含む多特異的結合性タンパク質を用いるための組成物および方法

## (57) 【要約】

VEGF-A および FGF の両方の生物学的活性を減少させる抗体 / 可溶性受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質が開示される。FGF 結合部分は、一般に、可溶性 FGFR3 および FGFR2 である。Fc ポリペプチドは、ペプチドまたはポリペプチドリソルバー配列を用いて融合されるポリペプチドである。FGF 結合部分および VEGF-A 結合部分の C 末端に融合され、単一の二重特異的結合性タンパク質として発現されることが可能。二重特異的抗体 / 可溶性受容体結合性タンパク質は、充実性腫瘍増殖によって特徴付けられる癌ならびに他の疾患の治療に用いることができる。

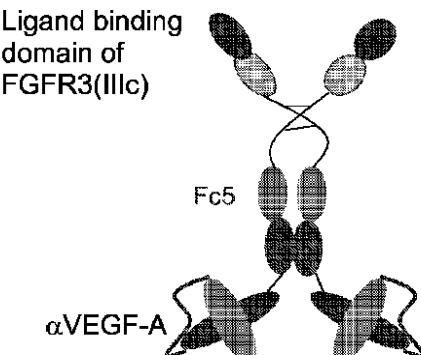


Figure 2

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

V E G F - A および F G F の両方の生物学的活性を減少させる、抗体部分および可溶性受容体部分を含む二重特異的結合性タンパク質。

**【請求項 2】**

V E G F - A および F G F の両方の生物学的活性を減少させる、V E G F - A 抗体部分および F G F 受容体の F G F 結合部分を含む二重特異的結合性タンパク質。

**【請求項 3】**

二重特異的結合性タンパク質の可溶性 F G F 受容体部分が F G F R 3 または F G F R 2 の F G F 受容体部分を含む、請求項 2 記載の二重特異的結合性タンパク質。 10

**【請求項 4】**

配列番号 1 3、配列番号 2、配列番号 1 9、配列番号 1 0、配列番号 1 5 および配列番号 2 2 からなる群から選択される F G F R 3 である F G F 受容体部分、

配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 5 2 および配列番号 7 0 からなる群から選択される V E G F - A 抗体部分

を含む V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質。

**【請求項 5】**

F G F および V E G F - A の活性を減少させる、請求項 4 記載の二重特異的結合性タンパク質。 20

**【請求項 6】**

二重特異的タンパク質をコードしているポリヌクレオチドであって、

配列番号 1 3、配列番号 2、配列番号 1 9、配列番号 1 0、配列番号 1 5 および配列番号 2 2 からなる群から選択される F G F R 3 ポリペプチド、および

配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 5 2 および配列番号 7 0 からなる群から選択される V E G F - A 抗体ポリペプチド  
をコードするポリヌクレオチド。

**【請求項 7】**

請求項 6 記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

**【請求項 8】**

請求項 7 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。 30

**【請求項 9】**

二重特異的結合性タンパク質が発現される条件下で、請求項 8 記載の宿主細胞を培養し、

該宿主細胞から該タンパク質を単離する  
ことを含む、二重特異的結合性タンパク質を產生する方法。

**【請求項 10】**

請求項 4 記載の二重特異的結合性タンパク質および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

**【請求項 11】**

配列番号 1 3、配列番号 2、配列番号 1 9、配列番号 1 0、配列番号 1 5 および配列番号 2 2 からなる群から選択される F G F R 3 である F G F 受容体部分、および

配列番号 4 8 および配列番号 5 0、配列番号 5 4 および配列番号 5 6、および配列番号 6 6 および配列番号 6 8 からなる群から選択される V E G F - A 抗体部分  
を含む V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質。 40

**【請求項 12】**

F G F および V E G F - A の活性を減少させる、請求項 11 記載の二重特異的結合性タンパク質。

**【請求項 13】**

10

20

30

40

50

配列番号 13、配列番号 2、配列番号 19、配列番号 10、配列番号 15 および配列番号 22 からなる群から選択される F G F R 3 ポリペプチド、および

配列番号 48 および配列番号 50、配列番号 54 および配列番号 56、および配列番号 66 および配列番号 68 からなる群から選択される V E G F - A 抗体ポリペプチドをコードする、二重特異的タンパク質をコードしているポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 13 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 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 16】

二重特異的結合性タンパク質が発現される条件下で、請求項 15 記載の宿主細胞を培養し、

該宿主細胞から該タンパク質を単離することを含む、二重特異的結合性タンパク質を產生する方法。

【請求項 17】

請求項 13 記載の二重特異的結合性タンパク質および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 18】

配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62 および配列番号 64 からなる群から選択される F G F R 3 部分および V E G F - A 抗体部分を含む二重特異的結合性タンパク質。

【請求項 19】

F G F および V E G F - A の活性を減少させる、請求項 18 記載の二重特異的結合性タンパク質。

【請求項 20】

配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62 および配列番号 64 からなる群から選択される F G F R 3 部分および V E G F - A 抗体部分をコードする、二重特異的タンパク質をコードしているポリヌクレオチド。

【請求項 21】

請求項 20 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 22】

請求項 21 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 23】

二重特異的結合性タンパク質が発現される条件下で、請求項 22 記載の宿主細胞を培養し、

該宿主細胞から該タンパク質を単離することを含む、二重特異的結合性タンパク質を產生する方法。

【請求項 24】

請求項 20 記載の二重特異的結合性タンパク質および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 25】

配列番号 24、配列番号 29、配列番号 33、配列番号 37、配列番号 40 および配列番号 42 からなる群から選択される F G F R 2 である F G F 受容体部分、および配列番号 44、配列番号 46、配列番号 52 および配列番号 70 からなる群から選択される V E G F - A 抗体部分を含む V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質。

【請求項 26】

F G F および V E G F - A の活性を減少させる、請求項 22 記載の二重特異的結合性タンパク質。

【請求項 27】

10

20

30

40

50

配列番号 2 4、配列番号 2 9、配列番号 3 3、配列番号 3 7、配列番号 4 0 および配列番号 4 2 からなる群から選択される F G F R 2 ポリペプチド、および

配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 5 2 および配列番号 7 0 からなる群から選択される V E G F - A 抗体ポリペプチド

をコードする、二重特異的タンパク質をコードしているポリヌクレオチド。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 0】

二重特異的結合性タンパク質が発現される条件下で、請求項 2 9 記載の宿主細胞を培養し、

該宿主細胞から該タンパク質を単離することを含む、二重特異的結合性タンパク質を產生する方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 5 記載の二重特異的結合性タンパク質および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 2】

配列番号 2 4、配列番号 2 9、配列番号 3 3、配列番号 3 7、配列番号 4 0 および配列番号 4 2 からなる群から選択される F G F R 2 である F G F 受容体部分、および

配列番号 4 8 および配列番号 5 0、配列番号 5 4 および配列番号 5 6、および配列番号 6 6 および配列番号 6 8 からなる群から選択される V E G F - A 抗体部分を含む V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質。

【請求項 3 3】

F G F および V E G F - A の活性を減少させる、請求項 2 9 記載の二重特異的結合性タンパク質。

【請求項 3 4】

配列番号 2 4、配列番号 2 9、配列番号 3 3、配列番号 3 7、配列番号 4 0 および配列番号 4 2 からなる群から選択される F G F R 2 ポリペプチド、および

配列番号 4 8 および配列番号 5 0、配列番号 5 4 および配列番号 5 6、および配列番号 6 6 および配列番号 6 8 からなる群から選択される V E G F - A 抗体ポリペプチドをコードする、二重特異的タンパク質をコードしているポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

請求項 3 4 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 7】

二重特異的結合性タンパク質が発現される条件下で、請求項 3 6 記載の宿主細胞を培養し、

該宿主細胞から該タンパク質を単離することを含む、二重特異的結合性タンパク質を產生する方法。

【請求項 3 8】

請求項 3 4 記載の二重特異的結合性タンパク質および医薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 3 9】

請求項 1、2、4、11、18、25 または 32 のいずれか 1 項記載の二重特異的結合性タンパク質の有効量を投与することを含む、対象において癌を治療する方法。

【請求項 4 0】

癌が充実性腫瘍である、請求項 3 9 記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 4 1】

癌が前立腺癌である、請求項 3 9 記載の方法。

## 【請求項 4 2】

癌が肺癌、消化管癌、消化管間質腫瘍（G I S T）、胰臓腺癌、胰腺房細胞癌腫、小腸の癌、肝臓の癌、乳癌、子宮頸癌、卵巣癌、腎臓癌、皮膚癌、グリア芽腫および骨癌からなる群から選択される、請求項 3 9 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0 0 0 1】

脈管形成は、既存の血管からの新規な血管の形成である。それは、発達の間、必須の役割を果たす。成体において、脈管形成は、創傷治癒の間に起こって、損傷または傷害後の組織への血流を回復させる。脈管形成はまた、腫瘍形成、および関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、乾癬、糖尿病性網膜症および黄斑変性を包含する他の疾患においても重要な役割を果たす（例えば、Fanら、Trends Pharmacol. Sci. 16:57, 1995; Folkman, Nature Med. 1:27, 1995 参照）。

10

## 【0 0 0 2】

生理学的または病理学的状態下における新規な血管の成長は、脈管形成の活性化剤および阻害剤の共同作用を必要とする。脈管形成の活性化剤は、血管内皮成長因子 - A (V E G F - A)、線維芽細胞成長因子 (F G F)、胎盤成長因子 (P I G F)、および肝細胞成長因子 (H G F) およびいくつかのサイトカイン、例えば、インターロイキン - 8 (I L - 8) を包含する。脈管形成の内因性阻害剤は、トロンボスポンディン、エンドスタチン、アンジオスタチンおよびインターロイキン - 12 を包含する。脈管形成の活性化剤と阻害剤との間のバランスは、生理学的および病理学的脈管形成の間、活性化剤の方に傾く。

20

## 【0 0 0 3】

V E G F - A は、生理学的脈管形成および病理学的脈管形成の両方の治療の重要な調節剤である。それは、内皮細胞の増殖、移動および生存を調節することによって、血管の特化、形態形成、分化およびホメオスタシスにおいて必須の役割を果たす（例えば、Ferraraら、Nat Med 9:669, 2003 参照）。研究により、V E G F - A が種々のヒト腫瘍において高く発現されることが示された（例えば、EllisおよびHicklin, Nat. rev. Cancer 8:579, 2008 参照）。V E G F - A 発現は、低酸素症誘導因子 1 (H I F - 1) 転写因子によって調節される（例えば、WangおよびSemenza, J. Biol. Chem. 270:1230, 1995 参照）。腫瘍細胞の迅速な増殖および乏しい血流は、腫瘍において低酸素症伝導性環境を引き起こし、V E G F - A の迅速なアップレギュレーションを導いた（例えば、Brahimi-HornおよびPouyssegur, Bull. Cancer 93:E73, 2006 参照）。

30

## 【0 0 0 4】

別個のm R N A スプライス変種によってコードされる 1 2 1、1 4 5、1 6 5、1 8 9 または 2 0 6 アミノ酸長の 5 つのヒト V E G F - A イソ型 (V E G F - A <sub>1 2 1 - 2 0 6</sub>) が記載されており、その全てが内皮細胞における有糸分裂誘発を刺激することができる。これらのイソ型は、生物学的活性、受容体特異性、ならびに細胞表面および細胞外マトリックス会合性ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対するアフィニティーが相違し、V E G F - A に対する低いアフィニティー受容体として作用する。すなわち、V E G F - A <sub>1 2 1</sub> は、ヘパリンまたはヘパラン硫酸のいずれにも結合せず、V E G F - A <sub>1 4 5</sub> および V E G F - A <sub>1 6 5</sub> (GenBank Acc. No. M32977) はどちらも、ヘパリンに結合することができ、V E G F - A <sub>1 8 9</sub> および V E G F - A <sub>2 0 6</sub> は、ヘパリンおよびヘパラン硫酸に対して最強のアフィニティーを示す。V E G F - A <sub>1 2 1</sub>、V E G F - A <sub>1 4 5</sub>、および V E G F - A <sub>1 6 5</sub> は、可溶性形態で分泌するが、V E G F - A <sub>1 6 5</sub> のほとんどは、細胞表面および細胞外マトリックスプロテオグリカンに限られるが、V E G F - A <sub>1 8 9</sub> および V E G F - A <sub>2 0 6</sub> は、細胞外マトリックスと結合したままである。V E G F - A <sub>1 8 9</sub> および V E G F - A <sub>2 0 6</sub> のどちらも、ヘパリンまたはヘパリナ

40

50

ーゼでの処理によって遊離することができ、それにより、これらのイソ型がプロテオグリカンを介して細胞外マトリックスに結合していることが示される。細胞に結合したVEGF-A<sub>189</sub>は、プラスミンなどのプロテアーゼによって切断することもでき、その結果、活性な可溶性VEGF-A<sub>110</sub>の放出がもたらされる。ヒトVEGF-A<sub>165</sub>は、最も豊富かつ生物学的に活性な形態であり、Asn74でグリコシル化され、典型的には、23kDaサブユニットからなる46kDaホモダイマーとして発現する。

#### 【0005】

VEGF-Aと相互作用する4つの細胞表面受容体が同定された。これらは、VEGFR-1/Flt-1 (fins様チロシンキナーゼ-1; GenBank Acc. No. X51602; DeVriesら、Science 255:989-991, 1992)、VEGFR-2/KDR/Flk-1 (キナーゼインサートドメイン含有受容体/胎児肝臓キナーゼ-1; GenBank Acc. No. X59397 (Flk-1) およびL04947 (KDR); Termanら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 187: 1579-1586, 1992; Matthewsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9026-9030, 1991)、ニューロピリン-1 (GenBank Acc. No. NM003873)、およびニューロピリン-2 (GenBank Acc. No. NM003872)を包含する。VEGF<sub>121</sub>およびVEGF<sub>165</sub>はVEGFR-1を結合し、VEGF<sub>121</sub>およびVEGF<sub>145</sub>およびVEGF<sub>165</sub>はVEGFR-2を結合し、VEGF<sub>165</sub>およびVEGF<sub>145</sub>はニューロピリン-1を結合し、VEGF<sub>165</sub>およびVEGF<sub>145</sub>はニューロピリン-2を結合する(例えば、Neufeldら、FASEB J. 13: 9-22, 1999; StackerおよびAchen, Growth Factors 17:1-11, 1999; Ortegaら、Fron. Biosci. 4: 141-152, 1999; Zachary, Intl. J. Biochem. Cell Bio. 30: 1169-1174, 1998; Petrovaら、Exp. Cell Res. 253: 117-130, 1999参照)。

#### 【0006】

いくつかの重要なクラスの癌の発現についてVEGF-Aの重要性の認識の結果、近年、ついに、転移性結腸直腸癌、非小細胞肺癌および転移性乳癌の化学治療との組合せ治療のために、VEGF-Aに対するヒト化モノクローナル抗体AVASTINTM(商標)が承認された(例えば、Hervitzら、N. Engl. J. Med. 350: 2335-2342, 2004; Sandlerら、N. Engl. J. Med. 355: 2542-2550, 2006; Millerら、2008参照)。同様に、血管新生眼障害の病理におけるVEGF-Aの重要性は、血管新生(湿潤)加齢黄斑変性(AMD)の治療のために、ヒト化モノクローナル抗体フラグメントLUCENTIS<sup>TM</sup>の近年の承認に反映される。

#### 【0007】

線維芽細胞成長因子(FGF)は、哺乳動物における22個のファミリーメンバー(FGF1-14、16-23)を有するヘパリン結合性成長因子のファミリーである。FGFは、細胞増殖、分化、移動、脈管形成および腫瘍形成などの種々の生物学的機能において重要な役割を果たす。それらは、細胞表面FGF受容体を結合、二量体化および活性化することによって、その多面発現性生物学的作用を実行する(例えば、Eswarakumarら、Cytokine Growth Factor Rev. 16: 139-149, 2005参照)。哺乳動物において4つのFGF受容体遺伝子、fgfR1-fgfR4がある。FGFRの細胞外ドメインは、3つの免疫グロブリン様ドメインを含む。FgfR1-FgfR3の膜近接Igループでのオルタネイティブ・スプライシングは、付加的な変種を生じる。該ループは、N末端側の半分について、変異していないエクソン(IIa)によってコードされ、他の半分について、IIbまたはIIcと称するエクソンの選択によってコードされる。

#### 【0008】

FGFリガンドおよび受容体の過剰発現ならびにFGF受容体における変異体は、前立腺癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸直腸癌、膵臓癌、肝臓癌、肺癌、グリア芽腫癌、多発性骨芽腫および白血病を包含する多くの種類の癌に関連する(例えば、Groseら、Cytokine Growth Factor Rev. 16: 179-186, 2005参照)。FGF1、2、6、8b、9および17は、前立腺腫瘍組織において過剰発現し、FGF8bおよび17の発現レベルは、腫瘍病期、

10

20

30

40

50

等級および予後不良と相関する (Dorkinら、Oncogene 18: 2755-2761, 1999; Gnanapraga samら、Oncogene 21: 5069-5080, 2002; Heerら、J Pathol. 204: 578-586, 2004参照)。FGFR9は、前立腺癌に誘導された新規な骨形成に寄与し、骨におけるアンドロゲン受容体陰性前立腺癌の骨芽細胞発達に関与しうる (Liら、J Clin Invest. 118: 2697-2710, 2008)。FGFR1およびFGFR4は、前立腺腫瘍組織において過剰発現し、FGFR2<sub>I</sub>I<sub>I</sub>b～I<sub>I</sub>I<sub>c</sub>イソ型スイッチは、前立腺癌開始および進行を促進する (Giriら、Clin Cancer Res. 5: 1063-1071, 1999; Wangら、Clin. Cancer Res. 5: 1063-1071, 1999; Wangら、Clin Cancer Res. 10: 6169-6178, 2004; Kwabi-Addoら、Prostate 46: 163-172, 2001)。FGF1、2、8は、胸部腫瘍組織において過剰発現する。全乳癌の8.7%までがFGFR1遺伝子増幅を有し、該増幅は、生存全体の独立した予測因子である。FGFR4過剰発現は、再発性乳癌患者におけるタモキシフェン治療における失敗と相関する (例えば、Elsheikhら、Breast Cancer Res. 9, 2007; Meijerら、Endocrine-Related Cancer 15: 101-111, 2008参照)。FGF1、8、9、18およびFGFR1<sub>I</sub>I<sub>I</sub>c、FGFR2<sub>I</sub>I<sub>I</sub>c、FGFR4は、卵巣腫瘍組織において過剰発現する。FGFR3過剰発現および活性化変異は、膀胱癌の尿路上皮細胞癌腫において報告された。非侵襲性の低等級および病期膀胱腫瘍におけるFGFR3変異は、より高い再発率と有意に関連する (例えば、Knowles、World J. Urol. 25: 581-593, 2007参照)。FGF-2、FGFR1およびFGFR2は、しばしば、肺の扁平上皮細胞癌腫および腺癌において過剰発現する。FGF-2シグナリング経路活性化は、扁平上皮細胞癌腫の病因における初期の現象でありうる (Behrensら、Clin Cancer Res. 14: 6014-6022, 2008)。

#### 【0009】

FGF1、FGF2、FGF4およびFGF6を包含するFGFファミリーの多くのメンバーは、また、イン・ビトロおよびイン・ビボで強力なプロ脈管形成活性を有し、腫瘍脈管化を調節することによって、腫瘍進行を促進することができる (Prestaら、Cytokine Growth Factor Rev. 16: 159-178, 2005)。脈管形成の間、親密なクロストークがFGFファミリーおよびVEGFファミリーのメンバー間に存在する。自発性肺臓腫瘍を発現するRip1-Tag2トランスジェニックマウスにおいて、抗VEGFR2モノクローナル抗体でのVEGFの遮断は、低酸素症を促進し、腫瘍組織においてFGF1、FGF2およびFGF7の発現を誘導する (Casanovasら、Cancer Cell 8:299-309, 2005)。FGFのアップレギュレーションは、脈管形成の再誘導と一致し、VEGF遮断から逃れる。該モデルにおけるVEGFおよびFGFシグナリングの合わせた阻害は、さらなる腫瘍抑制をもたらし、その結果、FGFシグナリング経路のアップレギュレーションが少なくとも部分的に、VEGF標的化治療後の逃避メカニズムに寄与することを実証する。さらに、T3M4、PanC1およびQG56異種移植モデルを包含するいくつかのマウス腫瘍モデルにおけるVEGFおよびFGFシグナリングの遮断は、相加的または相乗的抗腫瘍効果を示した (Ogawaら、Cancer Gene Ther. 9: 633-640, 2002)。近年、pan-VEGFRチロシンキナーゼ阻害剤で治療したグリア芽腫患者の臨床試験は、FGF2の血清レベルが応答期の患者よりも再発患者において高いことを示し、それにより、FGF2のアップレギュレーションを含む類似の補償メカニズムを示す (Batchelorら、Cancer Cell 11: 83-95, 2007)。

#### 【0010】

まとめると、上記の前臨床および臨床データは、VEGFおよびFGFの両方のシグナリング経路を遮断する組合せ治療が多く充実性腫瘍において、VEGFの単独遮断の場合よりも良好な抗腫瘍効果を奏すことができたという概念を支持する。これらのデータは、腫瘍学における治療の経路を標的とするための強力な概念実証原理を提供する。また、これらの2つの経路を一緒に遮断すると、AMDを包含する他の脈管形成疾患において良好な効力が提供されうる。本発明は、これらの用途および本明細書中の教示から当業者に明らかな他の用途のための多特異的タンパク質を提供する。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

## 【0011】

本発明は、VEGF-AおよびFGFの両方の生物学的活性を減少させる抗体／可溶性受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異性結合性タンパク質を提供する。本発明によると、該二重特異的結合性タンパク質は、本明細書に記載のように、抗-VEGF-A抗体(VEGF-A抗体)部分のVEGF-A結合性領域およびFGF受容体のFGF結合部分を含む。本明細書に記載のFGF結合部分は、一般に、可溶性FGF受容体(FGFR)である。本発明は、ある特定の具体例において、該二重特異的結合性タンパク質の可溶性FGF受容体部が本明細書に記載のFGFR3またはFGFR2のFGF受容体部分を含むことを提供する。他の具体例において、Fcポリペプチドは、FGFRのC末端に融合される。ある特定の具体例において、FGF結合部分およびVEGF-A結合部分は、ペプチドまたはポリペプチドリンカー配列を用いて融合されたポリペプチドであり、これらの例において、該具体例をコードしているポリヌクレオチドは、単一の二重特異的結合性タンパク質として発現されることがある。

10

## 【0012】

本発明はまた、二重特異的結合性タンパク質のある特定の具体例が、本明細書に記載されるように、VEGF-A抗体部分を含むことを提供する。該VEGF-A抗体部分は、さらに、本明細書に記載のscFVポリペプチドまたはVLおよびVHポリペプチドから構成されることがある。

20

## 【0013】

ある特定の具体例において、FGF結合部分は、FGF受容体部分であり、FGFR3であることができ、特に、本明細書に記載されるように、FGFR3<sub>I I I c</sub>である。ある特定の具体例において、二重特異的抗体／可溶性受容体タンパク質は、配列番号44で示されるようなc870.1e6 scFV、配列番号46で示されるようなc1094.1scFV、配列番号52で示されるようなc870 scFV、および配列番号70で示されるようなc1039 scFVからなる群から選択されるVEGF-A抗体部分と組み合わせた、配列番号13で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(23-375)、配列番号2で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(23-375)(S249W)、配列番号19で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(143-375)、配列番号10で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(143-375)(S249W)、配列番号15で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(23-375)(P250R)、配列番号22で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(143-375)(P250R)からなる群から選択されるFGFR3であるFGF受容体部分を含む。他の具体例において、二重特異的抗体／可溶性受容体組合せは、配列番号13で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(23-375)、配列番号2で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(23-375)(S249W)、配列番号19で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(143-375)、配列番号10で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(143-375)(S249W)、配列番号15で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(23-375)(P250R)、配列番号22で示されるようなFGFR3<sub>I I I c</sub>(143-375)(P250R)からなる群から選択されるFGFR3であるFGF結合部分、および配列番号48で示されるようなc870 VLおよび配列番号50で示されるようなVH、配列番号54で示されるようなc1094 VLおよび配列番号56で示されるようなVH、および配列番号66で示されるような1039 VLおよび配列番号68で示されるようなVHからなる群から選択されるVEGF-A結合部分を含む。

30

40

## 【0014】

他の具体例において、本発明の二重特異的結合性タンパク質は、FGFR3(143-375)(S249W)Fc5 c1094.1 pZMP31(配列番号58)、FGFR3(23-375)(S249W)Fc5 c1094.1 pZMP31(配列番号60)、FGFR3(143-375)(S249W)Fc5 c870e6 pZMP31(配列番号62)、およびFGFR3(23-375)(S249W)Fc5 c870e6 pZMP31(配列番号64)からなる群から選択されるFGFR3部分お

50

および V E G F - A 抗体部分を具体化する。

【0015】

他の具体例において、 F G F 結合部分は、 F G F R 2 である。ある特定の具体例において、 F G F R 2 は、 F G F R 2<sub>I I I c</sub> を含む。ある特定の具体例において、二重特異的抗体 / 可溶性受容体組合せは、配列番号 24 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 22 - 377 ) 、配列番号 29 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 22 - 377 ) ( S 252 W ) 、配列番号 33 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 22 - 377 ) ( P 253 R ) 、配列番号 37 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 145 - 377 ) 、配列番号 40 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 145 - 377 ) ( S 252 W ) 、および配列番号 42 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 145 - 377 ) ( P 253 R ) からなる群から選択される F G F R 2 である F G F 結合部分、および配列番号 44 で示されるような c 870 . 1 e 6 s c F V 、配列番号 46 で示されるような c 1094 . 1 s c F V 、配列番号 52 で示されるような c 870 s c F V 、および配列番号 70 で示されるような c 1039 s c F V からなる群から選択される V E G F - A 結合部分を含む。他の具体例において、二重特異的抗体 / 可溶性受容体組合せは、配列番号 24 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 22 - 377 ) 、配列番号 29 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 22 - 377 ) ( S 252 W ) 、配列番号 33 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 22 - 377 ) ( P 253 R ) 、配列番号 37 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 145 - 377 ) 、配列番号 40 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 145 - 377 ) ( S 252 W ) 、および配列番号 42 で示されるような F G F R 2<sub>I I I c</sub> ( 145 - 377 ) ( P 253 R ) からなる群から選択される F G F R 2 である F G F 結合部分、および配列番号 48 で示されるような c 870 V L および配列番号 50 で示されるような V H 、配列番号 54 で示されるような c 1094 V L および配列番号 56 で示されるような V H 、および配列番号 66 で示されるような 1039 V L および配列番号 68 で示されるような V H からなる群から選択される V E G F - A 結合部分を含む。

【0016】

他の態様において、本発明は、本明細書に記載の二重特異的抗体 / 可溶性受容体結合性タンパク質を使用する方法を提供する。ある特定の具体例において、該二重特異的抗体 / 可溶性受容体結合性タンパク質は、前立腺癌、乳癌、肺臓癌、腎細胞癌腫 ( R C C ) 、結腸直腸癌、グリア芽腫、非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 、および消化管間質腫瘍 ( G I S T ) などの充実性腫瘍成長によって特徴付けられる癌を治療するために、対象に投与することができる。

【0017】

本発明のこれらおよび他の態様は、下記の本発明の詳細な説明および添付図面を参照して明らかになろう。

【0018】

定義

別記しないかぎり、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、記載の方法および組成物に関する分野における通常の技術者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、下記の用語および句は、別記しないかぎり、それらに与えられた意味を有する。

【0019】

「ポリペプチド」は、天然または合成のいずれであっても、ペプチド結合によって結合されたアミノ酸残基のポリマーである。約 10 アミノ酸残基よりも小さいポリペプチドは、通常、「ペプチド」と呼ばれる。

【0020】

「タンパク質」は、1 以上のポリペプチド鎖を含む巨大分子である。タンパク質は、また、非ペプチド成分、例えば、炭水化物基を含んでいてもよい。炭水化物および他の非ペプチドサブユニットは、タンパク質を生産する細胞によってタンパク質に付加されてもよく、細胞の種類によって変化するであろう。タンパク質は、本明細書において、そのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸骨格構造に関連して定義され、炭水化物基などの置換基は、一般に特定されていないが、存在していてもよい。

【0021】

「アミノ末端」および「カルボキシル末端」は、本明細書で使用される場合、ポリペプチド内の位置を示す。文脈が許す場合、これらの用語は、ポリペプチドの特定の配列または部分を参照して使用されて、近接な位置または相対的な位置を示す。例えば、ポリペプチド内の参照配列に対してカルボキシル末端に位置するある特定の配列は、該参照配列のカルボキシル末端に近接に位置するが、必ずしも、完全なポリペプチドのカルボキシル末端にあるわけではない。

【0022】

本明細書中で使用される場合、「核酸」または「核酸分子」は、ポリヌクレオチド、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって生じたフラグメント、およびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用、およびエクソヌクレアーゼ作用のいずれかによって生じたフラグメントをいう。核酸分子は、天然ヌクレオチド（例えば、DNAおよびRNA）、または天然ヌクレオチドのアナログ（例えば、天然ヌクレオチドの-エナンチオマー形態）、またはその組合せであるモノマーから構成されることができる。修飾されたヌクレオチドは、糖部分および/またはピリミジンまたはプリン塩基部分において変更を有することができる。糖修飾は、例えば、1以上のヒドロキシル基の、ハロゲン、アルキル基、アミン、およびジアゾ基での置換を含むし、または糖は、エーテルまたはエステルとして官能基化されることができる。さらに、糖部分全体は、アザ-糖類および炭素環糖類似体などの立体的および電子的に類似の構造で置き換えることができる。塩基部分の修飾の例は、アルキル化プリンおよびピリミジン、アシル化プリンまたはピリミジン、または他のよく知られた複素環置換基を含む。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはかかる結合の類似体によって連結することができる。ホスホジエステル結合の類似体は、ホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデートなどを含む。「核酸分子」なる語はまた、所謂「ペプチド核酸」を含むし、それは、ポリアミド骨格に結合した天然または修飾された核酸塩基を含む。核酸は、一本鎖または二本鎖のいずれかであることができる。

【0023】

本明細書中で使用される場合、「アンタゴニスト」なる語は、生物学的設定において別の化合物の活性を減少させる化合物を示す。かくして、VEGF-Aアンタゴニストは、VEGF-Aの生物学的活性を減少させる化合物であり、FGFRアンタゴニストは、FGFの生物学的活性を減少させる化合物である。VEGF-AおよびFGFの両方の活性は、複数の分子（リガンド、受容体、およびシグナル伝達物質）の相互作用に依存するので、アンタゴニストは、VEGF-AまたはFGFに直接作用することによって、または同族（cognate）生物学的経路における別の分子に作用することによって、活性を減少させることができる。例えば、FGFアンタゴニストは、例えば、その受容体に結合することによって、そのリガンドの1つに結合することによって、受容体二量体化に干渉することによって、または受容体リン酸化を干渉することによって、FGF活性を減少させることができる。アンタゴニストは、限定するものではないが、抗体、可溶性受容体、およびリガンドまたはその受容体に結合するか、または別の方法でリガンド-受容体相互作用および/または他の受容体機能を干渉する非タンパク質化合物を含む。

【0024】

「受容体」なる語は、生物活性分子（すなわち、リガンド）に結合し、細胞上のリガンドの影響を仲介する細胞結合タンパク質を示す。膜結合受容体は、細胞外リガンド結合性ドメインおよび典型的にシグナル変換に関与する細胞内エフェクタードメインを含む多ドメインまたは多ペプチド構造によって特徴付けられる。リガンドの受容体への結合は、エフェクタードメインと細胞中の他の分子との間の相互作用を引き起こす受容体におけるコ

10

20

30

40

50

ンホメーション変化をもたらす。該相互作用は、次いで、細胞の代謝における改変をもたらす。受容体 - リガンド相互作用に関連する代謝事象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、サイクリックAMP産生の増加、細胞性カルシウムの流動化、膜脂質の流動化、細胞接着、イノシトール脂質の加水分解およびリン脂質の加水分解を包含する。一般に、受容体は、膜結合性の可溶性または核単量体（例えば、甲状腺刺激ホルモン受容体、ベータ-アドレナリン受容体）または多量体（例えば、PDGF受容体、成長ホルモン受容体、IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリトロポイエチン受容体およびIL-6受容体）であることができる。

## 【0025】

「可溶性受容体」は、細胞膜に結合しない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、最も一般的には、膜貫通型および細胞質ドメインを欠くリガンド結合性受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、付加的なアミノ酸残基、例えば、ポリペプチドの精製を提供するか、またはポリペプチドの基質への接着のための部位を提供するアフィニティータグを含むことができる。多くの細胞表面受容体は、タンパク質分解によって産生されるか、またはオルタナティブスプライスmRNAから翻訳された天然の可溶性カウンターパートを有する。受容体ポリペプチドは、膜固定またはシグナル変換を提供するのに十分なセグメント部分を欠く場合、各々、実質的に膜貫通型および細胞内ポリペプチドセグメントを含有しないと言われる。

10

## 【0026】

本明細書中で使用される場合、「Fc - 融合タンパク質」なる語は、異種タンパク質の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能とを組み合わせる抗体様分子を示す。構造的に、Fc - 融合タンパク質は、抗体の抗原認識結合部位以外である（すなわち、「異種」である）所望の結合特異性を有するアミノ酸配列、および免疫グロブリン定常ドメイン配列の融合を含む。Fc - 融合タンパク質分子は、典型的に、少なくとも受容体またはリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列を包含する。Fc - 融合タンパク質中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、いずれかの免疫グロブリン、例えば、IgG-1、IgG-2、IgG-3、またはIgG-4サブタイプ、IgA（IgA-1およびIgA-2を包含する）、IgE、IgDまたはIgMから得ることができる。例えば、有用なFc - 融合タンパク質は、本発明によると、FGFR3受容体のFGF結合部分を含み、FGFR3受容体の膜貫通または細胞質配列を含まないポリペプチドである。一の具体例において、FGFR3の細胞外ドメインは、免疫グロブリン配列の定常ドメインに融合している。

20

30

## 【0027】

「抗体」なる語は、本明細書中で使用される場合、抗原の存在に応答して体によって生産される、抗原に結合するタンパク質、ならびにその抗原結合性フラグメントおよび操作した変種を示す。したがって、「抗体」なる語は、ポリクローナル抗体、アフィニティー精製ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および抗原結合性抗体フラグメント、例えば、F(ab')<sub>2</sub>およびFabフラグメントを包含する。遺伝子操作した無傷抗体およびフラグメント、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖Fvフラグメント、一本鎖抗体、ダイアボディ、ミニボディ、直鎖状抗体、多価または多特異的ハイブリッド抗体などを包含する。かくして、「抗体」なる語は、抗体の抗原結合部位を含み、その抗原に結合可能なあらゆるタンパク質を包含するよう幅広く使用される。

40

## 【0028】

「遺伝子操作した抗体」なる語は、アミノ酸配列が天然抗体の配列から変化した抗体を意味する。抗体産生における組み換えDNA技術の関連性のために、天然抗体に見出されるアミノ酸の配列に制限する必要はなく、抗体は、所望の特徴を得るために再設計することができる。可能なバリエーションは多く、たった1つのアミノ酸または2、3個のアミノ酸の変化から、例えば、可変または定常領域の完全な再設計までの範囲である。定常領域の変化は、一般に、補体結合、細胞および他のエフェクター機能との相互作用などの特徴を改善または改変するために行われるであろう。典型的には、可変領域の変化は、抗原

50

結合特徴を改善するために、可変領域安定性を改善するために、または免疫原性のリスクを減少するために行われるであろう。

【0029】

「抗体の抗原結合部位」は、その抗原に結合するのに十分な抗体の部分である。最小のかかる領域は、典型的に、可変ドメインまたは遺伝子操作されたその変種である。單一ドメイン結合部位は、ラクダ科の抗体 (Muyldermaans および Lauwereys, *J. Mol. Recog.* 12: 131-140, 1999; Nguyen ら、*EMBO J.* 19:921-930, 2000 参照) または單一ドメイン抗体を产生するための他の種の  $V_H$  ドメイン (「d A b s」; Ward ら、*Nature* 341:544-546, 1989; 米国特許第 6,248,516 号、Winter ら 参照) から作成することができる。ある特定のバリエーションにおいて、抗原結合部位は、天然または非天然 (例えば、変異誘発した) 重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメイン、またはその組合せのたった 2 個の相補性決定領域 (CDR) を有するポリペプチド領域である (例えば、Pessi ら、*Nature* 362:367-369, 1993; Qiu ら、*Nature Biotechnol.* 25:921-929, 2007 参照)。より一般的には、抗体の抗原結合部位は、共通のエピトープに結合する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの両方を含む。本発明では、「抗体の抗原結合部位を含む」分子は、さらに、抗体の 1 以上の第 2 の抗原結合部位 (同一または異なるエピトープあるいは同一または異なる抗原に結合しうる)、ペプチドリンカー、免疫グロブリン定常ドメイン、免疫グロブリンヒンジ、両親媒性ヘリックス (Pack および Pluckthun, *Biochem.* 31:1579-1584, 1992 参照)、非ペプチドリンカー、オリゴヌクレオチド (Chaudri ら、*FEBS Letters* 450:23-26, 1999 参照)などを含んでいてもよく、単量体または多量体タンパク質であってもよい。抗体の抗原結合部位を含む分子の例は、当該分野で既知であり、例えば、 $F_v$  フラグメント、一本鎖  $F_v$  フラグメント ( $s_c F_v$ )、 $F_a b$  フラグメント、ダイアボディ、ミニボディ、 $F_a b - s_c F_v$  融合、二重特異的 ( $s_c F_v$ )<sub>4</sub> - IgG、および二重特異的 ( $s_c F_v$ )<sub>2</sub> -  $F_a b$  を包含する (例えば、Hu ら、*Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996; Atwell ら、*Molecular Immunology* 33:1301-1312, 1996; Carter および Merchant, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:449-454, 1997; Zuo et al., *Protein Engineering* 13:361-367, 2000; and Lu et al., *J. Immunol. Methods* 267:213-226, 2002 参照)。

【0030】

本明細書中で使用される場合、「免疫グロブリン」なる語は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコード化される 1 以上のポリペプチドから成るタンパク質をいう。免疫グロブリンの 1 の形態は、抗体の基本構造単位を構成する。該形態は、四量体であり、免疫グロブリン鎖の 2 つの同一のペアからなり、各ペアは、1 つの軽鎖および 1 つの重鎖を有する。各ペアにおいて、軽鎖および重鎖可変領域は一緒に、抗原に対する結合に関与し、定常領域は、抗体エフェクター機能に関与する。免疫グロブリンは、典型的に、脊椎生物において抗体として機能する。免疫グロブリンタンパク質の 5 つのクラス (IgG、IgA、IgM、IgD および IgE) は、高等脊椎動物において同定されている。IgG が主要なクラスを構成し、通常、血漿中に見出される二番目に豊富なタンパク質として存在する。ヒトにおいて、IgG は、IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 と呼ばれる 4 つのサブクラスからなる。IgG クラスの重鎖定常領域は、ギリシャ文字で特定される。例えば、IgG1 サブクラスの免疫グロブリンは、1 重鎖定常領域を含有する。各免疫グロブリン重鎖は、種における所定のサブクラスに対して本質的に不变性である定常領域タンパク質ドメイン ( $C_H$ 1、ヒンジ、 $C_H$ 2、および  $C_H$ 3; IgG3 はまた、 $C_H$ 4 ドメインも含有する) からなる定常領域を有する。ヒトおよび非ヒト免疫グロブリン鎖をコードしている DNA 配列は、当該分野で既知である (例えば、Ellison ら、*DNA* 1:11-18, 1981; Ellison ら、*Nucleic Acids Res.* 10:4071-4079, 1982; Kenten ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6661-6665, 1982; Seno ら、*Nuc. Acids Res.* 11:719-726, 1983; Riechmann ら、*Nature* 332:323-327, 1988; Amster ら、*Nuc. Acids Res.* 8:2055-2065, 1980; Rusconi および Kohler, *Nature* 314:330-334, 1985; Boss ら、*Nuc. Acids Res.* 12:3791-3806, 1984; Bothwell ら、*Nature* 298:380-382, 1982; van der Loo ら、*Immunogenetics* 42:333-341, 1995; Karlin ら、*J. Mol. Evol.* 22:195-208, 1985; Kindsvogel ら、

10

20

30

40

50

DNA 1:335-343, 1982; Breinerら、Gene 18:165-174, 1982; Kondoら、Eur. J. Immunol. 23:245-249, 1993; およびGenBankアクセションNo. J00228参照)。免疫グロブリン構造および機能の概説については、Putnam, The Plasma Proteins, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; およびPadlan, Mol. Immunol. 31:169-217, 1994を参照のこと。「免疫グロブリン」なる語は、本明細書中において一般的な意味で使用され、文脈にもよるが、無傷抗体、その成分鎖、または鎖のフラグメントを示す。

#### 【0031】

全長免疫グロブリン「軽鎖」(約25Kdまたは214アミノ酸)は、NH<sub>2</sub>-末端にて可変領域遺伝子(約110アミノ酸をコードしている)によってコードされ、COOH-末端にてカッパまたはラムダ定常領域遺伝子によってコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」(約50Kdまたは446アミノ酸)は、可変領域遺伝子(約116アミノ酸をコードしている)およびガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン定常領域遺伝子(約330アミノ酸をコードしている)によってコードされ、後者は、各々、抗体のイソ型 IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEとして定義される。軽鎖および重鎖内では、可変および定常領域が約12個以上のアミノ酸の「J」領域によって結合されており、重鎖はまた、約10個以上のアミノ酸の「D」領域を包含する(generally Fundamental Immunology (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7参照)。

#### 【0032】

免疫グロブリン「Fv」フラグメントは、非共有相互作用によって結びついた重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)および軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)を含有する。免疫グロブリンFvフラグメントは、かくして、单一抗原結合部位を含有する。Fvフラグメントの二量体構造は、さらに、変異誘発を介するジスルフィド結合の導入によって安定化することができる(Almogら、Proteins 31:128-138, 1998参照)。

#### 【0033】

本明細書中で使用される場合、「一本鎖Fv」および「一本鎖抗体」なる語は、単一ポリペプチド鎖内に、重鎖および軽鎖の両方から由来する可変領域を含むが、定常領域を欠く抗体フラグメントをいう。一般に、一本鎖抗体は、さらに、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン間のポリペプチドリンカーを含み、それにより、抗原結合を可能にする所望の構造を形成させる。一本鎖抗体は、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113 (RosenburgおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315によって詳細に議論されている。(また、WIPO公開WO 88/01649; 米国特許第4,946,778号および第5,260,203号; Birdら、Science 242:423-426, 1988を参照のこと)。一本鎖抗体は、また、二重特異的および/またはヒト化されることができる。

