

(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2018-528759

(P2018-528759A)

(43) 公表日 平成30年10月4日(2018.10.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 114 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-567294 (P2017-567294)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月29日 (2016. 6. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年2月21日 (2018. 2. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/040183
 (87) 国際公開番号 W02017/004254
 (87) 国際公開日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)
 (31) 優先権主張番号 62/187, 204
 (32) 優先日 平成27年6月30日 (2015. 6. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516359779
 ヘンリアス バイオテック カンパニー
 リミテッド
 台湾 ニュー タイペイ シティ 221
 80, シーチー ディストリクト, カ
 ンニン ストリート, レーン 169,
 21番, 9エフ-2
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 チアン, ウェイトン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 951
 29, サン ノゼ, イラファ コート
 1438

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2) 抗体

(57) 【要約】

抗血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2) 抗体及びその抗原結合断片が提供される。抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子、関連する発現ベクター、及び宿主細胞もまた提供される。抗VEGFR2抗体及びその抗原結合断片を作製する方法が提供される。抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）を含む関連する薬学的組成物、及び過剰な血管新生を特徴とする病的状態の治療におけるそれらの使用方法もまた提供される。

【選択図】 図1

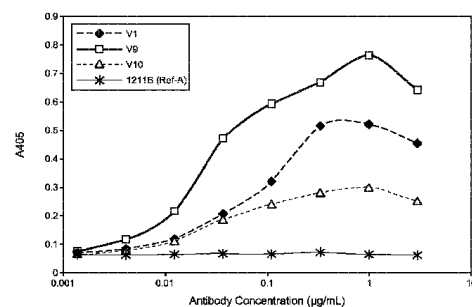


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 の V E G F への結合をブロックしない、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 のドメイン 5-7 に結合する、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 の V E G F への結合をブロックせず、かつ抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 のドメイン 5-7 に結合する、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 4】

抗体が全 H U V E C 細胞に結合する、請求項 1-3 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

抗体又はその抗原結合断片がインビトロで血管新生を阻害しない、請求項 1-4 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

抗体又はその抗原結合断片がインビボで血管新生を阻害する、請求項 1-4 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 7】

抗体又はその抗原結合断片がインビトロで血管新生を阻害せず、かつ抗体又はその抗原結合断片がインビボで血管新生を阻害する、請求項 1-4 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

(1) アミノ酸配列 R A S Q N I A S Y L N (配列番号 76) 又は R A S Q S V S - S / N - S / N - Y L - G / A (配列番号 83) 又は T R S R G S I A S S Y V Q (配列番号 80) 又は R S S Q S L - L / V / Y - H / Y - G / S / R - D / N - G - N / K / Y - N / T - Y / F - L D (配列番号 84) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L / A / G / K / E - G / A / V / N / S - S / D - N / S / Q / K - R / L - A / K / D / P - S / T (配列番号 60) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M / Q - Q / S - A / S / R / G / Y - L / Y / S / A / D / G / T - Q / S / N / H / F - T / I / W / S - P / T - Y / L / P / V / G / I - T / V (配列番号 72) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 T / S - Y - Y / G / A / S - M / I - H / N / S (配列番号 34) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I / V / G / S - I - N / S / I - P / Y / S / G - S / D / I - G / F / S - G / S - S / N / T / Y / A - T / K / A / I - S / Y / N / H - Y A - Q / D - K / S - F / V - K / Q - G (配列番号 40) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 G L W F G E G Y (配列番号 49) 又は E S Y G G Q F D Y (配列番号 43) 又は D L V V P A A T L D Y (配列番号 42) 又は D / G - F / I - Y / I - E / V - A / G - G / P - G / T - W / D - Y / A - F D - L / I (配列番号 51) 又は R D G S L G V G Y Y Y M D F (配列番号 50) 又は V G A T T S L Y Y Y Y G M D V (配列番号 47) 又は D G F G L A V A G P Y W Y F D L (配列番号 44) 又は P T R S R D F W S G L G Y Y Y Y M D V (配列番号 45) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) 抗体又はその抗原結合断片。

30

40

【請求項 9】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) 配列番号 75-82 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ; (2) 配列番号 54-59 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ; 及び (3) 配列番号 63-71 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) 配列番号

50

29-33及び85からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1；(2) 配列番号35-39及び125からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び(3) 配列番号42-50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、請求項8に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

【請求項10】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RSSQSLLHGNNGNNYLD (配列番号75)を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列LGSNRAS (配列番号54)を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列MQALQTPYT (配列番号63)を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列TYMH (配列番号29)を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列IINPSGGSTSYAQKFQG (配列番号36)を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列DLVVPAAATLDY (配列番号42)を含むCDR-H3を含む、請求項1又は2に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

【請求項11】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RASQNIASYN (配列番号76)を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列AASSLKS (配列番号55)を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列QQSYSIPTYT (配列番号64)を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYGMH (配列番号30)を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列VISYDGSNKYYADSVKG (配列番号37)を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列ESYGGQFDY (配列番号43)を含むCDR-H3を含む、請求項8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

【請求項12】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RASQSVSNLYLG (配列番号77)を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列GASSRAT (配列番号56)を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列QQRSNWPLT (配列番号65)を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYAMH (配列番号31)を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列VISYDGSNKYYADSVKG (配列番号37)を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列DGFGLAVAGPYWYFDL (配列番号44)を含むCDR-H3を含む、請求項8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

【請求項13】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RSSQSLVYS DGKTYLD (配列番号78)を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列KVSNRDS (配列番号57)を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列MQGAHWPT (配列番号66)を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYAIS (配列番号85)を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列GIIPIFGTANYAQKFQG (配列番号38)を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列PTRSRDFWSGLGYYYMDV (配列番号45)を含むCDR-H3を含む、請求項8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

【請求項14】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RASQSVSSSYLA (配列番号79)を含むCDR-L1；(2) GASSRAT (配列番号56)と記載されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列QQRSNWPT (配列番号67)を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYGMH (配列番号30)を含むCDR-H1；(2) VISYDGSNKHYYADSVKG (配列番号125)と記載されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び(3) DFYEAGGWYFDL (配列番号46)と記載されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、請求項8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

【請求項15】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 T R S R G S I A S S Y V Q (配列番号 80) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 E N D Q R P S (配列番号 58) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 Q S Y D F S T V V (配列番号 68) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 S Y A I S (配列番号 85) を含む C D R - H 1 ; (2) G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号 38) と記載されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 V G A T T S L Y Y Y Y G M D V (配列番号 47) を含む C D R - H 3 を含む、請求項 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 16】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 R A S Q S V S S S Y L A (配列番号 79) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 G A S S R A T (配列番号 56) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 Q Q Y G S S P G T (配列番号 69) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 S Y S M N (配列番号 28) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 S I S S S S S Y I Y Y A D S V K G (配列番号 35) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 G I I V G P T D A F D I (配列番号 48) を含む C D R - H 3 を含む、請求項 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 17】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 R S S Q S L Y Y R D G Y T F L D (配列番号 81) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L S S K R D S (配列番号 59) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M Q G T H W P Y T (配列番号 70) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 T Y A M S (配列番号 33) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 G I S G S G G A T H Y A D S V K G (配列番号 39) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 G L W F G E G Y (配列番号 49) を含む C D R - H 3 を含む、請求項 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 18】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 R S S Q S L L Y S N G Y N Y L D (配列番号 82) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L G S N R A S (配列番号 54) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M Q A L Q T P I T (配列番号 71) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 S Y A I S (配列番号 85) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号 38) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 R D G S L G V G Y Y Y M D F (配列番号 50) を含む C D R - H 3 を含む、請求項 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 19】

(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R - D / S - G Y T F (配列番号 22) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L / Q / R - S S (配列番号 23) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M / L / F - Q G T H W P Y T (配列番号 24) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに (1) アミノ酸配列 G / R - F - S / T / P - F S T Y A (配列番号 25) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I - S / N - G - S / N - G / S - G / Q - A / T - T (配列番号 26) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G - Y / L / I (配列番号 27) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む抗血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) 抗体又は抗 V E G F R 2 抗体の変異体である抗原結合断片であって、変異体が、配列番号 22、23、24、25、26、及び／又は 27 の 1 つ又は複数において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) 抗体又は抗 V E G F R 2 抗体の変異体である抗原結合断片。

【請求項 20】

第 2 の抗 V E G F R 2 抗体の V E G F R 2 への結合を競合的に阻害する抗血管内皮増殖

10

20

30

40

50

因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片であって、第 2 の抗 VEGFR2 抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYR-D/S-GYTF (配列番号 22) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 L/Q/R-SS (配列番号 23) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 M/L/F-QGTHWPYT (配列番号 24) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) アミノ酸配列 G/R-F-S/T/P-FSTYA (配列番号 25) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T (配列番号 26) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEG-Y/L/I (配列番号 27) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 21】

VEGFR2 に対する第 2 の抗 VEGFR2 抗体と同じ VEGFR2 のエピトープに特異的に結合する抗血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片であって、第 2 の抗 VEGFR2 抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYR-D/S-GYTF (配列番号 22) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 L/Q/R-SS (配列番号 23) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 M/L/F-QGTHWPYT (配列番号 24) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) アミノ酸配列 G/R-F-S/T/P-FSTYA (配列番号 25) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T (配列番号 26) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEG-Y/L/I (配列番号 27) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 22】

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYR-D/S-GYTF (配列番号 22) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 L/Q/R-SS (配列番号 23) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 M/L/F-QGTHWPYT (配列番号 24) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) アミノ酸配列 G/R-F-S/T/P-FSTYA (配列番号 25) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T (配列番号 26) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEG-Y/L/I (配列番号 27) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含み、変異体が、配列番号 22、23、24、25、26、及び/又は 27 の 1 つ又は複数において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、請求項 20 又は 21 に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 23】

抗体が、(1) 配列番号 1 及び 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-L1; (2) 配列番号 2、7、及び 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-L2; 及び (3) 配列番号 3、9、及び 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) 配列番号 4、13、14、及び 15 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H1; (2) 配列番号 5、7、17、18、19、20、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H2; 及び (3) 配列番号 6、10、及び 11 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 24】

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 LSS (配列番号 2) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 MQGTHWPYT (配列番号 3) を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 GFSFSSTYA (配列番号 4) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含

50

む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 25】

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 MQGTHWPYT (配列番号 3) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 26】

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 LQGTHWPYT (配列番号 9) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 10) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 27】

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 FQGTHWPYT (配列番号 12) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 28】