#### 【0034】

「Fab'フラグメント」は、1つの軽鎖ならびに1つの重鎖のC<sub>H</sub>1および可変領域を含有する。Fab'フラグメントの重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

#### 【0035】

「Fab'フラグメント」は、1つの軽鎖、およびC<sub>H</sub>1およびC<sub>H</sub>2ドメイン間に、いっそう多くの定常領域を含有する1つの重鎖を含有し、その結果、鎖内ジスルフィド結合が2つの重鎖間に形成されて、F(ab')<sub>2</sub>分子を形成する。

#### 【0036】

「F(ab')<sub>2</sub>フラグメント」は、2つの軽鎖、およびC<sub>H</sub>1およびC<sub>H</sub>2ドメイン間の定常領域の部分を含有する2つの重鎖を含有し、2つの重鎖の間に鎖内ジスルフィド結合が形成される。

#### 【0037】

「Fc'フラグメント」(またはFc'ドメイン)は、細胞上の抗体受容体および補体のC1q成分への結合に関与する抗体の部分である。Fc'は、「フラグメント結晶」を表し、タンパク質結晶を容易に形成する抗体のフラグメントである。別個のタンパク質フラグメント(当初、タンパク質分解性消化によって記述された)は、免疫グロブリンタンパク質

10

20

30

40

50

の全体的な一般構造を定義することができる。文献において当初定義されたように、Fcフラグメントは、ジスルフィド結合された重鎖ヒンジ領域、C<sub>H</sub>2、およびC<sub>H</sub>3ドメインからなる。しかしながら、より近年には、該用語は、C<sub>H</sub>3、C<sub>H</sub>2、および第2の鎖と共にジスルフィド結合二量体を形成するのに十分なヒンジの少なくとも一部からなる一本鎖にも使用されている。免疫グロブリン構造および機能の概説については、Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; およびPadlan, Mol. Immunol. 31:169-217, 1994を参照のこと。本明細書中で使用される場合、Fcなる語は、天然配列の変種を包含する。

#### 【0038】

免疫グロブリン軽鎖または重鎖可変領域は、3つの超可変領域によって中断された「フレームワーク」領域からなる。かくして、「超可変領域」なる語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基（例えば、ヒトにおいて、軽鎖可変ドメイン中、残基24-34（L1）、50-56（L2）、および89-97（L3）、および重鎖可変ドメイン中、残基31-35（H1）、50-65（H2）および95-102（H3）（EUインデックスに基づくアミノ酸配列番号；Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)参照）および/または「超可変ループ」由来のアミノ酸残基（ヒトにおいて、軽鎖可変ドメイン中、残基26-32（L1）、50-52（L2）および91-96（L3）および重鎖可変ドメイン中、26-32（H1）、53-55（H2）および96-101（H3）；ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987）（どちらも、出典明示より、本明細書の一部とする）を含む。「フレームワーク領域」または「FR」は、本明細書中で定義されるように、超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。かくして、「ヒトフレームワーク領域」は、天然ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域と実質的に同一（約85%以上、通常90-95%以上）のフレームワーク領域である。抗体のフレームワーク領域、すなわち、構成的軽鎖および重鎖を合わせたフレームワーク領域は、CDRを配置し、並べるように働く。CDRは、主として、抗原のエピトープへの結合に関与する。V<sub>L</sub>ドメインのCDRs L1、L2、およびL3は、また、各々、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3とも呼ばれ、V<sub>H</sub>ドメインのCDR H1、H2、およびH3は、また、各々、本明細書中において、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3とも呼ばれる。

#### 【0039】

「キメラ抗体」は、その軽鎖および重鎖遺伝子が典型的に遺伝子操作によって、異なる種に属する免疫グロブリン可変および定常領域遺伝子から構築されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変セグメントをヒト定常領域コードセグメント（例えば、ヒトガンマ1またはガンマ3重鎖遺伝子、およびヒトカッパ軽鎖遺伝子）に結合させてもよい。治療的キメラ抗体は、かくして、典型的に、マウス抗体由来の可変または抗原結合ドメインおよびヒト抗体由来の定常ドメインからなるハイブリッドタンパク質であるが、他の種を用いてもよい。特に、キメラ抗体は、免疫グロブリン軽鎖、重鎖、または両方のヒンジおよび定常領域の全てまたは一部が、別の動物の免疫グロブリン軽鎖または重鎖由来の対応する領域に置換される組み換えDNA技術によって製造される。このようにして、親モノクローナル抗体の抗原結合部分を別の種の抗体の骨格上に移植する。キメラ抗体は、所望により、露出した残基の置換によって、ヒト様表面で「覆われて（cloaked）」いてもよく、その結果、「ベニヤ（veneered）抗体」が形成される。

#### 【0040】

本明細書中で使用される場合、「ヒト抗体」なる語は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を包含し、例えば、Kucherlapatiらの米国特許第5,939,598号に記載されるような、ヒト免疫グロブリンライブリーカー、または1以上のヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックな動物であって、内在性免疫グロブリンを発

10

20

30

40

50

現しない動物から単離された抗体を包含する。

【0041】

「ヒト化免疫グロブリン」なる語は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウスまたはラット）免疫グロブリン由来の1以上のCDRを含む免疫グロブリンをいう。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。定常領域は存在する必要はないが、もし存在するなら、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85-90%、好ましくは約95%以上同一でなければならない。したがって、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、おそらくCDRを除き、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。いくつかの例において、ヒト化抗体は、ヒト可変領域フレームワークドメイン内に非ヒト残基を保持して、適当な結合特性を増加させうる（例えば、抗体がヒト化された場合、結合アフィニティーを保存するために、フレームワーク中の変異が必要とされうる）。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。例えば、ヒト化抗体は、例えば、キメラ抗体の全可変領域は非ヒトなので、上記で定義したような典型的なキメラ抗体を包含しないであろう。

10

【0042】

「二重特異的抗体」または「二機能性抗体」は、2つの異なる重鎖／軽鎖ペアおよび2つの異なる結合部位を有するハイブリッド抗体である。二重特異的抗体は、限定するものではないが、ハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結を包含する種々の方法によって生産されうる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321, 1990; Kostelnýら、J. Immunol. 148:1547-1553, 1992を参照のこと。

20

【0043】

「多特異的」または「多機能性」抗体以外の「二価抗体」は、ある特定の具体例において、同一の抗原特異性を有する2つの結合部位を含む抗体である。

【0044】

「ダイアボディ」なる語は、2つの抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントをいい、該フラグメントは、同じポリペプチド鎖( $V_H - V_L$ )において軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に連結された重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を含む。同じ鎖において2つのドメイン間を対合できないほど短いリンカーを用いることによって、該ドメインを別の鎖の相補性ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作出させる。ダイアボディは、例えば、EP 4 04,097、WO 93/11161、およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993に十分に記載されている。

30

【0045】

「ミニボディ」なる語は、本明細書中、天然または非天然（例えば、変異させた）重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインまたはその組合せのたった2つの相補性決定領域(CDR)をコードするポリペプチドをいう。ミニボディの例は、例えば、Pessiら、Nature 362:367-369, 1993、およびQiuら、Nature Biotechnol. 25:921-929, 2007によって記載されている。

40

【0046】

「直鎖状抗体」なる語は、Zapataら、Protein Eng. 8:1057-1062, 1995において記載される抗体をいう。簡単に言えば、これらの抗体は、抗原結合領域のペアを形成するタンデムFdセグメント( $V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}$ )のペアを含む。直鎖状抗体は、二重特異的または単一特異的であることができる。

【0047】

「モノクローナル抗体」なる語は、本明細書中で使用される場合、ハイブリドーマ技術によって産生された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」なる語は、單一クローン由来の抗体をいい、いずれかの真核生物、原核生物、またはファージクローンを包含し、その産生方法に言及しない。

【0048】

50

「親抗体」なる語は、本明細書中で使用される場合、変種の調製のために使用されたアミノ酸配列によってコードされる抗体をいう。好ましくは、親抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、存在するならば、ヒト抗体定常領域を有する。例えば、親抗体は、ヒト化またはヒト抗体であってもよい。

【0049】

「変種」抗 - VEGF - A 抗体は、親抗体配列における 1 以上のアミノ酸残基の付加、欠失および / または置換によって、「親」抗 - VEGF - A 抗体アミノ酸配列とアミノ酸配列が異なる分子をいう。好ましい具体例において、変種は、親抗体の 1 以上の超可変領域における 1 以上のアミノ酸置換を含む。例えば、変種は、親抗体の 1 以上の超可変領域において、少なくとも 1 つ、例えば約 1 個 ~ 約 10 個、好ましくは約 2 個 ~ 約 5 個の置換を含んでいてもよい。通常、変種は、親抗体重鎖または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも 75 %、より好ましくは少なくとも 80 %、より好ましくは少なくとも 85 %、より好ましくは少なくとも 90 %、最も好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するであろう。該配列に関する同一性または相同性は、本明細書中において、最大パーセント配列同一性を達成するように配列を整列し、ギャップ（必要な場合）を導入した後、親抗体残基と同一の候補配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義付けられる。抗体配列中への N - 末端、C - 末端、または内部伸長、欠失、または挿入のいずれも、配列同一性または相同性に影響を及ぼすものとして解釈されない。変種は、ヒト VEGF - A に対する結合能を保持し、好ましくは、親受容体または抗体の特性よりも優秀な特性を有する。例えば、変種は、より強力な結合アフィニティー、増加した VEGF - A - 誘導性生物学的活性（例えば、脈管形成または増殖）阻害能を有する。例えば、抗 - VEGF - A 抗体のフォーマットは本明細書中に開示される生物学的活性アッセイにおいてその活性に影響を与えることが見出されたので、かかる特性を分析するために、変種の Fab 形態を親抗体の Fab 形態と比較し、または変種の全長形態を親抗体の全長形態と比較すべきである。本明細書中で特に目的とされる変種抗体は、親抗体と比べて、生物学的活性において少なくとも約 3 倍、5 倍、10 倍、20 倍、または 50 倍増加を示すものである。

10

20

30

30

40

【0050】

「エピトープ」なる語は、免疫グロブリンまたは T 細胞受容体に対する特異的結合が可能ないずれかのタンパク質決定基を包含する。エピトープ決定基は、通常、分子の化学的に活性な表面群、例えば、アミノ酸または糖側鎖からなり、通常、特異的な三次元構造特徴、ならびに特異的な電荷特徴を有する。より詳細には、「VEGF - A エピトープ」なる語は、本明細書中で使用される場合、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはマウスまたはヒトにおいて、抗原性または免疫原性活性を有する VEGF - A ポリペプチドの部分をいう。免疫原性活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を顕現させる VEGF - A ポリペプチドの部分である。抗原性活性を有するエピトープは、当該分野で周知のいずれかの方法によって、例えば、イムノアッセイによって決定される場合、抗体が免疫特異的に結合する VEGF - A ポリペプチドの部分である。抗原性エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。

【0051】

「ベクター」は、宿主細胞における自己複製能を有する核酸分子、例えば、プラスミド、コスミド、またはバクテリオファージである。クローニングベクターは、典型的に、ベクターの必須な生物学的機能を喪失することなく、決定可能な様式で核酸分子の挿入を可能にする 1 つまたは少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位、ならびにクローニングベクターで形質転換した細胞の同定および選択において使用するのに適当なマーカー遺伝子をコードしているヌクレオチド配列を含有する。マーカー遺伝子は、典型的に、テトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性を提供する遺伝子を包含する。

【0052】

「発現ベクター」は、宿主細胞中で発現される遺伝子をコードしている核酸分子である。典型的には、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子、および転写ターミネーター

50

を含む。遺伝子発現は、通常、プロモーターの制御下に置かれており、かかる遺伝子は、該プロモーターに「作動可能に連結される」と言われる。同様に、調節エレメントおよびコアプロモーターは、調節エレメントがコアプロモーターの活性を変調する場合、作動可能に連結されている。

【0053】

「発現」なる語は、遺伝子産物の生合成をいう。例えば、構造遺伝子の場合、発現は、構造遺伝子のmRNAへの転写およびmRNAの1以上のポリペプチドへの翻訳を含む。

【0054】

本明細書中に記載されるようなタンパク質に関し、配列番号によって特定されるアミノ酸に対応するアミノ酸残基への言及は、かかる残基の翻訳後修飾を包含する。

10

【0055】

「新血管形成」および「脈管形成」なる語は、本明細書中で交換可能に使用される。新血管形成および脈管形成は、細胞、組織、または生物中への新規な血管の生成をいう。脈管形成の調節は、典型的に、ある特定の病態において改変され、多くの場合、該疾患に関連する生理学的損傷が、改変された脈管形成または規制されない脈管形成に関連する。持続性の規制されない脈管形成は、内皮細胞による異常な成長によって特徴付けられる病態を包含する種々の病態において起こり、血管の漏れおよび透過性を包含するこれらの病態においてみられる生理学的損傷を支持する。

【0056】

「血管新生障害」なる語は、本明細書中で使用される場合、増加した脈管形成活性、または規制されない脈管形成活性によって、少なくとも部分的に媒介される病理を有するいざれかの疾患または障害をいう。かかる疾患または障害の例は、充実性腫瘍を包含する種々の癌（例えば、肺腺癌、腎細胞癌腫（RCC）、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、および消化管間質腫瘍（GIST））ならびに新血管形成を含むある特定の眼疾患（「血管新生眼疾患」）を包含する。かかる疾患または障害は、本明細書中にさらに記載されるように、特に、脈管形成を阻害する特定の治療法に応じやすい。

20

【0057】

「有効量」なる語は、本明細書中に記載されるように、FGFRおよび/またはVEGF-Aアンタゴニストの対象への投与による血管新生障害の治療との関連において、血管新生障害の発症を阻害するように、または血管新生障害の1以上の症状を改善するように、対象において脈管形成を阻害するのに十分な薬剤の量をいう。薬剤の有効量は、「有効レジメ（regime）」における本発明の方法にしたがって投与される。「有効量」なる語は、疾患または障害の治療または予防を達成するのに十分な投与薬剤量および投与頻度の組合せをいう。

30

【0058】

「患者」または「対象」なる語は、本明細書中で記載されるような疾患または障害を治療することとの関連において、哺乳動物、例えば、ヒトおよび他の靈長類を包含する。該用語は、また、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、イヌ、およびネコなどの飼い慣らした動物を包含する。

30

【0059】

2つのアミノ酸配列は、最大に一致するように整列させた場合に2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が同じならば、「100%アミノ酸配列同一性」を有する。同様に、2つのヌクレオチド配列は、最大に一致するように整列させた場合に2つのヌクレオチド配列のヌクレオチド残基が同じならば、「100%ヌクレオチド配列同一性」を有する。配列比較は、DNASTAR (Madison, Wisconsin) によって製造されるLASERGENEバイオインフォマティックコンピューティングスイートに包含されるような標準的なソフトウェアプログラムを用いて実施することができる。最適なアラインメントを決定することによって2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者によく知られている。（例えば、PeruskiおよびPeruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wuら（編）、

40

50

"Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in *Methods in Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (編), *Guide to Human Genome Computing* (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998) 参照のこと。) 2つのスクレオチドまたはアミノ酸配列は、該2つの配列が互いに少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%配列同一性を有する場合、「実質的に類似の配列同一性」または「実質的な配列同一性」を有するとみなされる。

【0060】

パーセント配列同一性は、常法によって決定される。例えば、Altschulら、*Bull. Math. Bio.* 48:603, 1986、およびHenikoffおよびHenikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1992を参照のこと。例えば、2つのアミノ酸配列は、ギャップオープニングペナルティ10、ギャップエクステンションペナルティ1、および表1（アミノ酸は、標準的な一文字コードによって示される）に示されるような、HenikoffおよびHenikoff（上掲）の「BLOSUM62」スコアリングマトリックスを用いて、アライメントスコアを最適化するように整列させることができる。次いで、パーセント同一性は、  
( [完全な一致の総数] / [より長い配列の長さ + 2つの配列を整列させるために、より長い配列中に導入されたギャップの数] ) (100)  
として計算される。

【0061】

【表1】

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	9																
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4											
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	-2	-1	5								
F	-2	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0								
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4					
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	-4	-3	-2	11				
Y	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	7			
V	0	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4	

【0062】

当業者は、2つのアミノ酸配列を整列させるために利用可能な多くの確立されたアルゴリズムが存在することを認める。PearsonおよびLipmanの「FASTA」類似性検索アルゴリズムは、本明細書中に開示されるアミノ酸配列および第2のアミノ酸配列によって共有される同一性のレベルを調べるための適当なタンパク質アラインメント方法である。FASTAアルゴリズムは、PearsonおよびLipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444, 1988およびPearson, Meth. Enzymol. 183:63, 1990によって記載されている。簡単に言うと、FASTAは、まず、クエリー配列（例えば、配列番号2の残基25-266）および同一性の最大密度（k t u p変数が1の場合）または同一性のペア（k t u p = 2の場合）のいずれかを有する試験配列によって共有される領域を同定することによって、保存的アミノ酸置換、挿入または欠失を考慮することなく、配列類似性を特徴付ける。次いで、同一性の最大密度を有する10個の領域を、アミノ酸置換マトリックスを用いて全てのペアになったアミノ酸の類似性を比較することによって再スコア化し、最大スコアに寄

与する残基だけを含むように該領域の末端を「そろえる(trimmed)」。「カットオフ(cutoff)」値(配列の長さおよびk<sub>tup</sub>値に基づく所定の式によって計算された)よりも大きいスコアを有するいくつかの領域が存在する場合、そろえた最初の領域を調べて、ギャップを用いておよそのアラインメントを形成するように該領域を連結できるか否かを決定する。最終的に、アミノ酸挿入および欠失を可能にするNeedleman-Wunsc<sup>10</sup>h-Sellersアルゴリズム(NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:444, 1970; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787, 1974)の修飾を用いて、2つのアミノ酸配列の最大スコア領域を整列させる。FASTA分析の説明的パラメーターは、k<sub>tup</sub>=1、ギャップオーブニングペナルティ=10、ギャップエクステンションペナルティ=1、および置換マトリックス=BLOSUM62である。これらのパラメーターは、PEARSON, METH. ENZYML. 183:63, 1990のAppendix 2に説明されるように、スコアリングマトリックスファイル(「SMATRIX」)を修飾することによって、FASTAプログラム中に導入することができる。

## 【0063】

FASTAは、また、上記のような比率を用いて、核酸分子の配列同一性を決定するために使用することができる。ヌクレオチド配列比較の場合、k<sub>tup</sub>値は、上記のような他のパラメーターセットと共に、1~6、好ましくは3~6、最も好ましくは3の範囲であることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0064】

【図1】図1A-1Cは、ある特定の免疫グロブリンFcポリペプチドのアミノ酸配列を示す。アミノ酸配列数は、EUインデックス(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, Bethesda, 1991)に基づく。示された配列は、野生型ヒト配列(「wt」；配列番号75)、およびFc-488(配列番号76)、Fc4(配列番号77)、Fc5(配列番号74)、Fc6(配列番号78)およびFc7(配列番号79)と称する5つの変種配列を包含する。軽鎖定常領域(LC)および重鎖定常領域(HC)に対するジスルフィド結合に通常、関与するCys残基を示す。「.」は、その位置にて、野生型に対する同一性を示す。\*\*は、終止コドンを示し、C-末端Lys残基は、Fc6から除去されている。ヒンジ、C<sub>H</sub>2、およびC<sub>H</sub>3ドメインの境界が示される。

## 【0065】

【図2】図2は、2つの異なる標的(本明細書中において、VEGF-AおよびFGFRのリガンド結合ドメインという)に対する特異性を有する四価の二重特異的抗体/可溶性受容体組合せを示す。

## 【0066】

【図3】図3は、骨芽細胞のFGF-9-刺激性増殖の種々の阻害を示すFGFR-Fc(R&D Systems)を示す。

## 【0067】

【図4】図4Aは、FGFR-Fc構築物(ZymoGenetics)によるFGF-9-刺激性増殖の阻害を示す。全長FGFR3-Fc野生型および変異構築物(ZymoGenetics)は、類似のIC50を有し、図4Bは、末端切断型FGFR3-Fc変異構築物(ZymoGenetics)は、類似のIC50を有する。

## 【0068】

【図5】図5Aは、FGFR-Fc(R&D Systems)によるFGF-8bの直接的結合を示し、図5Bは、FGFR-Fc構築物(ZymoGenetics)によるFGF-8bの直接的結合を示す。

## 【0069】

【図6】図6Aは、FGFR-Fc(R&D Systems)によるFGF-17の直接的結合を示し、図6Bは、FGFR2-Fc構築物(ZymoGenetics)によるFGF-17の直接的結合を示す。

10

20

30

40

50

## 【0070】

【図7】図7は、FGFR3-Fc構築物(ZymoGenetics)によるFGF-17の直接的結合を示す。

## 【0071】

【図8】図8Aは、FGFR-FcがCaki-1細胞の増殖を阻害することを示し、図8Bは、FGFR-FcがDU145細胞の増殖を阻害することを示す。

## 【0072】

【図9】図9は、FGF受容体ファミリーの第2および第3Ig-様ドメインを示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0073】

10

発明の記載

## I. 概観

本発明は、多特異的結合性タンパク質、特に二重特異的結合性タンパク質である新規なタンパク質を提供することによって、癌、特に充実性腫瘍を治療するためのより多くの治療薬を提供することに対する、当該分野における要望に向けられている。該タンパク質は、抗体部分に融合した可溶性受容体部分を含む。本明細書中で使用される場合、「二重特異的結合性タンパク質」なる語は、異なる結合特異性を有する少なくとも2つの結合部分を介して、少なくとも2つの異なる標的分子に特異的に結合することができるタンパク質をいう。該結合部分は、例えば、タンパク質(例えば、抗体または可溶性受容体)または小型分子であってもよい。二重特異的結合性タンパク質の結合部分は、物理的に連結されてもよい。本発明は、本明細書中に記載されるように、可溶性受容体部分および抗体部分を含む二重特異的結合性タンパク質を提供する。

20

## 【0074】

本発明において、本明細書中に記載されるように、可溶性受容体部分は、可溶性FGF受容体またはその部分を含み、抗体部分は、VEGF-A抗体またはその部分を含む。ある特定の具体例において、二重特異的結合性タンパク質の2以上の異なる部分は、リンカーを介して連結して多量体(例えば、二量体)を形成する。例えば、少なくとも2つのポリペプチド部分(例えば、可溶性FGF受容体およびVEGF-A抗体)の融合物を含む二重特異的結合性タンパク質の場合、ペプチドリンカー配列を用いて、例えば、該ポリペプチド成分を、各ポリペプチドが確実にその二次および三次構造に折りたたまれるのに十分な間隔をあけて分離させてもよい。

30

## 【0075】

ある特定の具体例において、本発明の二重特異的結合性タンパク質は、FGFおよびVEGF-Aの両方の生物学的活性を減少させる。特に、本発明は、VEGF-A受容体およびFGF受容体を介するシグナリングを減少させるVEGF-AおよびFGFアンタゴニスト、特に、FGF可溶性受容体と組み合わせた中和性抗-VEGF-A抗体を提供する。かかるアンタゴニストを用いるVEGF-Aおよび/またはFGFによる脈管形成シグナルの減少は、少なくとも部分的に新血管形成によって特徴付けられる病理を有する種々の障害の治療に有用である。例えば、腫瘍中および腫瘍周辺のVEGF-Aおよび/またはFGFによる脈管形成シグナルの阻害は、腫瘍の血管形成、成長および転移する能力を減少させる。

40

## 【0076】

FGF受容体の活性化は、ホスホリパーゼC、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ、マイトジエン活性化タンパク質キナーゼおよびシグナル伝達および転写活性化因子(STAT)経路を包含する複数のシグナル変換経路(その全てが前立腺癌進行において役割を果たす)を活性化することができる。増加したFGFシグナリングの正味の結果は、増加した増殖、細胞死に対する耐性、増加した運動性および侵襲性、増加した脈管形成、強化した転移、化学治療および放射能照射に対する耐性およびアンドロゲン独立性を包含し、その全てが腫瘍進行および臨床的攻撃性を増加することができる。FGF受容体および/またはFGFシグナリングは、腫瘍細胞に直接的に影響を及ぼすことができ、また、

50

腫瘍脈管形成に影響を及ぼすことができる (Kwabi-Addoら、Endocrine-Related Cancer 11 (4) 709 -724, 2004)。

【0077】

本発明は、VEGF-A および FGF の両方の生物学的活性を減少させる VEGF-A および FGF アンタゴニストを提供する。FGF-結合性部分は、可溶性 FGF 受容体 (FGFR) であり、該 VEGF-A-結合性部分は、VEGF-A 抗体である。本発明によると、VEGF-A および FGF アンタゴニストは、VEGF-A および FGF に特異的に結合し、その活性を減少させる二重特異的抗体 / 可溶性受容体結合性タンパク質である。本発明の二重特異的結合性タンパク質は、本明細書中に詳細に記載される。

10

【0078】  
I I . FGF 受容体、抗 - VEGF-A 抗体、および関連する二重特異的結合性組成物  
A . FGF 受容体

該分子の FGFR 部分は、可溶性受容体である。FGFR は、D1、D2 および D3 と呼ばれる 3 つの Ig - 様ドメインを含む。該受容体は、D1、D2、D3 を含むことができるか、または FGF 受容体の D1 伴わずに、D2、D3 を含むことができる。さらに、該受容体は、天然受容体であってもよく、または D2 - D3 領域中に変異を有していてもよい。FGFR ファミリーおよびドメイン D2 および D3 は、図 1 に示される。

20

【0079】

D1 の切断型 (truncation) は、受容体のアフィニティーを増加させ、受容体 / リガンド相互作用を増強させることができることが実証された (Olsenら、PNAS 101:935-940, 2004)。FGFR 1 - 3 は、D3 のカルボキシ末端でのオルタネイティブ・スプライシングの結果として、イソ形態を有することが知られている。該知見から始めて、本発明者は、3 または 2 つの Ig - 様ドメインを有する複数の変種の可溶性 FGF 受容体を作成し、FGF リガンドに対する結合アフィニティーを特徴付けた。FGFR 3 および FGFR 2 イソ形態 I I I c は、対応する I I b イソ形態よりも、FGF 2、6、8 b、9 および 17 に対して比較的高いアフィニティーを有するので、特に興味深いことが実証される。

20

【0080】

FGF 受容体は、FGF リガンドに対する結合アフィニティーによって特徴付けることができる。会合速度定数 ( $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )) および解離速度定数 ( $k_d$  ( $s^{-1}$ )) は、所定の相互作用について測定される。会合速度定数は、リガンド - 受容体複合体形成の速度を反映する値である。解離速度定数は、該複合体の安定性を反映する値である。平衡結合アフィニティーは、典型的に、平衡解離定数 ( $K_d$  ( $M$ )) または平衡会合定数 ( $K_a$  ( $M^{-1}$ )) のいずれかとして表現される。 $K_d$  は、解離速度定数を会合速度定数で割ることによって得られ ( $k_d / k_a$ )、一方、 $K_a$  は、会合速度定数を解離速度定数で割ることによって得られる ( $k_a / k_d$ )。類似  $K_d$  (または類似  $K_a$ ) を有する分子は、幅広く種々の会合および解離速度定数を有することができる。本発明の二重特異的結合性タンパク質に対する結合アフィニティーは、標準的なイン・ビトロアッセイ、例えば、B I A C O R E 結合分析で測定した場合、100 nM 以下、好ましくは 10 nM 以下、より好ましくは 1 nM 以下の範囲であろう。

30

【0081】

ある特定の具体例において、FGFR は FGFR 3 I I I c である。他の特定の具体例は、配列番号 2 のアミノ酸番号 262 または配列番号 9 のアミノ酸番号 142 を S から W へ変異させた FGFR 3 I I I c を包含する。他の特定の具体例は、配列番号 15 のアミノ酸番号 263 または配列番号 22 のアミノ酸番号 143 を P から R へ変異させた FGFR 3 I I I c を包含する。他の具体例において、FGFR 3 I I I c は、配列番号 10、19 および 22 に示されるように、N 末端で切断されていてもよい。

40

【0082】

他の特定の具体例において、FGFR は FGFR 2 I I I c である。他の特定の具体例は、配列番号 29 のアミノ酸番号 X または配列番号 40 のアミノ酸番号 X a を S から W へ変異させた FGFR 2 I I I c を包含する。他の特定の具体例は、配列番号 33 のアミノ

50

酸番号Yまたは配列番号42のアミノ酸番号Y<sub>a</sub>をPからRへ変異させたFGFR2III<sub>c</sub>を包含する。他の具体例において、FGFR2III<sub>c</sub>は、配列番号37および42に示されるように、N末端で切断されていてもよい。

【0083】

B. VEGF-A抗体

本発明内で使用するためのVEGF-Aアンタゴニストは、VEGF-AまたはVEGF-A受容体に結合し、それにより、該受容体を発現する細胞上のVEGF-Aの活性を減少させる分子、例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、ニューロピリン-1、および/またはニューロピリン-2を包含する。特に、VEGF-Aアンタゴニストは、抗-VEGF-A抗体を包含する。他の適当なVEGF-Aアンタゴニストは、VEGFR細胞外ドメインを含む可溶性VEGF-A受容体、ならびにVEGF-Aとその受容体の相互作用を阻害することができる、または別法で、VEGF-A受容体を介するVEGF-A-誘導性細胞内シグナリングを阻害することができる小型分子アンタゴニストを包含する。さらに、非抗体足場(scaffold)に基づく結合性タンパク質を用いてもよい。(例えば、Koideら、J. Mol. Biol. 284:1141-1151, 1998; Hosseら、Protein Sci. 15:14-27, 2006、およびその引用文献を参照のこと。)本発明内で使用するための好ましいVEGF-Aアンタゴニストは、FGFのための結合部位も含む二重特異的抗体を包含するVEGF-Aに特異的に結合する抗体を包含する。VEGF-Aに特異的な抗体は、少なくとも、VEGF-Aの可溶性分泌形態を結合し、好ましくは、細胞表面結合形態も結合する。

【0084】

抗体は、(1)結合活性の閾値を示す場合、および(2)対照ポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、特異的に結合しているとみなされる。例えば、結合の閾値は、対照(非-VEGF-A)ポリペプチドに対する結合アフィニティーよりも少なくとも10倍高いアフィニティーで、抗-VEGF-A抗体がVEGF-Aポリペプチド、ペプチドまたはエピトープに結合する場合に決定される。本発明内で使用される抗体は、10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>以上、好ましくは10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>以上、より好ましくは10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>以上、最も好ましくは10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>以上の結合アフィニティー( $K_a$ )を示すことが好ましい。抗体の結合アフィニティーは、通常、自動装置を用いる表面プラズモン共鳴によって、当業者によって容易に決定されることができる。他の方法、例えば、Scatchard分析が当該分野で知られている(Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949)。

【0085】

本発明の抗体は、抗原-結合特異性を保持する無傷抗体の部分を含むか、または該部分からなる。適当な抗体は、例えば、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>およびFv抗体フラグメント、一本鎖抗体、および抗体重鎖または軽鎖の一量体または二量体またはその混合物を包含する。本発明の好ましい抗体は、モノクローナル抗体である。軽鎖を含む抗体は、カッパまたはラムダ軽鎖を含みうる。

【0086】

ある特定の具体例において、本発明の抗体は、IgA、IgG、IgE、IgD、またはIgM(そのサブタイプを包含する)を包含するいずれかのイソ型の無傷免疫グロブリンを包含する。本発明の無傷免疫グロブリンは、好ましくは、無傷IgG(例えば、無傷IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、またはIgA2)を包含する。

【0087】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびその抗原結合性抗体フラグメントを調製し、単離する方法は、当該分野で周知である。例えば、Current Protocols in Immunology(Coohiganら編、John Wiley and Sons, Inc. 2006); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, NY, 2nd ed. 1989); およびMonoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (Hurrell編、CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982)を参照のこと。scFvを包含する抗原結合性フラグメントは、当該分野で既知の方法にしたがって、ファージディスプレーライブリードを用いて調製で

10

20

30

40

50

きる。ファージディスプレーは、また、非抗体足場に基づく結合性タンパク質の調製に用いることができる (Koideら、上掲)。組み換えヒトポリクローナル抗体を調製する方法は、Wibergら、Biotechnol Bioeng. 94:396-405, 2006; Meijerら、J. Mol. Biol. 358:764-772, 2006; Haurumら、米国特許出願公開第2002/0009453号; およびHaurumら、米国特許出願公開第2005/0180967号によって開示される。

#### 【0088】

当業者に明らかなように、本発明内で使用するためのポリクローナル抗体は、種々の恒温動物、例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウスおよびラットのいずれかに、免疫原性ポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントを接種することによって作成することができる。免疫原性ポリペプチドの免疫原性は、アジュバント、例えば、アラム (alum) (水酸化アルミニウム) またはフロイントの完全もしくは不完全アジュバントによって増加させることができる。免疫化に有用なポリペプチドは、また、融合ポリペプチド、例えば、VEGF-A またはその一部と免疫グロブリンポリペプチドまたはマルトース結合性タンパク質との融合物を包含する。ポリペプチド免疫原は、全長分子またはその一部であってもよい。ポリペプチド部分がハプテン様である場合、それは、免疫化のために、巨大分子担体 (例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA) または破傷風トキソイド) に有利に結合または連結させてもよい。

#### 【0089】

さらに、抗体は、抗体標的 (例えば、オルソログ、パラログ、または配列変種) に関連する既知のポリペプチドに対してスクリーンして、例えば、該標的タンパク質またはポリペプチドに高度に特異的な抗体の集団を単離することができる。かかる高度に特異的な集団は、例えば、ヒトVEGF-A に結合するが、マウスVEGF-A に結合しない抗体を包含する。かかる関連するポリペプチド分子との交差反応性の欠如は、例えば、標準的なウェスタンプロット分析 (Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green and Wiley and Sons, NY 1993)) またはELISA (酵素免疫アッセイ) (Immunoassay, A Practical Guide (Chan編、Academic Press, Inc. 1987)) を用いて、VEGF-A ポリペプチドを検出するが、未知の関連するポリペプチドを検出しない抗体によって示される。別の例において、VEGF-A ポリペプチドに対して生じた抗体は、不溶性マトリックスに接着した関連するポリペプチドに吸着され、該VEGF-A ポリペプチドに高度に特異的な抗体は、適当なバッファー条件下で該マトリックス中を流れる。スクリーニングは、既知の密接に関連したポリペプチドに対して非交差反応性のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の単離を可能にする (Antibodies: A Laboratory Manual (HarlowおよびLane編、Cold Spring Harbor Laboratory Press 1988); Current Protocols in Immunology (Coohaganら編、National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc. 1995)。特異的抗体のスクリーニングおよび単離は、当該分野で周知である。Fundamental Immunology (Paul編、Raven Press 1993); Getzoffら、Adv. in Immunol. 43:1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Goding編、Academic Press Ltd. 1996); Benjaminら、Ann. Rev. Immunol. 2:67-101, 1984参照のこと。

#### 【0090】

天然モノクローナル抗体 (「mabs」) は、例えば、対象動物 (例えば、ラットまたはマウス) を精製した免疫原性タンパク質またはそのフラグメントで免疫化することによって、調製することができる。典型的な手法において、動物に各々、典型的にはアジュバント (例えば、完全フロイントのアジュバントまたはRIBIアジュバント (Sigma-Aldrich, St. Louis, MOから入手可能)) と共に、精製タンパク質またはそのフラグメントの開始腹腔内 (IP) 注射し、次いで、例えば二週間間隔で、該精製タンパク質の追加免疫IP 注射をする。3回目の追加免疫注射の7~10日後、動物を出血させ、血清を回収した。付加的な追加免疫を必要に応じて行うことができる。脾細胞およびリンパ節細胞を高タイマー動物から採取し、常法を用いて、ミエローマ細胞 (例えば、マウスSP2/0 またはAg8細胞) に融合させる。次いで、該融合混合物を胸腺細胞のフィーダー層上で培

10

20

30

40

50

養するか、または適当な培地補足物（市販の補足物、例えば、*Hybridoma Fusion and Cloning Supplement*; Roche Diagnostics, Indianapolis, INを包含する）と共に培養する。融合の約10日後、標準的なアッセイ（例えば、ELISA）を用いて、特異的抗体産生ハイブリドーマプールを同定する。陽性プールをさらに、標的タンパク質の活性を遮断または減少させる能力について分析してもよい。限界希釈によって、陽性プールをクローニ化する。

【0091】

ある特定の態様において、本発明は、また、単一標的分子の異なるエピトープに特異的な複数のモノクローナル抗体の使用を包含する。かかる複数の抗体を組み合わせた使用は、単一の抗体で見られた担体効果を減少させることができ、また、Fc受容体を介するクリアランスの速度を増加させ、ADCCを改善しうる。2、3またはそれ以上のモノクローナル抗体を組み合わせて用いることができる。

10

【0092】

天然抗体のアミノ酸配列は、組み換えDNA技術の適用によって変化させることができる。かくして、抗体は、所望の特徴を得るように再設計することができる。修飾した抗体は、その非修飾抗体と比べて、例えば、改善された安定性および/または治療効果を提供することができる。可能な変化は多く、例えば、可変または定常領域のたった1個または2、3個のアミノ酸の変化から完全な再設計までの範囲である。定常領域の変化は、一般に、特徴、例えば、補体結合、膜との相互作用、および他のエフェクター機能を改善または改変するために行う。典型的には、可変領域の変化は、抗原結合性特徴を改善するために、可変領域安定性を改善するために、または免疫原性のリスクを減少させるために行う。ファージディスプレー技術もまた、用いることができる。例えば、Huseら、*Science* 246:1275-1281, 1989; Ladnerら、米国特許第5,571,698号参照のこと。

20

【0093】

ヒトにおいて使用するための治療抗体の場合、通常、既知の手法にしたがって、抗体の非ヒト領域をヒト化することが望ましい。ヒト化抗体を作成する方法は、例えば、米国特許第5,530,101号、第5,821,337号、第5,585,089号、第5,693,762号、および第6,180,370号に開示される。典型的には、ヒト化抗-VEGF-A抗体は、マウスドナー免疫グロブリンの相補性決定領域(CDRs)、およびヒトアクセプター免疫グロブリンの重鎖および軽鎖フレームワークを含む。しばしば、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を改変、好ましくは改善するために、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換されるであろう。これらのフレームワーク置換は、当該分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRおよびフレームワーク残基の相互作用および特定の位置の異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較のモデリングによって、同定される。(例えば、Queenら、米国特許第5,585,089号; Riechmannら、*Nature* 332:323, 1988参照のこと。)

30

【0094】

非ヒト化キメラ抗体もまた、治療上使用することができる(例えば、免疫抑制患者において)。したがって、いくつかのバリエーションにおいて、本発明の抗体は、特に、非ヒト抗-VEGF-A抗体から由来する、キメラ抗体である。好ましくは、キメラ抗体は、長い半減期を有し、かつ、ヒト対象に投与時にあまり免疫原性とならないように、マウスまたはラット抗体由来の可変領域およびヒト由来の定常領域を含む。キメラ抗体を製造する方法は、当該分野で既知である。(例えば、Morrison, *Science* 229:1202, 1985; Oiら、*BioTechniques* 4:214, 1986; Gilliesら、*J. Immunol. Methods* 125:191-202, 1989; 米国特許第5,807,715号; 第4,816,567号; および第4,816,397号参照のこと。)

40

【0095】

本発明は、また、卵巣癌、乳癌、腎癌、結腸直腸癌、肺癌、子宮内膜癌または脳癌患者の末梢血単球由来のような完全ヒト抗体を包含する。かかる細胞は、例えば、VEGF-Aに対する完全ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を形成させるために、ミエローマ細胞と融合させてもよい。ヒト抗体は、また、トランスジェニック非ヒト動物、通常はマ

50

ウスにおいて作成することができる。例えば、Tomizukaら、米国特許第7,041,870号参照のこと。一般に、非ヒト哺乳動物は、ヒト重鎖座およびヒト軽鎖座についてトランスジェニックにされ、対応する内在性免疫グロブリン座は不活性化される。

【0096】

本発明の抗体は、抗体が認識または特異的に結合するVEGF-Aポリペプチドのエピトープまたは部分に関して特定されうる。エピトープまたはポリペプチド部分は、例えば、配列番号72に示されるVEGF-Aポリペプチドのエピトープまたは他の部分のN-末端およびC-末端位置によって、特定されうる。

【0097】

本発明の抗体は、解離定数( $K_d$ )  $5 \times 10^{-2}$  M未満、 $10^{-2}$  M未満、 $5 \times 10^{-3}$  M未満、 $10^{-3}$  M未満、 $5 \times 10^{-4}$  M未満、 $10^{-4}$  M未満、 $5 \times 10^{-5}$  M未満、 $10^{-5}$  M未満、 $5 \times 10^{-6}$  M未満、 $10^{-6}$  M未満、 $5 \times 10^{-7}$  M未満、 $10^{-7}$  M未満、 $5 \times 10^{-8}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $5 \times 10^{-9}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、 $5 \times 10^{-10}$  M未満、 $10^{-10}$  M未満、 $5 \times 10^{-11}$  M未満、 $10^{-11}$  M未満、 $5 \times 10^{-12}$  M未満、 $10^{-12}$  M未満、 $5 \times 10^{-13}$  M未満、 $10^{-13}$  M未満、 $5 \times 10^{-14}$  M未満、 $10^{-14}$  M未満、 $5 \times 10^{-15}$  M未満、または $10^{-15}$  M未満を包含する結合アフィニティーを有する。

【0098】

本発明の抗体は、さらに、例えば、いずれかの型の分子の抗体に対する共有結合によって(該共有結合は、該抗体がそのエピトープに結合するのを妨害しない)、修飾された誘導体を包含する。適当な修飾は、例えば、フコシル化、グリコシル化、アセチル化、ペグ化(pegylation)、リン酸化、およびアミド化を包含する。抗体およびその誘導体は、既知の保護/プロッキング基、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などによって誘導体化されたそれら自体であってもよい。本発明のいくつかの具体例において、抗体の少なくとも1つの重鎖がフコシル化されている。特定のバリエーションにおいて、フコシル化はN-連結されている。いくつかの特定の好ましい具体例において、抗体の少なくとも1つの重鎖は、フコシル化され、N-連結されたオリゴ糖を含む。

【0099】

本発明の抗体は、単独で使用してもよく、または細胞傷害剤との免疫コンジュゲートとして使用されうる。いくつかの具体例において、該剤は、化学治療剤である。他の具体例において、該剤は、放射性同位元素、例えば、鉛-212、ビスマス-212、アスタチン-211、ヨウ素-131、スカンジウム-47、レニウム-186、レニウム-188、イットリウム-90、ヨウ素-123、ヨウ素-125、臭素-77、インジウム-111、またはホウ素-10もしくはアクチニドなどの核分裂性核種である。また別の具体例において、該剤は、毒素または細胞毒薬、例えば、リシン、修飾シュードモナスエンテロトキシンA、カリケアミシン、アドリアマイシン、5-フルオロウラシル、オウリスタチン(auristatin)(例えば、オウリスタチンE)、マイタンシン(maytansin)などである。抗体および抗体フラグメントのかかる剤に対するコンジュゲーションの方法は、当該分野で既知である。