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 LQGTHWPYT (配列番号 9) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 29】

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRSGYTF (配列番号 16) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 MQGTHWPYT (配列番号 3) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 RFSFSITYA (配列番号 15) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGQAT (配列番号 20) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 20-22 の何れか一項に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 30】

抗体が、アミノ酸配列 QSLYYRSGYTF (配列番号 16) を含む CDR-L1 ; アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及びアミノ酸配列 FQGTHWPYT (配列番号 12) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ

50

酸配列 G F S F S T Y A（配列番号 4）を含む C D R－H 1；アミノ酸配列 I S G S G G T T（配列番号 2 1）を含む C D R－H 2；及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y（配列番号 6）を含む C D R－H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 2 0－2 2 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 1】

抗体が、アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F（配列番号 1 6）を含む C D R－L 1；アミノ酸配列 Q S S（配列番号 7）を含む C D R－L 2；及びアミノ酸配列 F Q G T H W P Y T（配列番号 1 2）を含む C D R－L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A（配列番号 4）を含む C D R－H 1；アミノ酸配列 I S G S G G T T（配列番号 2 1）を含む C D R－H 2；及びアミノ酸配列 K G L W F G E G L（配列番号 1 0）を含む C D R－H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、請求項 2 0－2 2 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 3 2】

抗体がヒト I g G の F c 配列を含む、請求項 1－3 1 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 3】

抗原結合断片が、F a b、F a b'、F（a b）' 2、一本鎖 F v（s c F v）、F v 断片、ダイアボディ、及び直鎖状抗体からなる群から選択される、請求項 1－3 2 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体の抗原結合断片。

【請求項 3 4】

抗体が多重特異性抗体である、請求項 1－3 3 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体。

20

【請求項 3 5】

治療剤にコンジュゲートしている、請求項 1－3 4 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 6】

標識にコンジュゲートしている、請求項 1－3 4 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3 7】

標識が、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される、請求項 3 6 に記載の抗 V E G F R 2 抗体。

30

【請求項 3 8】

請求項 1－3 4 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 に記載の核酸分子をコードする発現ベクター。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の発現ベクターを含む細胞。

【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載の細胞を培養すること、及び細胞培養物から抗 V E G F R 2 抗体を回収することを含む、抗 V E G F R 2 抗体を産生する方法。

40

【請求項 4 2】

請求項 1－3 5 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 4 3】

請求項 1－3 4 及び 3 6－3 7 の何れか一項に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片を試料に接触させること、及び V E G F R 2 タンパク質に結合した抗 V E G F R 2 抗体を検出することにより、患者からの試料中の V E G F R 2 タンパク質を検出する方法。

【請求項 4 4】

50

抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片が免疫組織化学アッセイ (I H C) 又は E L I S A アッセイで使用される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

請求項 4 2 に記載の組成物の有効量を被験体に投与することを含む、被験体における過剰な血管新生を特徴とする病的状態を治療する方法。

【請求項 4 6】

過剰な血管新生を特徴とする病的状態が、がん、眼疾患、又は炎症からなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

過剰な血管新生を特徴とする病的状態ががんである、請求項 4 6 に記載の方法。

10

【請求項 4 8】

がんが、結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん、又は固形腫瘍である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

がんが肺がんであり、かつ、該肺がんが非小細胞肺がん (N S C L C) である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

被験体が、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、及び細胞傷害性剤からなる群から選択される治療剤を更に投与される、請求項 4 5 - 4 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

【0002】

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2015年6月30日に出願された米国仮出願第62/187204号の優先権を主張する。

【0003】

A S C I I テキストファイルの配列表の提出

A S C I I テキストファイルの以下の提出の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形式 (C R F) (ファイル名：719902000240 S E Q L I S T . T X T 、記録日：2016年6月28日、サイズ：75 K B) 。

30

【背景技術】

【0004】

発明の背景

血管内皮増殖因子受容体 (V E G F R 2 、 K D R 、 F L K 1 、 及び C D 3 0 9 としても知られている) は、 V E G F R 1 (F L T 、 F L T 1) 、 V E G F R 2 、 及び V E G F R 3 (F L T 4 、 P C L) を含む 3 つの密接に関連する受容体チロシンキナーゼのサブファミリーである受容体の V E G F の細胞表面受容体である。リガンド (例えば、 V E G F A 、 C 、 D 、 又は E) への V E G F R 2 の結合は、受容体二量体化及び V E G F R 2 の C 末端ドメインにおける幾つかのチロシン (Y) 残基の自己リン酸化を誘導する。この自己リン酸化は、幾つかのシグナル伝達カスケードの下流での活性化を誘発し、内皮細胞の増殖及び遊走、血管透過性、及び血管新生を生じる。

40

【0005】

V E G F R 2 又はファミリーメンバーの突然変異、増幅又は誤制御は、上皮がんに関与している。例えば、 V E G F R 2 の変異及び増幅の比較的高い頻度 (9 %) が肺腺癌において検出されている。更に、 N S C L C 腫瘍における研究は、肺腺癌及び扁平上皮癌における V E G F R 2 コピー数変化 (3 2 %) の頻度が高く、 V E G F R - 2 タンパク質発現がより高くなることを示した。がん遺伝子としての V E G F R 2 の同定により、 V E G F R 2 に対する抗癌治療薬の開発が必要となっている。本発明は、この必要性及び他の必要

50

性を満たしている。

【発明の概要】

【0006】

発明の概要

本明細書において提供されるのは、抗体又はその抗原結合断片が、VEGFR2のVEGFへの結合をブロックしない、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片である。また本明細書において提供されるのは、抗体又はその抗原結合断片が、VEGFR2のドメイン5-7に結合する、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片である。また本明細書において提供されるのは、抗体又はその抗原結合断片が、VEGFR2のVEGFへの結合をブロックせず、かつ抗体又はその抗原結合断片が、VEGFR2のドメイン5-7に結合する、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片である。

10

【0007】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、全HUVEC細胞に結合する。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、インビトロで血管新生を阻害しない。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、インビボで血管新生を阻害する。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、インビトロで血管新生を阻害せず、かつ抗体又はその抗原結合断片は、インビボで血管新生を阻害する。

20

【0008】

本明細書で提供されるのは、抗血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）抗体又はその抗原結合断片であって、（1）アミノ酸配列RASQNIASYLEN（配列番号76）又はRASQSVS-S/N-S/N-YL-G/A（配列番号83）又はTRSRGSIASSYVQ（配列番号80）又はRSSQSL-L/V/Y-H/Y-G/S/R-D/N-G-N/K/Y-N/T-Y/F-LD（配列番号84）を含むCDR-L1；（2）アミノ酸配列L/A/G/K/E-G/A/V/N/S-S/D-N/S/Q/K-R/L-A/K/D/P-S/T（配列番号60）を含むCDR-L2；及び（3）アミノ酸配列M/Q-Q/S-A/S/R/G/Y-L/Y/S/A/D/G/T-Q/S/N/H/F-T/I/W/S-P/T-Y/L/P/V/G/I-T/V（配列番号72）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに（1）アミノ酸配列T/S-Y-Y/G/A/S-M/I-H/N/S（配列番号34）を含むCDR-H1；（2）アミノ酸配列I/V/G/S-I-N/S/I-P/Y/S/G-S/D/I-G/F/S-G/S-S/N/T/Y/A-T/K/A/I-S/Y/N/H-YA-Q/D-K/S-F/V-K/Q-G（配列番号40）を含むCDR-H2；及び（3）アミノ酸配列GLWFGEGY（配列番号49）又はESYGGQFDY（配列番号43）又はDLVVPAAATLDY（配列番号42）又はD/G-F/I-Y/I-E/V-A/G-G/P-G/T-W/D-Y/A-FD-L/I（配列番号51）又はRDGSLGVGYYYMDF（配列番号50）又はVGATTSLYYYYYGM DV（配列番号47）又はDGFGLAVAGPYWYFDL（配列番号44）又はPTRSRDFWSGLGYYYMYMDV（配列番号45）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含むものである。

30

40

【0009】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（1）配列番号75-82からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1；（2）配列番号54-59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び（3）配列番号63-71からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（1）配列番号29-33及び85からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1；（2）配列番号35-39及び125からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び（3

50

）配列番号 42-50 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む。

【0010】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 RSSQSLLHGNNGNNYLD（配列番号 75）を含む CDR-L1；（２）アミノ酸配列 LGSNRAS（配列番号 54）を含む CDR-L2；及び（３）アミノ酸配列 MQALQTPYT（配列番号 63）を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 TYYMH（配列番号 29）を含む CDR-H1；（２）アミノ酸配列 IINPSGGSTSYAQKFQG（配列番号 36）を含む CDR-H2；及び（３）アミノ酸配列 DLVVPAA TL DY（配列番号 42）を含む CDR-H3 を含む。

10

【0011】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 RASQNIAS YLN（配列番号 76）を含む CDR-L1；（２）アミノ酸配列 AASSLKS（配列番号 55）を含む CDR-L2；及び（３）アミノ酸配列 QQS YSIPYT（配列番号 64）を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 SYGMH（配列番号 30）を含む CDR-H1；（２）アミノ酸配列 VISYDGS NKYYADSVKG（配列番号 37）を含む CDR-H2；及び（３）アミノ酸配列 ESYGGQFDY（配列番号 43）を含む CDR-H3 を含む。

20

【0012】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 RASQS VSN NYLG（配列番号 77）を含む CDR-L1；（２）アミノ酸配列 GASSRAT（配列番号 56）を含む CDR-L2；及び（３）アミノ酸配列 QQR SNWPLT（配列番号 65）を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 SYAMH（配列番号 31）を含む CDR-H1；（２）アミノ酸配列 VISYDGS NKYYADSVKG（配列番号 37）を含む CDR-H2；及び（３）アミノ酸配列 DGFGLAVAGPYWYFDL（配列番号 44）を含む CDR-H3 を含む。

【0013】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 RSSQS LVYSDGKTYLD（配列番号 78）を含む CDR-L1；（２）アミノ酸配列 KVS NRDS（配列番号 57）を含む CDR-L2；及び（３）アミノ酸配列 MQGAHW PPT（配列番号 66）を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 SYAIS（配列番号 85）を含む CDR-H1；（２）アミノ酸配列 GIIP I FG TANYAQKFQG（配列番号 38）を含む CDR-H2；及び（３）アミノ酸配列 PTRSRDFWSGLGY YYYMDV（配列番号 45）を含む CDR-H3 を含む。

30

【0014】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 RASQS VSSSYLA（配列番号 79）を含む CDR-L1；（２）GASSRAT（配列番号 56）と記載されるアミノ酸配列を含む CDR-L2；及び（３）アミノ酸配列 QQR SNW PPT（配列番号 67）を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 SYGMH（配列番号 30）を含む CDR-H1；（２）VISYDGS NKHYADSVKG（配列番号 125）と記載されるアミノ酸配列を含む CDR-H2；及び（３）DFYEAGGWYFDL（配列番号 46）と記載されるアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む。

40

【0015】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 TRSRGSIASSYVQ（配列番号 80）を含む

50

C D R－L 1；（２）アミノ酸配列 E N D Q R P S（配列番号 58）を含む C D R－L 2；及び（３）アミノ酸配列 Q S Y D F S T V V（配列番号 68）を含む C D R－L 3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 S Y A I S（配列番号 85）を含む C D R－H 1；（２）G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G（配列番号 38）と記載されるアミノ酸配列を含む C D R－H 2；及び（３）アミノ酸配列 V G A T T S L Y Y Y Y G M D V（配列番号 47）を含む C D R－H 3を含む。

【0016】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 R A S Q S V S S S Y L A（配列番号 79）を含む C D R－L 1；（２）アミノ酸配列 G A S S R A T（配列番号 56）を含む C D R－L 2；及び（３）アミノ酸配列 Q Q Y G S S P G T（配列番号 69）を含む C D R－L 3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 S Y S M N（配列番号 28）を含む C D R－H 1；（２）アミノ酸配列 S I S S S S S Y I Y Y A D S V K G（配列番号 35）を含む C D R－H 2；及び（３）アミノ酸配列 G I I V G P T D A F D I（配列番号 48）を含む C D R－H 3を含む。

【0017】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 R S S Q S L Y Y R D G Y T F L D（配列番号 81）を含む C D R－L 1；（２）アミノ酸配列 L S S K R D S（配列番号 59）を含む C D R－L 2；及び（３）アミノ酸配列 M Q G T H W P Y T（配列番号 70）を含む C D R－L 3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 T Y A M S（配列番号 33）を含む C D R－H 1；（２）アミノ酸配列 G I S G S G G A T H Y A D S V K G（配列番号 39）を含む C D R－H 2；及び（３）アミノ酸配列 G L W F G E G Y（配列番号 49）を含む C D R－H 3を含む。

【0018】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、軽鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 R S S Q S L L Y S N G Y N Y L D（配列番号 82）を含む C D R－L 1；（２）アミノ酸配列 L G S N R A S（配列番号 54）を含む C D R－L 2；及び（３）アミノ酸配列 M Q A L Q T P I T（配列番号 71）を含む C D R－L 3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、（１）アミノ酸配列 S Y A I S（配列番号 85）を含む C D R－H 1；（２）アミノ酸配列 G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G（配列番号 38）を含む C D R－H 2；及び（３）アミノ酸配列 R D G S L G V G Y Y Y M D F（配列番号 50）を含む C D R－H 3を含む。

【0019】

本明細書で提供されるのは、抗血管内皮増殖因子受容体 2（V E G F R 2）抗体又は抗 V E G F R 2 抗体の変異体である抗原結合断片であって、該抗体は（１）アミノ酸配列 Q S L Y Y R－D／S－G Y T F（配列番号 22）を含む C D R－L 1；（２）アミノ酸配列 L／Q／R－S S（配列番号 23）を含む C D R－L 2；及び（３）アミノ酸配列 M／L／F－Q G T H W P Y T（配列番号 24）を含む C D R－L 3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに（１）アミノ酸配列 G／R－F－S／T／P－F S T Y A（配列番号 25）を含む C D R－H 1；（２）アミノ酸配列 I－S／N－G－S／N－G／S－G／Q－A／T－T（配列番号 26）を含む C D R－H 2；及び（３）アミノ酸配列 K G L W F G E G－Y／L／I（配列番号 27）を含む C D R－H 3を含む重鎖可変ドメイン配列を含み、ここで該変異体は、配列番号 22，23，24，25，26、及び／又は 27 の 1 つ又は複数において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。

【0020】

また提供されるのは、第 2 の抗 V E G F R 2 抗体の V E G F R 2 への結合を競合的に阻害する抗血管内皮増殖因子受容体 2（V E G F R 2）抗体又はその抗原結合断片であって、ここで該抗 V E G F R 2 抗体は、（１）アミノ酸配列 Q S L Y Y R－D／S－G Y T F（配列番号 22）を含む C D R－L 1；（２）アミノ酸配列 L／Q／R－S S（配列番号

10

20

30

40

50

23)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT(配列番号24)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA(配列番号25)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T(配列番号26)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I(配列番号27)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0021】

また本明細書で提供されるのは、VEGFR2に対する第2の抗VEGFR2抗体と同じVEGFR2のエピトープに特異的に結合する抗血管内皮増殖因子受容体2(VEGFR2)抗体又はその抗原結合断片であって、ここで該第2の抗VEGFR2抗体は、(1)アミノ酸配列QSLYYR-D/S-GYTF(配列番号22)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列L/Q/R-SS(配列番号23)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT(配列番号24)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA(配列番号25)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T(配列番号26)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I(配列番号27)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0022】

上記実施態様の何れかに従う(又は適用される)特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、(1)アミノ酸配列QSLYYR-D/S-GYTF(配列番号22)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列L/Q/R-SS(配列番号23)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT(配列番号24)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに(1)アミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA(配列番号25)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T(配列番号26)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I(配列番号27)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含み、ここで該変異体は、配列番号22、23、24、25、26、及び/又は27の1つ又は複数において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。

【0023】

上記実施態様の何れかに従う(又は適用される)特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、(1)配列番号1及び16からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1；(2)配列番号2、7、及び8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び(3)配列番号3、9、及び12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに(1)配列番号4、13、14、及び15からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1；(2)配列番号5、7、17、18、19、20、及び21からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び(3)配列番号6、10、及び11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0024】

上記実施態様の何れかに従う(又は適用される)特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、(1)アミノ酸配列QSLYYRDGYTF(配列番号1)を含むCDR-L1；(2)アミノ酸配列LSS(配列番号2)を含むCDR-L2；及び(3)アミノ酸配列MQGTHWPYT(配列番号3)を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、(1)アミノ酸配列GFSFSTYA(配列番号4)を含むCDR-H1；(2)アミノ酸配列ISGSGGAT(配列番号5)を含むCDR-H2；及び(3)アミノ酸配列KGLWFGEGY(配列番号6)を含むCDR-H3を含む。

【0025】

上記実施態様の何れかに従う(又は適用される)特定の実施態様において、その抗体又

10

20

30

40

50

はその抗原結合断片は、(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M Q G T H W P Y T (配列番号 3) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、(1) アミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I S G S G G A T (配列番号 5) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R - H 3 を含む。

【0026】

上記実施態様の何れかに従う (又は適用される) 特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 L Q G T H W P Y T (配列番号 9) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、(1) アミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I S G S G G A T (配列番号 5) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G L (配列番号 10) を含む C D R - H 3 を含む。

10

【0027】

上記実施態様の何れかに従う (又は適用される) 特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 F Q G T H W P Y T (配列番号 12) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、(1) アミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I S G S G G A T (配列番号 5) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R - H 3 を含む。

20

【0028】

上記実施態様の何れかに従う (又は適用される) 特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 L Q G T H W P Y T (配列番号 9) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、(1) アミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I S G S G G A T (配列番号 5) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R - H 3 を含む。

30

【0029】

上記実施態様の何れかに従う (又は適用される) 特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F (配列番号 16) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M Q G T H W P Y T (配列番号 3) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、(1) アミノ酸配列 R F S F S T Y A (配列番号 15) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I S G S G Q A T (配列番号 20) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R - H 3 を含む。

40

【0030】

上記実施態様の何れかに従う (又は適用される) 特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F (配列番号 16) を含む C D R - L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R - L 2 ; 及びアミノ酸配列 F Q G T H W P Y T (配列番号 12) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、アミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R - H 1 ; アミノ酸配列 I S G S G G T T (配列番号 21) を含む C D R - H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R - H 3 を含む。

【0031】

50

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、その抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F（配列番号 16）を含む C D R－L 1；アミノ酸配列 Q S S（配列番号 7）を含む C D R－L 2；及びアミノ酸配列 F Q G T H W P Y T（配列番号 12）を含む C D R－L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列は、アミノ酸配列 G F S F S T Y A（配列番号 4）を含む C D R－H 1；アミノ酸配列 I S G S G G T T（配列番号 21）を含む C D R－H 2；及びアミノ酸配列 K G L W F G E G L（配列番号 10）を含む C D R－H 3 を含む。

【0032】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗体は、ヒト I g G の F c 配列を含む。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗原結合断片は、F a b、F a b'、F（a b）' 2、一本鎖 F v（s c F v）、F v 断片、ダイアボディ、及び直鎖状抗体からなる群から選択される。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗体は多重特異性抗体である。

10

【0033】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、上記の実施態様の何れか 1 つに従う抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、治療剤にコンジュゲートされる。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗体又はその抗原結合断片は、標識にコンジュゲートされる。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、標識は、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される。

20

【0034】

本明細書において、上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子が提供される。また、上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）核酸分子をコードする発現ベクターも提供される。本明細書において、上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）発現ベクターを含む細胞が提供される。本明細書において、上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）細胞を培養すること、及び抗 V E G F R 2 抗体を細胞培養物から回収することを含む抗 V E G F R 2 抗体を産生する方法が提供される。

【0035】

上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片を含む組成物及び薬学的に許容される担体が提供される。また、上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片を試料に接触させて、V E G F R 2 タンパク質に結合した抗 V E G F R 2 抗体を検出することによって患者からの試料中の V E G F R 2 タンパク質を検出する方法が提供される。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、免疫組織化学アッセイ（I H C）又は E L I S A アッセイで使用される。

30

【0036】

本明細書において、上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）組成物の有効量を被験体に投与することを含む、被験体における過剰な血管新生を特徴とする病的状態を治療する方法が提供される。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、過剰な血管新生を特徴とする病的状態は、がん、眼疾患、又は炎症からなる群から選択される。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、過剰な血管新生を特徴とする病的状態はがんである。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、がんは結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん又は固形腫瘍である。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、被験体は、抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、及び細胞傷害性剤からなる群から選択される治療剤を更に投与される。上記実施態様の何れかに従う（又は適用される）特定の実施態様において、がんは非小細胞肺癌（N S C L C）である。