【0100】

本発明の抗体は、参照抗体(例えば、表2または表3に示されるようなVLおよび/またはVH配列を有する参照抗体)と比べて、单一または複数のアミノ酸置換、欠失、付加、または置き換え(replacement)を有する変種であって、その結果、該変種が、参照抗体の1以上の生物学的特性を保持するような(例えば、その各々のカウンター構造(VEGF-A受容体)に対するVEGF-Aの結合を遮断する、VEGF-Aの生物学的活性、結合アフィニティーを遮断する)変種を包含する。当業者は、单一または複数のアミノ酸置換、欠失、付加または置き換えを有する変種を作成することができる。これらの変種は、例えば、(a)1以上のアミノ酸残基が保存的または非保存的アミノ酸で置換された変種、(b)1以上のアミノ酸が該ポリペプチドに付加された、または該ポリペプチドか

10

20

30

40

50

ら欠失された変種、(c) 1以上のアミノ酸が置換基を含む変種、および(d)該ポリペプチドが、融合パートナー、タンパク質タグまたは他の化学基のような、該ポリペプチドに有用な特性を付与しうる別のペプチドまたはポリペプチド、例えば、抗体のエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン基などと融合した変種を包含しうる。本発明の抗体は、1の種由来のアミノ酸残基が保存的または非保存的位置で、別の種の対応する残基の代わりに用いられた変種を包含しうる。別の具体例において、非保存的位置のアミノ酸残基は、保存的または非保存的残基で置換される。これらの変種を得るための技術は、遺伝的(抑制、欠失、変異など)、化学的、および酵素的技術を包含し、当業者に既知である。

#### 【0101】

V E G F - A に結合する例示的抗体は、ファージディスプレーライブライアリーやスクリーニングすることによって同定された。ファージディスプレーをスクリーニングする方法は、標準的な参考テキスト、例えば、Babas, Phage Display: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab Press, 2001) および Lo, Benny K.C., A., Antibody Engineering (2004) に詳細に記載されている。かかるファージディスプレーライブライアリーは、相補的結合エンティティー(entity)が機能的に単離できるように、細胞または他の物質の表面上の発現タンパク質を展示するために使用することができる。一のかかるファージディスプレーライブライアリーにおいて、抗体軽鎖可変領域および重鎖可変領域の一部を、ヒト抗体配列をコードしている合成DNAと組合せ、次いでそれをファージおよびファージミドライブライアリー上に、Fab抗体フラグメントとして展示する (Dyax<sup>®</sup> (登録商標) Human Antibody Libraries, Dyax Corp., Cambridge, MA.)。かくして、抗体の可変軽鎖および重鎖フラグメントをFabフォーマットにおいて単離することができる。これらの可変領域を次いで、抗体結合フラグメント、例えば、scFv、二重特異的scFv、および VEGF - A に対する二重特異的な多機能的アンタゴニストを包含する抗体を作成するために操作することができる。

10

20

30

#### 【0102】

該技術を用いて、例示的Fabの可変領域が、本明細書中に記載のアッセイにおいて VEGF - A を結合および/または中和するその特徴について同定された。(下記の実施例を参照のこと。)これらの可変領域は、VEGF - A を結合および/または中和するscFvsを包含する種々の結合エンティティーを作成するために操作された。下記の表2は、VEGF - A を結合し、中和する能力について同定された抗-VEGF - A 抗体クラスターのためのヌクレオチドおよびアミノ酸配列番号指定を示し、一方、表3は、表2に挙げられた抗-VEGF - A 抗体のフレームワークおよびCDR領域に対応するアミノ酸残基位置を列挙する。

#### 【0103】

【表2】

表4：抗-VEGF-A抗体クランスターの配列番号指定

クランスター#	VLスクリプト# 配列番号	VLボリペプチド 配列番号	VHスクリプト# 配列番号	VHボリペプチド 配列番号
870	47	48	49	50
1039	65	66	67	68
1094	53	54	55	56

表5：抗-VEGF-A抗体のフレームワークおよびCDR領域に対するアミノ酸残基位置\*\*

クランスター#	軽FR1 範囲		軽CDR1 範囲		軽FR2 範囲		軽CDR2 範囲		軽FR3 範囲		軽CDR3 範囲		重FR1 範囲		重FR2 範囲		重FR3 範囲		重FR4 範囲	
	FR1 範囲	CDR1 範囲	FR2 範囲	CDR2 範囲	FR3 範囲	CDR3 範囲	FR4 範囲	CDR4 範囲	FR1 範囲	CDR1 範囲	FR2 範囲	CDR2 範囲	FR3 範囲	CDR3 範囲	FR4 範囲	CDR4 範囲	FR1 範囲	CDR1 範囲	FR2 範囲	CDR2 範囲
870	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113						
1039	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-110	111-121						
1094	1-22	23-35	36-50	51-57	58-89	90-100	101-110	1-30	31-35	36-49	50-66	67-98	99-102	103-113						

\* 示される残基番号(可変軽鎖(VL)または可変重鎖(VH)ボリペプチドの残基位置の「範囲」として示される)は、そのアミノ酸配列番号が表4に示される対応する抗体クラスター番号のVLまたはVHボリペプチド配列にしたがう。

いくつかの具体例において、本発明の抗 - V E G F - A 抗体は、表 2 に挙げられた抗 - V E G F - A 抗体の 1 以上の C D R を含む（各々、表 3 に示される対応する C D R 領域の境界）。例えば、ある特定の変種において、該抗体は、表 2 に挙げられた抗体の重鎖 C D R ( H C D R 1 、 H C D R 2 および H C D R 3 領域の少なくとも 1 つ ) および / または対応する軽鎖 C D R ( L C D R 1 、 L C D R 2 および L C D R 3 領域の少なくとも 1 つ ) を含む。典型的な具体例において、抗 - V E G F - A 抗体は、表 2 に挙げられた抗体の 2 または 3 個の重鎖 C D R および / または 2 または 3 個の軽鎖 C D R を有する。いくつかの変種において、抗 - V E G F - A 抗体が表 2 に挙げられた抗体の少なくとも 1 つの重鎖 C D R を有する場合、該抗体は、さらに、少なくとも 1 つの対応する軽鎖 C D R を含む。

## 【 0 1 0 5 】

10

特定の変種において、抗 - V E G F - A 抗体は、重および / または軽鎖可変ドメインを含み、該重または軽鎖可変ドメインは、( a ) 表 2 に挙げられた抗体について示されるような重または軽鎖 C D R に対応する 3 つの C D R のセット、および ( b ) 4 つのフレームワーク領域のセットを有する。例えば、抗 - V E G F - A 抗体は、重および / または軽鎖可変ドメインを含むことができ、ここに、該重または軽鎖可変ドメインは、( a ) 3 つの C D R のセットであって、該 C D R のセットが表 2 に挙げられた抗体由来であるセット、および ( b ) 4 つのフレームワーク領域のセットであって、該フレームワーク領域のセットが表 2 に挙げられた同じ抗体のフレームワーク領域のセットと同一または異なるセットを有する。

## 【 0 1 0 6 】

20

特定の具体例において、抗 - V E G F - A 抗体は、表 2 に挙げられた抗体の重および / または軽鎖可変領域と実質的に同一の重鎖可変領域および / または軽鎖可変領域を含む。

## 【 0 1 0 7 】

本発明にしたがう抗 - V E G F - A 抗体のいくつかの具体例において、 L C D R 1 は、配列番号 6 6 の残基 2 4 - 3 4 に示されるアミノ酸配列を有し、 L C D R 2 は、配列番号 6 6 の残基 5 0 - 5 6 に示されるアミノ酸配列を有し、 L C D R 3 は、配列番号 6 6 の残基 8 9 - 9 7 に示されるアミノ酸配列を有し、 H C D R 1 は、抗体 c 1 0 3 9 の H C D R 1 アミノ酸配列（配列番号 6 8 の残基 3 1 - 3 5 ）を有し、 H C D R 2 は、抗体 c 1 0 3 9 の H C D R 2 アミノ酸配列（配列番号 6 8 の残基 5 0 - 6 6 ）を有し、 H C D R 3 は、配列番号 6 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

30

## 【 0 1 0 8 】

本発明にしたがう抗 - V E G F - A 抗体の他の例において、 L C D R 1 は、 c 8 7 0 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の L C D R 1 アミノ酸配列（各々、配列番号 4 8 および 5 4 の残基 2 3 - 3 5 ）を有し、 L C D R 2 は、 c 8 7 0 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の L C D R 2 アミノ酸配列（各々、配列番号 4 8 および 5 4 の残基 5 1 - 5 7 ）を有し、 L C D R 3 は、 c 8 7 0 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の L C D R 3 アミノ酸配列（各々、配列番号 4 8 および 5 4 の残基 9 0 - 1 0 0 ）を有し、 H C D R 1 は、 c 8 7 0 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の H C D R 1 アミノ酸配列（各々、配列番号 4 8 および 5 4 の残基 3 1 - 3 5 ）を有し、 H C D R 2 は、 c 8 7 0 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の H C D R 2 アミノ酸配列（各々、配列番号 4 8 および 5 4 の残基 5 0 - 6 6 ）を有し、 H C D R 3 は、各々、配列番号 4 8 および 5 4 の残基 9 9 - 1 0 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。特定のバリエーションにおいて、抗 - V E G F - A 抗体は、 c 8 7 0 、 c 1 0 3 9 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の C D R s L C D R 1 、 L C D R 2 、 L C D R 3 、 H C D R 1 、 H C D R 2 、および H C D R 3 を有する。例えば、特定の具体例において、抗 - V E G F - A 抗体は、 c 8 7 0 、 c 1 0 3 9 および c 1 0 9 4 からなる群から選択される抗体の軽および重鎖可変ドメイン（ V L および V H ）を有する。

40

## 【 0 1 0 9 】

他の具体例において、本発明のしたがう抗 - V E G F - A 抗体は、 C D R s L C D R

50

1、LCDR2およびLCDR3を含むVLドメイン、およびCDRs HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含むVHドメインを含み、ここに、該VLおよびVHCDRのセットは、CDRの第2のセットと比べて3個以下のアミノ酸置換を有し、ここに、該第2のCDRのセットは、c870、c1039およびc1094からなる群から選択される抗体のLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3アミノ酸配列を有する。特定のバリエーションにおいて、該抗体は、該CDRのセットにおいて、0、1または2個のアミノ酸置換を含む。

## 【0110】

本発明の抗-VEGF-A抗体によって認識されるエピトープは、典型的に、ヒトVEGF-A<sub>1-65</sub>（配列番号72の残基27-191）の5またはそれ以上のアミノ酸を含む。好ましいエピトープは、VEGF-Aの下記のポリペプチド領域：HEVVVKFMDVYQRSYCHPIETL（配列番号72のアミノ酸残基38-58）、EYIFKPSCVPLMRCG（配列番号72のアミノ酸残基70-84）、EESNITMQIMRIKPHQG（配列番号72のアミノ酸残基98-114）、およびPCGPCSERRKHLF（アミノ酸残基142-154）の1以上内に含まれる少なくとも1個のアミノ酸を含む。ある特定の具体例において、エピトープは、配列番号72の残基38-58、70-84、98-114および142-154に示されるようなVEGF-Aポリペプチド領域の1以上から由来する少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、または少なくとも7個のアミノ酸を含む。いくつかのバリエーションにおいて、かかるVEGF-Aエピトープは、重複するVEGF-Aペプチド（例えば、連続したペプチドの各ペア間の2個のアミノ酸シフトを伴う、例えば、13-merrペプチド）の使用を含むペプチドマイクロアレイエピトープマッピングによって決定されるようなエピトープである。

## 【0111】

上記の抗-VEGF-A抗体の特定のバリエーションにおいて、抗-VEGF-Aエピトープは、VEGF-Aの下記のポリペプチド領域：KFM DVYQR SYC（配列番号72のアミノ酸残基42-52）、IFKPS CVPLMR（配列番号72のアミノ酸残基72-82）、IMRIKPHQG（配列番号72のアミノ酸残基106-114）、およびPCGPCSERRKHLF（アミノ酸残基142-154）の1以上内に含まれる少なくとも1つのアミノ酸を含む。ある特定の具体例において、エピトープは、配列番号72の残基42-52、72-82、106-114および142-154に示されるようなVEGF-Aポリペプチド領域の1以上から由来する少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、または少なくとも7個のアミノ酸を含む。

## 【0112】

いくつかの関連するバリエーションにおいて、本発明にしたがう抗-VEGF-A抗体は、（a）配列番号72のアミノ酸残基38-58または42-52に示されるようなVEGF-Aの第1のポリペプチド領域内に含まれる1以上のアミノ酸および（b）配列番号72のアミノ酸残基70-84または72-82に示されるようなVEGF-Aの第2のポリペプチド領域内に含まれる1以上のアミノ酸を含むエピトープに結合する。

## 【0113】

上記の（a）および（b）を含むエピトープに結合する抗-VEGF-A抗体のある特定の具体例において、エピトープは、配列番号72の残基90-132に示されるようなVEGF-Aのポリペプチド領域（EGLECVPTEESENITMQIMRIKPHQGQHIGEMSFQLQHNKCECRP）内に含まれるアミノ酸を含まない。

## 【0114】

上記（a）および（b）を含むエピトープに結合する抗-VEGF-A抗体の他の具体例において、該エピトープは、さらに、（c）配列番号72の残基96-114または106-114において示されるVEGF-Aの第3のポリペプチド領域に含まれる1以上のアミノ酸を含む。

10

20

30

40

50

## 【0115】

上記(a)、(b)および(c)を含むエピトープに結合する抗-VEGF-A抗体のいくつかの具体例において、該抗体は、ヒトおよびマウスVEGF-Aに対し、他の10倍以内のK<sub>d</sub>値で結合しない。

## 【0116】

上記(a)および(b)を含むエピトープに結合する抗-VEGF-A抗体のまた他のバリエーションにおいて、該エピトープは、さらに、(d)配列番号72の残基142-154に示されるVEGF-Aの第4のポリペプチド領域に含まれる1以上のアミノ酸を含む。

## 【0117】

ある特定の具体例において、抗-VEGF-A抗体は、抗体フラグメント、例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、scFv、またはダイアボディである。いくつかの好ましい具体例において、抗-VEGF-A抗体は、scFvである。VEGF-Aを結合するscFvエンティティーは、可変軽鎖(V<sub>L</sub>)領域のアミノ末端を可変重鎖(V<sub>H</sub>)領域に配向するか、またはカルボキシル末端をV<sub>H</sub>領域に配向させることができる。いくつかのバリエーションにおいて、抗-VEGF-A scFvは、表Xに列挙した抗-VEGF-A抗体のCDRを有する。特定のバリエーションにおいて、抗-VEGF-A scFvは、表2に列挙した抗-VEGF-A抗体のV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインを有する。ある特定の具体例において、抗-VEGF-A scFvのV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>ドメインのCDRは、c870 c1039およびc1094から選択される抗-VEGF-A抗体のものである。抗-VEGF-A scFvの特定のバリエーションにおいて、該scFvは、配列番号70(c1039 scFv；配列番号69に示されるヌクレオチド配列)、配列番号44(c870.1e6 scFv；配列番号43に示されるヌクレオチド配列)、または配列番号46(c1094.1 scFv；配列番号45に示されるヌクレオチド配列)に示されるアミノ酸配列を含む。さらに、scFvsは、種々の二重特異的抗体フォーマット、例えば、タンデムscFv(tascFv)、ビ一本鎖Fv(bis scFv)、およびカルボキシル末端に融合した一本鎖Fv(scFv)を有する全モノクローナル抗体(biAb)において提供されうる(下記参照)。

10

20

30

## 【0118】

C. Fcタンパク質を用いてコンジュゲートされた二重特異的抗体/可溶性受容体組合せ

二重特異的結合性タンパク質は、図2に例示されるように、本発明の結合性タンパク質を免疫グロブリン重鎖のFc領域を介して組み合わせる。該Fc-融合タンパク質は、IgG分子のFc領域を含む。さらなる具体例において、Fc領域は、ヒトIgG1分子由来である。いくつかの具体例において、該免疫グロブリン融合物は、IgG1分子のヒンジ、CH2およびCH3、またはヒンジ、CH1、CH2およびCH3領域を包含する。

## 【0119】

免疫グロブリン融合物の製造について、米国特許第5,428,130号、米国特許第5,843,725号、米国特許第6,018,026号、およびChamowら、TIBTECH, 14: 52-60 (1996)も参照のこと。

40

## 【0120】

最も単純かつ率直なFc-融合タンパク質設計は、しばしば、本発明のアンタゴニストポリペプチドの結合性ドメインを、免疫グロブリン重鎖のFc領域を介して組み合わせる。本発明のFc-融合タンパク質において、結合成分をコードする核酸は、C末端に、免疫グロブリン定常ドメイン配列のN末端をコードする核酸を融合するが、N末端融合物もまた可能である。

## 【0121】

典型的には、かかる融合物において、コードされたキメラポリペプチドは、免疫グロブリン重鎖の定常領域の少なくとも機能的に活性なヒンジ、CH2およびCH3ドメインを保持するであろう。融合は、また、定常ドメインのFc部分のC末端に対して行われるか

50

、または重鎖の C H 1 もしくは軽鎖の対応する領域の N 末端に隣接して行われる。融合が行われる正確な部位は重大ではなく、特定の部位がよく知られており、 F c 融合タンパク質の生物学的活性、分泌、または結合特性を最適化するために選択されうる。

【 0 1 2 2 】

好ましい具体例において、結合性ドメイン配列は、免疫グロブリン G 1 ( I g G 1 ) の F c 領域の N 末端に融合される。重鎖定常領域全体を結合性ドメイン配列に融合することが可能である。しかしながら、より好ましくは、 I g G F c を化学的に定義付けるペプチド ( すなわち、重鎖定常領域の最初の残基が 1 1 4 であるとして、残基 2 1 6 ) または他の免疫グロブリンの類似部位のすぐ上流のヒンジ領域において開始する配列が該融合において使用される。特に好ましい具体例において、結合性ドメインアミノ酸配列は、 I g G 重鎖の ( a ) ヒンジ領域および C H 2 および C H 3 または ( b ) C H 1 、ヒンジ、 C H 2 および C H 3 ドメインに融合される。

10

【 0 1 2 3 】

二重特異的 F c - 融合タンパク質の場合、該 F c - 融合タンパク質は、多量体として、特に、ヘテロ二量体またはヘテロ四量体として集合 ( assembled ) される。一般に、これらの集合された免疫グロブリンは、既知の単位構造を有する。基本的な 4 鎖構造単位は、 I g G 、 I g D および I g E が存在する形態である。4 鎖単位は、高分子量免疫グロブリンにおいて繰り返され、一般に、 I g M は、ジスルフィド結合によって結合された 4 つの基本単位からなる 5 量体として存在する。 I g A グロブリン、および場合により I g G グロブリンもまた、血清中に多量体形態で存在しうる。多量体の場合、4 単位の各々は同じであってもよく、または異なっていてもよい。

20

【 0 1 2 4 】

別法では、 F c 配列は、免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列間に挿入でき、その結果、キメラ重鎖を含む免疫グロブリンが得られる。該具体例において、 F c 配列は、免疫グロブリンの各アームにおいて、ヒンジおよび C H 2 ドメイン間または C H 2 および C H 3 ドメイン間で、免疫グロブリン重鎖の 3 ' 末端に融合される。類似の構築物が Hoogenboom ら、 Mol. Immunol. , 28: 1027-1037 ( 1991 ) によって報告されている。

30

【 0 1 2 5 】

免疫グロブリン軽鎖の存在は、本発明の F c - 融合タンパク質において必要とされないが、免疫グロブリン軽鎖は、結合性ドメイン - 免疫グロブリン重鎖融合ポリペプチドに共有結合するか、または結合性ドメインに直接融合して存在するかもしれない。前者の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードしている D N A は、典型的に、結合性ドメイン - 免疫グロブリン重鎖融合タンパク質をコードしている D N A と共に発現する。分泌時、該ハイブリッド重鎖および軽鎖は、共有結合して、2 つのジスルフィド結合された免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖ペアを含む免疫グロブリン様構造を提供するであろう。かかる構造の調製に適当な方法は、例えば、米国特許第 4,816,567 号に開示されている。

30

【 0 1 2 6 】

F c - 融合タンパク質は、最も好都合には、結合性ドメイン部分をフレーム内でコードしている c D N A 配列を免疫グロブリン c D N A 配列に融合することによって構築される。しかしながら、ゲノム免疫グロブリンフラグメントに対する融合もまた、使用できる ( 例えば、 Aruffo ら、 Cell , 61: 1303-1313 ( 1990 ) ; および Stamenkovic ら、 Cell , 66: 1133-1144 ( 1991 ) 参照 ) 。後者のタイプの融合は、発現のための I g 調節配列の存在を必要とする。 I g G 重鎖定常領域をコードしている c D N A は、公開された配列に基づいて、脾臓または末梢血リンパ球由来の c D N A ライブラリーから、ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 技術によって単離できる。 F c - 融合タンパク質の結合性ドメインおよび免疫グロブリン部分をコードしている c D N A は、選択された宿主細胞における効率の良い発現を指示するプラスミドベクター中にタンデムに挿入される。

40

【 0 1 2 7 】

特定の修飾は、本発明において使用するための F c 融合分子を作成するために有用な F c 配列を製造するために行われた。特に、 F c 融合タンパク質を作成するために、修飾さ

50

れたヒト Ig G 1 Fc の 6 つのバージョンを生じ、Fc - 488 (配列番号 76)、ならびに Fc 4 (配列番号 77)、Fc 5 (配列番号 74)、Fc 6 (配列番号 78)、および Fc 7 (配列番号 79) と名付けた。Fc 4、Fc 5 および Fc 6 は、Fc RI 結合および補体 C1q 結合を減少させることによって Fc によって媒介されるエフェクター機能を減少させるための変異を含む。Fc 4 は、Fc - 488 中に導入されたのと同じアミノ酸置換を含有する。付加的なアミノ酸置換は、可能性のある Fc 媒介性エフェクター機能を減少させるために導入された。特に、Fc RI 結合を減少させるために、3 つのアミノ酸置換が導入された。これらは、EU インデックス位置 234、235、および 237 にある置換である。これらの位置の置換は、Fc RI に対する結合を減少させることが示された (Duncan ら、Nature 332:563 (1988))。これらのアミノ酸置換は、また、Fc RIIa 結合、ならびに Fc RIIII 結合を減少させうる (Sondermann ら、Nature 406:267 (2000); Wines ら、J. Immunol. 164:5313 (2000))。

10

## 【0128】

いくつかのグループは、補体 C1q 結合および続く補体結合における EU インデックス位置 330 および 331 の関連性を記載している (Canfield および Morrison, J. Exp. Med. 173:1483 (1991); Tao ら、J. Exp. Med. 178:661 (1993))。これらの位置のアミノ酸置換は、補体結合を減少させるために Fc 4 に導入された。Fc 4 の C<sub>H3</sub> ドメインは、クローン化 DNA をイー・コリ (E. coli) の dam プラス株中で増殖させる場合に、可能性のある dam メチル化部位を排除するために TGA から TAA へ変化させた終止コドンを除き、対応する野生型ポリペプチドにおいて見出されるドメインと同一である。

20

## 【0129】

Fc 5 において、Bgl I II クローニングスキームは、該特定の Fc を含有する融合タンパク質において使用しなかったので、EU インデックス位置 218 にてアルギニン残基はリジンに復帰変異した。Fc 5 配列の残りは、Fc 4 の上記の記載と合致する。

## 【0130】

Fc 6 は、カルボキシル末端リジンコドンが排除されたことを除き、Fc 5 と同一である。成熟免疫グロブリンの C - 末端リジンは、しばしば、B 細胞からの分泌前に、翻訳後に成熟免疫グロブリンから除去されるか、または血清循環の間に除去される。結果的に、C 末端リジン残基は、典型的に、循環している抗体において見出されない。上記の Fc 4 および Fc 5 におけるように、Fc 6 配列中の終止コドンは、TAA に変化された。

30

## 【0131】

Fc 7 は、C<sub>H2</sub> ドメインに配置された EU インデックス位置 297 のアミノ酸置換を除き、野生型 1 Fc と同一である。EU インデックス位置 Asn - 297 は、N - 連結された炭水化物結合の部位である。N - 連結された炭水化物は、炭水化物構造中の可能性のあるバッチ間変異のため、組み換え発現されたタンパク質中において、変異性の可能性のある発生源を導入する。該可能性のある変異性を排除する試みにおいて、Asn - 297 をグルタミン残基に変異させて、該残基位置での N - 連結された炭水化物の結合を防ぐ。残基 297 での炭水化物は、また、Fc RIIII に対する Fc 結合に関与する (Sondermann ら、Nature 406:267 (2000))。したがって、炭水化物の除去は、一般に、Fc RII に対する組み換え Fc 7 含有融合タンパク質の結合を減少させるものである。上記のように、Fc 7 配列中の終止コドンは、TAA に変化された。

40

## 【0132】

これらの分子のロイシンジッパー形態もまた、本発明によって意図される。「ロイシンジッパー」は、その融合パートナー (例えば、ロイシンジッパーが融合または連結する配列または分子) の二量体化または三量体化を増加、促進または駆動するロイシンに富む配列を示すために当該分野で使用される用語である。種々のロイシンジッパーポリペプチドが当該分野で記載されている。例えば、Landschulz ら、Science, 240: 1759 (1988); 米国特許第 5,716,805 号; WO 94/10308; Hoppe ら、FEBS Letters, 344: 1991 (1994); Manatis ら、Nature, 341: 24 (1989) を参照のこと。本発明のポリペプチドの 5' または 3' 末端にロイシンジッパー配列を融合してもよいことは、当業者に明らかであろう。

50

## 【0133】

融合タンパク質は、一般に、化学的コンジュゲーションを包含する標準的な技術を用いて調製されうる。融合タンパク質は、また、標準的な技術によって、発現系において組み換えタンパク質として発現させることもできる。適当なリンカーは、さらに、本明細書中、下記に記載される。

## 【0134】

リンカーは、天然、合成、またはその両方の組合せであることができる。例えば、合成リンカーは、例えば配列およびサイズの両方において、ランダム化リンカーであることができる。一の態様において、ランダム化リンカーは、完全にランダムな配列を含むことができ、または所望により、ランダム化リンカーは、天然リンカー配列に基づくことができる。該リンカーは、例えば、非ポリペプチド部分（例えば、ポリヌクレオチド）、ポリペプチドなどを含むことができる。

10

## 【0135】

リンカーは、強固 (rigid) であることができ、あるいは柔軟であることができ、またはその両方の組合せであることができる。リンカー柔軟性は、リンカーおよびリンカーと相互作用するサブユニットの両方の組成の機能であることができる。リンカーは、2つの選択された結合エンティティー（例えば、2つの分離したポリペプチドまたはタンパク質、例えば、2つの異なる抗体）を結合し、該エンティティーを分離かつ別個に維持する。リンカーは、別個の特性、例えば、多量体において、同じ標的に対する複数の分離した結合部位、または例えば、多量体において、異なる標的に対する複数の分離した結合部位を維持したまま、該分離した別個のドメインを協力させることができる。いくつかの場合、ジスルフィド架橋は、2つの連結した結合エンティティー間またはリンカーと結合エンティティーとの間に存在する。

20

## 【0136】

2つ以上の結合エンティティーが連結しうる特定の場合に適当なリンカーの選択は、例えば、該結合エンティティーの性質、該二重特異的組成物が結合すべき標的の構造および性質、および／またはリンカー（例えば、ペプチドリンカー）のタンパク質分解および酸化に対する安定性を包含する種々のパラメーターに依存しうる。

## 【0137】

特に適当なリンカーポリペプチドは、主に、グリシン (Gly)、セリン (Ser)、アラニン (Ala)、およびスレオニン (Thr) から選択されるアミノ酸残基を包含する。例えば、該ペプチドリンカーは、Gly、Ser、Ala および Thr から選択されたアミノ酸残基を少なくとも 75%（該ペプチドリンカーに存在する残基の総数に基づいて計算される）、例えば、少なくとも 80%、少なくとも 85%、または少なくとも 90% 含有しうる。該ペプチドリンカーは、また、Gly、Ser、Ala および／または Thr 残基のみからなってもよい。該ペプチドリンカーは、2つの結合エンティティーを、それらが互いに正確なコンホメーションを取って、所望の活性、例えば、標的分子に対する結合ならびにかかる標的結合に関連しうる他の活性（例えば、所定の生物分子に関するアゴニスト活性またはアンタゴニスト活性）を保持するように連結するのに十分な長さを有するべきである。

30

## 【0138】

該目的のために適当な長さは、例えば、少なくとも 1 個、典型的には約 50 個未満のアミノ酸残基、例えば、2-25 アミノ酸残基、5-20 アミノ酸残基、5-15 アミノ酸残基、8-12 アミノ酸残基または 11 残基の長さである。他の適当なポリペプチドリンカーサイズは、例えば、約 2 ~ 約 15 アミノ酸、約 3 ~ 約 15 アミノ酸、約 4 ~ 約 12、約 10、約 8、または約 6 アミノ酸を包含しうる。リンカーポリペプチドに含まれるための選択されたアミノ酸残基は、ポリペプチド多量体の活性または機能を有意に干渉しない特性を示すべきである。かくして、該ペプチドリンカーは、全体として見ると、該多量体の活性または機能と矛盾する電荷を示さない、または内部フォールディングを干渉しない、または目的の標的に対する該多量体の結合を深刻に妨害する 1 以上のドメインにおける

40

50

アミノ酸残基との結合もしくは他の相互作用を形成しないものである。

【0139】

ポリペプチドを新規な連結された融合ポリペプチド中に連結するための天然ならびに合成ペプチドリンカーの使用は、当該分野で周知である。（例えば、Hallewellら、J. Biol. Chem. 264, 5260-5268, 1989; Alfthanら、Protein Eng. 8, 725-731, 1995; Robinson and Sauer, Biochemistry 35, 109-116, 1996; Khandekarら、J. Biol. Chem. 272, 32190-32197, 1997; Faresら、Endocrinology 139, 2459-2464, 1998; Smallshawら、Protein Eng. 12, 623-630, 1999; U.S. Patent No. 5,856,456参照のこと。）

【0140】

ペプチドリンカーが幅広く使用される一例は、軽鎖可変領域 ( $V_L$ ) および重鎖 ( $V_H$ ) の可変領域が合成リンカーによって結合された一本鎖抗体の製造についてであり、多数の出版物が該特定の分野内に存在する。幅広く使用されるペプチドリンカーは、Gly-Gly-Gly-Gly-Serアミノ酸配列の3回繰り返しからなる15mer(((Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>))（配列番号73）である。他のリンカーが使用されており、ファージディスプレー技術、ならびに選択的感染性ファージ技術が適當なリンカー配列を多様化し、選択するために使用されている（Tangら、J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Henneckeら、Protein Eng. 11, 405-410, 1998）。ペプチドリンカーは、T細胞受容体、ラムダCroレプレッサー、P22ファージArcレプレッサー、IL-12、TSH、FSH、IL-5、およびインターフェロン-などのヘテロ-およびホモ-二量体タンパク質において個々の鎖を連結するために使用された。ペプチドリンカーは、また、融合ポリペプチドを作成するために使用された。種々のリンカーが用いられており、Arcレプレッサーの場合、ファージディスプレーを用いて、一本鎖タンパク質の安定性増加のためのリンカーの長さおよび組成を最適化した（RobinsonおよびSauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5929-5934, 1998参照）。

【0141】

適當なリンカーを得るためのまた別の方法は、ランダム変異誘発によって、単純なリンカー（例えば、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>n</sub>）を最適化することによる。

【0142】

上記のように、一般的に、ペプチドリンカーは、少なくともある程度の柔軟性を有することが好ましい。したがって、いくつかのバリエーションにおいて、ペプチドリンカーは、1-25個のグリシン残基、5-20個のグリシン残基、5-15個のグリシン残基、または8-12個のグリシン残基を含有する。特に適當なペプチドリンカーは、典型的に、少なくとも50%グリシン残基、例えば少なくとも75%グリシン残基を含有する。いくつかの具体例において、ペプチドリンカーは、グリシン残基のみを含む。ある特定のバリエーションにおいて、ペプチドリンカーは、グリシンのほかに他の残基を含む。グリシン以外の好ましい残基は、Ser、Ala、およびThr、特にSerを包含する。

【0143】

いくつかの場合、ある程度の強固性をペプチドリンカー中に提供することが望ましい、または必要な場合がある。これは、ペプチドリンカーのアミノ酸配列中にプロリン残基を含ませることによって達成されうる。かくして、別の具体例において、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのプロリン残基をペプチドリンカーのアミノ酸配列中に含む。例えば、ペプチドリンカーは、アミノ酸残基の少なくとも25%（例えば、少なくとも50%または少なくとも75%）がプロリン残基であるアミノ酸配列を有することができる。本発明のある特定の具体例において、ペプチドリンカーは、プロリン残基のみを含む。

【0144】

いくつかの具体例において、ペプチドリンカーは、非-ポリペプチド部分のための結合基を含むアミノ酸残基が導入されるように修飾される。かかるアミノ酸残基の例は、システインまたはリジン残基でありうる（次いで、該残基に非-ポリペプチド部分が結合する）。別法では、イン・ビボでのN-グリコシル化部位を有するアミノ酸配列を含むことである（それにより、糖部分が（イン・ビボで）ペプチドリンカーに結合する）。さらなる

10

20

30

40

50

選択肢は、生じた t R N A および t R N A シンセターゼ（例えば、米国特許出願公開第2003/0082575号）を用いて非天然アミノ酸を遺伝学的にポリペプチド結合エンティティーまたはペプチドリンカー中に組み込むことである。例えば、ケト-チロシンの挿入は、発現したポリペプチドに対する部位特異的カッピングを可能にする。

## 【0145】

ある特定のバリエーションにおいて、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのシステイン残基、例えば、1つのシステイン残基を含む。例えば、いくつかの具体例において、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのシステイン残基ならびに G l y 、 S e r 、 A l a および T h r からなる群から選択されるアミノ酸残基を含む。いくつかのかかる具体例において、ペプチドリンカーは、グリシン残基およびシステイン残基を含み、例えば、グリシン残基およびシステイン残基のみを含む。典型的には、1つのペプチドリンカーにつき、たった1つのシステイン残基が含まれるであろう。システイン残基を含む特定のペプチドリンカーの一例は、アミノ酸配列 G l y <sub>n</sub> - C y s - G l y <sub>m</sub> (ここに、n および m は、各々、1 - 12、例えば、3 - 9、4 - 8、または4 - 7 の整数である) を有するペプチドリンカーを包含する。

10

## 【0146】

上記のように、本発明は、 F G F R および抗 - V E G F - A 抗体の二重特異的抗体 / 可溶性受容体の組合せを含む二重特異的結合性タンパク質を含む。いくつかのかかる具体例において、 F G F R および抗 - V E G F - A 抗体が共有結合して（例えば、ペプチドリンカーを介して）、二重特異的結合性タンパク質を形成する。いくつかのバリエーションにおいて、該二重特異的結合性タンパク質は、免疫グロブリン重鎖定常領域、例えば、 F c フラグメントを含む。特に適当な F c フラグメントは、例えば、1以上のエフェクター機能を減少または排除するように修飾された F c 領域を含む F c フラグメント（例えば、配列番号 74 に示されるアミノ酸配列を有する F c 5 ）を包含する。

20

## 【0147】

例えば、いくつかの具体例において、本発明にしたがう V E G F - A および F G F の両方の活性を減少させる V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質は、本明細書中に記載の抗 - V E G F - A 抗体部分の結合領域および本明細書に記載の F G F R 3 の F G F 結合部分を含む。ある特定の具体例において、 F G F 結合部分は、本明細書中に記載の F G F R 3 I I I <sub>c</sub> である。ある特定の具体例において、 F G F 結合部分は、 F G F 受容体部分であり、 F G F R 3 であることができ、特に、本明細書に記載の F G F R 3 I I I <sub>c</sub> である。ある特定の具体例において、二重特異的抗体 / 可溶性受容体タンパク質は、配列番号 13 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 23 - 375 ) 、配列番号 2 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 23 - 375 ) ( S 249W ) 、配列番号 19 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 143 - 375 ) 、配列番号 10 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 143 - 375 ) ( S 249W ) 、配列番号 15 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 23 - 375 ) ( P 250R ) 、および配列番号 22 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 143 - 375 ) ( P 250R ) からなる群から選択される F G F R 3 である F G F 受容体部分を、配列番号 44 に示されるような c 870 . 1 e 6 s c F V 、配列番号 46 に示されるような c 1094 . 1 s c F V 、配列番号 52 に示されるような c 870 s c F V 、および配列番号 70 に示されるような c 1039 s c F V からなる群から選択される V E G F - A 抗体部分と組み合わせて含む。他の具体例において、二重特異的抗体 / 可溶性受容体の組み合わせは、配列番号 13 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 23 - 375 ) 、配列番号 2 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 23 - 375 ) ( S 249W ) 、配列番号 19 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 143 - 375 ) 、配列番号 10 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 143 - 375 ) ( S 249W ) 、配列番号 15 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 23 - 375 ) ( P 250R ) 、配列番号 22 に示されるような F G F R 3 I I I <sub>c</sub> ( 143 - 375 ) ( P 250R ) からなる群から選択される F G F R 3 である F G F 結合部分、および配列番号 48 に示されるような c 870 V L および配列番号 50 に示されるよう

30

40

50

なVH、配列番号54に示されるようなc1094 VLおよび配列番号56に示されるようなVH、および配列番号66に示されるような1039 VLおよび配列番号68に示されるようなVHからなる群から選択されるVEGF-A結合部分を含む。

#### 【0148】

他の具体例において、本発明の二重特異的結合性タンパク質は、FGFR3 (143-375) (S249W) Fc5 c1094.1 pZMP31 (配列番号58)、FGFR3 (23-375) (S249W) Fc5 c1094.1 pZMP31 (配列番号60)、FGFR3 (143-375) (S249W) Fc5 c870e6 pZMP31 (配列番号62)、およびFGFR3 (23-375) (S249W) Fc5 c870e6 pZMP31 (配列番号64)からなる群から選択されるFGFR3部分およびVEGF-A抗体部分を具体化する。

#### 【0149】

他の具体例において、FGF結合性部分は、FGFR2である。ある特定の具体例において、FGFR2はFGFR2<sub>I I I c</sub>を含む。ある特定の具体例において、二重特異的抗体/可溶性受容体の組み合わせは、配列番号24に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (22-377)、配列番号29に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (22-377) (S252W)、配列番号33に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (22-377) (P253R)、配列番号37に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (145-377)、配列番号40に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (145-377) (S252W)、および配列番号42に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (145-377) (P253R)からなる群から選択されるFGFR2であるFGF結合性部分、および配列番号44に示されるようなc870.1e6 scFV、配列番号46に示されるようなc1094.1 scFV、配列番号52に示されるようなc870 scFV、および配列番号70に示されるようなc1039 scFVからなる群から選択されるVEGF-A結合性部分を含む。他の具体例において、二重特異的抗体/可溶性受容体の組み合わせは、配列番号24に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (22-377)、配列番号29に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (22-377) (S252W)、配列番号33に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (22-377) (P253R)、配列番号37に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (145-377)、配列番号40に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (145-377) (S252W)、および配列番号42に示されるようなFGFR2<sub>I I I c</sub> (145-377) (P253R)からなる群から選択されるFGFR2であるFGF結合性部分、および配列番号48に示されるようなc870 VLおよび配列番号50に示されるようなVH、配列番号54に示されるようなc1094 VLおよび配列番号56に示されるようなVH、および配列番号66に示されるような1039

VLおよび配列番号68に示されるようなVHからなる群から選択されるVEGF-A結合性部分を含む。

#### 【0150】

I I I . VEGF-AおよびFGF二重特異的抗体/可溶性受容体の組み合わせタンパク質を製造するための核酸、宿主細胞、および方法

本発明の可溶性FGFRポリペプチドは、細胞外ドメインまたはその部分をコードするDNAを発現させることによって調製することができる。例えば、配列番号13の残基36-388を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、FGFR3<sub>I I I c</sub>を調製することができる。N-末端切断型FGFR3<sub>I I I c</sub>は、配列番号19の残基36-268をコードするポリヌクレオチドを用いて調製することができる。FGFR2<sub>I I I c</sub>を調製するために、配列番号24の残基36-391をコードするポリヌクレオチドを用いることができる。別の例において、配列番号37の残基36-268を含有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を用いて、N-末端切断型FGFR2<sub>I I I c</sub>を調製することができる。細胞外ドメインポリペプチドは、膜貫通型の細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に含まない形態で調製されることが好ましい。宿主細胞からの受容体ドメインの輸送を指示するために、受容体DNAを、受容体の天然

10

20

30

40

50

シグナル配列などの分泌ペプチドをコードする第2のDNAセグメントに連結する。使用可能な他のシグナル配列は、tPAシグナル配列（下記の実施例に記載）、CD33シグナル配列またはヒト成長ホルモンシグナル配列を包含する。分泌される受容体ドメインの精製を容易にするために、C-末端伸長、例えば、ポリ-ヒスチジンタグ、物質P、F1a<sup>g</sup><sup>T</sup><sup>M</sup>（商標）ペプチド（Hoppら、Biotechnology 6:1204-1210, 1988; Eastman Kodak Co., New Haven, CTから入手可能）または抗体もしくは他の特異的結合剤を利用可能な別のポリペプチドまたはタンパク質を受容体ポリペプチドに融合することができる。

#### 【0151】

本発明は、また、本発明の抗体の重鎖および/または軽鎖をコードする核酸を包含する。本発明の核酸は、表2（上掲）に列挙されるV<sub>L</sub>-および/またはV<sub>H</sub>-コードポリヌクレオチドと実質的に同一の領域を有する核酸を包含する。本発明の核酸は、また、相補的な核酸を包含する。いくつかの例において、該配列は、整列（align）させた場合、完全に相補的（ミスマッチがない）であろう。他の例において、該配列において、約20%までのミスマッチが存在しうる。本発明のいくつかの具体例において、本発明の抗体の重鎖および軽鎖の両方をコードする核酸が提供される。本明細書中に提供される核酸配列は、コドン最適化、縮重配列、サイレント変異、および特定の宿主中の発現を最適化するための他のDNA技術を用いて活用することができ、本発明はかかる配列修飾を包含する。

10

#### 【0152】

かくして、いくつかの態様において、本発明は、本明細書中に記載のFGFRおよび/またはVEGFA抗体をコードする1以上のポリヌクレオチド（例えば、DNAまたはRNA）を提供する。いくつかのバリエーションにおいて、本発明のポリヌクレオチドは、FGFおよびVEGFAの両方に結合し、その活性を減少させるVEGFA抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質をコードする。当業者は、遺伝コードの縮重を考慮し、これらのポリヌクレオチド分子のなかで、相当数の配列バリエーションが可能なことを容易に認識するであろう。

20

#### 【0153】

本発明の核酸は、その中に別の遺伝子配列またはエレメント（DNAまたはRNA）を挿入して、その結合した配列またはエレメントの複製をもたらしうるベクター、例えば、プラスミド、コスミド、バクミド（bacmid）、ファージ、合成染色体（BAC、YAC）またはウイルス中にクローン化することができる。いくつかの具体例において、発現ベクターは、構造的に活性なプロモーターセグメント（例えば、限定するものではないが、CMV、SV40、伸長因子またはLTR配列）または誘導性プロモーター配列、例えば、ステロイド誘導性pINDベクター（Invitrogen）を含有し、ここに、該核酸の発現を調節することができる。本発明の発現ベクターは、さらに、調節配列、例えば、内部リボソーム侵入部位を含んでいてもよい。発現ベクターは、例えば、トランスフェクションによって、細胞中に導入することができる。

30

#### 【0154】

したがって、本発明内で使用するためのタンパク質は、従来の技術にしたがって遺伝子操作された宿主細胞において生産することができる。適当な宿主細胞は、外来性DNAで形質転換またはトランスフェクトされることができ、培養により増殖することができる細胞型であり、細菌、真菌細胞、および培養された高等真核生物細胞（多細胞生物の培養細胞を包含する）、特に、培養胞乳動物細胞を包含する。クローン化DNA分子を操作し、外来性DNAを種々の宿主細胞中に導入する技術は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) およびAusubelら（上掲）によって開示されている。

40

#### 【0155】

一般に、目的のタンパク質をコードしているDNA配列は、発現ベクター内で、その発現に必要な他の遺伝子エレメント（一般的に、転写プロモーターおよびターミネーターを包含する）に操作可能に連結される。ベクターは、また、一般に、1以上の選択マーカー

50

および1以上の複製起点を含有するが、当業者は、ある特定の系内で、選択マーカーを別々のベクターに提供してもよく、外来性DNAの複製は、宿主細胞ゲノム中への組み込みによって提供されうることを認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクターおよび他のエレメントの選択は、当業者のレベル内のルーチンな設計の事柄である。多くのかかるエレメントは、文献に記載されており、商業的供給元を介して入手可能である。

【0156】

宿主細胞の分泌経路中に組み換えタンパク質を向けるために、分泌シグナル配列（リーダー配列、プレプロ配列またはプレ配列としても知られる）を発現ベクター中に提供する。分泌シグナル配列は、組み換えタンパク質の天然形態のものであってもよく、または別の分泌されたタンパク質由来であってもよく（例えば、t-P A；米国特許第5,641,655号参照）、またはデノボ合成されたものであってもよい。分泌シグナル配列は、タンパク質コード化DNA配列に操作可能に連結され、すなわち、該2つの配列は、正しいリーディングフレーム中で結合され、該新たに合成されたポリペプチドが宿主細胞の分泌経路中に向けられるように配置される。分泌シグナル配列は、一般に、目的のポリペプチドをコードするDNA配列に対し5'に配置されるが、ある特定のシグナル配列は、目的のDNA配列のどこに配置されてもよい（例えば、Welchら、米国特許第5,037,743号；Hollandら、米国特許第5,143,830号参照）。特定のバリエーションにおいて、本発明にしたがって使用するための分泌シグナル配列は、配列番号2、10、13、15、19、22、24、29、33、37、40、42、58、60、62、および64の残基1-35からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

10

20

30

30

40

【0157】

培養哺乳動物細胞は、本発明内で使用するための組み換えタンパク質の生産に適当な宿主である。外来性DNAを哺乳動物宿主細胞中に導入するための方法は、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション（Wiglerら、Cell 14:725, 1978；CorsaroおよびPearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981；GrahamおよびVan der Eb, Virology 52:456, 1973）、エレクトロポレーション（Neumannら、EMBO J. 1:841-845, 1982）、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション（Ausubelら、上掲）、およびリポソーム媒介性トランスフェクション（Hawley-Nelsonら、Focus 15:73, 1993；Ciccaroneら、Focus 15:80, 1993）を包含する。培養哺乳動物細胞における組み換えポリペプチドの生産は、例えば、Levinsonら、米国特許第4,713,339号；Hagenら、米国特許第4,784,950号；Palmiterら、米国特許第4,579,821号；およびRingold、米国特許第4,656,134号によって開示されている。適当な哺乳動物宿主細胞の例は、アフリカミドリザル腎臓細胞（Vero；ATCC CRL 1587）、ヒト胚性腎臓細胞（293-HEK；ATCC CRL 1573）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK-21, BHK-570；ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314）、イヌ腎臓細胞（MDCK；ATCC CCL 34）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-K1；ATCC CCL61；CHO DG44；CHO DXB11（Hyclone, Logan, UT）；例えば、Chasinら、Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986参照））、ラット下垂体細胞（GH1；ATCC CCL82）、HeLa S3細胞（ATCC CCL2.2）、ラット肝癌細胞（H-4-II-E；ATCC CRL 1548）、SV40-形質転換サル腎臓細胞（COS-1；ATCC CRL 1650）およびネズミ胚細胞（NIH-3T3；ATCC CRL 1658）を包含する。さらなる適当な細胞系は、当該分野で知られており、American Type Culture Collection, Manassas, Virginiaなどの公共の受託機関から入手可能である。強力な転写プロモーター、例えば、SV-40またはサイトメガロウイルス由来のプロモーターを使用することができる。例えば、米国特許第4,956,288号を参照のこと。他の適当なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子由来のもの（米国特許第4,579,821号および第4,601,978号）およびアデノウイルス主要後期プロモーターを包含する。

40

【0158】

薬剤選択は、一般的に、外来性DNAを挿入した培養哺乳動物細胞を選択するために使用される。かかる細胞は、一般に、「トランスフェクタント」と呼ばれる。選択剤の存在下で培養し、目的の遺伝子をその子孫に伝えることのできる細胞は、「安定なトランスフ

50

エクタント」と呼ばれる。例示的な選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をコードしている遺伝子（ネオマイシンの存在下で選択を実施することが可能になる）、例えば、G-418など、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼのgpt遺伝子（ミコフェノール酸/キサンチンの存在下で宿主細胞成長が可能となる）、およびゼオシン（zeocin）、ブレオマイシン（bleomycin）、ブラストシジン（blastocidin）およびハイグロマイシン（hygromycin）に対する耐性を提供するマーカー（例えば、Gatignolら、Mol. Gen. Genet. 207:342, 1987; Drocourtら、Nucl. Acids Res. 18:4009, 1990参照）を包含する。選択系は、また、目的の遺伝子の発現レベルを増加させるために使用することができる（「増幅」と呼ばれるプロセス）。増幅は、低レベルの選択剤の存在下でトランスフェタントを培養し、次いで、選択剤の量を増やして、高レベルの導入遺伝子生産物を産生する細胞を選択することによって実施される。例示的な増幅選択マーカーは、ジヒドロ葉酸還元酵素であり、それはメトトレキサートに対する耐性を付与する。他の薬剤耐性遺伝子（例えば、ハイグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）も使用できる。

10

## 【0159】

他の高等真核細胞もまた、宿主として使用でき、昆虫細胞、植物細胞および鳥類細胞を包含する。植物細胞中で遺伝子を発現するためのベクターとしてのアグロバクテリウム・ライゾゲネス（*Agrobacterium rhizogenes*）の使用は、Sinkarら、J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987によって概説されている。昆虫細胞の形質転換およびその外来性ポリペプチドの産生は、Guarinoら、米国特許第5,162,222号およびWIPO公開第WO 94/06463号によって開示されている。

20

## 【0160】

昆虫細胞は、一般にオートグラファ・カリフォルニカ（*Autographa californica*）核多角体病ウイルス（AcNPV）から由来する、組み換えバキュロウイルスに感染させることができる。KingおよびPossee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide (Chapman & Hall, London); O'Reillyら、Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford University Press., New York 1994); およびBaculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology (Richardson ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1995)を参照のこと。組み換えバキュロウイルスは、また、Luckowら (J. Virol. 67:4566-4579, 1993)によって記載されるトランスポゾンに基づく系によって生産することができる。該系は、トランスファーベクターを利用するが、キット形態で市販されている（BAC-TO-BACキット；Life Technologies, Gaithersburg, MD）。トランスファーベクター（例えば、PFASTBAC1；Life Technologies）は、目的のタンパク質をコードするDNAを、「バクミド」と呼ばれる大きなプラスミドとしてイー・コリ中に維持されたバキュロウイルスゲノム中に移動させるためのTn7トランスポゾンを含有する。Hill-PerkinsおよびPossee, J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonningら、J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; およびChazenbalkおよびRapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-1549, 1995を参照のこと。さらに、トランスファーベクターは、上記のようなポリペプチド伸長またはアフィニティータグをコードするDNAとのフレーム内融合を包含することができる。当該分野で既知の技術を用いて、タンパク質コード化DNA配列を含有するトランスファーベクターをイー・コリ宿主細胞中に形質転換し、該細胞を、組み換えバキュロウイルスを示す遮断されたlacZ遺伝子を含有するバクミドについてスクリーンする。組み換えバキュロウイルスゲノムを含有するバクミドDNAを通常の技術を用いて単離し、スpodoptera・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞、例えばSf9細胞をトランスフェクトするために使用する。次いで、目的のタンパク質を発現する組み換えウイルスが産生する。組み換えウイルスストックは、当該分野で通常使用される方法によって作成される。

30

## 【0161】

タンパク質生産のために、組み換えウイルスを用いて宿主細胞を、典型的には、シマジロクサヨトウ（fall armyworm）、スpodoptera・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*

40

50

) ( 例えは、S f 9 または S f 2 1 細胞 ) またはトリコプラス・ニ ( *Trichoplusia ni* ) ( 例えは、H I G H F I V E 細胞 ; Invitrogen, Carlsbad, CA ) 由来の細胞系を感染させる。一般的に、GlickおよびPasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA ( ASM Press, Washington, D.C., 1994 ) を参照のこと。また、米国特許第5,300,435号も参照のこと。無血清培地を用いて、細胞を増殖および維持する。適当な培地処方は、当該分野で既知であり、商業的供給元から得ることができる。細胞は、約  $2 - 5 \times 10^5$  細胞の接種密度から約  $1 - 2 \times 10^6$  細胞密度まで増殖させ、該時点で、組み換えウイルスストックを感染多度 ( M O I ) 0.1 ~ 10 、より典型的には約 3 で加える。使用される手法は、一般的に、入手可能な研究室マニュアル ( 例えは、KingおよびPossee ( 上掲 ) ; O ' Reillyら ( 上掲 ) ; Richardson ( 上掲 ) ) に記載されている。

10

## 【 0 1 6 2 】

酵母細胞を包含する真菌細胞もまた、本発明内で使用することができる。この点で特に興味深い酵母種は、サッカロマイセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) 、ピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* ) 、およびピチア・メタノリカ ( *Pichia methanolica* ) を包含する。エス・セレビシエ細胞を外来性 DNA で形質転換し、そこから組み換えポリペプチドを産生する方法は、例えは、Kawasaki、米国特許第4,599,311号; Kawasakiら、米国特許第4,931,373号; Brake、米国特許第4,870,008号; Welchら、米国特許第5,037,743号; およびMurrayら、米国特許第4,845,075号によって開示されている。形質転換細胞は、選択マーカー、一般的には、薬剤耐性または特定の栄養素 ( 例えは、ロイシン ) の不在下での増殖能によって決定される表現型によって選択される。サッカロマイセス・セレビシエ ( *Saccharomyces cerevisiae* ) において使用するための例示的なベクター系は、Kawasaki ( 米国特許第4,931,373号 ) によって開示される P O T 1 ベクター系であり、形質転換細胞をグルコース含有培地中での増殖によって選択することができる。酵母において使用するための適当なプロモーターおよびターミネーターは、糖分解酵素遺伝子 ( 例えは、Kawasaki、米国特許第4,599,311号; Kingsmanら、米国特許第4,615,974号; およびBitter、米国特許第4,977,092号参照 ) およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来のものを包含する。米国特許第4,990,446号; 第5,063,154号; 第5,139,936号; および第4,661,454号を参照のこと。ハンセヌラ・ポリモルファ ( *Hansenula polymorpha* ) 、シゾサッカロマイセス・ポンベ ( *Schizosaccharomyces pombe* ) 、クルイベロマイセス・ラクティス ( *Kluyveromyces lactis* ) 、クルイベロマイセス・フラギリス ( *Kluyveromyces fragilis* ) 、ウスティラゴ・マイディス ( *Ustilago maydis* ) 、ピチア・パストリス ( *Pichia pastoris* ) 、ピチア・メタノリカ ( *Pichia methanolica* ) 、ピチア・グイレルモンディイ ( *Pichia guillermondii* ) 、およびカンディダ・マルトサ ( *Candida maltosa* ) を包含する他の酵母のための形質転換系は、当該分野で既知である。例えは、Gleesonら、J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986; Cregg、米国特許第4,882,279号; およびRaymondら、Yeast 14:11-23, 1998を参照のこと。アスペルギルス ( *Aspergillus* ) 細胞は、McKnightら、米国特許第4,935,349号の方法にしたがって利用されうる。アクレモニウム・クリソゲナム ( *Acremonium chrysogenum* ) を形質転換する方法は、Suminoら、米国特許第5,162,228号によって開示される。ニューロスボラ ( *Neurospora* ) を形質転換する方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号によって開示される。ピチア・メタノリカ ( *Pichia methanolica* ) における組み換えタンパク質の生産は、米国特許第5,716,808号; 第5,736,383号; 第5,854,039号; および第5,888,768号において開示される。

20

## 【 0 1 6 3 】

細菌エシェリキア・コリ ( *Escherichia coli* ) 、バチルス ( *Bacillus* ) 、および他の属を包含する原核生物宿主細胞もまた、本発明内の有用な宿主細胞である。これらの宿主を形質転換し、そこでクローン化した外来性 DNA 配列を発現させる技術は、当該分野で周知である ( 例えは、Sambrookら ( 上掲 ) 参照 ) 。イー・コリなどの細菌中で組み換えタンパク質を発現する場合、該タンパク質は、細胞質中で、典型的には不溶性顆粒として保持されてもよく、または細菌分泌配列によって細胞周辺腔に向けられてもよい。前者の場合

30

40

50

、細胞を溶解し、顆粒を回収し、例えば、グアニンイソチオシアネートまたは尿素を用いて、変性させる。次いで、変性させたタンパク質は、変性剤を希釈することによって、例えば、尿素ならびに還元および酸化グルタチオンの組み合わせの溶液に対する透析、次いで、緩衝化セーライン溶液に対する透析によって、リフォールディングおよび二量体化することができる。別法では、該タンパク質を可溶性形態で細胞質から回収し、変性剤を使用することなく、単離してもよい。該タンパク質は、細胞から、例えば、リン酸緩衝化セーライン中の水性抽出物として回収される。目的のタンパク質を捕獲するために、該抽出物を直接、クロマトグラフィー媒体、例えば、固定化抗体またはヘパリン・セファロースカラムに付す。分泌されるタンパク質は、細胞周辺腔から、（例えば、超音波処理または浸透圧衝撃によって）細胞を破壊して細胞周辺腔の内容物を放出させ、該タンパク質を回収することによって、可溶性の機能的形態で回収することができ、それにより、変性およびリフォールディングの必要性を回避する。一本鎖抗体を包含する抗体は、既知の方法にしたがって、細菌性宿主細胞中で産生することができる。例えば、Birdら、Science 242: 423-426, 1988; Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; and Pantolianoら、Biochem. 30:10117-10125, 1991参照のこと。

10

## 【0164】

形質転換またはトランスフェクト宿主細胞は、栄養素および選択した宿主細胞の増殖に必要な他の成分を含有する培養培地中で常法にしたがって培養する。規定培地および複合培地を包含する種々の適当な培地が当該分野で知られており、一般的に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよびミネラルを包含する。培地は、また、必要に応じて、成長因子または血清のような成分も含有しうる。増殖培地は、一般的に、例えば、発現ベクター上で運搬されるか、または宿主細胞中に共トランスフェクトされた選択マーカーによって、薬剤選択または補足された必須栄養素の欠失によって、外から加えられたDNAを含有する細胞について選択するであろう。

20

## 【0165】

VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、通常のタンパク質精製法によって、典型的には、クロマトグラフィー技術の組み合わせによって精製される。一般的に、Affinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, New York 1994)を参考のこと。免疫グロブリン重鎖ポリペプチドを含むタンパク質は、固定化タンパク質A上のアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。付加的な精製工程、例えば、ゲルろ過を用いて、所望のレベルの純度を得るか、または脱塩、バッファー交換などを提供することができる。

30

## 【0166】

抗体は、既知の方法、例えば、従来のカラムおよび他の装置を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって、細胞培養培地から精製することができる。典型的な手法において、馴化培地を得、5日まで4で保存してもよい。コンタミネーションを回避するために、静菌剤（例えば、アジ化ナトリウム）を一般的に添加する。培地のpHは、例えば、氷酢酸滴下によって、（典型的にはpH~5.5に）低下させる。より低いpHは、タンパク質G樹脂を介する最適な1gG捕獲を提供する。タンパク質Gカラムサイズは、馴化培地の容量に基づいて決定される。パックしたカラムを適当なバッファー、例えば、35mM NaPO<sub>4</sub>、120mM NaCl pH 7.2で中和する。次いで、該培地を中和タンパク質g樹脂に、培地の容量およびカラムサイズの容量の両方によって決定された流速で通過させる。付加的にカラムを通過させる可能性のために、通過物(flowthrough)を保持する。次いで、捕獲抗体を有する樹脂を中和バッファー中に洗浄する。酸性溶出バッファー、例えば、0.1Mグリシン、pH 2.7または等価物を用いて、カラムをフラクションに溶出する。各フラクションを、例えば、tris:グリシン 1:20比の2M tris、pH 8.0を用いて、中和する。タンパク質含有フラクション（例えば、A<sub>280</sub>に基づく）をプールする。脱塩カラムを用いて、プールしたフラクションを

40

50

適当なバッファー、例えば、35 mM NaPO<sub>4</sub>、120 mM NaCl pH 7.2 中にバッファー交換する。1.44の吸光係数を用いて、A<sub>280</sub>によって濃度を決定する。内毒素レベルは、LALアッセイによって決定してもよい。精製タンパク質は、典型的には-80にて、凍結保存してもよい。

【0167】

機能的VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を発現する細胞は、スクリーニングアッセイ内で使用される。種々の適当なアッセイは、当該分野で既知である。これらのアッセイは、標的細胞中の生物学的応答の検出に基づく。1のかかるアッセイは、細胞増殖アッセイである。細胞は、試験化合物の存在下または非存在下で培養し、細胞増殖を、例えば、トリチウム化チミジンの取り込みを測定することによって、または3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド(MTT)の代謝的分解に基づく比色アッセイによって、検出される(Mosman, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983)。別のアッセイフォーマットは、レポーター遺伝子を発現するようにさらに操作した細胞を用いる。該レポーター遺伝子は、受容体関連経路に応答するプロモーターエレメントに連結し、該アッセイは、該レポーター遺伝子の転写活性を検出する。この点において、好ましいプロモーターエレメントは、血清応答エレメント、またはSREである。(例えば、Shawら、Cell 56:563-572, 1989参照のこと。)好ましいかかるレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子である。(de Wetら、Mol. Cell. Biol. 7:725, 1987参照のこと。)ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当該分野で既知の方法を用いてルミネスセンスによって検出される。(例えば、Baumgartnerら、J. Biol. Chem. 269:29094-29101, 1994; SchenbornおよびGoiffin, Promega Notes 41:11, 1993参照のこと。)ルシフェラーゼ活性アッセイキットは、例えば、Promega Corp., Madison, WIから、市販されている。該型の標的細胞系統は、化学物質のライブリラー、細胞馴化培養培地、真菌プロス、土壤試料、水試料などをスクリーンするために使用できる。例えば、細胞馴化培地試料のバンクを標的細胞上でアッセイして、リガンドを生産する細胞を同定することができる。次いで、陽性細胞は、プールに分け、宿主細胞中にトランスフェクトし、発現させる哺乳動物発現ベクターにおけるcDNAライブラリーを製造するために使用される。次いで、トランスフェクト細胞由来の培地試料をアッセイし、次いでプールに分け、再トランスフェクションし、二次培養し、陽性細胞を再アッセイして、リガンドをコードしているクローン化cDNAを単離する。

【0168】

I V. 治療方法

A. 全般

別の態様において、本発明は、脈管形成を阻害する方法、特に、脈管形成に関連する疾患または障害を治療する方法を提供する。一般的に、かかる方法は、脈管形成を阻害するのに有効な量で二重特異的抗体/可溶性受容体の組み合わせを含む二重特異的結合性タンパク質を対象に投与することを含む。より特別には、治療的使用のために、該二重特異的結合性タンパク質は、脈管形成の増加によって特徴付けられる疾患または障害(「血管新生障害」)に罹患しているか、または該疾患または障害を発症するリスクが高い対象に投与される。本発明にしたがう治療に応じやすい血管新生障害は、例えば、充実性腫瘍成長によって特徴付けられる癌(例えば、肺臓癌、腎細胞癌(RCC)、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、グリア芽腫、および消化管間質主要(GIST))ならびに種々の血管新生眼障害(例えば、加齢黄斑変性、糖尿病性網膜症、虹彩新生血管、および血管新生緑内障)を包含する。本発明にしたがう治療に応じやすい他の血管新生障害は、例えば、関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、慢性炎症、肺炎症、子癇前症、心外膜液(例えば、心膜炎に関連する)、および胸水を包含する。

【0169】

本明細書中に記載の治療の各具体例において、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、その治療が求められる疾患または障害の管理に関連する通常の方法と合致する方法でデリバリーされる。本明

10

20

30

40

50

細書中の開示にしたがって、有効量のアンタゴニストを、疾患または障害を予防または治療するのに十分な時間および条件下で、かかる治療を必要とする対象に投与する。

【0170】

本明細書中に記載の二重特異的結合性タンパク質の投与対象は、脈管形成に関連する特定の疾患または障害を発症するリスクの高い患者、ならびに既存の血管新生障害を示す患者を包含する。ある特定の具体例において、対象は、その治療が求められる疾患または障害を有すると診断されている。さらに、疾患または障害におけるいづれかの変化について（例えば、疾患または障害の臨床症状の増加または減少について）、治療クールの間、対象をモニターすることができる。

【0171】

予防的応用において、医薬組成物または医薬は、特定の疾患のリスクを排除または減少させるか、または疾患の発症を遅らせるの十分な量において、該疾患に罹りやすい、または該疾患のリスクのある患者に投与される。治療的応用において、組成物または医薬は、かかる疾患およびその合併症の症状を治癒するか、または少なくとも部分的に阻止するのに十分な量において、該疾患に罹患している疑いがあるか、またはすでに罹患している患者に投与される。これを達成するのに十分な量は、治療上または医薬上有効な投与量または量と呼ばれる。予防的および治療的の両方のレジメンにおいて、薬剤は、通常、十分な応答（例えば、不適切な脈管形成活性の阻害）が達成されるまで、数回の用量で投与される。典型的には、応答をモニターし、所望の応答が消え始めたら、反復投与量を与える。

【0172】

本発明の方法にしたがう治療の対象患者を同定するために、許容されるスクリーニング方法を用いて、特定の血管新生障害に関連するリスク因子を決定し、または対象において同定された既存の障害の状態を決定してもよい。かかる方法は、例えば、個体に、特定の疾患と診断された親類がいるかどうかを決定することを包含することができる。スクリーニング方法は、また、例えば、遺伝性成分を有することが知られた特定の疾患について家族の状況を決定するための通常の精密検査を包含することができる。例えば、種々の癌はまた、ある特定の遺伝性成分を有することが知られている。癌の遺伝性成分は、例えば、形質転換している複数の遺伝子の変異（例えば、Ras、Raf、EGFR、cMetなど）、ある特定のHLAおよびキラー阻害受容体（KIR）分子の存在または非存在、または癌細胞がNK細胞およびT細胞などの細胞の免疫抑制を直接または間接的に変調することができるメカニズムを包含する（例えば、Ljunggren and Malmberg, Nature Rev. Immunol. 7:329-339, 2007; Boyton and Altmann, Clin. Exp. Immunol. 149:1-8, 2007参照）。このような目的で、目的の特定疾患に関連する遺伝子マーカーを有する個体を同定するために、スクレオチドプローブをルーチンに使用できる。さらに、特定の疾患のマーカーを同定するのに有用な幅広い種類の免疫学的方法が当該分野で知られている。例えば、モノクローナル抗体プローブを用いて特定の腫瘍に関連する抗原を検出する種々のELISA免疫アッセイ法が利用可能であり、当該分野で周知である。スクリーニングは、既知の患者の徴候学、年齢因子、関連リスク因子などによって示される場合、実行してもよい。これらの方針により、臨床医は、本明細書中に記載の治療方法を必要とする患者をルーチンに選択することができる。これらの方法にしたがって、独立した治療計画として、または他の治療に対するフォローアップ、補助、または同等の治療レジメンとして、脈管形成の阻害を実行してもよい。

【0173】

投与のために、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を医薬組成物として処方する。二重特異的VEGF-A抗体/FGFR可溶性受容体の組み合わせを含む医薬組成物は、医薬上有用な組成物を調製するための既知の方法にしたがって処方でき、それにより、治療分子を医薬上許容される担体との混合物中に配合する。組成物は、その投与がレシピエント患者によって許容される場合、「医薬上許容される担体」であると言われる。滅菌リン酸緩衝化セーラインは、医薬上許容される担体の一例である。他の適当な担体は、当業者に周知である。（例え

10

20

30

40

50

ば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995) 参照のこと。) 処方は、さらに、1 以上の賦形剤、保存料、安定化剤、緩衝化剤、バイアル表面上でのタンパク質喪失を防止するためのアルブミンなどを含んでいてもよい。単一特異的アンタゴニストは、個別に処方することができ、または組み合せた処方において提供することができる。

#### 【0174】

VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を含む医薬組成物は、有効量で対象に投与される。本発明の方法によると、アンタゴニストは、例えば、筋内、皮下、静脈内、心房内、関節内、非経口、鼻腔内、肺内、経皮、胸膜内、髄腔内、および経口投与形路を包含する種々の投与様式によって対象に投与されうる。血管新生眼障害の治療のための医薬的使用の場合、二重特異的結合性タンパク質は、典型的に、通常の方法にしたがって、硝子体内注射のために処方される。予防および治療目的のために、アンタゴニストは、継続的なデリバリー（例えば、継続的な経皮デリバリー）を介して長期間、または反復される投与プロトコール（例えば、時間、日または週単位で）において、単一ボーラスデリバリーにおいて対象に投与されうる。

10

#### 【0175】

組成物の「治療上有効量」は、統計学的に有意な効果、例えば、疾患進行における統計学的に有意な減少または器官機能における統計学的に有意な改善をもたらす量である。正確な投与量は、治療されるべき疾患の性質および重篤度、患者の形質などを考慮して、許容される標準にしたがって臨床医によって決定されるであろう。投与量の決定は、当業者のレベル内である。

20

#### 【0176】

これに関連して、有効量の決定は、典型的に、ヒト臨床試験によって追跡される動物モデル研究に基づくものであり、モデル対象における対象疾患または障害の発生または重篤度を有意に減少させる有効量および投与プロトコールを決定することによって導かれる。本発明の組成物の有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか動物であるか、投与される他の医薬、処置が予防であるか治療であるか、ならびに組成物自体の比活性および個体において所望の応答を顕現させる能力を包含する多くの異なる因子によって変化する。通常、患者はヒトであるが、いくつかの疾患において、患者が非ヒト哺乳動物であることができる。典型的には、投与レジメンは、最適な治療応答を提供するように、すなわち、安全性および効力を最適化するように調整される。したがって、治療上または予防上有効量は、脈管形成を阻害する有益な効果がいずれかの望まれない副作用を上回る量でもある。VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の投与の場合、投与量は、典型的に、対象の体重 1 kg あたり、約 0.1 μg ~ 100 mg / kg または 1 μg / kg ~ 約 50 mg / kg、より普通には 10 μg ~ 5 mg / kg の範囲である。より具体的な例において、該薬剤の有効量は、約 1 μg / kg ~ 約 20 mg / kg、約 10 μg / kg ~ 約 10 mg / kg、または約 0.1 mg / kg ~ 約 5 mg / kg である。該範囲内の投与量は、一回または例え、1 日に複数回の投与または毎日、毎週、週に 2 回、または毎月の投与を包含する複数回の投与によって達成することができる。例えば、ある特定のバリエーションにおいて、レジメンは、開始の投与、次いで、毎週または週 2 回の間隔での複数回の投与からなる。別のレジメンは、開始の投与、次いで、毎月または月 2 回の間隔で複数回の投与からなる。別法では、投与は、NK 細胞活性および / または疾患もしくは障害の臨床症状のモニタリングによって示される場合、不定期であることができる。

30

#### 【0177】

医薬組成物の投与量は、標的部位での所望の濃度を維持するように、担当医によって変更されうる。例えば、静脈内デリバリー様式を選択する場合、血流中の薬剤の標的組織での局所的濃度は、患者の状態および予測測定応答にもよるが、1 リットル当たり約 1 - 50 ナノモルの組成物、時折、1 リットル当たり約 1.0 ナノモル ~ 10.15 または 25

40

50

ナノモルであってもよい。デリバリー様式、例えば、経表皮デリバリー 対 粘膜面へのデリバリーに基づいて、高または低濃度を選択してもよい。投与量は、また、投与された処方、例えば、鼻スプレー 対 粉末、持続性放出経口または注射粒子、経皮処方などの放出速度に基づいて調整すべきである。同じ血清濃度レベルを達成するために、例えば、(標準条件下で) 5 ナノモルの放出速度を有する低放出粒子は、10 ナノモルの放出速度を有する粒子の投与量の約 2 倍で投与されるであろう。

【 0 1 7 8 】

V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を含む医薬組成物は、液体形態、エーロゾル、または固体形態で供給することができる。液体形態は、注射溶液、エーロゾル、滴、トポロジー (topological) 溶液または経口懸濁液によって説明される。例示的固体形態は、カプセル、錠剤および放出制御形態を包含する。後者の形態は、ミニオスモティックポンプおよびインプラントによって説明される。(例えば、Bremerら、*Pharm. Biotechnol.* 10:239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 95-123 (RanadeおよびHollinger編、CRC Press 1995); Bremerら、"Protein Delivery with Infusion Pumps," in *Protein Delivery: Physical Systems* 239-254 (SandersおよびHendren編、Plenum Press 1997); Yeweyら、"Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems* 93-117 (SandersおよびHendren編、Plenum Press 1997) 参照のこと。) 他の固体形態は、クリーム、ペースト、他のトポロジー応用などを包含する。

10

20

30

【 0 1 7 9 】

リポソームは、治療的ポリペプチドを対象に、例えば、静脈内、腹腔内、髄腔内、筋内、皮下または経口投与、吸入、または鼻腔内投与を介して、デリバリーするための一の手段を提供する。リポソームは、水性コンパートメントの周囲にある 1 以上の脂質二重層からなる顕微鏡的小胞である。(一般的に、Bakker-Woudenbergら、*Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61, 1993; Kim, *Drugs* 46:618, 1993; Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in *Drug Delivery Systems* 3-24 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995) 参照のこと。) リポソームは、細胞膜と組成が類似し、結果として、リポソームは、安全に投与することができ、生物分解性である。調製方法に依存して、リポソームは、単層または多層であってもよく、リポソームは、0.02 μm ~ 10 μm の範囲で直径サイズを変化することができる。種々の薬剤をリポソーム中に被包することができ、疎水性薬剤は二重層中に分配され、親水性薬剤は内部水性スペース内に分配される。(例えば、Machyら、*Liposomes In Cell Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987); Ostroら、*American J. Hosp. Pharm.* 46:1576, 1989 参照のこと。) さらに、リポソームのサイズ、二重層の数、脂質組成、ならびにリポソームの電荷および表面特徴を変化させることによって、被包された薬剤の治療的有用性を調節することができる。

30

40

【 0 1 8 0 】

リポソームは、事実上あらゆる型の細胞に吸着することができ、次いで、ゆっくりと被包薬剤を放出することができる。別法では、吸着したリポソームは、食細胞によって取り込まれる。エンドサイトーシスの次に、リポソーム脂質のリソソーム内分解および被包された薬剤の放出が起こる (Scherphofら、*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368, 1985 参照)。静脈内投与後、小型リポソーム (0.1 ~ 1.0 μm) は、典型的に、主として肝臓および脾臓に配置される網内系の細胞によって取り込まれ、一方、30. μm より大きいリポソームは、肺に沈澱する。該網内系の細胞による小型リポソームの優先的取り込みは、化学治療剤をマクロファージへ、および肝臓の腫瘍へデリバリーするために使用された。

40

【 0 1 8 1 】

網内系は、高用量のリポソーム粒子での飽和、または薬理学的手段による選択的マクロファージ不活性化を包含するいくつかの方法によって、回避することができる。(Claass

50

enら、*Biochim. Biophys. Acta* 802:428, 1984参照。) さらに、糖脂質 - またはポリエチレングリコール - 誘導体化リン脂質のリポソーム膜中への組み込みは、網内系による取り込みを有意に減少させることが示された (Allenら、*Biochim. Biophys. Acta* 1068:133, 1991; Allenら、*Biochim. Biophys. Acta* 1150:9, 1993参照)。

【0182】

リポソームは、また、リン脂質組成を変化させることによって、または受容体もしくはカウンター受容体をリポソーム中に挿入することによって、特定の細胞または器官を標的とするように調製することができる。例えば、高含量の非イオン性界面活性剤を用いて調製されたリポソームは、肝臓を標的化するために用いられている (例えば、日本特許第04-244,018号、Hayakawaら; Katoら、*Biol. Pharm. Bull.* 16:960, 1993参照)。これらの処方は、ダイズホスファチジルコリン、 - トコフェロール、およびエトキシ化水素化ヒマシ油 (H C O - 6 0) をメタノール中で混合し、該混合物を真空下で濃縮し、次いで、該混合物を水で再構成することによって調製された。ダイズ由来ステリルグルコシド混合物 (SG) およびコレステロール (Ch) を用いるジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のリポソーム処方は、肝臓を標的化することが示された。 (Shimizuら、*Biol. Pharm. Bull.* 20:881, 1997参照。)

【0183】

別法では、抗体、抗体フラグメント、炭水化物、ビタミンおよび輸送タンパク質などの種々の標的化カウンター受容体をリポソームの表面に結合することができる。例えば、肝臓を標的化するために、リポソームを側鎖型ガラクトシルリピド誘導体で修飾して、肝臓細胞の表面上に排他的に発現されるアシアロ糖蛋白 (ガラクトース) 受容体を標的化することができる。 (KatoおよびSugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287, 1997; Murahashiら、*Biol. Pharm. Bull.* 20:259, 1997参照。) 組織標的化へのより一般的なアプローチにおいて、標的細胞によって発現されるカウンター受容体に特異的なビオチン化抗体で標的細胞を予め標識する。 (Harasymら、*Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99, 1998参照。) 遊離抗体の血漿除去後、ストレプトアビジンにコンジュゲートされたリポソームを投与する。別のアプローチにおいて、標的化抗体を直接リポソームに結合させる。 (Harasymら、(上掲) 参照。)

【0184】

ポリペプチドおよび抗体は、タンパク質マイクロカプセル化の標準的な技術を用いて、リポソーム内に被包することができる。 (例えば、Andersonら、*Infect. Immun.* 31:1099, 1981; Andersonら、*Cancer Res.* 50:1853, 1990; Cohenら、*Biochim. Biophys. Acta* 1063:95, 1991; Alvingら、"Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology* (Vol. III) 317 (Gregoriadis, ed., CRC Press, 2nd ed. 1993); Wassefら、*Meth. Enzymol.* 149:124, 1987参照。) 上記のように、治療上有用なリポソームは、種々の成分を含有しうる。例えば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含みうる。 (Allenら、*Biochim. Biophys. Acta* 1150:9, 1993参照。)

【0185】

分解性ポリマーマイクロスフェアは、治療タンパク質の高い全身性レベルを維持するように設計された。マイクロスフェアは、ポリ(ラクチド - コ - グリコリド) (PLG)、ポリアンヒドリド、ポリ(オルトエステル)、非生物分解性エチルビニルアセテートポリマーなどの分解性ポリマーから調製され、ここに、タンパク質はポリマー中に捉えられる。 (例えば、GombotzおよびPettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332, 1995; Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems* 51-93 (Ranade and Hollinger, eds., CRC Press 1995); RoskosおよびMaskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems* 45-92 (Sanders and Hendren, eds., Plenum Press 1997); Bartusら、*Science* 281:1161, 1998; Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153, 1998; Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548, 1998参照。) ポリエチレングリコール (PEG) でコートされたナ

10

20

30

40

50

ノスフェアもまた、治療タンパク質の静脈内投与のための担体を提供することができる。  
( 例えば、Grefら、Pharm. Biotechnol. 10:167, 1997 参照。 )

【 0 1 8 6 】

他の投与形態は、例えば、AnselおよびPopovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lea & Febiger, 5th ed. 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995) およびRanade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996) に示されるように、当業者によって工夫されることがある。

【 0 1 8 7 】

本明細書に記載の医薬組成物は、また、組み合わせ治療との関係でも使用されうる。「組み合わせ治療」なる語は、本明細書中で使用される場合、対象に少なくとも1の治療上有効量のVEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質および別の治療剤を含む二重特異的結合性タンパク質を投与することを示す。例えば、癌免疫治療との関連で、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を含む組成物は、化学治療または放射線と組み合わせて、脈管形成阻害剤として使用できる。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、通常の型の化学治療または放射線と相乗作用することができる。該二重特異的結合性タンパク質は、さらに、腫瘍負荷を減少させることができ、化学治療剤による有効な死滅を可能にする。

【 0 1 8 8 】

脈管形成阻害活性を実証する本発明の組成物は、種々のサイトカインおよび共同刺激/阻害分子を包含する免疫調節化合物と共に使用することができる。これらは、限定するものではないが、抗-癌免疫応答を刺激するサイトカインの使用を包含する。例えば、IL-2およびIL-12の併用は、T細胞リンパ腫、扁平上皮細胞癌腫、および肺癌において有益な効果を示す。(Zakiら、J. Invest. Dermatol. 118:366-71, 2002; Liら、Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 127:1319-24, 2001; Hirakiら、Lung Cancer 35:329-33, 2002 参照。)さらに、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質は、CD137の活性化(Wilcoxら、J. Clin. Invest. 109:651-9, 2002 参照)またはCTLA4の阻害(Chambersら、Ann. Rev. Immunol. 19:565-94, 2001)などの、免疫に基づくエフェクター細胞上に見出される種々の細胞表面分子を共同刺激する試薬と組み合わせることができた。別法では、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、TRAIL関連受容体と相互作用することによって腫瘍細胞アポトーシスを誘導する試薬と共に使用することができた。(例えば、Takedaら、J. Exp. Med. 195:161-9, 2002; Srivastava, Neoplasia 3:535-46, 2001 参照。)かかる試薬は、TRAILリガンド、TRAILリガンド-Ig融合物、抗-TRAIL抗体などを包含する。

【 0 1 8 9 】

他のバリエーションにおいて、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、脈管形成を特異的に標的化しないモノクローナル抗体治療と組み合わせて使用される。かかる組み合わせ治療は、癌の治療に特に有用であり、ここに、モノクローナル抗体の使用、特に腫瘍発現抗原に対する抗体の使用は、乳腺細胞癌腫(トラスツツマブ(trastuzumab)またはHERCCEPTIN<sup>R</sup>(登録商標))および大腸癌腫(セツキシマブ(cetuximab)またはERBITUX<sup>R</sup>)を包含する多くの腫瘍のための標準的なプラクティスとなっている。

【 0 1 9 0 】

医薬組成物は、本明細書に記載の治療組成物を含む容器を含むキットとして供給されうる。治療組成物は、例えば、単一または複数回投与のための注射溶液の形態で、または注射前に復元される滅菌粉末として、提供することができる。別法では、かかるキットは、治療組成物の投与のための乾燥粉末ディスペンサー、液体エーロゾル発生器、またはネブライザーを含むことができる。かかるキットは、さらに、医薬組成物の指示および用法に

10

20

30

40

50

ついて書かれた情報を含んでいてもよい。

【0191】

B. 癌治療

1. 癌の種類

本発明にしたがう治療に応じやすい癌は、充実性腫瘍の存在によって特徴付けられる癌を包含する。以前に議論したように、腫瘍組織中の血管の量は、充実性腫瘍形成を含む癌の強力な負の予後指標であり（例えば、Weidnerら、（1992）（上掲）；Weidnerら、（1993）（上掲）；Liら、（上掲）；Fossら、（上掲）参照）、シグナル分子のVEGFおよびFGFの両方のファミリーが充実性腫瘍に関連する新規な血管の発達において重要な役割を果たすようである。下記の表4は、標的組織によって優勢に組織化された充実性腫瘍形成によって特徴付けられるいくつかの癌を挙げる。

【0192】

## 【表3】

表4：充実性腫瘍形成を含む例示的な癌

1.	頭頸部癌	
a.	脳	
b.	口腔	
c.	中咽頭	
d.	鼻咽頭	
e.	下咽頭	
f.	鼻腔および副鼻腔	10
g.	咽頭	
h.	唇	
2.	肺癌	
a.	非小細胞癌腫	
b.	小細胞癌腫	
3.	消化管癌	20
a.	結腸直腸癌	
b.	胃癌	
c.	食道癌	
d.	肛門癌	
e.	肝外胆管癌	
f.	ファーテー膨大部の癌	
g.	消化管間質腫瘍 (GIST)	
4.	肝臓癌	
a.	肝細胞アデノーマ	
b.	肝細胞癌腫	
5.	乳癌	30
6.	婦人科癌	
a.	子宮頸癌	
b.	卵巣癌	
c.	膣癌	
d.	外陰癌	
e.	妊娠性絨毛性新生物	
f.	子宮癌	

7.	尿路癌	
a.	腎臓癌	
b.	前立腺癌	
c.	膀胱癌	
d.	陰茎癌	
e.	尿道癌	
8.	膀胱癌	
9.	神経学的腫瘍	10
a.	星状細胞腫およびグリア芽腫	
b.	原発性CNSリンパ腫	
c.	髓芽腫	
d.	胚細胞腫瘍	
e.	網膜芽腫	
10.	内分泌腺新生物	
a.	甲状腺癌	
b.	膵臓癌	
1).	島細胞腫瘍	20
a).	インスリノーマ	
b).	グルカゴノーマ	
c.	褐色細胞腫	
d.	副腎癌腫	
e.	カルチノイド腫瘍	
f.	副甲状腺癌腫	
g.	松果腺新生物	
11.	皮膚癌	30
a.	悪性黒色腫	
b.	扁平上皮細胞癌腫	
c.	基底細胞癌腫	
d.	カポジ肉腫	