40

50

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、抗VEGFR2抗体V1、V9、V10、及び1121B(Ref A)のVEGFR2ドメイン5-7への結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。

【図2】図2は、VEGFR2へのVEGF結合を阻害する抗VEGFR2抗体V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8、V9、V10、及び1121B(Ref A)の能力を評価するために行われたELISAの結果を示す。

【図3】図3は、全HUVEC細胞に結合するV9、1121B(Ref A)及び1121N(Ref B)の能力を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図4】図4は、HUVEC遊走に対するV1、V2、V6、V7、V8、V9、V10、及び1121B(Ref A)の効果を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図5】図5は、HUVEC生存に対するV1、V2、V6、V7、V8、V9、V10、及び1121B(Ref A)の効果を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図6】図6は、HUVEC増殖に対するV1、V2、V6、V7、V8、V9、V10、及び1121B(Ref A)の効果を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図7】図7は、インビボでの血管新生に対するV9及び1121B(Ref A)の効果を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図8】図8は、V1、V9、V10、及び1121B(Ref A)の腫瘍増殖を阻害する能力を測定するHCT-116腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図9】図9は、抗VEGFR2抗体V9、29、30、32、34、及び67のVEGFR2ドメイン5-7への結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。

【図10】図10Aは、抗VEGFR2抗体V9/V9(LC/HC)、V9/29(LC/HC)、34/V9(LC/HC)、67/V9(LC/HC)、29/34(LC/HC)、34/34(LC/HC)、67/34(LC/HC)、1121B(Ref A)、抗PDGFR α 抗体、及びERBITUX(すなわち、抗EGFR抗体)のVEGFR2への結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。図10Bは、抗VEGFR2抗体V9/V9(LC/HC)、V9/29(LC/HC)、34/V9(LC/HC)、67/V9(LC/HC)、29/34(LC/HC)、34/34(LC/HC)、67/34(LC/HC)、1121B(Ref A)、抗PDGFR α 抗体、及びERBITUX(すなわち、抗EGFR抗体)のVEGFR2への結合を比較するために行われたELISAの第2のセットの結果を示す。

【図11】図11Aは、抗VEGFR2抗体V9/V9(LC/HC)、V9/29(LC/HC)、34/V9(LC/HC)、67/V9(LC/HC)、29/34(LC/HC)、34/34(LC/HC)、67/34(LC/HC)、1121B(Ref A)、1211N(Ref B)、及びAvastin(すなわち、抗VEGF)のインビトロでHUVEC増殖を阻害する能力を評価するために行われたアッセイの結果を示す。図11Bは、図11Aで試験した各抗体の増殖阻害%を示す。

【図12】図12Aは、抗VEGFR2抗体V9/V9(LC/HC)、V9/29(LC/HC)、34/V9(LC/HC)、67/V9(LC/HC)、29/34(LC/HC)、34/34(LC/HC)、67/34(LC/HC)、1121B(Ref A)、1211N(Ref B)、及びAvastin(すなわち、抗VEGF)のインビトロでHUVEC生存を阻害する能力を評価するために行われたアッセイの結果を示す。図12Bは、図12Aで試験した各抗体の生存阻害%を示す。

【図13】図13Aは、抗VEGFR2抗体34/80A(LC/HC)、34/80B(LC/HC)、34/86A(LC/HC)、34/86B(LC/HC)、29/88(LC/HC)、109/109(LC/HC)、110A/110A(LC/HC)

10

20

30

40

50

、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、及び1121B (Ref A)のVEGFR2への結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。図13Bは、1121B (Ref A)を含まない図13Aの結果を提供する。図13Cは、抗VEGFR2抗体34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、及び1121B (Ref A)のVEGFR2への結合を比較するために行われたELISAの第2のセットの結果を示す。図13Dは、1121B (Ref A)を含まない図13Cの結果を提供する。

10

【図14】図14Aは、抗VEGFR2抗体34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、及び1121B (Ref A)のVEGFR2への結合を比較するために行われたELISAの結果を示す。図14Bは、1121B (Ref A)を含まない図14Aの結果を提供する。図14Cは、抗VEGFR2抗体34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、及び1121B (Ref A)のVEGFR2への結合を比較するために行われたELISAの第2のセットの結果を示す。図14Dは、1121B (Ref A)を含まない図14Cの結果を提供する。

20

【図15】図15は、全HUV EC細胞に結合する34/V9 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110/110A (LC/HC)、110/110B (LC/HC)、1121B (Ref A)及び1121N (Ref B)の能力を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図16A】図16Aは、抗VEGFR2抗体V9/V9 (LC/HC)、V9/29 (LC/HC)、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、29/34 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、1121B (Ref A)、1211N (Ref B)、及びAvastin (すなわち、抗VEGF)のインビトロでHUV EC増殖を阻害する能力を評価するために行われたアッセイの結果を示す。図16Bは、図16Aで試験した各抗体の増殖阻害%を示す。

30

【図17A】図17Aは、抗VEGFR2抗体V9/V9 (LC/HC)、V9/29 (LC/HC)、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、29/34 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、1121B (Ref A)、1211N (Ref B)、及びAvastin (すなわち、抗VEGF)のインビトロでHUV EC生存を阻害する能力を評価するために行われたアッセイの結果を示す。図17Bは、図17Aで試験した各抗体の生存阻害%を示す。

40

【図18A】図18Aは、34/V9 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC) 1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びコントロール抗体 (HLX02)のマウスVEGFR2に結合する能力を評価するために行われたELISAの結果を示す。イチジク。図18Bは、重複セットのELISAの結果を示す。

【図19A】図19Aは、110B/110B (LC/HC)及び1121N (Ref B)のVEGFR2リン酸化を阻害する能力を比較するために行われたアッセイの結果を示す。図19Bは、図19Aの定量結果を提供する。

【図20】図20は、HUV EC遊走に対するV9、34/80B (LC/HC)、34

50

／86A (LC/HC)、34／86B (LC/HC)、29／88 (LC/HC)、109／109 (LC/HC)、110／110A (LC/HC)、110／110B (LC/HC)、1121N (Ref B)、及びAvastinの効果を比較するために行われたアッセイの結果を示す。

【図21】図21は、34／V9 (LC/HC)、109／109 (LC/HC)、110A／110A (LC/HC)、110B／110B (LC/HC) 1121B (Ref A)、及び1121N (Ref B)の腫瘍増殖を阻害する能力を測定するHCT-116腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図22】図22は、34／V9 (LC/HC)、109／109 (LC/HC)、110A／110A (LC/HC)、110B／110B (LC/HC) 1121B (Ref A)、及び1121N (Ref B)の腫瘍増殖を阻害する能力を測定するHCT-116腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【図23A】図23Aは、34／V9 (LC/HC)の異なる製剤で実施された安定性試験の結果を示す。図23Bは、110／110B (LC/HC)の異なる製剤で実施された安定性試験の結果を示す。

【図24A】図24Aは、抗体110／110BがVEGFR1に結合することができるかどうかを決定するために行われた実験の結果を示す。図24Bは、抗体110／110BがVEGFR3に結合することができるかどうかを決定するために行われた実験の結果を示す。

【図25】図25は、抗体110／110BがVEGF-C刺激ヒトリンパ内皮細胞 (HLEC)の増殖を阻害することができるかどうかを決定するために行われた実験の結果を示す。

【図26A】図26Aは、抗体110／110BがVEGF-C刺激VEGFR2リン酸化を阻害することができるかどうかを決定するために行われた実験の結果を示す。図26Bは、図26Aの定量化された結果を提供する。

【図27A】図27Aは、抗体110／110BがVEGF-C刺激VEGFR3リン酸化を阻害することができるかどうかを決定するために行われた実験の結果を示す。図27Bは、図26Aの定量化された結果を提供する。

【図28】図28は、110B／110Bが腫瘍増殖を阻害する能力を測定するNCI-H460腫瘍異種移植アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

発明の詳細な説明

本発明は、新規抗血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2)抗体を提供する。出願人は、驚くべきことに、当技術分野で周知の他の抗VEGFR2抗体とは対照的に、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体がVEGFR2のドメイン5-7に結合することを見出した。本明細書に記載の抗VEGFR2抗体は、VEGFのVEGFR2への結合をブロックしないが、インビトロ及びインビボで血管新生を阻害することができる。

【0039】

また、イムノコンジュゲート、本明細書に記載の新規抗VEGFR2抗体をコードする核酸、及び組成物 (薬学的組成物など)も提供される。本発明はまた、新規な抗VEGFR2抗体を使用して、試料 (インビボ又はエクスビボの試料など)中のVEGFR2を検出する方法、がんを治療することにおける使用のためのそのような抗体を含む組成物、及びがんの治療のための医薬の製造におけるそのような抗体の使用を提供する。

【0040】

定義

本明細書で使用される「治療」又は「治療する」とは、臨床結果を含む有益な又は所望の結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のために、有益な又は所望の臨床結果には、限定されないが以下の1つ又は複数が含まれる：疾患から生じる一又は複数の症状を軽減させること、疾患の程度を減少させること、疾患を安定化させること (例えば、

10

20

30

40

50

疾患の悪化（例えば、進行）を予防又は遅延させる）、疾患の広がり（例えば、転移）を予防又は遅延させること、疾患の再発を予防又は遅延させること、疾患の進行を遅延又は緩慢にすること、疾患状態を寛解させること、疾患の寛解（部分的又は完全）を提供すること、疾患を治療するために必要とされる一又は複数の他の医薬の用量を減少させること、疾患の進行を遅延させること、生活の質を向上又は改善すること、体重増加を増やすこと、及び／又は生存を延長すること。また、「治療」に包含されるのは、がんの病理学的帰結（例えば、腫瘍体積など）の減少である。本明細書で提供される方法は、治療のこれらの態様の何れか一又は複数の企図する。

【0041】

「再発（recurrence）」、「再発（relapse）」又は「再発（relapsed）」という用語は、疾患の消失を臨床的に評価した後のがん又は疾患の再発（return）を指す。遠隔転移又は局所再発の診断は再発とみなすことができる。

10

【0042】

用語「難治性」又は「耐性」とは、治療に応答しないがん又は疾患を指す。

【0043】

「補助療法」という用語は、一次療法（通常は外科手術）後に施される治療を意味する。がん又は疾患のための補助療法には、免疫療法、化学療法、放射線療法、又はホルモン療法が含まれ得る。