1 2 . 骨癌	
a . 骨芽細胞腫	
b . 骨軟骨腫	
c . 骨肉腫	
1 3 . 結合組織新生物	
a . 軟骨芽細胞腫	
b . 軟骨腫	
1 4 . 小児癌	10
a . 脳癌	
b . 神經芽細胞腫	
c . ウィルムス腫瘍 (腎芽細胞腫)	
d . 黄紋筋肉腫	
e . 網膜芽腫	
1 5 . 免疫治療感受性癌	
a . 黒色腫	
b . 腎臓癌	20
c . 乳癌	
d . 前立腺癌	
e . 結腸直腸癌	
f . 子宮頸癌	
g . 卵巣癌	
h . 肺癌	

## 【 0 1 9 3 】

したがって、ある特定の具体例において、本発明に記載の V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、充実性腫瘍、例えば、表 4 に挙げられる癌のいずれかの存在によって特徴付けられる癌を治療するために使用される。例えば、いくつかの具体例において、本発明にしたがって治療されるべき癌は、下記のものから選択される。頭頸部癌（例えば、口腔、中咽頭、鼻咽頭、下咽頭、鼻腔および副鼻腔、咽頭、唇、または唾液腺の癌）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌、小細胞癌腫、または中皮腫）、消化管癌（例えば、結腸直腸癌、胃癌、食道癌、または肛門癌）、消化管間質腫瘍（G I S T ）、膵臓腺癌、膵腺房細胞癌腫、小腸の癌、肝臓または胆道系の癌（例えば、肝細胞アデノーマ、肝細胞癌腫、血管肉腫、肝外または肝内胆管肉腫、ファーテー膨大部の癌、または胆囊癌）、乳癌（例えば、転移性乳癌または炎症性乳癌）、婦人科癌（例えば、子宮頸癌、卵巣癌、卵管癌、腹膜癌腫、腫瘍、外陰癌、妊娠性絨毛性新生物、または子宮内膜癌もしくは子宮肉腫を包含する子宮癌）、尿路の癌（例えば、前立腺癌、膀胱癌、陰茎癌、尿道癌、または腎臓癌、例えば、腎孟および尿管を包含する腎細胞癌腫または移行細胞癌腫）、精巣癌、中枢神経系（C N S ）の癌、例えば、頭蓋内腫瘍（例えば、星状細胞腫、未分化星状細胞腫、グリア芽腫、乏突起膠腫、未分化乏突起膠腫、上衣細胞腫、原発性C N S リンパ腫、髄芽腫、胚細胞腫瘍、松果腺新生物、髄膜腫、下垂体腫瘍、神経鞘の腫瘍（例えば、神経鞘腫）、脊索腫、頭蓋咽頭腫、脈絡叢腫瘍（例えば、脈絡叢癌腫）、またはニューロンまたはグリア起源の他の頭蓋内腫瘍、または脊髄の腫瘍（例えば、神經鞘腫、髄膜腫）、内分泌腺新生物（例えば、甲状腺癌、例えば、甲状腺癌腫、髄様癌、または甲状腺リンパ腫、膵臓内分泌腺腫瘍、例えば、インスリノーマまたはグルカゴノーマ、副腎癌腫、例えば、褐色細胞腫、カルチノイド腫瘍、ま

30

40

50

たは副甲状腺癌腫)、皮膚癌(例えば、扁平上皮細胞癌腫、基底細胞癌腫、カボジ肉腫、または悪性黒色腫、例えば、眼球内黒色腫)、骨癌(例えば、骨肉腫、例えば、オステオサルコーマ、骨軟骨腫、またはユーリング肉腫)、多発性骨髄腫、緑色腫、軟組織肉腫(例えば、線維腫または線維組織球腫瘍)、平滑筋または骨格筋の腫瘍、血管またはリンパ管周囲の腫瘍(例えば、カボジ肉腫)、滑液腫瘍、中皮腫瘍、神経索腫瘍、傍神経節腫瘍、骨外性軟骨性または骨性腫瘍、および多能性間葉性腫瘍。

#### 【0194】

いくつかのバリエーションにおいて、治療されるべき癌は、小児癌、例えば、脳癌、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍(腎芽細胞腫)、黄紋筋肉腫、網膜芽腫、または肝芽腫である。

10

#### 【0195】

他のバリエーションにおいて、癌は、免疫治療感受性癌、例えば、黒色腫、腎臓癌、乳癌、前立腺癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、卵巣癌、または肺癌である。

#### 【0196】

上記の癌のいくつかは、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果を評価するための関連する動物モデルのいくつかを含め、下記でさらに詳細に論じる。

#### 【0197】

##### a. 前立腺癌

前立腺癌は、膀胱の下および直腸の前に見られる男性生殖器系における腺内の異常成長である。ほとんど全ての前立腺癌は、前立腺における分泌性腺細胞から生じるので、前立腺癌である。アメリカ合衆国において、前立腺の癌は、男性における一般的な悪性の癌であり、肺癌に次いで2番目に多い。前立腺の癌腫は、主に、年輩の男性の腫瘍であり、しばしば、広がっているときは治療に応答し、局在化しているときは治癒しうる。男性の17%が生涯で前立腺癌と診断されると見積もられる。該腫瘍は、一般的に、小さく、よく定義付けられた病変として生じ、しばしば、多重腫として存在することができる(Villersら、1992)。進行は、典型的には精嚢、射精管および骨盤リンパ節、およびより進行したステージでは、肝臓および肺に、局所的かつ遠隔である。いったん転移が起これば、癌細胞増殖速度が加速する。

20

#### 【0198】

可溶性FGF受容体および抗-VEGF-A抗体を含む二重特異的結合性組成物の腫瘍応答に対する効果は、実施例12に提供されるように、前立腺癌のために利用可能なマウスモデルにおいて評価できる(Ahmadら、Expert Rev Mol Med, 10:e16 (2008)によって概説される)。

30

#### 【0199】

##### b. 黒色腫

表在拡大型黒色腫は、最も一般的な黒色腫の型である。10個のうち約7個(70%)がこの型である。それらは、主として、中年の人々に起こる。女性における最も一般的な場所は足であるが、男性においては、胴体、特に背中において、より一般的である。それらは、皮膚の表面を介して広がることによって開始する傾向があり、このことは、肥大生长期(radial growth phase)として知られている。黒色腫が該ステージで除去されれば、治癒の可能性が非常に高い。黒色腫が除去されなければ、皮膚の層の深くに向かって成長し始めるであろう。次いで、血流またはリンパ系において、体の他の部分へ広がる危険性がある。結節型黒色腫は、ほとんどの場合、腰または背中に起こる。中年の人々に最も一般的に見られる。それは、除去されなければ、皮膚の深くに向かって非常に迅速に成長する傾向がある。該型の黒色腫は、しばしば、皮膚表面の残部上に隆起し、瘤のように感じる。非常に暗い茶色-黒色または黒色でありうる。悪性黒子型黒色腫は、特に年輩の人々において、顔に最も一般的に見られる。それは、ゆっくりと成長し、数年かけて発現することもある。末端型黒色腫は、通常、手のひら、足の裏または足指の爪の周辺に見られる。他の非常に稀な型の皮膚の黒色腫は、メラニン欠乏性黒色腫(黒色腫がその色素を失

40

50

い、白色領域として現れる)および線維形成性黒色腫(線維性瘢痕組織を含有する)を包含する。悪性黒色腫は、皮膚以外の体の部分において始まることができるが、非常に稀である。影響を及ぼされうる体の部分は、眼、口、指の爪の下(爪下黒色腫として知られる)、外陰または膣組織、または内部である。

#### 【0200】

ほとんどの黒色腫は、正常な皮膚の外見に変化を伴って始まる。これは、異常な新しい黒子のように見える。3分の1未満が既存の黒子において発現する。黒子と黒色腫の違いを示すことは困難であるが、下記のチェックリストを用いて手助けすることができる。それは、A B C Dリストとして知られている。非対称 - 通常の黒子は、普通、形状が対称的である。黒色腫は、不規則または非対称になりやすい。境界 - 黒子は通常、よく定義付けられた規則的な境界を有する。黒色腫は、ギザギザになった縁を有する不規則な境界を有する傾向が強い。色 - 黒子は、通常、一様な茶色である。黒色腫は、多色を有する傾向がある。黒色腫は、クロ、赤、ピンク、白または青みを帯びた色と混合した茶色の様々に代わる色合いでありうる。直径 - 黒子は、通常、鉛筆の平滑末端(直径で約6mm)以下である。黒色腫は、通常、直径が7mmよりも大きい。通常の黒子は、皮膚から隆起することができ、および/または毛で覆われることもある。黒色腫では、搔痒、瘡蓋形成または出血も起こる。これらは、あまり一般的ではない徴候ではあるが、無視するべきではない(cancerbaccupインターネットウェブサイト)。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、Hermansら、Cancer Res. 63:8408-13, 2003; Ramontら、Exp. Cell Res. 29:1-10, 2003; Safwatら、J. Exp. Ther. Oncol. 3:161-8, 2003; およびFidler, Nat New Biol. 242:148-9, 1973に記載のモデルに類似するネズミ黒色腫モデルにおいて評価することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0201】

##### c. 腎細胞癌腫

腎細胞癌腫(尿細管の細胞における癌性変化を含む腎臓癌の形態)は、成人において最も一般的な腎臓癌の型である。なぜ細胞が癌になるのかは分かっていない。喫煙歴は、腎細胞癌腫を発症するリスクを大いに増加させる。幾人かの人々は、腎細胞癌腫を発症する高いリスクを遺伝しているかもしれない場合があり、腎臓癌の家族歴はリスクを増加する。脳の毛細管に影響を及ぼす遺伝病であるフォン・ヒッペル・リンドウ病の人々は、一般に、腎細胞癌腫を発症する。透析治療を必要とする腎臓障害もまた、腎細胞癌腫を発症するリスクを増加する。最初の症状は、通常、尿中の血液である。時折、治療の腎臓が関与する。癌は、ほとんどの場合、肺および他の器官に、容易に転移し、または広がり、患者の約3分の1が診断時に転移している(Medline Plus Medical Encyclopediaインターネットウェブサイト)。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する影響は、Sayersら、Cancer Res. 50:5414-20, 1990; Salupら、Immunol. 138:641-7, 1987; およびLuanら、Transplantation 73:1565-72, 2002に記載のモデルに類似したネズミ腎細胞癌腫モデルにおいて評価できる。

#### 【0202】

##### d. 子宮頸癌

子宮頸は、膣へ通じる子宮の頸部である。子宮頸癌(「cervical carcinoma」ともいう)は、子宮頸の表面にある異常な細胞から発症する。子宮頸癌は、女性を襲う最も一般的な癌の1つである。子宮頸癌は、通常、子宮頸の表面にある細胞における形成異常、前癌状態の変化が先立つ。これらの異常な細胞は、侵襲性癌に進行することができる。いったん癌が発症すれば、それは4つのステージを経て進行することができる。ステージは、癌の広がりの程度によって定義付けられる。癌が広がれば広がるほど、治療が大規模になる傾向にある。2つの主要な型の子宮頸癌がある。すなわち、(1)扁平上皮(squamous)型(類表皮癌) : 最も一般的な型であり、子宮頸癌の約80%~85%を占める。該癌は、性感染症によって引き起こされうる。一のかかる性疾患は、ヒトパピローマウイルスで

あり、性病いぼを引き起こす。癌性腫瘍は、子宮頸上または中に成長する。該癌は、一般に、子宮頸の表面において始まり、パップスメア (Pap smear) によって初期に診断される。(2)腺癌：該型の子宮頸癌は、子宮頸管における頸管腺中の組織から発症する。初期の子宮頸癌は、通常、症状がない。該癌は、通常、パップスメアおよび骨盤内診察によって検出される。したがって、性的活動を始めるとすぐにパップスメアおよび骨盤内診察を受け始めるべきである。性交経験のない健康な若い女性は、18才で最初の骨盤内診察を受けるべきである。子宮頸癌の後期では、例えば、月経期の間、性交の後、または月経閉止後などの予想外の時期に異常な膣出血または血痕のある分泌物が引き起こされる。異常な膣分泌物は、濁っていたり、血に染まっていることがあり、または異臭を伴う粘液を含んでいることもある。該癌の進行したステージでは、痛みが引き起こされる (University of Michigan Health Systemインターネットウェブサイト)。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、Ahnら、Hum. Gene Ther. 14:1389-99, 2003; Hussainら、Oncology 49:237-40, 1992; およびSenguptaら、Oncology 48:258-61, 1991に記載のモデルに類似したネズミ子宮頸癌モデルにおいて評価できる。

10

#### 【0203】

##### e. 頭頸部腫瘍

頭頸部のほとんどの癌は、癌腫と呼ばれる型である（特に、扁平上皮細胞癌腫）。頭頸部の癌腫は、口、鼻、喉または耳の粘膜 (lining)、または舌を覆う表層を形成する細胞において始まる。しかしながら、頭頸部の癌は、他の型の細胞から始まることもできる。リンパ腫は、リンパ系の細胞から発症する。肉腫は、筋肉、軟骨または血管を形成する支持細胞 (supportive cell) から発症する。黒色腫は、眼および皮膚に色を与えるメラノサイトと呼ばれる細胞から始まる。頭頸部癌の症状は、その場所に依存し、例えば、舌の癌は、不明瞭な発語を引き起こしうる。最も一般的な症状は、2、3週間以内で回復しない頭頸部における潰瘍またはヒリヒリする領域、嚥下が困難なこと、または咀嚼もしくは嚥下時の疼痛、呼吸または発語のトラブル、例えば、持続的なゼーゼーとした呼吸、不正確な発語またはしわがれた声、口内の麻痺した感覚、持続的な鼻詰まり、または鼻血、持続的な耳痛、耳鳴り、または難聴、口または首の腫れ物または塊、顔または上顎の痛みであり、喫煙または嗜みタバコを嗜む人々において、前癌状態の変化は、口の粘膜または舌上で起こることができる。これらは、持続性の白色斑点（白板症）または赤色斑点（紅板症）として現れることがある。それらは、通常、痛みがないが、時折、ヒリヒリすることがあり、出血しうる（Cancerbacupインターネットウェブサイト）。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、Kuriakoseら、Head Neck 22:57-63, 2000; Cao et al., Clin. Cancer Res. 5:1925-34, 1999; Hierら、Laryngoscope 105:1077-80, 1995; Braakhuisら、Cancer Res. 51:211-4, 1991; Baker, Laryngoscope 95:43-56, 1985; およびDongら、Cancer Gene Ther. 10:96-104, 2003に記載のモデルに類似したネズミ頭頸部腫瘍モデルにおいて評価できる。

20

#### 【0204】

##### f. 脳癌

脳組織において始まる腫瘍は、脳の原発性腫瘍として知られている。原発性脳腫瘍は、それらが始まる細胞の型または脳の部位にしたがって名付けられる。最も一般的な原発性脳腫瘍は、グリオーマである。それらは、グリア細胞において始まる。多くの型のグリオーマがある。(1)星状細胞腫 - 該腫瘍は、星状細胞と呼ばれる星の形状をしたグリア細胞から生じる。成人において、星状細胞腫は、ほとんどの場合、大脳において生じる。子供において、それらは、脳幹、大脳、および小脳において起こる。グレードI-IIの星状細胞腫は、時折、未分化星状細胞腫と呼ばれる。グレードIVの星状細胞腫は、通常、多形グリア芽細胞腫と呼ばれる。(2)脳幹グリオーマ - 該腫瘍は、脳の最も低部で起こる。脳幹グリオーマは、ほとんどの場合、幼児および中年の成人において診断される。(3)上衣腫 - 該腫瘍は、心室または脊髄の中心管の内壁を覆う細胞から生じる。それらは、

30

40

50

子供および若い成人において最も一般的に見られる。(4)オリゴデンドログリオーマ-この稀な腫瘍は、神経を覆い、保護する脂肪物質を形成する細胞から生じる。これらの腫瘍は、通常、大脳において起こる。それらは、ゆっくりと成長し、通常、脳組織の周囲に広がらない。それらは、ほとんどの場合、中年の成人に起こる。脳腫瘍の症状は、腫瘍のサイズ、型、および場所に依存する。症状は、腫瘍が神経を圧迫し、脳のある特定の領域を損傷させる場合に生じる。それらは、また、脳が膨張し、頭蓋内で流体が増加する場合にも生じる。これらは、脳腫瘍の最も一般的な症状である：頭痛（通常、朝に激しい）、吐き気または嘔吐、発語、視覚または聴覚の変化、平衡または歩行の問題、感情、性格または集中力の変化、記憶の問題、筋肉の引きつりまたは単収縮（発作または痙攣）、および腕または足の無感覚またはうずき（National Cancer Instituteのインターネットウェブサイト）。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、Schuenemanら、Cancer Res. 63:4009-16, 2003; Martinetら、Eur. J. Surg. Oncol. 29:351-7, 2003; Belloら、Clin. Cancer Res. 8:3539-48, 2002; Ishikawaら、Cancer Sci. 95:98-103, 2004; Degenら、J. Neurosurg. 99:893-8, 2003; Engelhardら、Neurosurgery 48:616-24, 2001; Watanabeら、Neurol. Res. 24:485-90, 2002; and Lumniczkyら、Cancer Gene Ther. 9:44-52, 2002に記載のモデルに類似するグリオーマ動物モデルにおいて評価できる。

10

#### 【0205】

##### g. 甲状腺癌

乳頭および濾胞性甲状腺癌は、全ての甲状腺癌の80~90パーセントを占める。両型は、甲状腺の濾胞性細胞において始まる。ほとんどの乳頭および濾胞性甲状腺癌は、ゆっくりと成長する傾向にある。それらが初期に検出されれば、治療はほとんど成功する。甲状腺臓様癌は、甲状腺癌事象の5~10パーセントを占める。それは、C細胞に生じ、濾胞性細胞に生じない。甲状腺臓様癌は、体の他の部分に広がる前に見出され、治療された場合、制御が容易である。未分化甲状腺癌は、極めて稀な型の甲状腺癌である（事象のたった1~2パーセント）。それは、濾胞性細胞に生じる。該癌細胞は、大変異常であり、認識するのが困難である。該癌細胞は非常に速く成長し、広がるので、該型の癌は、通常、制御が非常に困難である。初期の甲状腺癌は、しばしば、症状を引き起こさない。しかしながら、癌が成長すると、症状は、のど仏近くの首の全部にある塊または小瘤、しゃがれ声または正常な声で話すことが困難、（特に首の）腫れたリンパ節、嚥下または呼吸が困難、または喉もしくは首の痛みを含む（National Cancer Instituteのインターネットウェブサイト）。VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、Quidvilleら、Endocrinology 145:2561-71, 2004（マウスモデル）；Cranstonら、Cancer Res. 63:4777-80, 2003（マウスモデル）；Zhangら、Clin Endocrinol (Oxf). 52:687-94, 2000（ラットモデル）；およびZhangら、Endocrinology 140:2152-8, 1999（ラットモデル）に記載のモデルに類似のネズミまたはラット甲状腺腫瘍モデルにおいて評価できる。

20

30

#### 【0206】

##### h. 肝臓癌

2つの異なる型の原発性肝臓癌がある。最も一般的な種類は、肝癌（hepatoma）または肝細胞癌腫（HCC）であり、肝臓の主要細胞（肝細胞）から生じる。該型は、通常、肝臓に制限されるが、時折、他の器官に広がる。それは、主に、肝硬変と呼ばれる肝臓病の人々において起こる。また、線維層板肝癌（Fibrolamellar hepatoma）と呼ばれる稀なサブタイプもあり、若い人々に起こることがあり、以前の肝臓病に関連しない。他の型の原発性肝臓癌は、胆管の内壁を覆う細胞において開始するので、胆管癌腫（cholangiocarcinoma）または胆管癌（bile duct cancer）と呼ばれる。肝癌を発症するほとんどの人々は、通常、肝臓の肝硬変とよばれる症状も有する。これは、感染および長期間にわたる大量のアルコール摂取を含む種々の原因のために、肝臓中に残る微細な傷である。しかしながら、肝硬変を有する人のほんの一部が原発性肝臓癌を発症する。B型肝炎またはC型肝炎のいずれかのウイルス感染が肝臓癌を引き起こすことができ、また、肝硬変の原因に

40

50

もあり、肝癌を発症するリスクを増加させる。体内に過剰な鉄の蓄積をもたらすヘマクロマトーシス (haemochromatosis) と呼ばれる稀な症状を有する人々は、肝癌を発症する機会が多い。かくして、本発明の VEGF-A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、肝細胞癌腫に関連する状態または症状の少なくとも 1 つを治療、予防、該状態または症状の進行を阻害、発症を遅延、および / または重篤度を減少させ、または阻害するために使用されうる。肝細胞癌腫は、肝炎 (例えば、A 型肝炎、B 型肝炎、C 型肝炎および D 型肝炎) 感染に関連していてもよく、または関連していないなくてもよい。

#### 【0207】

VEGF-A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、形質転換成長因子 (TGF- $\beta$ ) 単独の (Jhappanら、Cell, 61:1137-1146, 1990; Sandgrenら、Mol. Cell Biol., 13:320-330, 1993; Sandgrenら、Oncogene 4:715-724, 1989; および Lee ら、Cancer Res. 52:5162-5170, 1992)、または c-myc と組み合わせた (Murakami ら、Cancer Res., 53:1719-1723, 1993) 過剰発現、変異した H-ras (Saitoh ら、Oncogene 5:1195-2000, 1990)、HbsAg および HBx をコードしている B 型肝炎ウイルス遺伝子 (Toshkov ら、Hepatology 20:1162-1172, 1994; Koike ら、Hepatology 19:810-819, 1994)、SV40 大型 T 抗原 (Sepulveda ら、Cancer Res. 49:6108-6117, 1989; Schirmacher ら、Am. J. Pathol., 139:231-241, 1991) および FGF19 (Nicholes ら、American Journal of Pathology, 160:2295-2307, 2002) を包含する肝細胞癌腫トランスジェニックマウスモデルにおいて評価できる。  
10

#### 【0208】

##### i. 肺癌

VEGF-A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の腫瘍応答に対する効果は、ヒト小 / 非小細胞肺癌腫異種移植片モデルにおいて評価できる。簡単に言うと、ヒト腫瘍を免疫欠損マウス中に移植し、これらのマウスを、VEGF-A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を単独で含むか、または腫瘍成長を評価することによって治療の効力を明らかにするために使用することができる他の薬剤と共に含む二重特異的結合性タンパク質で処理する (Nemati ら、Clin. Cancer Res. 6:2075-86, 2000; および Hu ら、Clin. Cancer Res. 10:7662-70, 2004)。  
20

。

#### 【0209】

##### 2. 充実性腫瘍のための終点および抗腫瘍活性

各プロトコールは、異なる腫瘍応答評価を定義しうるが、RECIST (充実性腫瘍における応答評価基準 (Response evaluation Criteria in solid tumors)) 基準は、近年、ナショナル・キャンサー・インスティチュート (National Cancer Institute) による腫瘍応答の評価のための推奨されるガイドラインであると考えられる (Therasse ら、J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216, 2000 参照)。RECIST 基準にしたがうと、腫瘍応答は、全ての測定可能な病変または転移の減少または排除を意味する。疾患は、一般的に、医学的写真または X 線、コンピューター断層撮影 (CT)、磁気共鳴映像法 (MRI)、または臨床検査 (病変が表在性である場合) によって明白に定義された縁を有し、少なくとも 1 次元で、通常の技術で  $\geq 20\text{ mm}$  またはスパイラル CT スキャンで  $\geq 10\text{ mm}$  と正確に測定できる病変を含む場合、測定可能とみなされる。測定不可能疾患は、通常の技術で  $< 20\text{ mm}$  またはスパイラル CT スキャンで  $< 10\text{ mm}$  の病変、および本当に測定できない病変 (小さすぎて正確に測定できない病変) を含む疾患を意味する。測定不可能疾患は、胸膜滲出、腹水、および間接的な形跡によって記録される疾患を包含する。  
40

#### 【0210】

客観的状態の基準は、充実性腫瘍応答を評価するためにプロトコールに必要とされる。代表的な基準は、下記のものを包含する。(1) 全ての検出可能な疾患の完全な消失、新たな病変無し、関連する症状無し、測定不可能疾患の形跡無しとして定義される、完全応

50

答（C R）、（2）標的病変の最長直径の合計で30%の減少として定義される、部分的応答（P R）、（3）標的病変の最長直径の合計で20%の増加またはいずれかの新規な病変の出現として定義される、進行性疾患（P D）、（4）C R、P Rまたは進行性疾患にふさわしくないものとして定義される、安定または応答無し。（Therasseら、（上掲）参照）。

#### 【0211】

腫瘍学の分野内で許容されるさらなる終点は、全生存（O S）、疾患のない生存（D F S）、客観的応答率（O R R）、進行までの時間（T T P）、および進行しない生存（P F S）を包含する（Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, April 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MD参照）。

10

#### 【0212】

##### 3. 組み合わせ癌治療

以前に論じたように、ある特定の具体例において、二重特異的V E G F - A抗体 / F G F R可溶性受容体の組み合わせは、血管新生障害の治療のための第2の薬剤と組み合わせて使用される。癌を治療するために使用する場合、本発明のアンタゴニストは、通常の癌治療、例えば、外科手術、放射線治療、化学治療、またはその組み合わせと組み合わせて使用されうる。ある特定の態様において、V E G F - A抗体 / 可溶性F G F受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質との組み合わせ癌治療に有用な他の治療剤は、他の抗脈管形成剤を包含する。いくつかの他の態様において、V E G F - A抗体 / 可溶性F G F受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質との組み合わせ治療に有用な他の治療剤は、腫瘍成長に関与する他の因子、例えば、E G F R、E r b B 2（H e r 2）、E r b B 3、E r b B 4、またはT N Fのアンタゴニストを包含する。いくつかの態様において、V E G F - A抗体 / 可溶性F G F受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、サイトカイン（例えば、腫瘍に対する免疫応答を刺激するサイトカイン）と共に投与される。癌治療に特に応じやすい例示的な組み合わせ治療は、下記においてさらに詳細に記載する。

20

#### 【0213】

a. 二重特異的抗体 / 可溶性受容体結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質と組み合わせた腫瘍関連抗原を標的とする抗体

30

抗体治療は、ある特定の腫瘍が独特の抗原、系統特異的抗原または正常細胞と比べて過剰量で存在する抗原のいずれかを展示するので、癌治療において特に成功的であった。モノクローナル抗体治療の抗腫瘍活性に関連するメカニズムの1つは、抗体依存性細胞障害（A D C C）である。A D C Cにおいて、モノクローナル抗体は、標的細胞（例えば、癌細胞）に結合し、該モノクローナル抗体の受容体を発現する特異的エフェクター細胞（例えば、N K細胞、単球、顆粒球）が該モノクローナル抗体 / 標的細胞複合体に結合して、標的細胞死をもたらす。本発明のある特定のバリエーションにおいて、V E G F - A抗体 / 可溶性F G F受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体と共に投与される。M A bの投与量および計画は、共投与される特異的抗体に帰する薬物動力学的および毒物動力学的特性に基づき、V E G F - A抗体 / 可溶性F G F受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質の投与に不隨しうるいずれの毒性も最小限にしながら、これらの効果を最適化すべきである。

40

#### 【0214】

V E G F - A抗体 / 可溶性F G F受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質および腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体との組み合わせ治療は、一次治療が失敗した場合に指示されることがあり、二次治療とみなされうる。本発明は、また、新規に診断され、かつ、以前に抗癌剤で治療されていない患者集団（「デ・ノボ患者」）および以前にいずれのモノクローナル抗体治療も受けていない患者（「ネイティブ患者」）における一次治療として該組み合わせを用いることを提供する。

50

## 【0215】

二重特異的結合性タンパク質は、また、腫瘍細胞のいずれもの直接的な抗体媒介性ADCの不在下で、腫瘍関連抗原に対するモノクローナル抗体との組み合わせ治療において有用である。例えば、免疫系における阻害シグナルを遮断する抗体は、免疫応答増加を導くことができる。例えば、(1)阻害機能を有するB7Rファミリーの分子、例えば、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4(CTLA-4)、プログラムされた死-1(PD-1)、BおよびTリンパ球アテニュエーター(BTLA)に対する抗体、(2)IL-10、TGF- $\beta$ のような阻害性サイトカインに対する抗体、および(3)抗-CD25またはCTLA-4のような抑制細胞の機能を消耗または阻害する抗体が含まれる。例えば、マウスおよびヒトの両方における抗-CTLA4 MAbは、免疫抑制調節T細胞(Tregs)の機能を抑制するか、またはT細胞上のCTLA-4のAPCもしくは腫瘍細胞上のB7-1もしくはB7-2分子への結合を介して伝達される阻害シグナルを阻害すると考えられる。

## 【0216】

表8は、VEGF-A抗体／可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質との組み合わせ治療が可能であることが承認または試験されているモノクローナル抗体の非限定的なリストである。

## 【表4】

表8：VEGF-A抗体／可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質と組み合わせて使用するためのモノクローナル抗体治療

標的	薬物名	臨床的適用	会社
TRAIL-R1	HGS-ETR1	癌	HGS
TRAIL-R2	HGS-ETR2	充実性腫瘍	HGS
CD40	SGN40	MM	Seattle Genetics
HER2	Herceptin	乳癌	Genentech
EGF-R	ABX-EGF	CRC, NSCLC, R-CC	Abgenix
EGF-R	EMD72000	充実性腫瘍	Merck
EGF-R	MDX-214	EGF-R-陽性腫瘍	Medarex
EGF-R	Erbitux	CRC	Imclone
$\alpha$ 5 $\beta$ 3インテグリン	Vitaxin	乾癬、前立腺癌	AME/Lilly
CD152	CTLA-4	癌	Medarex
CD49e	インテグリン $\alpha$ 5	癌	Protein Design Labs
MUC18 (TIM-様)	ABX-MA1	黒色腫	
TAG-72 $\mu$ g	Anatumomab	癌	
CD3	Ecromeximab	黒色腫	Kyowa Hakko
CD64 (Fc GRI)	AntiCD64	癌	Medarex
CEA	CEA-Cide	癌	Immunomedics
EpCAM	Panorex	結腸直腸癌	Centocor
Lewis-Y-Ag	SGN15	癌	Seattle Genetics

## 【0217】

b. VEGF-A抗体／可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質

いくつかの具体例において、本明細書に記載のVEGF-A抗体／可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、チロシンキナーゼ阻

10

20

30

40

50

害剤と組み合わせて使用される。チロシンキナーゼは、アデノシン三リン酸から標的タンパク質へのリン酸基の移動を触媒する酵素である。チロシンキナーゼは、受容体および非受容体タンパク質チロシンキナーゼとして分類することができる。それらは、成長因子による活性化を包含する種々の正常細胞プロセスにおいて重要な役割を果たし、種々の細胞型の増殖、生存および成長に影響を及ぼす。さらに、それらは、腫瘍細胞増殖を促進すると考えられ、抗アポトーシス効果を誘導し、脈管形成および転移を促進する。成長因子による活性化のほかに、体細胞変異によるタンパク質キナーゼ活性化が腫瘍発生の一般的なメカニズムである。同定される変異のいくつかは、B-Rafキナーゼ、FLT3キナーゼ、BCR-ABLキナーゼ、c-KITキナーゼ、上皮細胞増殖因子(EGFR)およびPDGFR経路にある。Her2、VEGFRおよびc-Metは、癌進行および腫瘍発生に関連する他の重要な受容体チロシンキナーゼ(RTK)経路である。多数の細胞プロセスがチロシンキナーゼによって開始するので、それらは、阻害剤の重要な標的として同定されている。

10

#### 【0218】

チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)は、細胞内で作用する小型分子であり、受容体および非受容体チロシンキナーゼの両方の触媒性チロシンキナーゼドメインへの結合について、アデノシン三リン酸(ATP)と競合する。該競合的結合は、成長、生存および脈管形成のようなシグナリング事象に関連するエフェクター機能を導く下流シグナリングの開始を遮断する。構造およびコンピューター的アプローチを用いて、多くの医学化学コンビナトリアルライブラリーから、チロシンキナーゼを阻害するいくつかの化合物が同定された。

20

#### 【0219】

ほとんどのTKIは、腫瘍細胞の直接的阻害により、または脈管形成の阻害により、腫瘍の成長を阻害すると考えられる。さらに、ソラフェニブ(sorafenib)およびスニチニブ(sunitinib)を包含するある特定のTKIは、VEGFR受容体によりシグナリングに影響を及ぼす。いくつかの場合において、TKIは、樹状細胞および他の内在的免疫細胞、例えば、NK細胞の機能を活性化させることが示された。このことは、近年、イマチニブ(imatinib)について動物モデルにおいて報告された。イマチニブは、樹状細胞およびNK細胞によってキナーゼ活性を増加させることが示されたTKIである(概説について、Smythら、NEJM 354:2282, 2006参照)。

30

#### 【0220】

BAY 43-9006(ソラフェニブ,Nexavar(登録商標))およびSU11248(スニチニブ,Sutent(登録商標))は、転移性腎細胞癌腫(RCC)における使用が近年承認されたTKIである。いくつかの他のTKIが種々の型の癌の治療について、後期および初期の開発段階にある。他のTKIは、限定するものではないが、イマチニブメシラート(Gleevec(登録商標), Novartis)、ゲフィチニブ(Gefitinib)(Iressa(登録商標), AstraZeneca)、エルロチニブ(Erlotinib)塩酸塩(Tarceva(登録商標), Genentech)、ヴァンデタニブ(Vandetanib)(Zactima(登録商標), AstraZeneca)、チピニフアニブ(Tipifarnib)(Zarnestra(登録商標), Janssen-Cilag)、ダサチニブ(Dasatinib)(Sprycel(登録商標), Bristol Myers Squibb)、ロナファルニブ(Lonafarnib)(Sarasar(登録商標), Schering Plough)、バタラニブ(Vatalanib)スクシナート(Novartis, Schering AG)、ラパニチブ(Lapatinib)(Tykerb(登録商標), GlaxoSmithKline)、ニロチニブ(Nilotinib)(Novartis)、レスタウロチニブ(Lestaurtinib)(Cephalon)、パゾパニブ(Pazopanib)塩酸塩(GlaxoSmithKline)、アクシチニブ(Axitinib)(Pfizer)、カネルチニブ(Canertinib)二塩酸塩(Pfizer)、ペルチニブ(Pelitinib)(National Cancer Institute, Wyeth)、タンデウチニブ(Tandutinib)(Millennium)、ボスチニブ(Bosutinib)(Wyeth)、セマキサニブ(Semaxanib)(Sugen, Taiho)、AZD-2171(AstraZeneca)、VX-680(Merck, Vertex)、EXEL-0999(Exelixis)、ARRY-142886(Array BioPharma, AstraZeneca)、PD-0325901(Pfizer)、AMG-706(Amgen)、BIBF-1120(Boehringer

40

50

Ingelheim)、S U - 6 6 6 8 (Taiho)、C P - 5 4 7 6 3 2 (OSI)、A E E - 7 8 8 (Novartis)、B M S - 5 8 2 6 6 4 (Bristol-Myers Squibb)、J N K - 4 0 1 (Celine)、R - 7 8 8 (Rigel)、A Z D - 1 1 5 2 H Q P A (AstraZeneca)、N M - 3 (Genzyme Oncology)、C P - 8 6 8 5 9 6 (Pfizer)、B M S - 5 9 9 6 2 6 (Bristol-Myers Squibb)、P T C - 2 9 9 (PTC Therapeutics)、A B T - 8 6 9 (Abbott)、E X E L - 2 8 8 0 (Exelixis)、A G - 0 2 4 3 2 2 (Pfizer)、X L - 8 2 0 (Exelixis)、O S I - 9 3 0 (OSI)、X L - 1 8 4 (Exelixis)、K R N - 9 5 1 (Kirin Brewerry)、C P - 7 2 4 7 1 4 (OSI)、E - 7 0 8 0 (Eisai)、H K I - 2 7 2 (Wyeth)、C H I R - 2 5 8 (Chiron)、Z K - 3 0 4 7 0 9 (Schering AG)、E X E L - 7 6 4 7 (Exelixis)、B A Y - 5 7 - 9 3 5 2 (Bayer)、B I B W - 2 9 9 2 (Boehringer Ingelheim)、A V - 4 1 2 (AVEO)、Y N - 9 6 8 D 1 (Advenchen Laboratories)、ミドスタウリン (Midostaurin) (Novartis)、ペリホシン (Perifosine) (AEterna Zentaris, Keryx, National Cancer Institute)、A G - 0 2 4 3 2 2 (Pfizer)、A Z D - 1 1 5 2 (AstraZeneca)、O N - 0 1 9 1 0 N a (Onconova)、およびA Z D - 0 5 3 0 (AstraZeneca) を包含する。

10

#### 【0221】

##### c. 化学治療の組み合わせ

ある特定の具体例において、V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体を含む二重特異的結合性タンパク質は、1 以上の化学治療剤と組み合わせて投与される。化学治療剤は、例えば、D N A または R N A に影響を及ぼし、細胞周期複製に干渉することによって、種々の様式の作用を有する。D N A レベルまたはR N A レベルで作用する化学治療剤の例は、抗代謝物 (例えば、アザチオプリン (Azathioprine)、シタラビン (Cytarabine)、フルダラビン (Fludarabine) ホスフェート、フルダラビン、ゲムシタビン (Gemcitabine)、シタラビン、クラドリビン (Cladribine)、カペシタビン (capecitabine) 6 - メルカブトプリン、6 - チオグアニン、メトトレキサート (methotrexate)、5 - フルオロウラシルおよびヒロキシ尿素 (hydroxyurea) )、アルキル化剤 (例えば、メルファラン (Melphalan)、ブスルファン (Busulfan)、シス - プラチニ (Cis-platin)、カルボプラチニ (Carboplatin)、シクロホスファミド、イソスファミド (Ifosfamide)、デカラバザン (Dacarabazine)、プロカルバジン (Procarbazine)、クロラムブシル (Chlorambucil)、チオテパ (Thiotepa)、ロムスチン (Lomustine)、テモゾラミド (Temozolamide) )、抗有糸分裂剤 (例えば、ビノレルビン (Vinorelbine)、ニンクリスチン (Vincristine)、ビンブラスチニ (Vinblastine)、ドセタキセル (Docetaxel)、パクリタキセル (Paclitaxel) )、トポイソメラーゼ阻害剤 (例えば、ドクソルビシン (Doxorubicin)、アムサクリン (Amsacrine)、イリノテカン (Irinotecan)、ダウノルビシン (Daunorubicin)、エピルビシン (Epirubicin)、マイトマイシン (Mitomycin)、ミトキサントロン (Mitoxantrone)、イダルビシン (Idarubicin)、テニポシド (Teniposide)、エトポシド (Etoposide)、トポテカン (Topotecan) )、抗生物質 (例えば、アクチオマイシンおよびブレオマイシン)、アスパラギナーゼ、およびアントラサイクリン類、またはタキサン類である。

20

#### 【0222】

##### d. 放射線治療の組み合わせ

いくつかのバリエーションにおいて、V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、放射線治療と組み合わせて投与される。ある特定の腫瘍は、放射線照射または放射線医薬で治療することができる。放射線照射治療は、一般的に、切除不能または手術不可能な腫瘍および / または腫瘍転移を治療するために使用される。放射線治療は、典型的に、3 つの方法でデリバリーされる。遠隔照射は、体から離れて施され、ガンマ線 ( $^{60}\text{Co}$ ) および X 線を包含する。小線源治療は、線源、例えば、 $^{60}\text{Co}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{192}\text{Ir}$ 、または $^{125}\text{I}$ を標的組織と一緒に、または標的組織と接触させて用いる。

30

#### 【0223】

40

50

## e. ホルモン剤の組み合わせ

いくつかの具体例において、V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質は、ホルモンまたは抗ホルモンと組み合わせて投与される。ある特定の癌は、ホルモン依存性に関連し、例えば、卵巣癌、乳癌および前立腺癌を包含する。ホルモン依存性癌治療は、抗アンドロゲンまたは抗エストロゲン化合物の使用を含みうる。癌治療に使用されるホルモンおよび抗ホルモンは、エストラムスチン (Estramustine) ホスフェート、ポリエストラジオールホスフェート、エストラジオール、アナストロゾール (Anastrozole)、エキセメスタン (Exemestane)、レトロゾール (Letrozole)、タモキシフェン (Tamoxifen)、メゲストロール (Megestrol) アセテート、メドロキシプロゲステロン (Medroxyprogesterone) アセテート、オクトレオチド (Octreotide)、シプロテロン (Cyproterone) アセテート、ビカルツミド (Bicalutamide)、フルタミド (Flutamide)、トリトレリン (Tritorelin)、ロイプロレリン (Leuprolin)、ブセレリン (Buserelin) およびゴセレリン (Goserelin) を包含する。

10

## 【実施例】

## 【0224】

本発明は、さらに、下記の非限定的な実施例によって説明される。

## 【0225】

## 実施例1：V E G F - A を結合する抗体のパンニング (panning)

V E G F - A に結合する抗体は、D y a x F a b 3 1 0 ファージライブラリー (Dyax Corp., Cambridge, MA) をスクリーニングすることによって同定された。該ファージ抗体ライブラリーの選ばれた選択およびスクリーニング方法は、抗原 (V E G F - A<sub>1-6</sub><sub>5</sub>, R&D Systems) でコートされたポリスチレンイムノチューブ (NUNC, Denmark) を利用した。該抗体は、2、3ラウンドの選択後、ストリンジエンシーを増加させることによって単離された。第一世代の抗体は、F a b 様式であった。該可溶性 F a b 抗体は、M 1 u I (#R0198S, New England Biolabs, Beverly, MA) 酵素消化によって、M 1 3 ファージから g e n e I I I スタムプ (stump) を除去することによって生じた。同じ選択、スクリーニングおよび可溶化法を s c F v 様式の抗体に適用した。

20

## 【0226】

## 実施例2：V E G F - A - 結合性 F a b クローンの同定

V E G F - A を結合する F a b クローンは、プレートに基づく結合アッセイによって同定された。C o s t a r (#9018) 9 6 - ウェルプレートを 5 0  $\mu$  l の V E G F - A (R&D Systems) または P D G F - D (配列番号：80) ホモダイマーで、0.1 M N a H C O<sub>3</sub>、p H 9.6 中 0.6  $\mu$  g / m l にて、4 で一晩コートした。次の日に、プレートを 0.1% Tween - 20 / P B S (P B S T) で 3 回洗浄した。室温にて 1 時間、プロッキングのために各ウェルを 1 0 0  $\mu$  l の 2 % ミルク (#170-6404, Bio-Rad) / P B S T で満たした。アッセイプレートを次いで、P B S T で 3 回洗浄した。各ウェルを 2 5  $\mu$  l の 2 % ミルク / P B S T で満たし、次いで、2 5  $\mu$  l の F a b 上清で添加した。次いで、ウェルを混合し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを P B S T で 3 回洗浄した。F a b 検出のために、5 0  $\mu$  l の 2 % ミルク / P B S T 中における (1 : 4 0 0 0) 抗 - ヒト F a b 特異的 p A b - H R P (#31482, Pierce) を各ウェルに、室温で 1 時間加えた。次いで、プレートを P B S T で 3 回洗浄した。5 0  $\mu$  l の T M B (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) を各ウェルに加えて 1 5 分間展開させ、次いで、5 0  $\mu$  l の終止バッファー (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) を添加して反応をクエンチした。次いで、プレートをプレートリーダー上、4 5 0 n m で読み取った。