【0044】

「維持療法」という用語は、以前の治療効果を維持するのに役立つよう与えられるスケジュールされた再治療を指す。維持療法は、がんを寛解状態に保つのを助けるために、又は疾患の進行にかかわらず特定の療法への応答を延長するために、しばしば施される。

20

【0045】

用語「侵襲性がん」とは、正常な周囲組織に始まった組織の層を越えて広がっているがんを指す。浸潤性がんは転移性である場合と転移性でない場合がある。

【0046】

用語「非侵襲性がん」とは、非常に初期のがん又は起源の組織を超えて広がっていないがんを指す。

【0047】

腫瘍学における「無増悪生存期間」という用語は、がんが増殖しない治療中及び治療後の期間を指す。無増悪生存期間には、患者が完全な応答又は部分応答を経験した時間、並びに患者が安定した疾患を経験した時間が含まれる。

30

【0048】

腫瘍学における「進行性疾患」という用語は、治療の開始以来、腫瘍の質量の増加又は広がり起因した、20%以上の腫瘍増殖を指すことができる。

【0049】

「障害」は、抗体による治療から利益を得るであろう任意の状態である。例えば、異なるVEGFR2活性に罹患しているか又はその予防が必要な哺乳動物。これには、哺乳動物に問題の疾患に罹らせる病的状態を含む慢性及び急性の障害又は疾患が含まれる。本明細書で治療される障害の非限定的な例には、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）、及び過度の血管新生を特徴とする病的状態が含まれる。本発明によって提供される抗VEGFR2抗体による治療から利益を得るであろう過度の血管新生によって特徴付けられる例示的ながん及び病的状態は、本明細書の他の箇所でも更に詳細に記載される。

40

【0050】

本明細書で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性に関わらず、全ての腫瘍細胞成長及び増殖、及び全ての前がん性及びがん性の細胞及び組織を意味する。

【0051】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的には、例えば単一モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト及び中和抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する

50

抗体組成物、ポリクローナル抗体、一本鎖抗体、及び抗体の断片（下記を参照）（それらが天然ポリペプチドに特異的に結合し、及び／又は本発明の生物学的活性又は免疫学的活性を示す限り）を含む。特定の実施態様では、抗体はタンパク質に特異的に結合し、この結合は本発明のモノクローナル抗体（例えば、本発明の寄託抗体など）によって阻害され得る。抗体の「機能的断片又は類似体」という語句は、それが参照される抗体と共通の定性的な生物活性を有する化合物である。例えば、本発明の抗体の機能的断片又は類似体は、VEGFR2に特異的に結合することができるものであり得る。一実施態様において、抗体は、VEGFR2が細胞増殖を誘導する能力を予防するか、又は実質的に低下させることができる。

【0052】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質を含むことができる。好ましい実施態様において、抗体は、（１）ローリー法により判定して抗体95重量%超、及び最も好ましくは99重量%超まで、（２）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、N末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、又は（３）クーマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を用いる還元もしくは非還元条件下でSDS-PAGEにより均一になるまで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一つの精製工程により調製されるであろう。

【0053】

基本的な4鎖抗体単位は、2つの同一の軽（L）鎖及び2つの同一の重（H）鎖からなるヘテロ四量体糖タンパク質である（IgM抗体は、J鎖と呼ばれる付加的ポリペプチドと共に5つの基本的なヘテロ四量体単位からなり、従って、10の抗原結合部位を含み、一方分泌型IgA抗体は重合し、J鎖と共に2つから5つの基本的な4鎖単位を含む多価集合体を形成することができる）。IgGの場合、4鎖単位は一般的に約150000ダルトンである。各L鎖は一つの共有ジスルフィド結合によりH鎖に連結している一方、2つのH鎖はH鎖のアイソタイプに応じて一又は複数のジスルフィド結合により互いに連結されている。また各H及びL鎖は、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋を有している。各H鎖は、N末端に可変ドメイン（VH）と、これに続くα及びγ鎖それぞれに対しては3つの定常ドメイン（CH）と、μ及びεアイソタイプに対しては4つのCHドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン（VL）と、これに続く定常ドメイン（CL）をその他端に有する。VLはVHに整列しており、CLは重鎖の第1定常ドメイン（CH1）に整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の界面を形成すると考えられている。VHとVLの対形成は、一緒に単一の抗原結合部位を形成する。異なったクラスの抗体の構造及び特性について、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8版、Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow（編）、Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 71頁、6章を参照のこと。

【0054】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に異なる型のうちの1つに割り当てることができる。重鎖の定常ドメイン（CH）のアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンを異なるクラス又はアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには、それぞれ、α、δ、γ、ε及びμと命名された重鎖を有するIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つのクラスがある。γ及びαクラスは更にCH配列及び機能の比較的小さな差異に基づいてサブクラスに分割され、例えばヒトでは、次のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を発現する。

【0055】

「可変」なる用語は、可変ドメインの所定のセグメントが抗体間で配列の点で広範囲に

相違していることを意味する。Vドメインは抗原結合を媒介し、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を定める。しかしながら、可変性は可変ドメインの110アミノ酸全長にわたって均一に分布しているのではない。代わりに、V領域は、それぞれが9～12アミノ酸長である「超可変領域」と呼ばれる極端な可変性のより短い領域によって分離された15～30アミノ酸のフレームワーク領域（FR）と呼ばれる比較的不变のストレッチからなる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、βシート構造を連結するループを形成する、場合によってはβシート構造の一部を形成する3つの超可変領域によって連結された、βシート構造を主に採用する4つのFRを含む。各鎖の超可変領域はFRによって極く近傍と一緒に保持され、他の鎖からの超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照）。定常ドメインは抗体の抗原への結合に直接は関係しないが、例えば抗体依存性細胞傷害性（ADCC）における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

10

【0056】

本明細書中で使用される場合、用語「CDR」又は「相補性決定領域」は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される非連続抗原結合部位を意味することが意図される。これらの特定の領域は、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); by Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); 及びMacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)により記載され、ここではその定義は、互いに比較した場合に、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体若しくは移植抗体又はその変異体のCDRを意味する何れかの定義の適用は、本明細書において定義され、使用される場合の用語の範囲内にあることを意図している。上記の引用文献の各々によって定義されるように、CDRを包含するアミノ酸残基が、比較として以下の表1に記載されている。

20

表 1: CDR の定義

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

30

¹残基番号付けは、上記のKabatらの命名法に従う。

²残基番号付けは、上記のChothiaらの命名法に従う。

³残基番号付けは、上記のMacCallumらの命名法に従う。

40

【0057】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在することができる可能な自然に生じる突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であって、単一の抗原部位に対するものである。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが、他の抗体により汚染されずに合成されることができ点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とする

50

と解釈されるべきではない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、Kohler et al. Nature. 256:495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって調製することができ、又は細菌、真核生物の動物又は植物細胞において組換えDNA法を用いて作製することができる（例えば、米国特許第4816567号参照）。また「モノクローナル抗体」は、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)、及び以下の実施例に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

【0058】

本発明のモノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種に由来する又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同であるが、その（それらの）鎖の残部は別の種に由来する又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにそのような抗体の断片（但し、それらが本発明の生物学的活性を示すことを条件とする）であり得る（米国特許第4816567号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)）。本明細書における対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば旧世界ザル、類人猿など）及びヒト定常領域配列に由来する可変ドメイン抗原結合配列を含む霊長類化抗体が含まれる。

【0059】

「インタクトな」抗体は、抗原結合部位並びにCL及び少なくとも重鎖定常ドメイン、CH1、CH2及びCH3を含むものである。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であることができる。好ましくは、インタクトな抗体は、一又は複数のエフェクター機能を有する。

【0060】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片；ダイアボディ；直鎖状抗体（米国特許第5641870号の実施例2；Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]参照）；一本鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

【0061】

「直鎖状抗体」という表現は、一般的には、Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995)に記載された抗体を意味する。簡単に言えば、これらの抗体は、相補的な軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域の対を形成する一対の直列のFdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）を含む。直鎖状抗体は、二重特異性又は単一特異性であり得る。

【0062】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片と、残りの「Fc」断片（容易に結晶化する能力を反映する命名である）を生成する。Fab断片は、L鎖全体並びにH鎖の可変領域ドメイン（VH）、及び一つの重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）からなる。各Fab断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理により単一の大きなF(ab')₂断片が生じ、これは凡そ、二価の抗原結合活性を有するジスルフィド結合した二つのFab断片に対応し、依然として抗原に架橋することができる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の一又は複数のシステインを含むCH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基を更に有している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、本明細書において、Fab'の名称であり、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を持つ。F(ab')₂抗体断片はもともと、それらの間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として産生された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

【0063】

Fc断片は、ジスルフィドによって一緒に保持された両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域内の配列によって決定される。この領域は

、特定の細胞型に見られる F c 受容体 (F c R) によって認識される部分でもある。

【0064】

「変異体 F c 領域」は、本明細書に定義される少なくとも 1 つの「アミノ酸修飾」により、天然配列 F c 領域とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異 F c 領域は、天然配列 F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有し、例えば、天然配列 F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域に、約 1 から約 10 のアミノ酸置換、及び好ましくは約 1 から約 5 のアミノ酸置換を有する。一実施態様において、本明細書の変異体 F c 領域は、天然配列 F c 領域と少なくとも約 80 % の相同性、少なくとも約 85 % の相同性、少なくとも約 90 % の相同性、少なくとも約 95 % の相同性又は少なくとも約 99 % の相同性を有する。別の実施態様において、本明細書の変異体 F c 領域は、親ポリペプチドの F c 領域と少なくとも約 80 % の相同性、少なくとも約 85 % の相同性、少なくとも約 90 % の相同性、少なくとも約 95 % の相同性又は少なくとも約 99 % の相同性を有する。

10

【0065】

「F c 領域含有ポリペプチド」という用語は、F c 領域を含む抗体又はイムノアドヘンシ (本明細書の他の箇所の定義を参照のこと) などのポリペプチドを指す。F c 領域の C 末端リジン (E U 番号付けシステムによれば残基 447) は、例えば、ポリペプチドの精製中に、又はポリペプチドをコードする核酸を組換え的に遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。従って、本発明による F c 領域を有する抗体を含むポリペプチドを含む組成物は、全ての K 447 残基が除去されたポリペプチド集団、K 447 残基が除去されていないポリペプチド集団、又は K 447 残基を有するポリペプチドと有さないポリペプチドの混合物を有するポリペプチド集団を含むことができる。