30

## 【0227】

## 実施例3：V E G F - A - 結合性 s F a b の s c F v への変換

ラムダ、カッパおよび重鎖可変領域を、ラウンド 2、A r m A および A r m B V E G F - A - パンニングした F a b D y a x ファージ D N A のプールから、各サブタイプのためのフレームワーク配列に対して向けられたプライマーを用いて 3 工程プロセスで增幅させた。最初のラウンドの P C R は、可変フレームワーク領域の各々を增幅し、ラウ

40

50

ンド 2 P C R 反応を容易にするための適当な突出部を付加する。ラウンド 2 P C R 反応は、適当な g l y / s e r リンカー配列を適切なラウンド 1 P C R 産物の末端に加え、ラウンド 3 P C R 反応は、可変軽鎖ラムダ、可変軽鎖カッパ、および可変重鎖産物をオーバーラップさせて、L H および H L の両方の方向において s c F v 産物を生じ、次いで、それを A p a L I / N o t I - 消化した P I M D 2 1 ファージディスプレーベクター中にクローン化した。

#### 【 0 2 2 8 】

実施例 4 : s V E G F R 2 に結合する V E G F を阻害する s F a b および s c F v の同定

V E G F - A F a b および s c F v クローンは、プレートに基づく中和アッセイによってスクリーンした。Costar (#9018) 96 - ウェルプレートを 100  $\mu$  l の抗 - 10  
ヒト I g G F c - 特異的抗体 (#109-005-098, Jackson Immunology) で、0.1 M  
N a H C O<sub>3</sub>、p H 9.6 中 1  $\mu$  g / m l にて、4 で一晩コートした。次の日に、プレートを 400 u l 0.1% Tween - 20 / P B S ( P B S T ) で 3 回洗浄した。ブロッキングのために、各ウェルを室温 ( R T ) で 1 時間、100  $\mu$  l の 1% B S A (#A30 20  
59-100G, SIGMA) / P B S T で満たした。プレートを P B S T で 3 回洗浄した。100  $\mu$  l の V E G F R 2 - F c ( 配列番号 : 81 ) を 1% B S A / P B S T 中 0.2  $\mu$  g / m l にて、室温で 1 時間各ウェルに加えた。同時に、別の 96 ウェルプレート (Costar 3357 ) 中、65  $\mu$  l の F a b または s c F v 上清を 65  $\mu$  l の 1% B S A / P B S T 中のビオ 20  
チン化 V E G F - A に、20 n g / m l にて、室温で 1 時間加えた。ブロックされたアッセイプレートを P B S T で 3 回洗浄した。各ウェルを室温で 1 時間、100  $\mu$  l の上清 / ビオチン化 V E G F - A 複合体で満たした。プレートを P B S T で 3 回洗浄した。100  $\mu$  l の 1% B S A / P B S T 中の ( 1 : 4000 ) ストレプトアビジン - H R P (#21124 , Pierce) を室温で 1 時間、各ウェルに加えた。次いで、プレートを P B S T で 3 回洗浄した。100  $\mu$  l の T M B (TMBW-1000-01, BioFX Laboratories) を各ウェルに加えて 20 分間展開させ、次いで、100  $\mu$  l の終止バッファー (STPR-1000-01, BioFX Laboratories) を加えて反応をクエンチした。次いで、プレートをプレートリーダー上、450 n m で読み取った。

#### 【 0 2 2 9 】

実施例 5 : 表面プラズモン共鳴 (Biacore) によるヒト V E G F - A アンタゴニストとヒト V E G F - A との相互作用の解離速度定数の測定

ヒト V E G F - A アンタゴニストを、ヒト V E G F - A に対する結合アフィニティーについて評価した。

#### 【 0 2 3 0 】

表面プラズモン共鳴を用いる解離速度定数にしたがう V E G F - A 。解離速度定数は、V E G F - A アンタゴニストと V E G F - A との相互作用について、表面プラズモン共鳴によって測定された。解離速度定数 (  $k_d$  ( s - 1 ) ) は、該複合体の安定性を反映する値である。それは濃度から独立しており、したがって、未知濃度の試料をスクリーニングおよびランキングするのに適当である。

#### 【 0 2 3 1 】

材料および方法 : 一連の実験は、V E G F - A に対する V E G F - A アンタゴニストの結合アフィニティーを測定するために完成された。結合速度論およびアフィニティー研究は、B i a c o r e T - 1 0 0 (商標) システム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上で実施された。方法は、B i a c o r e T 1 0 0 (商標) コントロールソフトウェア、v 1.1.1 を用いてプログラムされた。ヒト V E G F - A は、アミンカップリング化学 ( E D C : N H S ) を用いて、約 2 0 0 R U の密度まで、C M 5 センサーチップ上に共有結合により固定化された。V E G F - A は、活性なフローセル (flow cell) にだけ固定化された。固定化手法後、フローセル上の残りの活性部位をエタノールアミンでブロックした。50 mM N a O H での洗浄によって、非特異的に結合したタンパク質を除去した。参照セルを活性化させ、次いで、エタノールアミンでブロックした。

#### 【 0 2 3 2 】

VEGF-Aアンタゴニスト上清(Dyaxファージライブラリースクリーニングから選択された)をランニングバッファー中で1:3希釈し、表面にインジェクトし、結合時間5分および解離時間5分で、センサーチップ上のVEGF-Aに特異的に結合させた。100nM VEGFR-2-Fc5および100nM抗-VEGF-Aモノクローナル抗体(Avastin(商標), Genentech)の2回のインジェクションを陽性対照として用いた。速度論結合研究は、流速30u1/分を用いて実施した。全結合実験は、10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA 0.05%界面活性剤P20、1mg/mlウシ血清アルブミン、pH 7.4のランニングバッファー中、25℃で実施した。また、バッファーインジェクションを行って、装置ノイズおよびドリフトの控除を可能にした。サイクルとサイクルの間に、フローセルを10mMグリシン、pH 1.5で洗浄して、結合したVEGF-Aアンタゴニストを表面から除去した。

10

## 【0233】

データは、Biacore T100(商標)評価ソフトウェア(バージョン1.1.1)を用いてまとめた。データは、参照フローセルおよびプランクインジェクションを差し引くことによって処理した。再生工程が一連のインジェクションを通して一定の結合表面を提供したことを確実にするために、ベースライン安定性を評価した。VEGF-Aアンタゴニストの出発濃度が分からなかったので、得られた結合曲線を全体的に1:1解離結合モデルにフィットさせて、解離速度定数( $k_d(s-1)$ )を算出した。

## 【0234】

結果:ヒトVEGF-Aに対するVEGF-Aアンタゴニストの解離速度分析を決定した。得られた結合曲線は、1:1解離モデルによくフィットする。VEGF-Aアンタゴニストの出発濃度は分かっておらず、したがって、 $k_d$ は濃度に依存しないので、解離速度定数( $k_d(s-1)$ )のみを報告した。算出した解離速度定数は、最も遅いものから最速のものまでランク付けした。これらのアッセイ条件下、VEGF-Aアンタゴニストは、VEGF-Aに対する相互作用について、幅広い範囲の解離速度定数を展示する(1. E - 5 - 2. E - 2 (s-1))(表5参照)。比較すると、VEGFR-2-Fc5-VEGF-A相互作用の $k_d$ は、約2. E - 4 s - 1であり、抗-VEGF-Aモノクローナル抗体Avastin(商標)Fab-VEGF-A相互作用では、約8. E - 5 s - 1であった。

20

## 【0235】

30

## 【表5】

表5: VEGF-AアンタゴニストとVEGF-A scFvおよび対照との相互作用の解離速度定数

	Off速度 [ $k_d(s-1)$ ]
Avastin(商標)	1. E 04
Lucentis(商標)	2. E 05
Avastin(商標)Fab	8. E 05
c1094.1_1	4. E 04
c1039.1_1	2. E 04
c870.1_1 2. E	0.4

40

## 【0236】

実施例6:イー・コリ細胞周辺質(periplasmic)画分由来のタンパク質の精製

scFv、タンデムscFv、およびscFabタンパク質は、イー・コリ細胞の細胞周辺腔において発現される。発酵スケールは、25mL振盪フラスコ培養から2Lバッチ投入系までの範囲であった。イー・コリ細胞を遠心機を用いてペレット中にスピンダウンした。湿った細胞ペレットを周辺質化(periplasting)バッファー[0.2M Tris, 20%(w/v)シュークロース、完全EDTA不含プロテアーゼインヒビターカクテル(Roche) pH 7.5]中、湿潤細胞重量1グラムあたり2mLの比率で、完全に再懸

50

濁した。該手法において、細胞壁の分解を容易にする酵素であるリソチームは、含まれていても、含まれていなくてもよい。リソチームを使用するか否かを決定するために、500  $\mu$  Lの再懸濁化ペレットをエッペンドルフチューブに移し、使用した周辺質化バッファー-1  $\mu$  Lあたり30 UのReady-Lys eリソチーム(Epicentre)を加え、懸濁を室温で5分間インキュベートした。インキュベーション後、該溶液を逆さまにすることによって粘性増加についてチェックした。該溶液がチューブの壁にくっついて離れない場合、早期の細胞溶解が起こっている可能性があり、リソチームは調製溶液に含まれない。該溶液がチューブの壁にくっつかない場合、リソチームは調製溶液に含まれる。リソチームを用いる場合、使用した周辺質化バッファー-1  $\mu$  Lあたり30 UのReady-Lys eリソチーム(Epicentre)を加え、懸濁を室温で4-6分インキュベートした。元々の湿润細胞ペレット重量1グラムあたり3mLの比率で氷冷水を加え、該溶液を少なくとも10分間(しかしながら、30分を超えない)インキュベートした。残ったスフェロプラストを15,000  $\times$  g(または10,000~20,000 RPM, 速い方)の遠心分離により、少なくとも15分間(しかしながら45分を超えない)、室温にてペレット化した。細胞周辺質画分を含有する上清を新しい容器に注ぎ入れ、検量した固体を用いて、25 mMイミダゾール、500 mM NaClに調整した。該溶液を0.22  $\mu$ mフィルターでろ過した後、ボトルトップフィルター(Nalgene)を用いて精製した。

10

## 【0237】

## 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)捕獲

伝統的に、5mL HisTrap HPカラム(GE Healthcare)をIMAC工程に用いたが、該カラムサイズは、分析的IMAC-SECアッセイによって決定される細胞周辺質画分中のscFv標的の量に依存して、スケールアップまたはスケールダウンすることができる。該IMAC樹脂の結合能は、少なくとも20 mg / mL充填層であることが示された。10mLよりも大きなサイズのカラムを用いる場合、内径が2および5cmのWatersガラスカラム(Millipore)が好ましかった。適当なクロマトグラフィーステーション(UNICORNソフトウェア4.1以上を用いるAkta Explorer[GE Healthcare]またはBioCAD Sprint, 700E、またはPerfusion Chromatographyソフトウェアバージョン3.00以上を用いるVision[Applied Biosystems])を用いて、IMACカラムを50 mM NaPO<sub>4</sub>、500 mM NaCl、25 mMイミダゾール、pH 7.5中で平衡化し、細胞周辺質画分を濁渙するまで、190 cm / 時間以下の速度で該カラムに負荷した。UV A 254 nmおよびUV A 280 nmでのモニターが190 cm / 時間を超えない流速で、少なくとも2CVについて安定なベースラインになるまで、カラムを平衡化バッファーで洗浄した。結合したタンパク質は、50 mM NaPO<sub>4</sub>、500 mM NaCl、400 mMイミダゾール、pH 7.5を190 cm / 時間以下の速度で用いて競合的に溶出させた。溶出フラクションを、A 280 nmでのUV、分析的サイズ排除クロマトグラフィー、およびSDS-PAGEにより、タンパク質含量について評価した。

20

## 【0238】

## 他のクロマトグラフィー技術

IMACプールの純度は、SDS-PAGEゲルおよび分析的サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって評価された。プールがSECによる最終的な浄化に応じなかつた場合、他のクロマトグラフィー技術を用いて、残存する宿主細胞夾雜物および凝集物から標的scFvタンパク質をさらに精製した。これらの従来技術は、アニオン交換、カチオン交換、および疎水性相互作用を包含した。他のアフィニティーに基づくアプローチもまた使用され、限定するものではないが、抗-myc樹脂によるc末端mycタグの利用または、堅固なビーズに共有結合した適当なリガンドを用いるリガンドに基づくアフィニティーアプローチを包含した。これらの他の技術の有用性は、タンパク質対タンパク質に基づいて決定された。

30

## 【0239】

## サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

40

50

A 280 nmでのUVおよび分析的SEC法によって評価されるタンパク質量は、使用されるゲルろ過カラムのサイズを決定した： $< 1 \text{ mg} = 10 / 300 \text{ Superdex} \times 200 \text{ GLカラム}$ 、 $1 - 10 \text{ mg} = 16 / 60 \text{ Superdex} 200$ 、 $> 10 \text{ mg} = 26 / 60 \text{ Superdex} 200$ （全て、GE Healthcare）。IMAC溶出プールは、10kD MWCO Ulttrace1遠心濃縮器（Millipore）を用いて濃縮され、最終濃縮容量は、使用したゲルろ過カラムの容量の3%以下であった。濃縮物をカラム上に注入し、76cm/時間を超えず、かつ34cm/時間以上の流速で、タンパク質を定組成溶出した。溶出フラクションをSDS-PAGEで分析し、適当なプールを得た。

## 【0240】

10

## 内毒素除去

内毒素レベルに関する最終産物の明細は、特定のクラスターの状態によって決定された。SECプールをA280 nmでのUVにより決定した場合、 $> 0.25 \text{ mg/mL}$ になるまで、10kD MWCO Ulttrace1遠心濃縮器（Millipore）を用いて濃縮した。Mustang E 0.22 umフィルター（PALL）をSEC移動相バッファーで予め湿らせ、SEC濃縮物を手動のシリンジデリバリーシステムにより、 $\sim 1 \text{ mL/min}$ の流速で、該フィルターでろ過した。PTS EndoSafeシステム（Charles River）を用いて、最終ろ過産物を内毒素についてアッセイし、A280 nmでのUVにより濃度測定し、保存のためにアリコートに分けた。

## 【0241】

20

実施例7：293/KDR/KZ136/c22 VEGF-A-誘導性細胞に基づくルシフェラーゼアッセイを用いる中和性抗-ヒトVEGF scFvの同定

候補分子（scFv's）をヒトVEGF-Aの活性中和能についてスクリーンするために、細胞に基づくルシフェラーゼアッセイを行った。100 μl完全培地（DMEM, 10%胎仔ウシ血清（FBS）、1Xピルビン酸ナトリウム、1X Glutamax（Invitrogen））中、96-ウェル不透明白色組織培養処理プレート（Costar #3917）の1ウェルあたり10,000細胞の播種密度で、293/KDR/KZ136/c22細胞を播種し、37 加湿5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、48時間インキュベートした。48時間後、完全培地を真空吸引によって除去し、100 μlの無血清培地（DMEM, 1Xピルビン酸ナトリウム, 1X Glutamax（Invitrogen））と置き換え、一晩インキュベートした。

30

## 【0242】

次の日に、候補VEGF-A中和分子（scFv's, Fab's）、陽性対照（ベバシツマブ（bevacizumab）（抗-VEGF-Aモノクローナル抗体, Genentech）、ラニビツマブ（ranibizumab）（抗-VEGF-Aアフィニティー-成熟Fab, Genentech）、および社内で作成したベバシツマブFab）を200 nMから12 pMへ、1:5希釈にて、非中和剤（培地のみ）と共に、無血清培地中で連続希釈した。これらに、等容量のVEGF-A<sub>165</sub>を、最終濃度0.26 nM VEGF-Aおよび100 nM~6 pM中和分子または陽性対照に対し、0.54 nMで加えた。これらを37で60分間インキュベートした。インキュベーション後、培地から血清飢餓細胞を吸引し、100 μlの上記複合体を加え、37で4時間インキュベートした。

40

## 【0243】

4時間インキュベーション後、製造者の指示に従ってLuciferase Assay System（Promega, E1501）を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。簡単に言うと、培地を吸引し、25 μlの1X isバッファー（Promega, E153A）を各ウェルに加えた。プレートを室温で20-30分間インキュベートして平衡化した。ルシフェラーゼ活性は、マイクロプレートルミノメーター（Berthold Technologies）、40 μl基質インジェクション、1秒置換（integration）時間を用いて測定された。分析ソフトウェア（Spotfire）を用いてデータを分析し、各候補および対照について、IC<sub>50</sub>値を算出した。

50

## 【0244】

VEGF-A<sub>1-6</sub>のその受容体、VEGF-R2 (KDR/F1k-1)に対する結合作用は、STAT (転写のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター (signal transducer and activator of transcription)) および / またはルシフェラーゼ受容体遺伝子の転写を駆動するSRE (血清応答エレメント (serum-response element)) を活性化するシグナリングカスケードを誘導する。ルシフェラーゼ活性の減少は、該VEGF-A-媒介性シグナリングが中和されていることを示す。

## 【0245】

結果：下記の表6に示すscFvは、ルシフェラーゼアッセイにおいて、VEGF-誘導性活性の中和についてスクリーンされた。スクリーンされた多くのscFvを用いて、有意な阻害が実証された（表6においてIC50値として報告される）。IC50値は、VEGF-活性を50%中和するのに必要なscFvのnM濃度として示される。ベバシツマブ (Avastin (商標))、Lucentis (商標) およびAvastin (商標) F(ab) (社内で作成)を活性の対照として用いた。

10

## 【0246】

## 【表6】

表6：細胞に基づくルシフェラーゼアッセイscFvおよび対照における活性

	IC50 (nM)
Avastin (商標)	0.1-0.4
Lucentis (商標)	0.1-0.5
Avastin (商標) F(ab)	2.9-6.45
c1094.1_1	0.95
c870.1_1	0.16-0.3
c1039.1_1	0.07

20

## 【0247】

実施例8：ヒトVEGF-A-刺激性HUVVEC細胞におけるVEGFA scFvの中和活性を決定するための増殖アッセイ

30

VEGF-Aに対して中程度のアフィニティーを有する中和性VEGF-A scFvをスクリーンするため、<sup>3</sup>H-チミジンアッセイを行った。組み換えヒトVEGF-A<sub>1-6</sub>を2.6nMで陽性対照として用いた。1×インスリン-トランスフェリン-セレニウムを含有するDMEM-F12 (1:1) 培地 (無血清培地, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) を陰性対照として用いた。ヒトVEGF-A scFvをSFM中、500nM、50nM、5nM、0.5nM、0.05nM、0.005nM、および0.0005nMにて連続希釈した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVVEC) を96-ウェル平底プレート中に、100μL容量において、1ウェル当たり900-1000細胞の密度で播種した。HUVVEC細胞を完全EGM-2 MV培地 (Lonza, Walkersville, MD) 中、37、5%CO<sub>2</sub>にて2日間培養した。該細胞をSFMを用いて24時間、血清飢餓にし、2.6nMの連続希釈VEGF-A scFvを用いて、または用いないで、24時間刺激し、1ウェル当たり1μCiの<sup>3</sup>H-チミジン (増殖細胞中に組み込まれる) で24時間パルスした (全て、37、5%CO<sub>2</sub>)。該細胞を収穫し、Topcount装置 (Hewlett Packard) を用いてカウントした。

40

## 【0248】

結果：アッセイにおいてスクリーンした多数のscFvは、表7に示される低いnM IC50値によって分かるように、ヒトVEGF-誘導性HUVVEC増殖の強力な中和を示した。

## 【0249】

## 【表7】

表7：H U V E C 増殖アッセイにおける抗-V E G F - A s c F v 中和活性

s c F v s および対照	I C 5 0 (nM)
A v a s t i n (商標)	0. 3 - 0. 6
L u c e n t i s (商標)	0. 3 - 0. 8
A v a s t i n (商標) F a b	1 4 - 1 7
c 1 0 9 4. 1 _ 1	1. 0 0
c 8 7 0. 1 _ 1	0. 8 - 2
c 1 0 3 9. 1 _ 1	0. 7
c 8 7 0 e 6	1. 6 - 4

10

20

30

40

## 【0250】

## 実施例9：V E G F - A アンタゴニストのエピトープ結合

どのV E G F - A アンタゴニストがヒトV E G F - A に同時に結合できるかを決定するために、エピトープ結合実験を実施した。抗原上の同一またはオーバーラップする結合部位（エピトープ）に対して競合するV E G F - A アンタゴニストは、同時に結合することができず、単一のファミリーまたは「エピトープ・ピン（bin）」に機能的に分類される。抗原上の同じ結合部位について競合しないV E G F - A アンタゴニストは、同時に結合することができ、別々のファミリーまたはエピトープ・ピンに分類される。実験は、B i a c o r e T 1 0 0 (商標) 装置を用いて実施した。B i a c o r e は、抗体フラグメントおよびモノクローナル抗体のパネルをエピトープ・ピンに割り当てるためにルーチンに使用される種々のアッセイフォーマットのうちの単なる1つである。多くの参考文献（例えば、The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 6,6 Glenn E. Morris ed.）が抗体フラグメントを「ピン」に分類するために使用でき、ヒトV E G F - A に対するV E G F - A アンタゴニストの結合特徴に関して比較可能なデータを提供すると予測される別法を記載する。エピトープ結合実験は、可溶性の天然ヒトV E G F - A を抗原として用いて実施した。

## 【0251】

材料および方法：2つの別々のエピトープ結合実験をB I A C O R E T 1 0 0 (商標) システム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上で実施した。両方の実験において、一次V E G F - A アンタゴニストは、アミンカップリング化学 (E D C : N H S) を用いて、約8 0 0 - 1 0 0 0 R U の密度まで、C M 5 センサーチップ上に共有結合により固定化された。固定化手法後、フローセル上の残りの活性部位をエタノールアミンでブロックした。非特異的に結合したタンパク質を5 0 m M N a O H での洗浄によって除去した。参照セルもまた、活性化させ、次いで、V E G F - A アンタゴニストを用いることなく、エタノールアミンを用いてブロックした。

## 【0252】

第1セットの実験において、二次V E G F - A アンタゴニストおよびV E G F - A 抗原を1 0 0 n M に希釈した。V E G F - A 抗原をインジェクトし、センサーチップ上に固定化したV E G F - A アンタゴニストに特異的に結合させた。V E G F - A はダイマーであるので、あらゆるV E G F - A アンタゴニストに対する2つの潜在的な結合部位がある。全ての結合部位が占められたことを確認するために、以前に固定化した一次V E G F - A アンタゴニストをV E G F - A 上にインジェクトした。該工程後、二次V E G F - A アンタゴニストをインジェクトして、V E G F - A に対する同時結合を観察した。

## 【0253】

結合実験の第2のセットにおいて、一次V E G F - A アンタゴニストを再び共有結合により固定化して、B I A C O R E C M 5 センサーチップのフローセルを分離した。該実

50

験において、しかしながら、10 nM VEGF-A抗原は、1 mMの二次VEGF-Aアンタゴニストと予め混合し、次いで、固定化した一次VEGF-Aアンタゴニスト上に競合様式でインジェクトした。全ての結合実験は、10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA 0.05%界面活性剤P20、1 mg/mlウシ血清アルブミン、pH 7.4のバッファー中、25℃で実施した。バッファーインジェクションもまた実施して、装置ノイズおよびドリフトの控除を可能にした。サイクルとサイクルの間に、各インジェクションサイクル後に、10 mMグリシン、pH 1.5の50 uL/分での60秒インジェクションにより、捕獲表面を再生した。これにより、結合したVEGF-Aを表面から除去した。Biacore T100(商標)Evaluationソフトウェア(バージョン1.1.1)を用いて、データをまとめた。

10

#### 【0254】

両方のセットの実験結果を下記のように解釈した。二次VEGF-Aアンタゴニストが一次アンタゴニストと同時にVEGF-A抗原に結合できない場合、それは、機能的に、単一のファミリーまたはエピトープ・ピンに分類された。しかしながら、二次VEGF-Aアンタゴニストが、チップ表面上の質量の増加を示すことによって、一次アンタゴニストと同時に該抗原に結合できた場合、それは、別のファミリーまたはエピトープ・ピンに分類された。各VEGF-Aアンタゴニストは、陰性対照としてそれ自体に対して試験され、バックグラウンド(非結合)シグナルのレベルを確立した。

20

#### 【0255】

結果：精製したVEGF-Aアンタゴニストは、上記の2セットの実験由来の結合データを用いて、エピトープ・ピンに割り当てられた。BIACORE(商標)によって報告されるシグナル(RU、応答単位)は、直接、センサーチップ表面上の質量に相関する。いったん、陰性対照に関連するバックグラウンドシグナル(RU)のレベルが確立されると(一次および二次アンタゴニストの両方として使用される同じVEGF-Aアンタゴニスト)、結合結果は、陽性または陰性結合のいずれかとして報告された。陽性結合は、2つの異なるVEGF-Aアンタゴニストが該抗原に同時に結合できることを示す。陰性結合は、2つの異なるVEGF-Aアンタゴニストが該抗原に同時に結合できないことを示す。

20

#### 【0256】

これらの実験における陽性応答値と陰性応答値との間の差を用いて、VEGF-Aアンタゴニストを3つのファミリーまたはエピトープ・ピンに分類した(表8参照)。第1のエピトープ・ピンは、クローンc636によって產生されるVEGF-Aアンタゴニストを代表とする。第2のエピトープ・ピンは、VEGF-Aアンタゴニストc868、c1039、およびc1081を代表とする。注目すべきは、c636を最初にVEGF-Aと相互作用させた場合、c868およびc1039はどちらも、同時結合を示したことである。c868またはc1039のいずれかが最初にVEGF-Aと相互作用した場合、c636はいずれの結合も示さなかつたので、c868およびc1039は、c636エピトープとオーバーラップしている。さらに、VEGF-Aアンタゴニストc870がピン#1およびピン#2とオーバーラップした。第3のエピトープ・ピンは、VEGF-Aアンタゴニストc820および陽性対照VEGF-A抗体(マウス抗VEGF-Aモノクローナル抗体、R&D Systems)を代表とする。これらのVEGF-Aアンタゴニストはどちらも、全ての他のVEGF-Aアンタゴニストの存在下で同時結合を示した。結合実験において試験したアンタゴニストの全ては、ある程度までVEGF-A有糸分裂促進活性を中和することが示された。

30

#### 【0257】

40

## 【表8】

表8：V E G F - Aアンタゴニストを中和するためのエピトープ・ビン割り当て

エピトープ・ビン#	V E G F - Aアンタゴニスト
ビン#1：	c 6 3 6
ビン#2：	c 8 6 8, c 1 0 3 9, c 1 0 8 1
ビン#1/2：	c 8 7 0
ビン#3：	c 8 2 0

10

## 【0258】

実施例10：表面プラズモン共鳴（B i a c o r e）によるヒトV E G F - AアンタゴニストのV E G F - Aに対する結合アフィニティーの測定

クローンc 8 7 0 およびc 1 0 3 9 によって產生された一価のヒトV E G F - Aアンタゴニストは、表面プラズモン共鳴を用いて、ヒトV E G F - Aに対する結合アフィニティーについて評価された。アフィニティー決定運動速度定数および平衡解離定数は、表面プラズモン共鳴により、V E G F - AアンタゴニストとV E G F - Aとの相互作用について測定された。会合速度定数（ $k_a (M_{-1}s_{-1})$ ）は、抗原 - アンタゴニスト複合体形成の速度を反映する値である。解離速度定数（ $k_d (s_{-1})$ ）は、該複合体の安定性を反映する値である。会合速度定数を解離速度定数で割ることによって（ $k_a / k_d$ ）、平衡会合定数（ $K_A (M_{-1})$ ）が得られる。解離速度定数を会合速度定数で割ることによって（ $k_d / k_a$ ）、平衡解離定数（ $K_D (M)$ ）が得られる。該値は、相互作用の結合アフィニティーを表す。同じ $K_D$ との相互作用は、幅広く変化可能な会合および解離速度定数を有することができる。結果として、 $k_a$ および $k_d$ の両方を測定することは、相互作用のアフィニティーをより独特に表す助けとなる。

20

## 【0259】

材料および方法：一連の実験は、クローンc 8 7 0 およびc 1 0 3 9 によって產生される精製V E G F - Aアンタゴニストの結合アフィニティーを測定するために完了した。結合速度論およびアフィニティー研究は、B i a c o r e T 1 0 0（商標）システム（GE Healthcare, Piscataway, NJ）上で実施された。方法は、B i a c o r e T 1 0 0（商標）コントロール・ソフトウェア v 1 . 1 . 1 を用いてプログラム化された。V E G F - Aアンタゴニストは、H i s 6 / M y c エピトープタグを用いて生産された。アフィニティー分析は、C M 5 チップ上に固定化された抗 - H i s 6 / M y c 抗体を用いてV E G F - Aアンタゴニストを捕獲することによって実施された。抗 - H i s 6 および抗 - M y c 抗体は、1 : 1 モル比で混合し、アミンカップリング化学を用いて、約7500R Uの密度まで、C M 5 センサーチップに共有結合により固定化した。10 n M のV E G F - Aアンタゴニストを分離したフローセル上に、10 u l / 分にて1分間インジェクトし、次いで、1分安定化期間をおいた。V E G F - Aの33 . 3 n M ~ 0 . 1 4 n M の連続1 : 3 希釀物を該表面にインジェクトし、センサーチップ上に捕獲されたV E G F - Aアンタゴニストに特異的に結合させた。各V E G F - A濃度について2回のインジェクションを、会合時間5分および解離時間10分で行った。速度論的結合研究は、流速30  $\mu$  L / 分で行った。全ての結合実験は、10 mM H E P E S、500 mM N a C l、3 mM E D T A 0 . 0 5 % 界面活性剤P 2 0、0 . 1 m g / m l ウシ血清アルブミン、p H 7 . 4 のバッファー中、25 °C で実施した。サイクルとサイクルの間に、フローセルを50 mM H 3 P O 4 で洗浄して、該表面を再生した。該洗浄工程は、捕獲したV E G F - Aアンタゴニストを固定化抗体表面から除去し、次の試料のその後の結合を可能にした。

30

## 【0260】

データは、B i a c o r e T 1 0 0（商標）E v a l u a t i o n ソフトウェア（バージョン1 . 1 . 1 ）を用いてまとめた。データは、参照フローセルおよびブランクイン

40

50

ジェクションを差し引くことによって処理した。再生工程が一連のインジェクションを通して一定の結合表面を提供したことを確実にするために、ベースライン安定性を評価した。2回のインジェクション曲線を再現性についてチェックした。VEGF-A抗原は二量体を形成するので、得られる結合曲線は、二価分析相互作用モデルに全体的にフィットした。

#### 【0261】

結果：2つのVEGFAアンタゴニストが、VEGF-Aに対する結合アフィニティーについて特徴付けられた（表9にまとめられた結果）。会合速度定数（ $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )）および解離速度定数（ $k_d$  ( $s^{-1}$ )）は、これらのヒトVEGF-Aアンタゴニストについて測定された。 $K_D$  および  $K_A$  は、 $k_a$  および  $k_d$  値から算出した。データは、二価分析モデルによくフィットした。該モデルは、 $k_a$  ( $k_{a1}$  および  $k_{a2}$ ) および  $k_d$  ( $k_{d1}$  および  $k_{d2}$ ) について2つの値を測定する。第1セットの値 ( $k_{a1}$  および  $k_{d1}$ ) は、表9に報告される相互作用の一価の反応速度論を表す。これらの試料について報告されたアフィニティーは、これらの値に由来し、 $K_{D1}$  と称する。 $K_D$  および  $K_A$  は、 $k_a$  および  $k_d$  値から算出された。全3つのVEGF-Aアンタゴニストは、VEGF-A抗原に対して類似のアフィニティーを示し ( $K_D = 0.7-1.0E-9M$ )、これらの結果は2つの独立したランにおいて一致した。

10

#### 【0262】

#### 【表9】

表9：VEGF-Aに対するVEGF-Aアンタゴニスト結合アフィニティーの特徴付け

20

ID #	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ ( $M$ )	$K_A$ ( $M^{-1}$ )
c868	5.E+5	6.E-4	1.E-9	8.E+8
c870	2.E+5	2.E-4	1.E-9	1.E+9
c1039	3.E+5	2.E-4	6.E-10	2.E+9

#### 【0263】

#### 実施例11：抗-VEGF-A抗体のエピトープマッピング

クローンc870およびc1039によって產生されたモノクローナルヒトVEGF-A抗体は、JPT VEGF-A RepliTop e（商標）スライドを用いて、ヒトVEGF-Aに対するペプチド結合について評価された。

30

#### 【0264】

材料および方法：各JPTスライドは、下記のアレイの3つの複製物から構成された。各アレイは、VEGF-Aの連続的なオーバーラップする13aaフラグメント（スポット1-78）、次いで、VEGF-Aの連続的なオーバーラップする20aaフラグメント（スポット85-115）から構成された。さらに、各試験抗体ならびにマウスおよびヒトIgGの対照スポットは、各アレイの上面、底面および側面に位置した。一連の実験は、ヒトVEGF-Aタンパク質の合成直鎖ペプチドに対するscFv c870およびc1039の結合能を決定するために完了させた。抗-ヒトVEGF-A scFvは、His/Myoエピトープタグで標識された。10-100 μg/mlの抗体溶液を該ペプチドスライドにアプライした。抗-Hisおよび/または抗-Myo抗体を次いで、該スライドにアプライした。ビオチン化チラミド（Biotinylated Tyramide）（Renaissance（登録商標）TSA（商標）ビオチンシステム、PerkinElmer, #NEL700A）を用い、該キットに説明された方法にしたがって、シグナルを増幅した。ストレプトアビジンアルカリホスファターゼおよびDAKO Permanent Red染料を用いて、結合した抗体を視覚化した。

40

#### 【0265】

Nikon Eclipse TE2000U倒立顕微鏡、ASI MS-2000モーター駆動ステージ、Photometrics Cascade II 512カメラ

50

および X - c i t e 120 蛍光イルミネーションシステムからなる自家製顕微鏡スライドスキャナーを用いて、データをまとめた。シグナル強度は、Metamorph v7.1イメージングソフトウェアを用いて分析した。

【0266】

結果：結合ペプチドの位置および配列を下記表10に示す。数字は、全シグナル強度に対する該ペプチドのシグナル強度パーセンテージを示す。

【0267】

【表10】

表10

ペプチドI	ペプチド配列	機能的単位	A2131/c1039	A2128/c870	10
D					
7	HEVVKFMDVYQRS	$\alpha$ 1	3%	4%	
8	VVKFMDVYQRSSYS	$\alpha$ 1	6%	14%	
9	KFMDVYQRSSYSHP	$\alpha$ 1	7%	17%	
10	MDVYQRSSYSHPIE	$\alpha$ 1	5%		
11	VYQRSSYSHPIETL	$\alpha$ 1	7%	6%	
18	DIFQEYPDEIEYI	$\alpha$ 2	3%		
19	FQEYPDEIEYIFK	$\alpha$ 2	5%		
20	EYPDEIEYIFKPS	$\beta$ 2	3%		
23	EYIFKPSSVPLMR	$\alpha$ 2- $\beta$ 2	9%	32%	20
24	IFKPSSVPLMRSG	$\alpha$ 2- $\beta$ 2	7%	25%	
34	LESVPTEESNITM	$\beta$ 4- $\beta$ 5			
36	PTEESNITMQIMR	$\beta$ 4- $\beta$ 5			
37	EESNITMQIMRIK	$\beta$ 5	4%		
38	SNITMQIMRIKPH	$\beta$ 5			
39	ITMQIMRIKPHQG	$\beta$ 5	3%	1%	
41	IMRIKPHQGQHIG	$\beta$ 5- $\beta$ 6			
59	PSGPSSERRKHLF	post $\beta$ 7*	13%		
60	GPSERRKHLFVQ	post $\beta$ 7*	5%		30
75	ARQLELNERTSRS	post $\beta$ 7*	7%		
76	QLELNERTSRSRDK	post $\beta$ 7*	4%		
77	ELNERTSRSRDKPR	post $\beta$ 7*	4%		
78	LNERTSRSRDKPRR	post $\beta$ 7*	4%		

\* 領域「post 7」は、VEGF 分子のヘパリン結合ドメインである。

【0268】

全抗体は、2-2 領域の周辺に特異的結合部位を示した。データは、試験抗体を 2 つのカテゴリーに分類できることを示し、すなわち、抗体 c870 は、VEGF の c 末端側が好ましく、一方、抗体 c1039 は、該タンパク質の n 末端側に向かってより強力な結合を有した。抗体 c870 は、最少の結合ペプチドを有したが、抗体 c1039 は、最も分散した結合パターンを有した。各抗体由来のトップ 2 つの結合部位を下記の表に示す。

【0269】

## 【表11】

表11

結合ランク	A 2 1 3 1 / c 1 0 3 9	A 2 1 2 8 / c 8 7 0
1	post $\beta$ 7	$\alpha$ 2 - $\beta$ 2
2	$\alpha$ 2 - $\beta$ 2	$\alpha$ 1

## 【0270】

実施例12: VEGFR2リン酸化アッセイを用いる、VEGF-A-結合性scFvおよびネズミVEGF-Aの活性に対する二重特異的抗体の交差反応性試験

10

ネズミVEGF-Aを中和する能力についての候補分子(scFv、Fabおよび二重特異的)をスクリーンするために、VEGFR2(KDR/Flik-1)リン酸化を測定する細胞に基づくルミネックス(luminex)アッセイを行った。mVEGF-A<sub>164</sub>は、ヒトVEGFR2と交差反応するので、ヒトVEGFR2に基づくレポーターシステムを利用することができる。293/KDR/KZ136/c22細胞を透明96ウェル組織培養プレート中、100  $\mu$ l完全培地(DMEM、10%胎仔ウシ血清(FBS)、1Xピルビン酸ナトリウム、1XGlutamax(Invitrogen))中1ウェル当たり20,000細胞の密度で播種し、一晩接着させた。次の日に、完全培地を真空吸引によって除去し、100  $\mu$ lの無血清培地(DMEM、1Xピルビン酸ナトリウム、1XGlutamax)に交換した。細胞を一晩インキュベートした。

20

## 【0271】

次の日に、候補VEGF-A中和性分子(scFvs、Fabs)を、無血清培地において非中和剤(培地のみ)と共に1:5希釈で、200nMから12pMに連続希釈した。VEGFR2-Fcを中和の陽性対照として用いた。これらに、等容量のmVEGF-A<sub>164</sub>(493-MV-005, R&D Systems)を、0.26nM VEGF-Aおよび100nM~6pM中和分子または陽性対照の最終濃度に対して、0.54nMで加えた。これらを37度60分間インキュベートした。

20

## 【0272】

インキュベーション後、真空吸引によって培地を血清飢餓細胞から除去し、100  $\mu$ lの上記複合体に交換した。細胞を37度10分間インキュベートした。インキュベーション後、培地を真空吸引によって除去し、細胞を100  $\mu$ lの氷冷したリン酸緩衝化セライン(PBS, Invitrogen)で優しく洗浄した。PBSを真空吸引によって除去し、細胞を、1mM PMSF(Sigma, DMSO中のP-2714)および10mLにつき1個のComplete Miniタブレット(Roche, 11836153001)を含有する25  $\mu$ lのNP-40溶解バッファー(Invitrogen Cat.# FNN0021)中で溶解した。溶解物をプラットホーム振盪機上、4度20分間インキュベートし、3000rpmにて、4度10分間遠心分離して溶解物を浄化した。溶解物を新しい96ウェルマイクロタイープレートに移し、アッセイするまで-20度で置いた。

30

## 【0273】

VEGFR2リン酸化ルミネックスアッセイのために、Intracellular Protein Buffer Reagent Kit(Invitrogen LHB0002)およびVEGFR2[pY1059] Antibody Bead Kit(Invitrogen LH00601)を製造者の指示にしたがって用いた。溶解物を解凍し、80  $\mu$ lのAssay Diluentと1:5で混合した。ルミネックス真空ろ過プレートのウェルを200  $\mu$ lのWorking Wash Solutionで予め湿らせた。希釈したビーズを1ウェル当たり25  $\mu$ lで加え、200  $\mu$ lのWorking Wash Solutionで2回洗浄した。洗浄後、50  $\mu$ lの希釈した溶解物、および50  $\mu$ lの希釈したデテクター抗体を各ウェルに加え、プレートをホイルで覆い、プラットホーム振盪機上、500rpmにて、室温(RT)で3時間インキュベートした。インキュベーション後、ビーズを200  $\mu$ lのWorking Wash Solutionで2回洗浄し、次いで、100

40

50

$\mu$  l の希釈した抗ウサギ IgG - RPE を各ウェルに加え、プレートをホイルで覆い、プラットホーム振盪機上 500 rpm にて、RT で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、ビーズを 200  $\mu$  l の Working Wash Solution で 3 回洗浄し、125  $\mu$  l の Working Wash Solution 中で再懸濁した。ビーズをプラットホーム振盪機上 500 rpm にて 30 秒間再懸濁し、Lumineux-100 装置 (BioRad) 中で読み取った。分析ソフトウェア (Spotfire) を用いてデータを分析し、各候補および対照について IC<sub>50</sub> 値を計算した。

## 【0274】

結果：ヒト受容体、VEGF-R2 (KDR/Flik-1) に結合する mVEGF-A<sub>164</sub> の作用は、該受容体のリン酸化を誘導する。該ルミネックスに基づくアッセイは、全 VEGF-R2 を、抗-VEGFR2 抗体にコンジュゲートした蛍光標識したビーズに結合させる。[pY1059] でのリン酸化を検出する二次抗体を用いて、どれだけ多くの VEGFR2 がリン酸化されたかを検出する。下記の表 12 に示されるように、ヒト VEGF-A 活性を中和した多くの scFv が、該アッセイにおいて、マウス VEGF 活性も阻害した。これらの同じ scFv を含有した二重特異的抗体もまた、マウス VEGF-A 活性を中和した。

10

## 【0275】

## 【表 12】

表 12 : VEGF-A 特異的 scFv および二重特異的抗体によるマウス VEGF-A 活性の中和

20

scFv	IC <sub>50</sub> (nM)
c870	0.16
c1039	活性無し
c1094	0.55

## 【0276】

実施例 13 : マウス VEGFA (VEGF-A<sub>164</sub>) で刺激された HUVEC 細胞上の scFvs の中和活性を測定するための増殖アッセイ