20

【0066】

抗体「エフェクター機能」とは、抗体の F c 領域 (天然配列 F c 領域又はアミノ酸配列変異体 F c 領域) に起因し得る生物学的活性を指し、抗体のアイソタイプにより変化する。抗体のエフェクター機能の例は：C1q 結合及び補体依存性細胞障害；F c 受容体結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)；貪食作用；細胞表面受容体のダウンレギュレーション；及び B 細胞活性化を含む。「天然配列 F c 領域」は、天然にみられる F c 領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。F c 配列の例は、例えば、限定されるものではないが、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) に記載される。

30

【0067】

「F v」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小抗体断片である。この断片は、一つの重鎖及び一つの軽鎖可変領域ドメインが、堅固な非共有結合をなした二量体からなる。これら二つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する 6 つの超可変ループ (H 鎖及び L 鎖それぞれ由来の 3 つのループ) が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン (又は抗原に対して特異的な三つの CDR のみを含む F v の半分) でさえ、結合部位全体よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

40

【0068】

「s F v」又は「s c F v」とも略称される「一本鎖 F v」は、単一のポリペプチド鎖内に結合した V H 及び V L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s F v ポリペプチドは V H 及び V L ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは s F v が抗原結合のために望まれる構造を形成することを可能にする。s F v の総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra* a を参照のこと。

【0069】

用語「ダイアボディ (diabodies)」は、鎖間ではなく鎖内で V ドメインを対形成させ

50

、結果として二価の断片、すなわち2つの抗原-結合部位を有する断片が得られるように、VHとVLドメインとの間に短いリンカー（約5-10残基）を有するSFV断片（前の段落を参照）を構築することにより調製される小型の抗体断片を意味する。二重特異性ダイアボディは、二つの抗体のVHドメインとVLドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する二つの「クロスオーバー」FV断片のヘテロ二量体である。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により完全に記載されている。

【0070】

非ヒト（例えばげっ歯類）抗体の「ヒト化」型は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大抵の場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、非ヒト種、例えば、所望の抗体特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長動物の超可変領域（ドナー抗体）由来の残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。幾つかの例においては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に見出されない残基を含むことができる。これらの修飾は、抗体の性能を更に改良するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの全てを実質的に含み、ここでは超可変ループの全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含むであろう。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照。

【0071】

本明細書において同定されたポリペプチド及び抗体配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」又は「相同性」は、任意の保存的置換を配列同一性の一部として考慮して配列を整列させた後に、比較されるポリペプチド中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当分野の技術の範囲内にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign（DNASTAR）ソフトウェアのような公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、ここでの目的のためには、％アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社によって著作され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD. C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムは、カリフォルニア州サウスサンフランシスコのジェネンテック社（Genentech, Inc.）から公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX（登録商標）V4.0Dでの使用のためにコンパイルする必要がある。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されて変動しない。

【0072】

「Fc受容体」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を記述するために使用される。一実施態様において、本発明のFcRは、IgG抗体（γ受容体）に結合するものであり、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスの受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcγRII受容体は、FcγRIIA（「活性化受容体」）及びFcγRIIB（「阻害受容体」）を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ

酸配列を有する。活性化 F c γ R I I A は、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T A M) を有する。阻害受容体 F c γ R I I B は、その細胞質ドメインに、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ (I T I M) を有する (総説 Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)を参照)。その用語には、F c γ R I I I A アロタイプ: F c γ R I I I A - P h e 1 5 8、F c γ R I I I A - V a l 1 5 8、F c γ R I I A - R 1 3 1 及び/又は F c γ R I I A - H 1 3 1 などのアロタイプが含まれる。F c R は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 及び de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に総説される。他の F c R は、将来同定されるべきものを含み、本明細書にて用語「F c R」により網羅される。この用語には、胎児への母親の I g G の移行に関与している新生児の受容体 F c R n も含まれる (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) 及び Kim et al., J. Immunol. 249 (1994))。

10

【0073】

「F c R n」という用語は、新生児 F c 受容体 (F c R n) を指す。F c R n は主要組織適合複合体 (M H C) と構造的に類似しており、β 2 -ミクログロブリンに非共有結合した α 鎖からなる。新生児 F c 受容体 F c R n の複数の機能は、Ghetie and Ward (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766 に総説される。F c R n は、母親から子どもへの免疫グロブリン I g G の受動的送達及び血清 I g G レベルの調節において役割を果たす。F c R n は、サルベージ受容体として作用し、細胞内及び細胞間のインタクトな形態の貪食された I g G を結合及び輸送し、それらをデフォルトの分解経路から救出することができる。

20

【0074】

ヒト I g G F c 領域の「C H 1 ドメイン」(「H 1」ドメインの「C 1」とも称される) は、通常約アミノ酸 1 1 8 から約アミノ酸 2 1 5 (E U 番号付けシステム) に及ぶ。

【0075】

「ヒンジ領域」は、通常、ヒト I g G 1 の G l u 2 1 6 から P r o 2 3 0 まで延びていと定義される (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206, 1985)。他の I g G アイソタイプのヒンジ領域は、同じ位置に内部重鎖 S - S 結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することにより I g G 1 と整列させることができる。

【0076】

F c 領域の「下部ヒンジ領域」は、通常、ヒンジ領域のすぐ C 末端の残基、すなわち F c 領域の残基 2 3 3 から 2 3 9 のストレッチとして定義される。以前の報告では、F c R 結合は、一般に、I g G F c 領域の下部ヒンジ領域のアミノ酸残基によるものである。

30

【0077】

ヒト I g G F c 領域の「C H 2 ドメイン」(「H 2」ドメインの「C 2」とも称される) は、通常約アミノ酸 2 3 1 から約アミノ酸 3 4 0 に及ぶ。C H 2 ドメインは、別のドメインと密接に対合しないという点で独特である。むしろ、2 つの N 結合分岐型糖鎖が、インタクトな天然型 I g G 分子の 2 つの C H 2 ドメインの間に挿入される。糖鎖はドメイン-ドメイン対合の代替物を提供し、C H 2 ドメインを安定化させるのに役立つことが推測されている。Burton, Molec Immunol. 22:161-206 (1985)。

40

【0078】

「C H 3 ドメイン」(「C 2」又は「H 3」ドメインとも称される) は、F c 領域の C 末端から C H 2 ドメインまでの残基のストレッチ (すなわち、抗体配列のアミノ酸残基約 3 4 1 から C 末端まで、典型的には I g G のアミノ酸残基 4 4 6 又は 4 4 7 まで) を含む。

【0079】

「機能的 F c 領域」は、天然型配列 F c 領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C 1 q 結合、補体依存性細胞障害作用 (C D C)、F c 受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用 (A D C C)、食作用、細胞表面受容体 (例えば B 細胞受容体; B C R) の下方制御などが含まれる。そのようなエフェクター機能

50

は、通常、F c 領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせることを必要とし、例えばここに開示される様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0080】

「C1q」は、免疫グロブリンのF c 領域の結合部位を含むポリペプチドである。C1qは、2つのセリンプロテアーゼC1r及びC1sとともに、補体依存性細胞傷害（CDC）経路の第1成分である複合体C1を形成する。ヒトC1qは、例えばQuidel、San Diego、CAから商業的に購入することができる。

【0081】

「結合ドメイン」という用語は、別の分子に結合するポリペプチドの領域を指す。FcRの場合、結合ドメインは、F c 領域の結合に関与するポリペプチド鎖の一部（例えば、そのアルファ鎖）を含むことができる。有用な結合ドメインの1つは、FcRアルファ鎖の細胞外ドメインである。

【0082】

「改変された」FcR結合親和性又はADCC活性を有する変異体IgG Fcを有する抗体は、親ポリペプチド又は天然配列F c 領域を含むポリペプチドと比較して、FcR結合活性（例えば、FcγR又はFcRn）及び／又はADCC活性の何れかを増強又は低下させたものである。FcRに対して「増加した結合を示す」変異体Fcは、親ポリペプチド又は天然配列IgG Fcよりも高い親和性（例えば、低い見かけのKd又はIC50値）で少なくとも1つのFcRに結合する。幾つかの実施態様によれば、親ポリペプチドと比較した結合の改善は、約3倍、好ましくは約5、10、25、50、60、100、150、200、最大500倍又は約25%から1000%の結合の改善である。FcRに対して「減少した結合を示す」ポリペプチド変異体は、親ポリペプチドよりも低い親和性（例えば、高い見かけのKd又はIC50値）で少なくとも1つのFcRに結合する。親ポリペプチドと比較した結合の減少は、結合の約40%以上の減少であり得る。

【0083】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性」又はADCCは、ある種の細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcRs）と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。抗体は細胞障害性細胞を「作動可能にし」、このような死滅に絶対的に必要とされる。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞がFcγRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号若しくは同第5821337号又は以下の例に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む。代わりに、又は更に、対象の分子のADCC活性は、インビボで、例えばClynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されている動物モデルなどの動物モデルで評価され得る。

【0084】

野生型IgG Fc又は親ポリペプチドを有するポリペプチドよりも効果的にヒトエフェクター細胞の存在下で「ADCCの増加を示す」、又は抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を媒介する変異体Fc領域を含むポリペプチドは、変異体Fc領域を有するポリペプチド及び野生型Fc領域を有するポリペプチド（又は親ポリペプチド）の量がアッセイにおいて本質的に同じである場合、インビトロ又はインビボでADCCを媒介する上で実質的により効果的であるものである。一般に、そのような変異体は、例えば動物モデルにおいてADCC活性を測定するためのアッセイ又は方法など、当技術分野で周知の任意のインビトロADCCアッセイを用いて同定されるであろう。一実施態様において、好ましい変異体は、野生型Fc（又は親ポリペプチド）よりもADCCを媒介する点にお

いて、約 5 倍から約 100 倍、例えば約 25 倍から約 50 倍、より効果的である。

【0085】

「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。標準的補体経路の活性化は、補体系の第 1 の成分 (C1q) の、それらの同種抗原に結合した (適切なサブクラスの) 抗体への結合により開始される。補体活性化を評価するために、CDC アッセイが、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載されるように実施することができる。Fc 領域アミノ酸配列が改変されて C1q 結合能力が向上したか又は低下したポリペプチド変異体は、米国特許第 619455 B1 号及び国際公開第 99/51642 号に記述されている。これらの特許文献の内容は出典明示により本明細書に援用される。また、Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) も参照のこと。

【0086】

本明細書に開示される抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の「有効量」は、具体的に述べられた目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、経験的に、及び記載された目的に関連する周知の方法によって決定することができる。

【0087】

「治療的有效量」という用語は、哺乳動物 (別名患者) の疾患又は障害の「治療」のために有効な、本明細書に開示される抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の量を指す。がんの場合は、本明細書に開示される抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の治療的有效量は、がん細胞の数を減少させる; 腫瘍の大きさ又は重さを小さくする; がん細胞の周辺器官への浸潤を阻害する (すなわち、ある程度まで遅くする、好ましくは止める); 腫瘍の転移を阻害する (すなわち、ある程度まで遅くする、好ましくは止める); 腫瘍の増殖をある程度まで阻害する; 及び/又はがんに関連する一又は複数の症状をある程度まで和らげることが可能である。本明細書に開示される抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物が、現存のがん細胞の増殖を妨げ及び/又は死滅させる程度まで、それは細胞分裂停止性及び/又は細胞障害性であり得る。一実施態様では、治療的有效量は増殖阻害量である。別の実施態様では、治療的有效量は、患者の生存期間を延長する量である。別の実施態様では、治療的有效量は、患者の無増悪生存期間を改善する量である。

【0088】

本発明の本明細書に開示される抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の「増殖阻害量」は、インビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えばがん細胞の増殖を阻害することができる量である。腫瘍細胞増殖を阻害する目的のための本発明のポリペプチド、抗体、アンタゴニスト又は組成物の「増殖阻害量」は、経験的に、及び既知の方法又は本明細書で提供される実施例により決定することができる。

【0089】

本発明の抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の「細胞傷害性量」は、インビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えばがん細胞の破壊を引き起こすことができる量である。腫瘍細胞増殖を阻害する目的のための本発明の抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の「細胞傷害性量」は、経験的に、及び当技術分野で周知の方法により決定することができる。

【0090】

本発明の抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の「増殖阻害量」は、インビトロ又はインビボの何れかで細胞、特に腫瘍、例えばがん細胞の増殖を阻害することができる量である。腫瘍細胞増殖を阻害する目的のための本発明の抗 VEGFR2 抗体 (又はその断片) 又は組成物の「増殖阻害量」は、経験的に、及び既知の方法又は本明細書で提供される実施例により決定することができる。

【0091】

本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容可能」又は「薬理学的に適合性」とは、生物学的又はその他の点で所望されたくない物質を意味し、例えば、物質は、有意な所望

されない生物学的効果を引き起こすことなく、又はそれが含まれる組成物の他の成分の何れかと有害な様式で相互作用することなく、患者に投与される薬学的組成物に組み込むことができる。薬学的に許容される担体又は賦形剤は、好ましくは、毒物学及び製造試験の要求基準を満たしているか、及び／又は米国食品医薬品局によって作成された不活性成分ガイドに含まれている。

【0092】

「検出する」という用語は、物質の存在又は非存在を決定すること又は物質（VEGFR2など）の量を定量することを含むことを意図する。従って、その用語は、定性的及び定量的測定のための本発明の材料、組成物、及び方法の使用を指す。一般に、検出に使用される特定の技術は、本発明の実施には重要ではない。

10

【0093】

例えば、本発明による「検出する」とは、VEGFR2遺伝子産物、mRNA分子、又はVEGFR2ポリペプチドの存在又は非存在；VEGFR2ポリペプチドのレベル又は標的に結合した量の変化；VEGFR2ポリペプチドの生物学的機能／活性の変化を観察することを含み得る。幾つかの実施態様において、「検出する」は、野生型VEGFR2レベル（例えば、mRNA又はポリペプチドレベル）を検出することを含み得る。検出するとは、対照と比較した場合、10%から90%の間の任意の値、又は30%から60%の間の任意の値、又は100%を超える任意の値の変化（増加又は減少）を定量化することを含み得る。検出するとは、2倍から10倍までの間の任意の値、又はそれ以上、例えば100倍の変化を定量化することが含まれ得る。

20

【0094】

本明細書で使用する場合、「標識」という単語は、抗体に直接的又は間接的にコンジュゲートした検出可能な化合物又は組成物を指す。標識がそれ自体で検出可能（例えば放射性標識又は蛍光性標識）であってもよく、又は酵素標識の場合は、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的变化を触媒するものであってもよい。

【0095】

本明細書における値又はパラメータの「約」への言及は、この技術分野の当業者に容易に知られているそれぞれの値に対する通常の誤差範囲を指す。本明細書における値又はパラメータの「約」への言及は、その値又はパラメータ自体を対象にする態様を含む（及び記載する）。例えば、「約X」に言及する記述は「X」の記述が含まれる。

30

【0096】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施態様は、態様及び実施態様を「含む」、「からなる」及び／又は「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0097】

特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、その全体が参考により本明細書に援用される。

【0098】

抗血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）抗体

本発明は、血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）に結合する新規な抗体の同定に基づく。抗VEGFR2抗体は、様々な治療方法及び診断方法において使用することができる。例えば、抗VEGFR2抗体は、例えば、大腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん、固形腫瘍、及び過剰な血管新生を特徴とする病的状態（本明細書の他の箇所に記載されるものなど）を含む、異常なVEGFR2発現又は異常なVEGFR2活性により特徴付けられる疾患の治療において、単独で又は他の薬剤と組み合わせて使用することができる。本明細書で提供される抗体は、抗VEGFR2抗体を患者に投与し、患者からの試料中において（例えば、インビボ又はエクスピボで）VEGFR2タンパク質に結合した抗VEGFR2抗体を検出することによって、又は患者からの試料と抗VEGFR2抗体とを接触させ、VEGFR2タンパク質に結合した抗VEGFR2抗体を定性的に又は定量的に検出することによって、患者又は患者試料中のVEGFR2タンパク質を検出するために使用することもできる。

40

50

【0099】

血管内皮増殖因子受容体2又は「VEGFR2」（例えばKDR、「キナーゼインサートドメイン受容体」、FLK1、「胎児肝臓キナーゼ1」及びCD309としても知られている）は、VEGFRファミリーの受容体であり、3つの密接に関連した受容体チロシンキナーゼのサブファミリーである。VEGF受容体は、典型的には、それらのアミノ末端細胞外受容体リガンド結合ドメインに数個、典型的には5又は7個の免疫グロブリン様ループを有することを特徴とするクラスIII受容体チロシンキナーゼである（Kaipainen et al., J. Exp. Med., 178:2077-88 (1993)）。血管新生及びリンパ管新生シグナル伝達を促進するVEGFR2は、内皮細胞上の主なVEGF受容体である。VEGFR2はVEGFAの結合によって活性化され、VEGFR2は二量体化及びチロシン自己リン酸化を受ける。自己リン酸化は、例えばPLC-γ、VRAP（VEGF受容体関連タンパク質）及びSrcなどSH2ドメイン含有シグナル伝達分子の下流の直接活性化、並びにSrc及びPI3K（ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ）の間接的活性化をもたらす。VEGFR2は、内皮細胞の増殖、遊走、分化、管形成、血管透過性の増加、及び血管完全性の維持をもたらす主なVEGFシグナルトランスデューサーであるとい一般的に考えられている。異常なVEGFR2発現又はVEGFR2活性は、多くのがん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）及び過剰な血管新生を特徴とする病的状態（本明細書の他の箇所に記載されるものなど）と関連している。

10

【0100】

20

抗VEGFR2抗体は、十分な親和性及び特異性でVEGFR2に結合する抗体である。好ましくは、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、VEGFR2活性が関与する疾患又は状態を標的としかつ妨げる治療剤として使用することができる。特定の実施態様では、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体は、VEGFR1/FLT1又はVEGFR3/FLT4/PCl/ChyなどのVEGF受容体ファミリーの他のメンバーに結合しない。特定の実施態様では、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体はまた、VEGFR3/FLT4/PCl/Chyに結合する。特定の実施態様では、抗VEGFR2抗体は、組換えヒト化抗VEGFR2モノクローナル抗体である。一実施態様によれば、抗VEGFR2抗体は、本明細書中に開示される抗体の何れか1つのCDR、可変重鎖領域、及び／又は可変軽鎖領域を含む。

30

【0101】

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、第2の抗VEGFR2抗体のヒトVEGFR2への結合を競合的に阻害しない。特定の実施態様において、第2の抗VEGFR2抗体は、アミノ酸配列RASQSVSSYL A（配列番号73）を含むCDR-L1；アミノ酸配列DSSNRAT（配列番号52）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列LQHNTFPPT（配列番号61）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYSMN（配列番号28）を含むCDR-H1；アミノ酸配列SISSSSSYIYYADSVKG（配列番号35）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列VTDAFDI（配列番号41）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。特定の実施態様では、第2の抗VEGFR2抗体は、米国特許出願公開第2009/0306348号（この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている1121Bである。特定の実施態様において、第2の抗VEGFR2抗体は、アミノ酸配列RASQGIDNWL G（配列番号74）を含むCDR-L1；アミノ酸配列DASNLD T（配列番号53）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列QQA KAF PPT（配列番号62）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYSMN（配列番号28）を含むCDR-H1；アミノ酸配列SISSSSSYIYYADSVKG（配列番号35）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列VTDAFDI（配列番号41）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。特定の実施態様では、第2の抗VEGFR2抗体は、米国特許第7498414号（この内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれ

40

50

る)に記載されている1121Nである。

【0102】

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体(又はその抗原結合断片)は、第2の抗VEGFR2抗体によって結合されたVEGFR2のドメインに結合しない。特定の実施態様において、第2の抗VEGFR2抗体は、アミノ酸配列RASQSVSSYLA(配列番号73)を含むCDR-L1;アミノ酸配列DSSNRAT(配列番号52)を含むCDR-L2及びアミノ酸配列LQHNTFPPT(配列番号61)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列SYSMN(配列番号28)を含むCDR-H1;アミノ酸配列SISSSSSYIYYADSVKG(配列番号35)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列VTDAFDI(配列番号41)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。特定の実施態様では、第2の抗VEGFR2抗体は、配列番号104のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号106のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様では、第2の抗VEGFR2抗体は、米国特許出願公開第2009/0306348号に記載されている1121Bである。特定の実施態様において、第2の抗VEGFR2抗体は、アミノ酸配列RASQGIDNWL(配列番号74)を含むCDR-L1;アミノ酸配列DASNLD(配列番号53)を含むCDR-L2及びアミノ酸配列QQA KAFPT(配列番号62)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列SYSMN(配列番号28)を含むCDR-H1;アミノ酸配列SISSSSSYIYYADSVKG(配列番号35)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列VTDAFDI(配列番号41)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。特定の実施態様では、第2の抗VEGFR2抗体は、配列番号105のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号106のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様では、第2の抗VEGFR2抗体は、米国特許第7,498,414号に記載されている1121Nである。