マウス VEGF-A 中和性 scFv をスクリーンするために、<sup>3</sup>H-チミジンアッセイを行った。組み換えマウス VEGF-A<sub>164</sub> を陽性対照として、2.6 nM で用いた。1 × インスリン - トランスフェリン - セレニウムを含有する DMEM-F12 (1 : 1) 培地 (無血清培地, SFM; Invitrogen, Carlsbad, CA) を陰性対照として用いた。scFv 分子は、SFM 中、500 nM、50 nM、5 nM、0.5 nM、0.05 nM、0.005 nM、および 0.0005 nM で連続希釈した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を 96 ウェル平底プレート中に、容量 100  $\mu$ L、1 ウェル当たり 900 - 1000 細胞の密度で播種した。HUVEC 細胞を完全 EGM-2 MV 培地 (Lonza, Walkersville, MD) 中、37 °C、5% CO<sub>2</sub> にて 2 日間培養した。細胞を SFM で 24 時間血清飢餓にし、2.6 nM で、連続希釈した VEGF-A scFv を用いて、または用いないで、24 時間刺激し、1 ウェル当たり 1  $\mu$ Ci の <sup>3</sup>Hチミジン (増殖する細胞中に組み込まれる) で 24 時間パルスした (全て、37 °C、5% CO<sub>2</sub>)。細胞を採取し、Top count 装置 (Hewlett Packard) を用いてカウントした。

30

## 【0277】

結果：該アッセイにおいてスクリーンされた多くの scFvs は、下記の表 13 において示される低い nM IC<sub>50</sub> 値によって分かるように、マウス VEGF 誘導性 HUVEC 増殖の強力な中和を示した。

40

## 【0278】

## 【表13】

表13: VEGF-A-特異的scFvによるマウスVEGF-A誘導性HUVETC増殖の中和

scFv	IC <sub>50</sub> (nM)
c870	0.36
c1094	2.84
c1039	活性無し

## 【0279】

10

実施例14: 第1、第2および第3の細胞外Ig様ドメインまたは第2および第3の細胞外Ig様ドメインを含む切断型を発現するための可溶性FGFR3IIIc-C-末端Fc5発現プラスミドの構築

ヒトFGFR3IIIcの第1、2および3の細胞外Ig様ドメインまたはヒトFGFR3IIIcの第2および第3細胞外Ig様ドメインを有する切断型を含有する一連の発現構築物を作成した。これらのヒトFGFR3IIIc配列スパンを下流C末端Fc5配列に融合した。該一連の構築物は、上記の配列スパンおよび配列番号2のアミノ酸残基262および配列番号10のアミノ酸残基142にて、セリンの代わりにトリプトファンを生じる点変異を含んだ。(249位の該変異は、天然FGFR3IIIcアミノ酸配列に関する。)該変異は、S249Wと記す。これらの構築物、PCRおよび相同組み換えにより、上記のFGFR3IIIcドメインをコードするDNAフラグメント、Fc5フラグメントおよび発現ベクターpZMP31を用いて、作成された。

20

## 【0280】

20

MPET構築物#1917(配列番号1および2)と称する全長可溶性ヒトFGFR3IIIc(S249W)Fc5構築物を作成するために、3つのPCRフラグメントを作成し、酵母組み換えにより、一緒にpZMP31ベクター中に導入した。最初のフラグメントは、pZMP31ベクター配列中の最適化TPAリーダーとの5'オーバーラップ、次いで、S249W点変異をコードするヒトHumanFGFR3IIIcの配列および下流ヒトFGFR3IIIc配列との3'オーバーラップを示した。該フラグメントの場合、PCR增幅反応は、5'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 2(配列番号3)(FGFR3IIIcを鋳型として用いてPCRフラグメントを作成するためのフォワードプライマー。FGFR3IIIcは、配列番号2のE36で開始する。)を使用した。pZMP31中でクローン化されるべきフラグメントは、optTPAリーダー配列(配列番号2の残基1-35)を用いた。PCRは、3'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 7(配列番号4)(FGFR3IIIcを鋳型として用いてPCRフラグメントを作成するためのリバースプライマー。フラグメントはS249W変異を生じるであろう。Rec配列の5'末端でネスト化したフォワードプライマーと共に使用されるべき)を用いて行い、クロントラックID#102551ヒトFGFR3IIIcを鋳型として用いた。

30

## 【0281】

30

第2のフラグメントは、上流ヒトFGFR3IIIc配列との5'オーバーラップ、次いで、S249W点変異をコードするヒトFGFR3IIIcの配列およびFc5配列(配列番号2の残基389-620)との3'オーバーラップを示した。該フラグメントの場合、PCR增幅反応は、5'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 6(配列番号82)(FGFR3IIIcを鋳型として用いてPCRフラグメントを作成するためのフォワードプライマー。フラグメントはS249W変異を生じるであろう。sol.Rec配列の3'末端でネスト化されたリバースプライマーと共に使用されるべき)を使用した。PCRは、3'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 3(配列番号6)(FGFR3IIIcを鋳型として用いてPCRフラグメントを作成するためのリバースプライマー。sol.FGFR3IIIcないしG375の配列。フラグメントは、オーバーラップしているFc5配列を有するであろう。)を用いて行い、クロントラックID#102551ヒトFG

40

50

F R 3 I I I c を鋳型として用いた。

【 0 2 8 2 】

第3のフラグメントは、F c 5 配列を含有し、ヒト F G F R 3 I I I c との5'オーバーラップおよびp Z M P 3 1 ベクター配列との3'オーバーラップを示した。該フラグメントの場合、P C R 増幅反応は、5'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 4 (配列番号7) を使用した。(F c 5 を鋳型として用いてP C R フラグメントを作成するためのフォワードプライマー。フラグメントは、s o l . F G F R 3 I I I c ないしG 3 7 5 のオーバーラップしている配列を有するであろう。) P C R は、3'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 5 (配列番号8) (F c 5 を鋳型として用いてP C R フラグメントを作成するためのリバースプライマー。フラグメントは、p Z M P 3 1 のオーバーラップする配列を有するであろう。) を用いて行い、鋳型としてM P E T 構築物# 1 6 9 9 、I L 1 7 R E F c 5 を用いた。

【 0 2 8 3 】

上記の3つのフラグメントを作成するためのP C R 増幅反応条件は、下記の通りであった。1サイクル、95°、5分；25サイクル、95°、30秒、次いで、55°、30秒、次いで、68°、1分30秒；1サイクル、72°、7分。P C R 反応混合物は、1%アガロースゲル上に流し、予想サイズに対応するD N A フラグメントをQ I A q u i c k (商標) G e l E x t r a c t i o n K i t (Qiagen, Cat. No. 28704) を用いてゲルから抽出した。

【 0 2 8 4 】

プラスミドp Z M P 3 1 は、キメラC M V エンハンサー / M P S V プロモーターを有する発現カセット、酵母組み換え前の線状化のためのF s e 1 、N a r 1 およびB g l I I 部位、イー・コリ複製起点；S V 4 0 プロモーター、エンハンサーおよび複製起点、D H F R 遺伝子、およびS V 4 0 ターミネーターを含む哺乳動物選択マーカー発現単位；およびエス・セレビシエ (S. cerevisiae) 中での選択および複製に必要なU R A 3 およびC E N - A R S 配列を含有する哺乳動物発現ベクターである。

【 0 2 8 5 】

酵母中の組み合え前に、プラスミドp Z M P 3 1 をB g l I I で消化し、次いで、上記のP C R フラグメントをゲル抽出した。5 0 μ l のコンピート酵母 (S. cerevisiae) 細胞を3 μ l の各P C R フラグメントインサートD N A および約5 0 n g のB g l I I 消化p Z M P 3 1 ベクターと合わせた。該混合物を0.2 c m エレクトロポレーションキュベットに移した。該酵母 / D N A 混合物を、0.7 5 k V (5 k V / c m ) 、オームおよび2 5 μ F にセットしたパワーサプライ (BioRad Laboratories, Hercules, CA) を用いて電気パルスした。3 0 0 μ l の1.2 M ソルビトールをキュベットに加え、酵母を7 5 μ l および2 0 0 μ l アリコートで、2つのU R A - D S プレート上に播種し、3 0 でインキュベートした。約7 2 時間後、單一プレート由来のU r a + 酵母形質転換体を1 0 0 u l の酵母溶解バッファー (自家製：. 1 M N a C L 、. 0 0 6 2 M T r i s H C L 、. 0 0 3 8 M T r i s 塩基、. 0 0 1 M E D T A 、2% (v / v) ポリソルベート2 0 、1% (w / v) S D S ) および1 0 U Z y m o l y a s e / 1 0 0 u l を含有する1 0 0 u l のQ i a g e n M i n i P r e p キットバッファー P 1 中で再懸濁した。次いで、該混合物を3 7 で約1 5 分間インキュベートし、Q i a g e n m i n i p r e p キットプロトコールの残りを製造者の指示にしたがって実施した。

【 0 2 8 6 】

エレクトロコンピーテントなイー・コリ宿主細胞 (D H 1 2 S ) の形質転換を、4 μ l の酵母D N A 調製物および5 0 μ l のイー・コリ細胞を用いて行った。細胞を1.7 5 k V 、2 5 μ F 、および4 0 0 オームで電気パルスした。エレクトロポレーション後、. 5 m l のL B を加え、次いで、細胞を1 0 μ l および3 0 μ l のアリコートで、2つのL B A M P プレート (L B プロス (Lennox) 、1.8% B a c t o (商標) A g a r (Difco) 、1 0 0 m g / L アンピシリン) 上に播種した。

【 0 2 8 7 】

10

20

30

40

50

インサートDNAクローンを配列分析に付した。正しい配列を含有する1つのクローンを選択する。大規模プラスミドDNAを市販のキット(QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA)を用いて、製造者の指示に従って単離する。

【0288】

同じプロセスを用いて、M P E T構築物#1920(配列番号9および10)と称する切断型可溶性ヒトF G F R 3 I I I c (S 2 4 9 W) F c 5構築物を調製した。第1のフラグメントは、p Z M P 3 1ベクター配列中の最適化T P Aリーダー配列との5'オーバーラップ、次いで、S 2 4 9 W点変異をコードしているヒトF G F R 3 I I I cの配列および下流ヒトF G F R 3 I I I c配列との3'オーバーラップを示した。該フラグメントの場合、P C R增幅反応は、5'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 6 0((配列番号11)(F G F R 3 I I I cを鋳型として用いてP C Rフラグメントを作成するためのフォワードプライマー。フラグメントはI g D 2 D 3形態を生じるであろう。切断型F G F R 3 I I I cの配列は、I g D 2の上流の配列番号2のD 1 5 6で開始する。o p T P Aリーダー配列を用いてp Z M P 3 1中にクローン化されるべきフラグメント))を用いた。P C Rは、3'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 7(配列番号4)(F G F R 3 I I I cを鋳型として用いてP C Rフラグメントを作成するためのリバースプライマー。フラグメントはS 2 4 9 W変異を生じるであろう。R e c配列の5'末端でネストかされたフォワードプライマーとともに使用されるべき))を用いて行い、鋳型として、クロントラックI D #102551ヒトF G F R 3 I I I cを用いた。該フラグメントは、上記の同じP C Rサーモサイクルを用いて作製し、上記の第2および第3フラグメントと共に、B g 1 I I消化したp z M P 3 1ベクター中に導入して、切断型可溶性ヒトF G F R 3 I I I c (S 2 4 9 W) F c 5構築物を生じた。

【0289】

メガp r e p DNAをQ i a g e n P l a s m i d M e g a K i t (Qiagen, Valencia, CA)を用いて各プラスミドについて調製した。各々、M P E T構築物#1917(配列番号1および2)および#1920(配列番号9および10)と称する、全長可溶性ヒトF G F R 3 I I I c (S 2 4 9 W) F c 5および切断型可溶性ヒトF G F R 3 I I I c (S 2 4 9 W) F c 5構築物の場合、2 0 0 μ gの各発現構築物メガp r e pプラスミドを約2 4 0単位のB s t B 1制限酵素で、3 7で2時間消化し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで洗浄し、次いで、クロロホルム/イソアミルで洗浄し、次いで、エタノールで一晩沈澱させ、1.5 mL微量遠心チューブ中で遠心分離した。上清をデカントし、ペレットを1 mLの7 0 %エタノールで洗浄し、室温で5分間インキュベートした。該チューブを微量遠心分離機(microfuge)中、1 4 , 0 0 0 R P Mで10分間スピinnし、上清をペレットからデカントした。滅菌環境中、組織培養フード上、ペレットを解放空気中で約5分間乾燥させ、次いで、3 7の予め温めたC H O細胞組織培養培地0.4 m l中に再懸濁し、3 7で10分間インキュベートした。D N Aペレットを可溶化させた一方で、エレクトロポレートすべき各ベクターのために、約9 × 1 0 <sup>6</sup> C H O細胞をペレット化し、0.4 m lのC H O細胞組織培養培地中に再懸濁し、最終容量8 0 0 μ lになるよう再懸濁したプラスミドDNAと合わせた。D N A/細胞混合物を0.4 cmのギャップキュベット中に置き、下記のパラメーターを用いてエレクトロポレートした。3 0 0 Vにて、9 5 0 μ F、大容量。各プラスミドエレクトロポレーションセットの場合、次いで、キュベットの中身を除去し、プールし、C H O細胞組織培養培地で2 5 mLに希釈し、1 2 5 mLの振盪フラスコ中に置いた。フラスコを振盪機上、3 7、5%C O <sub>2</sub>にて、1 2 0 R P Mで振盪しながら、インキュベーター中に置いた。

【0290】

C H O細胞を、5 0 0 n Mメトトレキサート(M T X)に対する栄養選択および増幅に付した。選択されたC H O系統をM E C L 1 3 3 4 (s o l F G F R 3 I I I c (2 3\_3 7 5)(S 2 4 9 W) F c 5)およびM E C L 1 3 3 7 (s o l F G F R 3 I I I c (1 4 3\_3 7 5)(S 2 4 9 W) F c 5)と称する。

【0291】

10

20

30

30

40

50

発現試験のために、培養物を継代3エレクトロポレーション後プールを用いて設定した。細胞を遠心分離し、50ml容量中、.5e6c/mlにて、選択せずに新鮮な培地中に再懸濁し、上記のとおり、96時間進行させた。タンパク質発現は、ウェスタンプロットによって確認した。

【0292】

大規模スピナー(spinner)フラスコは、精製のためにタンパク質を生成するために開始させた。200ml種培養物を継代6のトランスフェクト後CHO細胞プールのM E C L 1334およびM E C L 1337上で、5mM L-グルタミン(200mM L-グルタミン由来, Gibco catalog #25030-081)、1mMピルビン酸ナトリウム(100mMピルビン酸ナトリウム由来, Gibco catalog #11360-070)および500nMメトトレキサートを添加したZM2培地(SAFC Biosciences Ex-CELL catalog # 68041)を用いて開始した。フラスコを37、120rpmおよび6%CO<sub>2</sub>で培養した。6日後、各CHOプールフラスコを3Lスピナーフラスコ中に播種して、.5e6c/mlにて、5mM L-グルタミン(200mM L-グルタミン由来, Gibco catalog #25030-081)、1mMピルビン酸ナトリウム(100mMピルビン酸ナトリウム由来, Gibco catalog #11360-070)を添加したZM2培地(SAFC Biosciences Ex-CELL catalog # 68041)を用いて、選択を用いずに1Lの可動容量(working volume)を達成した。スピナーフラスコは、37、95rpmおよび6%CO<sub>2</sub>で培養した。播種の約24時間後、.5Lの培地を各スピナーに加えて、最終容量1.5Lを達成し、培養を続けた。播種の約8日後、馴化培地を収集し、0.2μMろ過し、タンパク質精製に付した。

10

20

30

40

【0293】

同様の方法を用いて、点変異のない、または配列番号15の位置263および配列番号22の位置143におけるプロリン残基をアルギニンに変化させるような配列変異(P250Rと記す)(250位の該変異は、天然FGFR3IIIcアミノ酸配列に関する。)を有する可溶性全長および切断型バージョンを包含するFGFR3Fc5分野に対する付加的な構築物を作成した。該オリゴヌクレオチドおよび得られる構築物は、対応する配列識別子と共に下記に示される。

【0294】

【表14】

表14:

pZMP31s01FGFR3IIIc(23\_375)(S249W)Fc5  
、構築物#1917(配列番号1および2)

zc62552	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCC GTAGAGAGTCCTGGGGACGGAGCAGCGC	配列番号:3
zc62557	CGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCAGGCCAGCGC TCCAGCACGTCCAGCGTGT	配列番号:4
zc62556	TACACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTGGCCGCA CCGGCCCCATCCTGCAGGCG	配列番号:5
zc62553	TGGGCATGTGAGTTGTCTGAAGATTGGG CTCGCCTGCATACACACTGCCCGCCTC	配列番号:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCAGTGTGTATGCA GGCGAGCCCAAATCTTCAGACAAACT	配列番号:7
zc62555	CAACCCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcCTCTAGATTA TTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

【0295】

## 【表 15】

表 15 :

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 3 I I I c (1 4 3 \_ 3 7 5) (S 2 4 9 W) F c  
 5、構築物 # 1 9 2 0 (配列番号 9 および 10)

zc62560	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCT TCCGTAGAGACACAGGTGTGGACACAGGGGCC	配列番号:11
zc62557	CGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCAGGCCAG CGCTCCAGCACGTCCAGCGTGT	配列番号:4
zc62556	TACACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTGGCC GCACCGGCCCATCCTGCAGGCG	配列番号:5
zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTGTCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCGCCCTC	配列番号:6
zc62554	GTGGAGGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCAAATCTCAGACACAAACT	配列番号:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGGCGCGCTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

10

20

## 【0 2 9 6】

【表 16】

表 16 :

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 3 I I I c (2 3 \_ 3 7 5) F c 5、構築物 # 1 9  
 1 6 (配列番号 1 2 および 1 3)

zc62552	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCT TCCGTAGAGAGTCCTGGGGACGGAGCAGCGC	配列番号:3
zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTGTCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCGCCCTC	配列番号:6
zc62554	GTGGAGGGCTGACGAGGCGGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCCAAATCTCAGACACAAACT	配列番号:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGGCGCGCTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

30

## 【0 2 9 7】

## 【表17】

表17：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 3 I I I c (2 3 \_ 3 7 5) (P 2 5 0 R) F c 5  
 、構築物#1918 (配列番号14および15)

zc62552	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCT TCCGTAGAGAGTCCTGGGGACGGAGCAGCGC	配列番号:3
zc62553	TGGGCATGTGAGTTTGCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCGCCTC	配列番号:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCAAATCTCAGACAAACT	配列番号:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGGCGGCCCTCTAG ATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8
zc62558	CCCCGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCCGGAG CGCTCCAGCACGTCCAGCGT	配列番号:16
zc62559	ACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTCCGGCACCG GCCCATCCTGCAGGCGGGG	配列番号:17

10

20

## 【0298】

【表18】

表18：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 3 I I I c (1 4 3 \_ 3 7 5) F c 5、構築物#1919 (配列番号18および19)

zc62553	TGGGCATGTGAGTTTGCTGAAGATT GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCGCCTC	配列番号:6
zc62554	GTGGAGGCTGACGAGGCAGTGTGTAT GCAGGCGAGCCAAATCTCAGACAAACT	配列番号:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGGCGGCCCTCTAG ATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8
zc62560	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCG TAGAGACACAGGTGTGGACACAGGGGCC	配列番号:20

30

## 【0299】

## 【表19】

表19：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 3 I I I c (1 4 3 \_ 3 7 5) (P 2 5 0 R) F c  
 5、構築物#1921 (配列番号21および22)

zc62553	TGGGCATGTGTGAGTTTGTCTGAAGATTG GGGCTCGCCTGCATACACACTGCCGCCTC	配列番号:6
zc62554	GTGGAGGGCTGACGAGGCAGGTGTATGC CAGGCGAGCCCAAATCTCAGACACAAACT	配列番号:7
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcTCTAG ATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8
zc62558	CCCCGCCTGCAGGATGGGCCGGTGCCGGAG CGCTCCAGCACGTCCAGCGT	配列番号:16
zc62559	ACGCTGGACGTGCTGGAGCGCTCCCGCACCG GCCCATCCTGCAGGCGGG	配列番号:17
zc62560	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCGTA GAGACACAGGTGTGGACACAGGGGCC	配列番号:20

10

20

30

40

## 【0300】

類似の方法を用いて、点変異のない、または配列番号29の位置266および配列番号40の位置143のセリン残基がトリプトファンに変化するような配列変異(S252Wと記す)または配列番号33の位置267および配列番号42の位置144のプロリン残基がアルギニンに変化するような配列変異(P253Rと記す)(該変異の位置は、天然F G F R 2 a 1 p h a I I I c アミノ酸配列に関する。)を有する可溶性全長および切断型バージョンの両方を包含するF G F R 2 a 1 p h a I I I c F c 5の可溶性形態の構築物の分野を生成した。

## 【0301】

## 【表20】

表20：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 2 a 1 p h a I I I c (2 2 \_ 3 7 7) F c 5、構築物#1945 (配列番号23および24)

zc62932	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTC CGTAGACGGCCCTCCTCAGTTAGTGAG	配列番号:25
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTTGTCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGAAAGCTGT	配列番号:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTCAGACACAAAC	配列番号:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcTCTAG ATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

## 【0302】

## 【表 2 1】

表 2 1 :

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 2 a 1 p h a I I I c (2 2 \_ 3 7 7) (S 2 5 2  
W) F c 5、構築物 # 1 9 4 6 (配列番号 2 8 および 2 9)

zc62932	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTC CGTAGACGGCCCTCCTTCAGTTAGTTGAG	配列番号:25
zc62933	TGGGCATGTGAGTTTGCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAAGCTGT	配列番号:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	配列番号:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcTCTAG ATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8
zc62937	GGCTTGGAGGATGGGCCGGTGAGGCCATCGC TCCACAAACATCCAGGTGGTA	配列番号:30
zc62936	TACCACCTGGATGTTGGAGCGATGGCCTCA CCGGCCCATCCTCCAAGCC	配列番号:31

10

20

## 【0 3 0 3】

【表 2 2】

表 2 2 :

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 2 a 1 p h a I I I c (2 2 \_ 3 7 7) (P 2 5 3  
R) F c 5、構築物 # 1 9 4 7 (配列番号 3 2 および 3 3)

zc62932	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTC CGTAGACGGCCCTCCTTCAGTTAGTTGAG	配列番号:25
zc62933	TGGGCATGTGAGTTTGCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAAAGCTGT	配列番号:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	配列番号:27
zc62939	TCCGGCTTGGAGGATGGGCCGGTGACGCGATCGC TCCACAAACATCCAGGTG	配列番号:34
zc62938	CACCTGGATGTTGTGGAGCGATCGCGTCACCGGCC ATCCTCCAAGCCGGA	配列番号:35
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcTCTAG ATTATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

30

40

## 【0 3 0 4】

## 【表23】

表23：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 2 a 1 p h a I I I c (1 4 5 \_ 3 7 7) F c 5、  
構築物 # 1 9 4 8 (配列番号 3 6 および 3 7)

zc62935	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCC GTAGAAGTGAGAACAGTAACAACAAGAGA	配列番号:38
zc62933	TGGGCATGTGAGTTGTCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGGAGCTGT	配列番号:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	配列番号:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

10

## 【0305】

【表24】

表24：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 2 a 1 p h a I I I c (1 4 5 \_ 3 7 7) (S 2 5  
2 W) F c 5、構築物 # 1 9 4 9 (配列番号 3 9 および 4 0)

zc62935	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTCCGTA GAAGTGAGAACAGTAACAACAAGAGA	配列番号:38
zc62937	GGCTTGGAGGATGGGCCGGTGAGGCCATCGC TCCACAAACATCCAGGTGGTA	配列番号:30
zc62936	TACCACCTGGATGTTGTGGAGCGATGGCCTCA CCGGCCCCATCCTCCAAGCC	配列番号:31
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCCAAATCTTCAGACAAAAC	配列番号:27
zc62555	CAACCCCAGAGCTGTTTAAGgcgcgcTCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

20

30

## 【0306】

## 【表25】

表25：

p Z M P 3 1 s o 1 F G F R 2 a 1 p h a I I I c (1 4 5 \_ 3 7 7) (P 2 5  
3 R) F c 5、構築物#1950 (配列番号41および42)

zc62935	CAGGAAATCCATGCCGAGTTGAGACGCTTCCG TAGAAGTGAGAACAGTAACAAACAAGAGA	配列番号:38
zc62933	TGGGCATGTGTGAGTTGTCTGAAGATTGG GCTCCTCCAGGTAGTCTGGGAAGCTGT	配列番号:26
zc62934	GAAAAGGAGATTACAGCTCCCCAGACTACCTG GAGGAGCCAAATCTTCAGACAAAC	配列番号:27
zc62939	TCCGGCTTGGAGGATGGGCCGGTGACGCGATCGC TCCACAAACATCCAGGTG	配列番号:34
zc62938	CACCTGGATGTTGTGGAGCGATCGCGTCACCGGCC ATCCTCCAAGCCGGA	配列番号:35
zc62555	CAACCCCAGAGCTTTAAggcgcgcctCTAG ATTATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCT	配列番号:8

10

20

## 【0307】

実施例15：多特異的可溶性F G F R 3 I I I c F c 5 V E G F A s c F v 発現プラスミドの構築

ヒトF G F R 3 I I I cの第1、第2および第3の細胞外Ig様ドメインまたはヒトF G F R 3 I I I cの第2および第3の細胞外Ig様ドメインを有する切断型を含有する一連の発現構築物を作成した。これらのヒトF G F R 3 I I I c配列スパンは、下流のC末端F c 5、リンカーおよびV E G F - Aに対する結合に特異的な下流のc末端s c F v配列に融合された。該一連の構築物は、上記のヒトF G F R 3 I I I c配列スパンおよび配列番号64のアミノ酸位置162および配列番号62の位置142にセリンの代わりにトリプトファン残基を生じる点変異を包含した。該変異は、S 2 4 9 Wと記される。(該変異の位置は、天然F G F R 3 I I I cアミノ酸配列に関する。)これらの構築物を、F c 5配列を有するF G F R 3 I I I cドメインをコードしているDNAフラグメントおよびV E G F - A s c F v配列870e6および1094.1を含有する発現ベクターp Z M P 3 1を用いて、PCRおよび相同組み換えによって作成した。

30

## 【0308】

全長可溶性ヒトF G F R 3 I I I c (S 2 4 9 W) F c 5 c 8 7 0 e 6 および全長可溶性ヒトF G F R 3 I I I c (S 2 4 9 W) F c 5 c 1 0 9 4 . 1構築物を作成するために、PCRフラグメントを作成し、酵母組み換えにより、リンカーおよび下流V E G F A s c F v配列870e6または1094.1(MVC 709 - 配列番号43および44; およびMVC 710 - 配列番号45および46と称する)を含有するp Z M P 3 1に基づくベクター中に導入した。PCRフラグメントは、p Z M P 3 1に基づくベクター配列中の最適化TPAリーダー配列との5'オーバーラップ、次いで、S 2 4 9 W点変異をコードしているヒトF G F R 3 I I I cの配列、F c 5配列およびリンカー配列との3'オーバーラップを示した。該フラグメントの場合、PCR增幅反応は、5'オリゴヌクレオチドz c 6 2 5 5 2(配列番号3)(鑄型としてF G F R 3 I I I cを用いてPCRフラグメントを作成するためのフォワードプライマー。F G F R 3 I I I cの配列は、Ig D 1のE 2 3上流で開始する。o p T P Aリーダー配列を用いてp Z M P 3 1中にクローン化されるべきフラグメント)を用いた。PCRは、3'オリゴヌクレオチドz c 6 0 5 6 6(配列番号82)を用いてを行い、M P E T構築物#1917(配列番号1)を鑄型として用いた。

40

## 【0309】

50

上記の3つのフラグメントを作成するためのPCR增幅反応条件は、下記の通りである。1サイクル、95℃、5分；25サイクル、95℃、30秒、次いで、55℃、30秒、次いで、68℃、2分；1サイクル、72℃、7分。PCR反応混合物は、1%アガロースゲル上に流し、QIAquick (商標) Gel Extraction Kit (Qiagen, Cat. No. 28704) を用いて、予想サイズに対応するDNAフラグメントをゲルから抽出した。

【0310】

プラスミドMVC709およびMVC710は、ネズミFc2、リンカー、および870e6 (配列番号43) または1094.1scFv (配列番号45) の下流配列、VEGF-A結合性配列を含有するpZMP31に基づく哺乳動物発現ベクターである。これらのベクターは、キメラCMVエンハンサー/MPSVプロモーターを有する発現カセット、酵母組み換え前の線状化のためのFse1、Nar1およびBglI部位、イー・コリ複製起点；SV40プロモーター、エンハンサーおよび複製起点を含む哺乳動物選択マーカー発現単位、DHF-R遺伝子、およびSV40ターミネーター；およびエス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) における選択および複製に必要なURA3およびCEN-ARS配列を含有する。

【0311】

プラスミドMVC709およびMVC710は、酵母における組み換え前にBglI制限酵素で消化し、次いで、上記のPCRフラグメントをゲル抽出した。60μlのコンピート酵母 (*S. cerevisiae*) 細胞を5μlの各PCRフラグメントインサートDNAおよび約50ngのBglI消化MVC709およびMVC710ベクターと合わせた。該混合物を0.2cmエレクトロポレーションキュベットに移した。酵母/DNA混合物を、0.75kV (5kV/cm)、オームおよび25μFにセットしたパワーサプライ (BioRad Laboratories, Hercules, CA) を用いて電気パルスした。400μlの1.2Mソルビトールをキュベットに加え、酵母を75μlおよび200μlアリコートで、2つのURA-DSプレート上に播種し、30℃でインキュベートした。約72時間後、單一プレート由来のUra<sup>+</sup>酵母形質転換体を100ulの酵母溶解バッファー (自家製: 1M NaCl、0.062M Tris HCl、0.038M Tris塩基、0.01M EDTA、2% (v/v) ポリソルベート20、1% (w/v) SDS) および10U Zymolysase/100ulを含有する100ulのQiagen Mini PrepキットバッファーP1中で再懸濁した。次いで、該混合物を37℃で約15分間インキュベートし、Qiagen miniprepキットプロトコールの残りを製造者の指示にしたがって実施した。

【0312】

エレクトロコンピートなイー・コリ宿主細胞 (DH12S) の形質転換を、4μlの抽出した酵母プラスミドDNA調製物および50μlのイー・コリ細胞を用いて行った。細胞を1.75kV、25μF、および400オームで電気パルスした。エレクトロポレーション後、5mlのLBを加え、次いで、細胞を10μlおよび30μlのアリコートで、2つのLB AMPプレート (LBプロス (Lennox)、1.8% Bacto (商標) Agar (Difco)、100mg/Lアンピシリン) 上に播種した。

【0313】

インサートDNAクローンを配列分析に付した。正しい配列を含有する1つのクローンを選択する。大規模プラスミドDNAを市販のキット (QIAGEN Plasmid Mega Kit, Qiagen, Valencia, CA) を用いて、製造者の指示に従って単離する。

【0314】

同じプロセスを用いて、切断型可溶性ヒトFGFR3<sub>IIc</sub> (S249W) Fc5構築物を調製した。フラグメントは、pZMP31ベクター配列中の最適化TPAリーダーとの5'オーバーラップ、次いで、S249W点変異をコードしているヒトFGFR3<sub>IIc</sub>の配列、Fc5配列およびリンカー配列との3'オーバーラップを示した。該フラグメントの場合、PCR增幅反応は、5'オリゴヌクレオチドzczc62560 (配列番号

10

20

30

40

50

20) を用いた。(FGFR3<sub>I I I c</sub> を鋳型として用いて PCR フラグメントを作成するためのフォワードプライマー。フラグメントは、 IgD2D3 形態を生じるであろう。 FGFR3<sub>I I I c</sub> の配列は、 IgD2 の上流の配列番号 60 の D156 で開始する。 optPA リーダー配列を用いて pZMP31 中にクローン化されるべきフラグメント。) PCR は、 3' オリゴヌクレオチド zc60566 ( 配列番号 82) を用いて行い、鋳型として、 MPE T 構築物 #1920 ( 配列番号 9) を用いた。

#### 【 0315 】

該フラグメントは、上記の PCR サーモサイクルを用いて作製され、 Bg1II で消化した MVC709 および MVC710 ベクター中に導入されて、切断型可溶性ヒト FGFR3<sub>I I I c</sub> (S249W) Fc5 、およびリンカーおよび上記の VEGA 構築物への結合に特異的な下流の c 末端 scFv 配列を生じた。

10

#### 【 0316 】

全長および切断型可溶性ヒト FGFR3<sub>I I I c</sub> (S249W) Fc5 、リンカーおよび VEGA - A への結合に特異的な下流の c 末端 scFv 配列をコードしているプラスミドは、配列番号 57 および 58 に示される FGFR3 (143 - 375) (S249W) Fc5 c1094.1 pZMP31 (MVC781) 、配列番号 59 および 60 に示される FGFR3 (23 - 375) (S249W) Fc5 c1094.1 pZMP31 (MVC782) 、配列番号 61 および 62 に示される FGFR3 (143 - 375) (S249W) Fc5 c870e6 pZMP31 (MVC783) 、および配列番号 63 および 64 に示される FGFR3 (23 - 375) (S249W) Fc5 c870e6 pZMP31 (MVC784) と称する。これらのプラスミドは、 293F 細胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat# R790-07) 中に一時的に発現した。

Mega prep DNA は、 Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、各プラスミドについて調製された。 293F 懸濁細胞は、 293 Free stye 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat# 12338-018) 中、 37% 、 6% CO<sub>2</sub> にて、 3L スピナーフラスコ中、 95 RPM にて培養された。トランスフェクションの直前に新しい培地を加えて、 1.5L の可動容量を最終密度 1 × 10E6 細胞 / mL で得た。各スピナーについて、 2mL のリポフェクタミン 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat# 11668-019) を 20mL の Opti - MEM 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA Cat# 31985-070) に加え、 1.5mg の全プラスミド DNA を 20mL Opti - MEM の入った別のチューブで希釈した。各チューブを室温にて 5 分間、別々にインキュベートし、次いで、合わせて、室温にてさらに 30 分間、時折穏やかに混合しながら、一緒にインキュベートした。該脂質 - DNA 混合物を 293F 細胞の各スピナーに加え、次いでそれを 37% 、 6% CO<sub>2</sub> 、 75 RPM に戻した。約 96 時間後、馴化培地を採取し、 0.2 μM ろ過し、タンパク質精製に付した。

20

#### 【 0317 】

##### 実施例 16 : 精製プロセス

馴化培地を、 0.02% アジ化ナトリウムを含有する 0.2 μ 灑菌ろ過成果物 (deliverable) として精製に付した。培地をアフィニティーカラムに負荷する前に、さらなる調整は行わなかった。

40

#### 【 0318 】

~10 リットルの成果物のような大規模精製の場合、 POROS A50 (タンパク質 A アフィニティー樹脂) の直径 2cm のカラムによる 87mL 床を捕獲プロセス目的で用いた。小規模精製 (~1 - 1.5 リットル成果物) の場合、 4mL 床の POROS Mab Capture A パーヒュージョンクロマトグラフィー樹脂を利用した。

#### 【 0319 】

試料負荷の前に、カラムを 20 カラム容量の 0.02% アジ化ナトリウム (W/v) を含有するバッファー A : 10mM リン酸一ナトリウム、 10mM クエン酸一水和物、 250mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 、 pH 7.3 で平衡化した。平衡化するとすぐに、馴化培地を 1 分当たり 20mL ( 大規模プロセスの場合 ) または 1 分当たり 10mL ( 小規模プロ

50

セスの場合)で負荷した。負荷プロセスを完了すると、10-20カラム容量の平衡化バッファーを用いて、非結合タンパク質フラクションをカラムから洗い流した。結合したタンパク質の溶出は、平衡化バッファーAと溶出バッファーB(下記の組成からなる:0.02%アジ化ナトリウム(w/v)を含有する、10 mMリン酸ナトリウム、10 mMクエン酸一水和物、250 mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、pH 3.0)との間に形成されるpH減少勾配によって達成された。大規模プロセスの溶出は、流速30 mL/分であり、同時に、バッファーAおよびバッファーBとの間に3カラム容量勾配を形成した。フラクション(10 mL)を0.5 mL 2 M Tris pH 8.0バッファーで収集し、内容物をすぐに混合した。小規模プロセスの溶出では、同じバッファーおよびバッファーAからバッファーBへの4カラム容量勾配を流速5 mL/分で用いた。フラクション(4 mL)を0.25 mL 2 M Tris pH 8.0バッファーで収集した。全溶出フラクションをすぐに混合して、迅速なpH中和を確実にした。

10

## 【0320】

280 nm波長で陽性の吸収を有する全てのフラクションをプールし、サイズ排除クロマトグラフィー工程に進めた。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)のために、プールしたタンパク質を7 mL(大規模プロセス)または1.5 mL(小規模プロセス)に濃縮した。SECクロマトグラフィーは、バッファー交換目的で利用され、ならびに、少量の多重結合種または凝集した種の最終産物からの区別を提供する。SECおよび最終タンパク質処方のための移動相は、35 mMリン酸ナトリウム、120 mM塩化ナトリウム、pH 7.3であった。大規模SECは、Pharmacia Superdex 200 prep等級SECカラム(321 mL床容量で26/60様式)上で実施した。小規模SECは、Pharmacia Superdex 200 prep等級SECカラム(120 mL床容量で16/60様式)上で実施した。プロセス規模にもよるが、2.5 mL/分または1.5 mL/分の流速(各々、大規模または小規模の場合)をSEC工程に用いた。主要な対称ピーク下のフラクションをプールし、いずれかの少量レベルの高分子量物質を最終産物から排除することに重点を置いた。最終的なプールを0.2 μでフィルター滅菌し、アリコートに分け、-80°で保管した。この同じ方法を、全てのFGFR受容体および可溶性FGFR受容体(FGFR)およびVEGF-A抗体の二重特異的結合性組成物を処理するために使用する。

20

【0321】

実施例17:FGF-刺激HUVEC細胞上での可溶性FGFR受容体の中和活性を決定するための<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイ

種々のFGFの活性を阻害する中和性可溶性FGFR受容体(FGFR)についてスクリーンするために、ヒト臍帯内皮細胞(HUVEC)を用いる<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイを行った。組み換えヒトFGF1、2、4および6(R&D Systems, Inc.)をアッセイ培地(RPMI-1640、1%FBS、1単位/mLヘパリンおよびピルビン酸塩)中10 ng/mLで用いた。次いで、可溶性ヒトFGFR(R&D Systems and ZymoGenetics)を0.5-4 μg/mL(受容体に依存する)から漸増し、アッセイ培地中32-4 ng/mLに連続希釈した。HUVECを96-ウェル平底プレート(Costar)中に、容量100 μL、密度2000細胞/ウェルにて播種した。HUVEC増殖アッセイは、37°、5%CO<sub>2</sub>で2日間培養した。次いで、HUVECを1 μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジン(Amersham, TRK120)(増殖細胞中に組み込まれる)で18時間パルスした(全て、37°、5%CO<sub>2</sub>)。細胞を採取し、Packard TopCount NXTプレートリーダー上でカウントした。

30

## 【0322】

結果:試験された全てのFGFRは、予想通り類似の活性でFGF1を中和した。FGFR1およびFGFR2(R&D Systems)は、全てのFGFを強力に中和した。一方、FGFR3およびFGFR4(R&D Systems)は、FGF2、4および6活性の阻害において、あまり強力ではない。FGFR3 A2258F(143\_375, S249W)(配列番号10)およびFGFR3 A2256F(22\_375, S249W)(配列番号10)は、FGF2、4および6活性の阻害において、あまり強力ではない。FGFR3 A2258F(143\_375, S249W)(配列番号10)およびFGFR3 A2256F(22\_375, S249W)(配列番号10)は、FGF2、4および6活性の阻害において、あまり強力ではない。

40

50

列番号2)は、FGF1、2、4および6を、FGFR1に類似するIC50値で、強力に中和した。

【0323】

【表26】

表26

IC50 (nM)	FGF1	FGF2	FGF4	FGF6
FGFR1 (R&D systems)	0.63	0.92	0.53	0.42
FGFR2 (R&D systems)	0.42	0.85	0.48	0.3
FGFR3 (R&D systems)	0.53	5.5	1.06	9.96
FGFR4 (R&D systems)	0.85	18	4.15	19
FGFR3 A2258F (ZymoGenetics)	0.55	0.67	0.68	0.78
FGFR3 A2256F (ZymoGenetics)	0.82	1	0.74	0.95

【0324】

実施例18：FGF8b-刺激LNCap細胞上の可溶性FGF受容体の中和活性を決定するための<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイ

FGF8bの活性を阻害する中和性可溶性FGF受容体(FGFR)についてスクリーニングするために、ヒトLNCap細胞を用いる<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイを行った。組み換えヒトFGF8b (R&D Systems, Inc.)をアッセイ培地 (RPMI-1640、1% BSA、ITS [インスリン-トランスフェリンおよびセリニウム]、L-グルタミン酸塩およびピルビン酸塩 [全てInvitrogenから入手]) 中200~1000ng/mlで用いた。次いで、R&D Systems由来の可溶性ヒトFGFR (R1-R4) およびZymoGenetics由来のFGFR3および2を1-2ug/mlから漸増(titrate)し、アッセイ培地中31-15ng/mlに連続希釈した。LNCap細胞を96-ウェル平底プレート(Costar)中に、容量100μL、密度2500細胞/ウェルにて播種した。LNCap増殖アッセイは、37、5%CO<sub>2</sub>で3日間培養した。次いで、LNCapを1μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジン(Amersham, TRK120) (増殖細胞中に組み込まれる)で8時間パルスした(全て、37、5%CO<sub>2</sub>)。細胞を採取し、Packard TopCount NXTプレートリーダー上でカウントした。

【0325】

結果：R1を除くR&D SystemのFGFR R2-R4は、FGF8bを中和した。全長FGFR2 A2556F (22\_377)配列番号24、A2557F (22\_377) (S252W)配列番号29、およびA2558F (22\_377) (P253R)配列番号33は、FGF8bを中和しなかった。一方、切断型FGFR2 A2559F (145\_377)配列番号37、A2560F (145\_377) (S252W)配列番号40、およびA2561F (145\_377) (P253F)配列番号42は、R&D SystemsのFGFR2と同様にFGF8bを中和した。FGFR3 A2519F (143\_375) (P250R)配列番号22、A2256F (23\_375) (S249W)配列番号2、およびA2258F (143\_375) (S249W)配列番号10は、FGF8bを中和したが、A2518F (143\_375)配列番号19、A2257F (23\_375)配列番号13、およびA2259F (23\_375) (P250R)配列番号15は中和しなかった。

【0326】

10

20

30

40

## 【表27】

表27

FGFRs	増殖 IC50 (nM)
R&D FGFR1	ND
R&D FGFR2	0.29
R&D FGFR3	0.79
R&D FGFR4	0.13
FGFR2 A2556F	ND
FGFR2 A2557F	ND
FGFR2 A2558F	ND
FGFR2 A2559F	0.3
FGFR2 A2560F	0.01
FGFR2 A2561F	0.01
FGFR3 A2518F	ND
FGFR3 A2519F	0.01
FGFR3 A2256F	0.01
FGFR3 A2257F	ND
FGFR3 A2258F	0.02
FGFR3 A2259F	ND

10

20

30

40

50

ND, 測定せず。

## 【0327】

実施例19：FGF8b-刺激MCF-7細胞上の可溶性FGF受容体の中和活性を測定するための<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイ

FGF8bの活性を阻害する中和性可溶性FGF受容体(FGFR)についてスクリーニングするために、ヒトMCF-7細胞を用いる<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイを行う。組み換えヒトFGF8b(R&D Systems, Inc.)をアッセイ培地(RPMI-1640、5%FBS、L-グルタミン酸塩およびピルビン酸塩)中100ng/mlで用いる。次いで、R&D Systems由来の可溶性ヒトFGFR-Fc(R1-R4)およびZymoGenetics由来のFGFR3および2を10ug/mlから漸増し、アッセイ培地中78ng/mlに連続希釈する。MCF-7細胞を96-ウェル平底プレート(Costar)中に、容量100μL、密度1250細胞/ウェルにて播種する。MCF-7増殖アッセイは、37、5%CO<sub>2</sub>で4日間培養する。次いで、細胞を1μCi/ウェルの<sup>3</sup>H-チミジン(Amersham, TRK120)(増殖細胞中に組み込まれる)で8時間パルスする(全て、37、5%CO<sub>2</sub>)。細胞を採取し、Packard TopCount NXTプレートリーダー上でカウントする。

## 【0328】

実施例20：FGF9-刺激HCO骨芽細胞上のsFGFR-Fcの中和活性を測定するための<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイ

FGF9-刺激骨芽細胞増殖に対するsFGFR-Fc構築物の中和効果を決定するために、<sup>3</sup>H-チミジン増殖アッセイを行った。ヒト骨芽細胞をヒトFGF-9で刺激して生育させた。FGFR-Fcタンパク質をアッセイ培地に0.02nM~6nMの濃度で加えた。骨芽細胞に対する有意な阻害が観察され、各タンパク質についてIC50が計算された。

## 【0329】

研究計画：ヒト頭蓋冠骨芽細胞(HCO; ScienCell, Carlsbad, CA)を1.2nMのヒトFGF-9(R&D Systems, Minneapolis, MN)で刺激した。OBMアッセイ培地[0.5%胎仔ウシ血清(FBS)、2mM Glutamax(Invitrogen, Carlsbad, CA

)、1 mM ピルビン酸ナトリウム、および 1 × インスリン - トランスフェリン - セリニウム (Invitrogen) を含有する骨芽細胞基礎培地 (ObM, ScienCell) ] を陰性対照として用いた。ヒト FGFR1-Fc、FGFR2-Fc、FGFR3-Fc、および FGFR4-Fc (R&D Systems) を ObM アッセイ培地中、6 nM、2 nM、0.67 nM、0.22 nM、0.07 nM、および 0.02 nM にて連続希釈した。FGFR3-Fc 変異体 (ZymoGenetics, Seattle, WA) もまた、同様に希釈した。HCO 細胞を、5% FBS および骨芽細胞成長サプリメント (ObGS, ScienCell) を補足した ObM 中、96 ウェル平底プレート中において、容量 100 μL、密度 1000 細胞 / ウェルで播種した。プレートを 37°C、5% CO<sub>2</sub> で一晩インキュベートした。細胞を ObM アッセイ培地で 24 時間血清飢餓にし、連続希釈した FGFR-Fc を用いて、または用いないで、1.2 nM FGFR-Fc で 24 時間刺激し、1 μCi / ウェルの <sup>3</sup>H-チミジン (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) (増殖細胞中に組み込まれる) で 24 時間パルスした (全て、37°C、5% CO<sub>2</sub>)。細胞を採取し、Packard TopCount NXT 上でカウントした。  
10

## 【0330】

結果は、図 3 に示されるように、変異体 FGFR3-Fc 構築物がヒト骨芽細胞増殖を有意に阻害し、R&D Systems 由来の FGFR3-Fc の 3 倍の範囲の IC50 を有したことを見明らかにし、図 2 は、全長 FGFR3-Fc 野生型および変異体構築物 (ZymoGenetics) が類似の IC50 を有することを示す。

## 【0331】

## 【表 28】

表 28：骨芽細胞増殖アッセイにおける FGFR-Fc IC50

FGFR-Fc	増殖 IC50 (nM)
FGFR1-Fc	1.10
FGFR2-Fc	0.49
FGFR3-Fc	0.44
FGFR4-Fc	6.63
全長 FGFR3-Fc (A2257F)	1.19
全長 FGFR3-Fc S249W (A2256F)	0.84
全長 FGFR3-Fc P250R (A2259F)	1.14
切断型 FGFR3-Fc (A2518F)	0.77
切断型 FGFR3-Fc S249W (A2258F)	0.75
切断型 FGFR3-Fc P250R (A2519F)	0.99

## 【0332】

実施例 21：FGFR-Fc 野生型および変異体構築物の FGFR-8b および FGFR-17 に対する結合

FGFR-Fc の各リガンドに対する結合能を決定するために、ELISA を行った。組み換えヒト FGFR-8b または FGFR-17 (R&D Systems) を 100 nM にて、Nunc Maxisorp 96 - ウェルプレート上、振盪しながら室温で 1 時間培養した。プレートを室温で 1 時間、BLOTTO (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) でブロックし、次いで、ELISA C バッファー (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% (v/w) ポリソルベート 20, pH 7.2) で 5 回洗浄した。FGFR-Fc を PBS / 0.1 × BLotto / 10 μg / mL ブタヘパリン (Sigma, St. Louis, MO) で 100 nM に希釈し、次いで、0.10 nM で終了する 1:2 連続希釈を行った。100 μL の FGFR-Fc を播種し、4°C で一晩インキュベートした。次の日に、プレートを ELISA C で 5 回洗浄し、次いで、2.5 μg / mL 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型抗 - ヒト Fc 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) と共に、振盪し  
40

10

20

30

50

ながら室温で1時間インキュベートした。ELISA Cで5回洗浄後、クエン酸バッファー(63 mMクエン酸ナトリウム中の5 mg o-フェニレンジアミン、37 mMクエン酸、pH 5.0、0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)中における100 μLのOPDを検出のために加えた。2-5分後、1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を止めた。Soft Max Proソフトウェアを用いて、プレートを490 nmで読み取った。

### 【0333】

結果：野生型および変異体FGFR2-Fc sは、FGF-8bまたは-17に有意に結合しなかったが、図5A、5B、6A、6Bおよび7に示されるように、いくつかの変異体FGFR3-Fc構築物は、野生型FGFR3-Fcよりも高い程度まで、FGF-8bおよびFGF-17の両方に結合した。

10

### 【0334】

#### 【表29】

表29：野生型および変異体FGFR3-Fc構築物はFGF-8bおよびFGF-17を結合する

FGFR-Fc	FGF-8b 結合 IC50 (nM)	FGF-17 結合 IC50 (nM)
FGFR1-Fc	n/a	n/a
FGFR2-Fc	n/a	n/a
FGFR3-Fc	23.4	30.1
FGFR4-Fc	142	317
全長 FGFR2-Fc (A2556F)		n/a
全長 FGFR2-Fc S252W (A2557F)		n/a
全長 FGFR2-Fc P253R (A2558F)		n/a
切断型FGFR2-Fc (A2559F)		n/a
切断型 FGFR2-Fc S252W (A2560F)		223
切断型 FGFR2-Fc P253R (A2561F)		n/a
全長 FGFR3-Fc (A2257F)	41.9	20.1
全長 FGFR3-Fc S249W (A2256F)	37.7	8.66
全長 FGFR3-Fc P250R (A2259F)	52.6	45.3
切断型 FGFR3-Fc (A2518F)	16.4	3.79
切断型 FGFR3-Fc S249W (A2258F)	10.0	1.31
切断型 FGFR3-Fc P250R (A2519F)	9.7	37.6

20

30

### 【0335】

実施例22：表面プラズモン共鳴によるFGF受容体のFGFリガンドに対する結合アフィニティの測定

運動速度定数、平衡会合定数および平衡解離定数は、可溶性FGF受容体(FGFR)とFGFリガンドとの相互作用について、表面プラズモン共鳴によって測定された。種々の形態のFGFR3が該研究において調べられた。FGFR3は、2または3個のIg様ドメイン、および2つの可能な点変異(S249WまたはP250R)と共に生産された。各FGFR3は、二量体Fc-融合タンパク質として生産された。これらの研究のために、Fc-タグを用いて、タンパク質Aを予め固定化したBiacoreチップ上にFGFR分子を捕獲した。FGFリガンドは、ヘパリン含有バッファー上で表面にフローさせた。FGFリガンドは単量体であるが、それらは、ヘパリンの存在下で二量体に会合すると考えられている。結果として、二価の分析モデルがこれらの相互作用に適すると決定された。

40

### 【0336】

アフィニティ測定：FGF受容体は、FGFリガンドに対する結合アフィニティについて特徴付けられた。会合速度定数( $k_a$  (M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>))および解離速度定数( $k$

50

$k_d$  ( $s^{-1}$ ) は、各相互作用について測定された。会合速度定数は、リガンド - 受容体複合体形成の速度を反映する値である。解離速度定数は、該複合体の安定性を反映する値である。平衡結合アフィニティーは、典型的に、平衡解離定数 ( $K_D$  (M)) または平衡会合定数 ( $K_A$  (M $^{-1}$ )) として表される。 $K_D$  は、解離速度定数を会合速度定数で割ることによって得られ ( $k_d / k_a$ )、一方、 $K_A$  は、会合速度定数を解離速度定数で割ることによって得られる ( $k_a / k_d$ )。類似の  $K_D$  (または類似の  $K_A$ ) を有する分子は、幅広く変化可能な会合および解離速度定数を有することができる。結果として、 $k_a$  および  $k_d$  ならびに  $K_A$  または  $K_D$  を測定することは、リガンド - 受容体相互作用のアフィニティーをより独特に表す助けとなる。

## 【0337】

10

材料および方法：結合速度論およびアフィニティー研究は、Biacore T100 (商標) システム (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 上で実施された。Biacore T100 (商標) のための方法は、Biacore T100 (商標) Control Software, v2.0 を用いてプログラム化された。FGF 受容体分子の各々がヒト Fc ドメインを含有したので、ビオチン化タンパク質 - A (Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, IL) をこれらの研究の捕獲試薬として用いた。ビオチン化タンパク質 - A は、HBS - EP バッファー (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% 界面活性剤 P20; GE Healthcare, Piscataway, NJ) 中 50  $\mu$ g / mL の濃度に希釈し、次いで、SA (ストレプトアビジン) センサーチップの全部で 4 つのフローセルに捕獲した。約 1100 RU の密度を各フローセルについて得た。各 FGF 受容体分子は、次に、タンパク質 - A を介して、SA チップの分離したフローセル上に、約 150 - 250 RU の密度で捕獲された。Biacore 装置は、センサーチップ表面に結合したタンパク質の質量を測定し、かくして、各サイクルについて、受容体の捕獲を証明した。

20

## 【0338】

速度論的 (kinetic) 結合研究のために、FGF リガンドの連続 1 : 5 希釈物を 200 nM ~ 0.06 nM で調製した。これらの試料を表面にインジェクトし、センサーチップ上に捕獲された FGF 受容体への特異的結合を可能にした。各リガンド濃度のインジェクションは、会合時間 7 分および解離時間 15 分を用いて実施された。速度論的結合研究は、流速 50  $\mu$ L / 分で実施された。全ての結合実験は、50  $\mu$ g / mL ヘパリン (Calbiochem, La Jolla, CA) を含有する HBS - P バッファー (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% 界面活性剤 P20, pH 7.4; GE Healthcare, Piscataway, NJ) 中、25 で実施された。

30

## 【0339】

40

サイクルとサイクルの間に、20 mM 塩酸でフローセルを洗浄して、該表面を再生した。該洗浄工程は、捕獲した VEGF 受容体およびいずれかの結合した FGF リガンドの両方をタンパク質 - A 表面から除去し、次の試験試料のその後の結合を可能にした。データは、Biacore T100 (商標) 評価ソフトウェア (バージョン 2.0) を用いてまとめた。データは、参照フローセルおよびブランクインジェクションを差し引くことによって処理した。再生工程が一連のインジェクションを通して一定の結合表面を提供したことを確実にするために、ベースライン安定性を評価した。2 回のインジェクション曲線を再現性についてチェックした。結合曲線は、二価分析相互作用モデルに全体的にフィットした。

## 【0340】

50

結果：二価の分析モデルは、これらの相互作用に最も適当であることが決定された。該モデルは、 $k_a$  ( $k_{a1}$  および  $k_{a2}$ ) および  $k_d$  ( $k_{d1}$  および  $k_{d2}$ ) について 2 つの値を測定する。第 1 セットの値 ( $k_{a1}$  および  $k_{d1}$ ) は、相互作用の一価の反応速度論を表す。これらの試料に関して報告されたアフィニティーは、これらの値に由来し、 $K_{D1}$  および  $K_{A1}$  と称する。第 2 のセットの値 ( $k_{a2}$  および  $k_{d2}$ ) は、相互作用のアビディティ (avidity) を示し、報告されていない。残留物にある程度の傾向があるが、

モデルに対するフィットは、結合アフィニティーを評価するのに十分であった。種々の F G F R 3 分子と F G F 6 との結合相互作用の反応速度論は、表 3 0 に詳述する。全長 F G F R 分子 ( 2 3 \_ 3 7 5 ) のアフィニティーは、2 ドメイン F G F R 分子 ( 1 4 3 \_ 3 7 5 ) と類似した。点変異は、S 2 4 9 W > P 2 5 0 R > 野生型のアフィニティーで、F G F 6 に対するアフィニティーを増加させた。一般的に、該アフィニティー増加は、主として、より遅い解離速度定数に起因した。

## 【 0 3 4 1 】

## 【表 3 0 】

表 3 0 : F G F 6 に対する結合アフィニティー

記載	$k_{a1}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{d1}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_{D1}$ (M)	$K_{A1}$ (M <sup>-1</sup> )
FGFR3IIIc(23_375) C(Fc5)	4.E+05	6.E-02	2.E-07	7.E+06
FGFR3IIIc(23_375) (S249W) C(Fc5)	6.E+05	5.E-04	8.E-10	1.E+09
FGFR3IIIc(23_375) (P250R) C(Fc5)	3.E+05	5.E-03	2.E-08	6.E+07
FGFR3IIIc(143_375) C(Fc5)	2.E+05	6.E-02	3.E-07	3.E+06
FGFR3IIIc(143_375) (S249W) C(Fc5)	3.E+05	6.E-04	2.E-09	5.E+08
FGFR3IIIc(143_375) (P250R) C(Fc5)	2.E+05	4.E-03	2.E-08	5.E+07

## 【 0 3 4 2 】

実施例 2 3 : 腫瘍細胞上の F G F R - F c による増殖の阻害を決定するための <sup>3</sup> H - チミジン増殖アッセイ

F G F R - F c の腫瘍細胞増殖阻害能を決定するために、<sup>3</sup> H - チミジンアッセイを行った。C a k i - 1 および D U 1 4 5 腫瘍細胞を 9 6 ウェル平底プレート中に、2 0 0 0 細胞 / ウェルの密度で播種し、3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で一晩インキュベートした。次の日に、F G F R - F c 構築物を R P M I 1 6 4 0 ( 0 . 5 % F B S 、 1 m M ピルビン酸ナトリウム、および 2 m M G l u t a M A X を含有する) 中で、2 0 、 1 0 、 および 5 μ g / m L にて連続希釈し、3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で 3 日間、細胞上に播種した。細胞を 1 μ C i / ウェルの <sup>3</sup> H - チミジン (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ) (増殖細胞中に組み込まれる) で 2 4 時間パルスした。細胞を採取し、P a c k a r d T o p C o u n t N X T 上でカウントした。

## 【 0 3 4 3 】

結果 : 2 0 μ g / m L にて、切断型 F G F R 3 - F C S 2 4 9 W 変異体は、C a k i - 1 および D U 1 4 5 細胞の両方を、野生型 F G F R 2 - F c または F G F R 3 - F c よりも僅かに大きい程度まで阻害した。図 8 A は、F G F R - F c が C a k i - 1 細胞の増殖を阻害することを示し、図 8 B は、F G F R - F c が D U 1 4 5 細胞の増殖を阻害することを示す。

## 【 0 3 4 4 】

## 【表 3 1 】

表 3 1 : 増殖のパーセント阻害

細胞	全長FGFR2-Fc A2256F	全長FGFR3-Fc A2257F	切断型FGFR3-Fc S249W A2258F
Caki-1	41%	48%	56%
DU145	47%	53%	59%

## 【 0 3 4 5 】

実施例 2 4 : s F G F R - V E G F s c F v タンパク質による内皮細胞発芽 (sprouting) の阻害

V E G F - A 抗体 / 可溶性 F G F 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的

10

20

30

40

50

結合性タンパク質の効力を試験するために、内皮細胞および周皮細胞のイン・ビトロ共培養系を記載のように (Darlandら、Dev Biol 264 (2003), 275) 確立した。該共培養において、Cytodexビーズ上にコートされたHUVECをヒト間葉幹細胞 (Lonzo) と共に、EGM-2完全培地およびD551線維芽細胞馴化培地の存在下、フィブリンゲル中で共培養した。実験開始時または実験7日目に、0.04-50nMの対照アンタゴニスト、VEGF-AアンタゴニストまたはVEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を培養物に加える。PFAを用いるアンタゴニストの添加後、8日目に細胞を固定化する。次いで、抗-平滑筋細胞アクチン (aSMA) または抗-PECAM抗体を用いて、細胞をIHCによって染色して、各々、周皮細胞および内皮細胞を同定する。対照アンタゴニスト処理したウェル中、これらの細胞は、周皮細胞のカバーによって保護された内皮細胞の芽 (sprout) を形成する。抗-VEGF-A、VEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質で処理された細胞中、芽の数および芽の長さが減少し、アンタゴニストがイン・ビトロでの共培養モデルにおいて効力を示すことを示唆する。

10

#### 【0346】

研究計画：1日目に、Cytodex-3ビーズをHUVECでコートし、37%CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートする。2日目に、24ウェルプレートのウェル中において、HUVECビーズ (200ビーズ/ウェル) をヒト間葉幹細胞 (hMSC) (40,000細胞/ウェル) と共に、フィブリンゲル中に包埋させる。EGM-2完全培地およびD551線維芽細胞培地の1:1混合物を、2ng/mLのHGFと共に、これらの細胞に加える。実験の最後まで、培地を2日毎に取り替える。2日目 (共培養の開始から) または7日目 (共培養形成後) に、培養物にアンタゴニストを加える。アンタゴニストの添加6日後に、細胞を4%PFA中で一晩固定化する。細胞を抗-PECAMまたは抗-SMA抗体、次いで、二次抗体 (蛍光コンジュゲート) で染色する。次いで、細胞を顕微鏡で観察し、10ビーズ/ウェルの代表的セットについて、芽の数および長さを手動でカウントする。次いで、ウェルの平均を計算する。

20

#### 【0347】

結果：対照アンタゴニスト処理したウェル中、細胞は、周皮細胞のカバーによって保護された内皮細胞の芽を形成する。抗-VEGF-AまたはVEGF-A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質で処理した細胞中、芽の数および芽の長さの減少は、アンタゴニストが該イン・ビトロ共培養モデルにおいて効力を示すことを示唆する。

30

#### 【0348】

実施例25：sFGFR-Fcタンパク質での予防的処置は、Nu/NuマウスにおけるA549肺癌細胞の増殖を阻害する

sFGFRタンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0日目に、マウス群にA549肺癌腫瘍をs.c.注射する。マウス群 (n=10/群) には、次いで、0.01mg/Kg ~ 10mg/Kgの対照試薬、sFGFR-Fcタンパク質2-3X/週を4週間注射し、腫瘍接種後1日目に開始する。腫瘍体積は、3X/週で4週間モニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、sFGFRタンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

40

#### 【0349】

研究計画：8~10週齢雌Nu/Nuマウス (Charles River Laboratories) の右脇腹に、2×10<sup>6</sup> A549細胞を0日目にs.c.注射する。開始1日目に、マウス群 (n=10/群) に、0.01mg/Kg ~ 10mg/Kg濃度の対照試薬またはsFGFR-Fcタンパク質を2-3X/週で4週間、i.p.注射した。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3X/週で4週間モニターする。腫瘍体積は、式  $1/2^* (B)^2^* L (mm^3)$  を用いて計算する。研究の最後に (最後の投与後24時間) 、マウスを殺し、

50

腫瘍の重量を量り、組織学に付す。腫瘍は、NBF中に固定化し、次いで、マウス内皮細胞に特異的なMECA-32抗体を用いて、免疫組織化学によって血管密度について試験する。

#### 【0350】

結果：対照試薬を注射したマウスと比べて、sFGRタンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0351】

実施例26：sFGR-Fcタンパク質での治療的処置は、Nu/NuマウスにおけるA549肺癌細胞の増殖を阻害する

sFGRタンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0日目に、マウス群にA549肺癌腫瘍をs.c.注射する。腫瘍が200mm<sup>3</sup>のサイズに達したとき、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬、またはsFGR-Fcタンパク質2-3X/週を4週間注射する。腫瘍体積は、3X/週でモニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、sFGRタンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0352】

研究計画：8~10週齢雌Nu/Nuマウス(Charles River Laboratories)の右脇腹に、2×10<sup>6</sup> A549細胞を0日目にs.c.注射する。腫瘍が200mm<sup>3</sup>のサイズに達したとき、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬またはsFGR-Fcタンパク質を2-3X/週で4週間、i.p.注射する。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3X/週で4週間モニターする。腫瘍体積は、式 $1/2^* (B) 2^* L (mm^3)$ を用いて計算する。研究の最後に(最後の投与後24時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量る。腫瘍はまた、微小血管密度について組織学的分析に付す。

#### 【0353】

結果：対照試薬を注射したマウスと比べて、sFGRタンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0354】

実施例27：sFGR-Fcタンパク質での予防的処置は、Nu/NuマウスにおけるDU145前立腺癌細胞の増殖を阻害する

sFGRタンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0日目に、マウス群にDU145前立腺癌腫瘍をs.c.注射する。マウス群(n=10/群)には、次いで、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬、sFGR-Fcタンパク質2-3X/週を4週間注射し、腫瘍接種後1日目に開始する。腫瘍体積は、3X/週で4週間モニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、sFGRタンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0355】

研究計画：8~10週齢雌Nu/Nuマウス(Charles River Laboratories)の右脇腹に、2×10<sup>6</sup> DU145細胞を0日目にs.c.注射する。開始1日目に、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kg濃度の対照試薬またはsFGR-Fcタンパク質を2-3X/週で4週間、i.p.注射した。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3X/週で4週間モニターする。腫瘍体積は、式 $1/2^* (B) 2^* L (mm^3)$ を用いて計算する。研究の最後に(最後の投与後24時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量り、組織学に付す。腫瘍は、NBF中に固定化し、次いで、マウス内皮細胞に特異的なMECA-32抗体を用いて、免疫組織化学によって血管密度について試験する。

#### 【0356】

結果：対照試薬を注射したマウスと比べて、sFGRタンパク質を注射したマウスに

10

20

30

40

50

において有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

【0357】

実施例28：s F G F R - F c タンパク質での治療的処置は、Nu / NuマウスにおけるDU145前立腺癌細胞の増殖を阻害する

s F G F R タンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0日目に、マウス群にDU145前立腺癌腫瘍をs.c.注射する。腫瘍が200mm<sup>3</sup>のサイズに達したとき、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬、またはs F G F R - F c タンパク質2-3X/週を4週間注射する。腫瘍体積は、3X/週でモニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、s F G F R - F c タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

10

【0358】

研究計画：8~10週齢雌Nu / Nuマウス(Charles River Laboratories)の右脇腹に、2×10<sup>6</sup> DU145細胞を0日目にs.c.注射する。腫瘍が200mm<sup>3</sup>のサイズに達したとき、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kg濃度の対照試薬またはs F G F R - F c タンパク質を2-3X/週で4週間、i.p.注射した。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3X/週でモニターする。腫瘍体積は、式 $1/2^* (B) 2^* L (mm^3)$ を用いて計算する。研究の最後に(最後の投与後24時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量る。腫瘍はまた、微小血管密度について組織学的分析に付す。

20

【0359】

結果：対照試薬を注射したマウスと比べて、s F G F R タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

【0360】

実施例29：二重特異的結合性タンパク質での予防的処置は、Nu / NuマウスにおけるA549肺癌細胞の増殖を阻害する

VEGF - A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0日目に、マウス群にA549肺癌腫瘍をs.c.注射する。マウス群(n=10/群)には、次いで、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬、s F G F R - V E G F - s c F v 融合タンパク質2-3X/週を4週間注射し、腫瘍接種後1日目に開始する。腫瘍体積は、3X/週で4週間モニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF - A抗体/可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

30

【0361】

研究計画：8~10週齢雌Nu / Nuマウス(Charles River Laboratories)の右脇腹に、2×10<sup>6</sup> A549細胞を0日目にs.c.注射する。開始1日目に、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬またはs F G F R - V E G F - s c F v 融合タンパク質を2-3X/週で4週間、i.p.注射した。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3X/週で4週間モニターする。腫瘍体積は、式 $1/2^* (B) 2^* L (mm^3)$ を用いて計算する。研究の最後に(最後の投与後24時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量り、組織学に付す。腫瘍は、NBF中に固定化し、次いで、マウス内皮細胞に特異的なMECA-32抗体を用いて、免疫組織化学によって血管密度について試験する。

40

【0362】

結果：対照試薬を注射したマウスと比べて、s F G F R - V E G F - s c F v 融合タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

【0363】

50

実施例 3 0 : 二重特異的結合性タンパク質での治療的処置は、N u / N u マウスにおける A 5 4 9 肺癌細胞の増殖を阻害する

VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0 日目に、マウス群に A 5 4 9 肺癌腫瘍を s . c . 注射する。腫瘍が 2 0 0 mm<sup>3</sup> サイズに達したとき、マウス群 (n = 1 0 / 群) には、0 . 0 1 mg / Kg ~ 1 0 mg / Kg の対照試薬、または VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質 2 - 3 X / 週を 4 週間注射する。腫瘍体積は、3 X / 週でモニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【 0 3 6 4 】

研究計画 : 8 ~ 1 0 週齢雌 N u / N u マウス (Charles River Laboratories) の右脇腹に、2 × 1 0<sup>6</sup> A 5 4 9 細胞を 0 日目に s . c . 注射する。腫瘍が 2 0 0 mm<sup>3</sup> サイズに達したとき、マウス群 (n = 1 0 / 群) に、0 . 0 1 mg / Kg ~ 1 0 mg / Kg の対照試薬、または VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を 2 - 3 X / 週で 4 週間、i . p . 注射する。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3 X / 週でモニターする。腫瘍体積は、式 1 / 2 \* (B) 2 \* L (mm<sup>3</sup>) を用いて計算する。研究の最後に (最後の投与後 2 4 時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量る。腫瘍はまた、微小血管密度について組織学的分析に付す。

#### 【 0 3 6 5 】

結果 : 対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【 0 3 6 6 】

実施例 3 1 : 二重特異的結合性タンパク質での予防的処置は、N u / N u マウスにおける DU 1 4 5 前立腺癌細胞の増殖を阻害する

VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するために、0 日目に、マウス群に DU 1 4 5 前立腺癌腫瘍を s . c . 注射する。マウス群 (n = 1 0 / 群) には、次いで、0 . 0 1 mg / Kg ~ 1 0 mg / Kg の対照試薬、VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を 2 - 3 X / 週を 4 週間注射し、腫瘍接種後 1 日目に開始する。腫瘍体積は、3 X / 週で 4 週間モニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【 0 3 6 7 】

研究計画 : 8 ~ 1 0 週齢雌 N u / N u マウス (Charles River Laboratories) の右脇腹に、2 × 1 0<sup>6</sup> DU 1 4 5 細胞を 0 日目に s . c . 注射する。開始 1 日目に、マウス群 (n = 1 0 / 群) に、0 . 0 1 mg / Kg ~ 1 0 mg / Kg 濃度の対照試薬または VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を 2 - 3 X / 週で 4 週間、i . p . 注射した。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3 X / 週で 4 週間モニターする。腫瘍体積は、式 1 / 2 \* (B) 2 \* L (mm<sup>3</sup>) を用いて計算する。研究の最後に (最後の投与後 2 4 時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量り、組織学に付す。腫瘍は、NBF 中に固定化し、次いで、マウス内皮細胞に特異的な M E C A - 3 2 抗体を用いて、免疫組織化学によって血管密度について試験する。

#### 【 0 3 6 8 】

結果 : 対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF - A 抗体 / 可溶性 FGF 受容体二

10

20

30

40

50

重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0369】

実施例32：二重特異的結合性タンパク質での治療的処置は、N<sub>u</sub> / N<sub>u</sub>マウスにおけるDU145前立腺癌細胞の増殖を阻害する

VEGF-A抗体 / 可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質がマウスにおける腫瘍成長に対して活性を有するか否かを試験するため10に、0日目に、マウス群にDU145前立腺癌腫瘍をs.c.注射する。腫瘍が200mm<sup>3</sup>サイズに達したとき、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬、またはVEGF-A抗体 / 可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質2-3X/週を4週間注射する。腫瘍体積は、3X/週でモニターする。対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF-A抗体 / 可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0370】

研究計画：8~10週齢雌N<sub>u</sub> / N<sub>u</sub>マウス(Charles River Laboratories)の右脇腹に、2×10<sup>6</sup>DU145細胞を0日目にs.c.注射する。腫瘍が200mm<sup>3</sup>サイズに達したとき、マウス群(n=10/群)に、0.01mg/Kg~10mg/Kgの対照試薬、またはVEGF-A抗体 / 可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を2-3X/週で4週間、i.p.注射する。腫瘍成長は、カリパス測定を用いて、3X/週でモニターする。腫瘍体積は、式 1/2<sup>\*</sup>(B)2<sup>\*</sup>L(mm<sup>3</sup>)を用いて計算する。研究の最後に(最後の投与後24時間)、マウスを殺し、腫瘍の重量を量る。腫瘍はまた、微小血管密度について組織学的分析に付す。

#### 【0371】

結果：対照試薬を注射したマウスと比べて、VEGF-A抗体 / 可溶性FGF受容体二重特異的結合性タンパク質を含む二重特異的結合性タンパク質を注射したマウスにおいて有意に小さい腫瘍は、腫瘍成長の阻害に対するアンタゴニストの効力を示す。

#### 【0372】

上記から、本発明の特定の具体例を説明目的で記載しているが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、種々の修飾を施してもよいことは明らかである。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲によるものを除き、限定されない。本明細書中に挙げられた全ての出版物、特許、および特許出願は、全ての目的において、出典明示により、全体として本明細書の一部とされる。

【図1A】

1/11

	LC	HC	HC	
	218	222	230	
wt	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
Fc-488	. . Arg . Ser .			
Fc4	. . Arg . Ser .			
Fc5	. . . . Ser .			
Fc6	. . . . Ser .			
Fc7	. .			
	<- ピジ' ->			
	234 235 237	245		
wt	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
Fc-488	. .			
Fc4	. . . . Ala Glu . Ala . . . . . . . . . . . . . . . . . .			
Fc5	. . . . Ala Glu . Ala . . . . . . . . . . . . . . . . . .			
Fc6	. . . . Ala Glu . Ala . . . . . . . . . . . . . . . . . .			
Fc7	. .			
	CH2 ->			
	260			
wt	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
Fc-488	. .			
Fc4	. .			
Fc5	. .			
Fc6	. .			
Fc7	. .			
	275			
wt	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
Fc-488	. .			
Fc4	. .			
Fc5	. .			
Fc6	. .			
Fc7	. .			
	290			
wt	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys			
Fc-488	. .			
Fc4	. .			
Fc5	. .			
Fc6	. .			
Fc7	. .			
	297	305		
wt	Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
Fc-488	. .			
Fc4	. .			
Fc5	. .			
Fc6	. .			
Fc7	. .			
	Gln			

Fig. 1A

【図1C】

3/11

	410		
wt	Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	425		
wt	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	431	440	
wt	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	446		
wt	Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys ***		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		

Fig. 1C

【図1B】

2/11

	320		
wt	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	330 331	335	
wt	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	350		
wt	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	<- CH2 CH3 ->		
	356	358	365
wt	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	380		
wt	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		
	395		
wt	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
Fc-488	. .		
Fc4	. .		
Fc5	. .		
Fc6	. .		
Fc7	. .		

Fig. 1B

【図2】

4/11

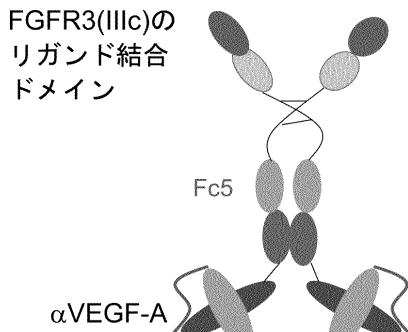


Figure 2

## 【図3】

5/11

FGFR-Fc (R&D Systems) は、骨芽細胞のFGF-9刺激増殖の変化可能な阻害を示す。

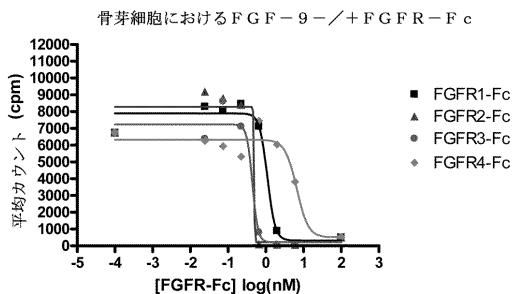


Figure 3

## 【図4】

6/11

Figure 4A: 全長FGFR3-Fc 野生型および変異体構築物 (ZymoGenetics) は、類似のIC50を有する。

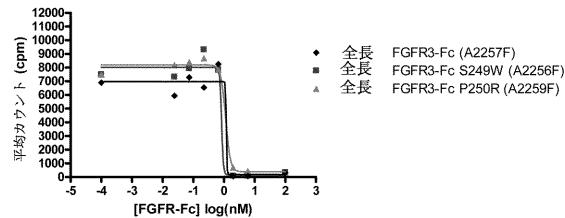
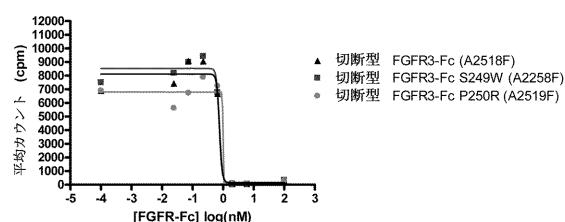
骨芽細胞における  
FGF-9-/+ + FGFR3-Fc 全長変異体

Figure 4B: 切断型FGFR3-Fc 変異体構築物 (ZymoGenetics) は、類似のIC50を有する。

骨芽細胞における  
FGF-9-/+ + FGFR3-Fc 切断型変異体

Figures 4A-B

## 【図5】

7/11

Figure 5A: FGF-8bのFGFR-Fc (R&D Systems)による直接結合  
FGF-8bのFGFR-Fcによる直接結合

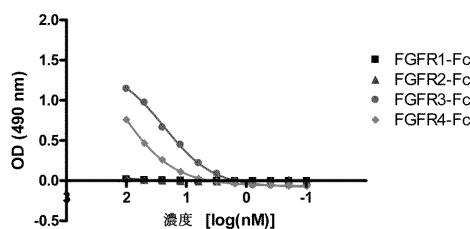
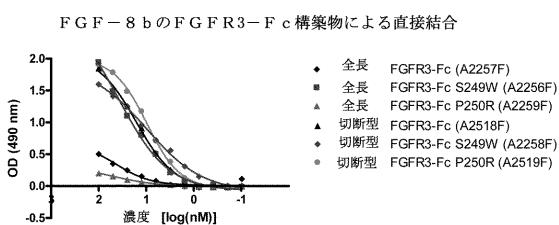


Figure 5B: FGF-8bのFGFR-Fc構築物 (ZymoGenetics)による直接結合



## 【図6】

8/11

Figure 6A: FGF-17のFGFR-Fc (R&D Systems)による直接結合  
FGF-17のFGFR-Fcによる直接結合

## FGF-17のFGFR-Fcによる直接結合

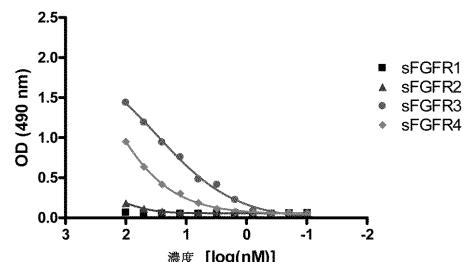
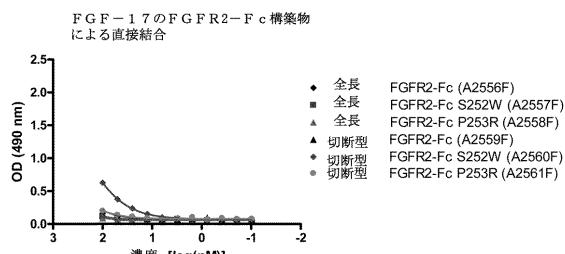
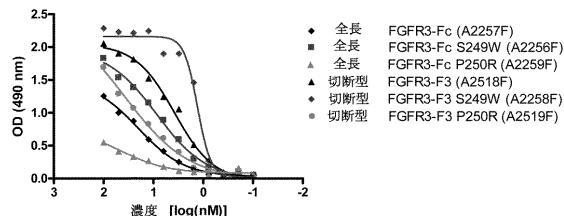


Figure 6B: FGF-17のFGFR-Fc構築物 (ZymoGenetics)による直接結合



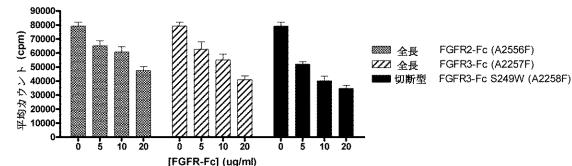
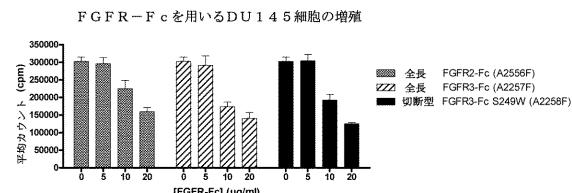
【図7】

9/11

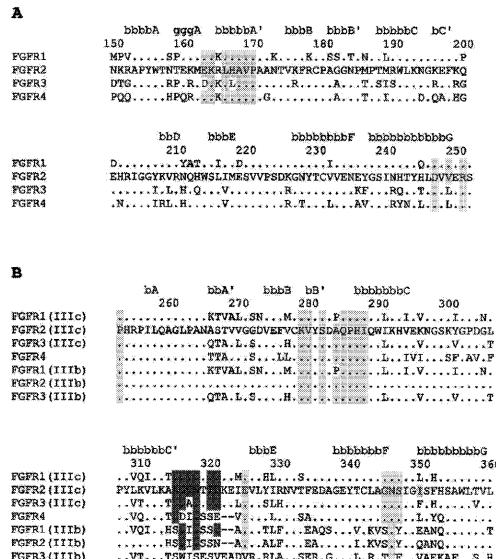
Figure 7: FGF-17のFGFR3-Fc構築物(ZymoGenetics)による直接結合  
FGF-17のFGFR3-Fc構築物による直接結合

【図8】

10/11

Figure 8A: FGF-FcはCaki-1細胞の増殖を阻害する。  
FGFR-Fcを用いるCaki-1細胞の増殖Figure 8B: FGF-FcはDU145細胞の増殖を阻害する。  
FGFR-Fcを用いるDU145細胞の増殖

【図9】



Plotnikov et al. Cell 101 (4), 2000

Figure 9

【手続補正書】

【提出日】平成23年11月28日(2011.11.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2012521768000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2010/028877

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/71 C12N15/62 C07K16/22 A61K39/395 ADD.			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C07K C12N A61K</b>			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) <b>EPO-Internal</b>			
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
A	OGAWA T ET AL: "Anti-tumor angiogenesis therapy using soluble receptors: enhanced inhibition of tumor growth when soluble fibroblast growth factor receptor-1 is used with soluble vascular endothelial growth factor receptor" CANCER GENE THERAPY, NORWALK, CT, US LNKD-DOI:10.1038/SJ.CGT.7700478, vol. 9, no. 8, 1 August 2002 (2002-08-01), pages 633-640, XP002312418 ISSN: 0929-1903 cited in the application figure 5	1-42	
A	WO 03/020906 A2 (ABMAXIS INC [US]; LIU SHENGJIANG [US]; LIU DAYOU [US]; MARTINI JEAN-FR) 13 March 2003 (2003-03-13) page 8 - page 13	1-42	
	-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search <b>23 July 2010</b>		Date of mailing of the international search report <b>05/08/2010</b>	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Cupido, Marinus</b>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/028877

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KANO MITSUNOBU R ET AL: "VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling." JOURNAL OF CELL SCIENCE 15 AUG 2005 LNKD-PUBMED:16105884, vol. 118, no. Pt 16, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 3759-3768, XP002593101 ISSN: 0021-9533 the whole document</p> <p>-----</p> <p>SATHORN SUMETEE SITH ET AL: "Antiangiogenic therapy in malignant glioma: Promise and challenge" CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 13, no. 35, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 3545-3558, XP002570212 ISSN: 1381-6128 page 3545, last paragraph</p> <p>-----</p> <p>CAO YIHAI ET AL: "Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis." ADVANCES IN CANCER RESEARCH 2007 LNKD-PUBMED:17419947, vol. 97, 2007, pages 203-224, XP008124688 ISSN: 0065-230X page 211 - page 212</p> <p>-----</p>	1-42
A		1-42
A		1-42

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/028877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 03020906	A2 13-03-2003	AU 2002339863 A1	EP 1427829 A2	18-03-2003 16-06-2004

## 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 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C 0 7 K 16/22	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

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

(72)発明者 パン・キ

アメリカ合衆国 9 8 0 2 1 ワシントン州ボセル、ナインス・プレイス・ウエスト 2 3 2 2 1 番

(72)発明者 カール・ダブリュー・バークス

アメリカ合衆国 9 8 1 1 5 ワシントン州シアトル、ノースイースト・ナインティファイフス・ストリート 1 5 3 2 番

(72)発明者 パラブル・ブイ・シバクマル

アメリカ合衆国 9 8 1 1 7 ワシントン州シアトル、ジョーンズ・アベニュー・ノースウエスト 8 0 2 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA53 BA63 CA04 CA07 DA02 DA05 DA11 EA04 FA02  
 GA11 HA03  
 4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA01  
 4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA44  
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 NA14 ZB26 ZB261 ZB262  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74