【0103】

配列番号104-106のアミノ酸配列を以下に示す。

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDSSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFATYYCLQHNTFPPTFGQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN(配列番号104)

DIQMTQSPSSVSASIGDRVITTCRASQGIDNWL GWYQQKPGKAPKLLIYDASNLDTGVPSTRFSGSGSGTYFTLTITSSLQAE DFAVYFCQQA KAFPTFGGGTKVDIKGTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN(配列番号105)

EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVTDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVT(配列番号106)

【0104】

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、VEGFR2のVEGFへの結合をブロックしない。

【0105】

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、VEGFR2のドメイン5-7に結合する。

【0106】

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、以下の実施例に記載されるように、フローサイトメトリーによって決定されるように、全HUVEC細胞に結合する。

【0107】

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）管形成アッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC管形成アッセイなど）において管形成を阻害する。特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、HUVEC遊走アッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC遊走アッセイなど）においてHUVEC遊走を阻害する。特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、HUVEC遊走アッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC遊走アッセイなど）においてHUVEC遊走を阻害しない。特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、HUVEC生存アッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC生存アッセイなど）においてHUVEC生存を阻害する。特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、HUVEC増殖アッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC増殖アッセイなど）においてHUVEC増殖を阻害する。

【0108】

特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、インビトロアッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC発芽アッセイなど）において血管新生を阻害しない。特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、インビボアッセイ（以下の実施例に記載のHUVECマトリゲルプラグアッセイ）において血管新生を阻害する。特定の実施態様では、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、インビトロアッセイ（以下の実施例に記載のHUVEC発芽アッセイなど）において血管新生を阻害しないが、インビボアッセイ（以下の実施例に記載のHUVECマトリゲルプラグアッセイ）において血管新生を阻害する。

【0109】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RASQNIASYLEN（配列番号76）又はRASQSVS-S/N-S/N-YL-G/A（配列番号83）又はTRSRGSIASSYVQ（配列番号80）又はRSSQSL-L/V/Y-H/Y-G/S/R-D/N-G-N/K/Y-N/T-Y/F-LD（配列番号84）を含むCDR-L1；アミノ酸配列L/A/G/K/E-G/A/V/N/S-S/D-N/S/Q/K-R/L-A/K/D/P-S/T（配列番号60）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列M/Q-Q/S-A/S/R/G/Y-L/Y/S/A/D/G/T-Q/S/N/H/F-T/I/W/S-P/T-Y/L/P/V/G/I-T/V（配列番号72）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列T/S-Y-Y/G/A/S-M/I-H/N/S（配列番号34）を含むCDR-H1；アミノ酸配列I/V/G/S-I-N/S/I-P/Y/S/G-S/D/I-G/F/S-G/S-S/N/T/Y-A-T/K/A/I-S/Y/N/H-YA-Q/D-K/S-F/V-K/Q-G（配列番号40）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列GLWFGEGY（配列番号49）又はESYGGQFDY（配列番号43）又はDLVVPAAATLDY（配列番号42）又はD/G-F/I-Y/I-E/V-A/G-G/P-G/T-W/D-Y/A-FD-L/I（配列番号51）又はRDGSLGVGYYYMDV（配列番号50）又はVGATTSLYYYYGMDV（配列番号47）又はDGFGLA VAGPYWYFDL（配列番号44）又はPTRSRDFWSGLGYYYYYMDV（配列番号45）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0110】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、配列番号75-82からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1；配列番号54-

59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び配列番号63-71からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに配列番号29-33からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1；配列番号35-39及び125からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び配列番号42-50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0111】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RSSQSL LHGNNGNNYLD（配列番号75）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LGSNRAS（配列番号54）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQALQTPYT（配列番号63）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列TY YMH（配列番号29）を含むCDR-H1；アミノ酸配列IINPSGGSTSYAQKFQG（配列番号36）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列DLVVP AATLDY（配列番号42）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0112】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RASQNI ASYLN（配列番号76）を含むCDR-L1；アミノ酸配列AASSLSKS（配列番号55）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列QQSYSI PYT（配列番号64）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYGMH（配列番号30）を含むCDR-H1；アミノ酸配列VISYDGS NKYYA DSVKG（配列番号37）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列ESYGGQFDY（配列番号43）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0113】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RASQS VSN NYLG（配列番号77）を含むCDR-L1；アミノ酸配列GASSRAT（配列番号56）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列QQR SNWPLT（配列番号65）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYAMH（配列番号31）を含むCDR-H1；アミノ酸配列VISYDGS NKYYA DSVKG（配列番号37）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列DGFGLAVA GPYWYFDL（配列番号44）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0114】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RSSQS LVYSDGKTYLD（配列番号78）を含むCDR-L1；アミノ酸配列KVS NRDS（配列番号57）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGAHW PPT（配列番号66）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYAIS（配列番号85）を含むCDR-H1；アミノ酸配列GIIPIFGTANYAQKFQG（配列番号38）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列PTRSRDFWSGLGYYYMDV（配列番号45）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0115】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RASQS VSSSYLA（配列番号79）を含むCDR-L1；アミノ酸配列GASSRAT（配列番号56）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列QQR SNW PPT（配列番号67）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYGMH（配列番号30）を含むCDR-H1；アミノ酸配列VISYDGS NKHYA DSVKG（配列番号125）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列DFYEAGGWYFDL（配列番号46）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0116】

50

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列TRSRGSIASSYVQ（配列番号80）を含むCDR-L1；アミノ酸配列ENDQRPS（配列番号58）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列QSYDFSTVV（配列番号68）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYAIS（配列番号85）を含むCDR-H1；アミノ酸配列GIIPIFGTANYAQKFQG（配列番号38）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列VGATTSLYYYYGMDV（配列番号47）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0117】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RASQSVSSSYLA（配列番号79）を含むCDR-L1；アミノ酸配列GASSRAT（配列番号56）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列QQYGSSPGT（配列番号69）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYSMN（配列番号28）を含むCDR-H1；アミノ酸配列SISSSSSYIYYADSVKG（配列番号35）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列GIIVGPTDAFDI（配列番号48）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0118】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RSSQSLYYRDGYTFLD（配列番号81）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LSSKRDS（配列番号59）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号70）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列TYAMS（配列番号33）を含むCDR-H1；アミノ酸配列GISGSGGATHYADSVKG（配列番号39）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列GLWFGEGY（配列番号49）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0119】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列RSSQSLLYSNGYNYLD（配列番号82）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LGSNRAS（配列番号54）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQALQTPIT（配列番号71）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列SYAIS（配列番号85）を含むCDR-H1；アミノ酸配列GIIPIFGTANYAQKFQG（配列番号38）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列RDGSLGVGYYYMDF（配列番号50）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0120】

本明細書に記載のCDRの配列を以下の表2に示す。

10

20

30

表 2

配列番号 28	SYSMN	配列番号 56	GASSRAT
配列番号 29	TYMH	配列番号 57	KVSNRDS
配列番号 30	SYGMH	配列番号 58	ENDQRPS
配列番号 31	SYAMH	配列番号 59	LSSKRDS
配列番号 32	SYSMN	配列番号 63	MQALQTPYT
配列番号 33	TYAMS	配列番号 64	QQSYSIPYT
配列番号 35	SISSSSYIYYADSVKG	配列番号 65	QQRSNWPLT
配列番号 36	IINPSGGSTSYAQKFQG	配列番号 66	MQGAHWPPPT
配列番号 37	VISYDGSNKYYADSVKG	配列番号 67	QQRSNWPPT
配列番号 38	GIPIFGTANYAQKFQG	配列番号 68	QSYDFSTVV
配列番号 39	GISGSGGATHYADSVKG	配列番号 69	QQYGSSPGT
配列番号 42	DLVVPAATLDY	配列番号 70	MQGTHWPYT
配列番号 43	ESYGGQFDY	配列番号 71	MQALQTPIT
配列番号 44	DGFG LAVAGPYWYFDL	配列番号 75	RSSQSLLHGNGNNYLD
配列番号 45	PTRSRDFWSGLGYYYYMD V	配列番号 76	RASQNIASYLN
配列番号 46	DFYEAGGWYFDL	配列番号 77	RASQSVSNLYLG
配列番号 47	VGATTSLYYYYGMDV	配列番号 78	RSSQSLVYSDGKTYLD
配列番号 48	GIIVGPTDAFDI	配列番号 79	RASQSVSSSYLA
配列番号 49	GLWFGEGY	配列番号 80	TRSRGSIASSYVQ
配列番号 50	RDGSLGVGYYYMDF	配列番号 81	RSSQSLYYRDGYTFD
配列番号 54	LGSNRAS	配列番号 82	RSSQSLLYSNGYNYLD
配列番号 55	AASSLKS	配列番号 85	SYAIS
配列番号 125	VISYDGSNKHADSVKG		

10

20

30

40

50

【0121】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、配列番号86-94からなる群から選択される軽鎖可変ドメイン配列及び配列番号95-103からなる群から選択される重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0122】

配列番号86-103のアミノ酸配列を以下に示す。

DVVM TQSP LSLP VTPGESAS ISCRSSQS L L H G N G N N Y L D W
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L Q I
S R V E P E D V G V Y Y C M Q A L Q T P Y T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
S G N（配列番号86）

DVVM TQSP SSL S A S V G D R V T V T C R A S Q N I A S Y L N W Y Q Q K P

G K A P K L L I Y A A S S L K S G V P S R F S G S G S G R D F T L T I S S L Q P
E D F A A Y Y C Q Q S Y S I P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q L G N (配
列番号 8 7)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S N N Y L G W Y Q Q K
P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E
P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N (配
列番号 8 8)

10

D V V M T Q S P L S L S V T P G E P A S I S C R S S Q S L V Y S D G K T Y L D W
F L Q R P G Q S P R R L I Y K V S N R D S G V S D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D V G V Y Y C M Q G A H W P P T F G Q G T R V E I K R T V A A P S V
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
S G N (配列番号 8 9)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K
P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E
P E D F A V Y Y C Q Q R S N W P P T F G P G T K V D I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N (配
列番号 9 0)

20

N F M L T Q P H S V S E S P G K T V T V S C T R S R G S I A S S Y V Q W Y Q Q R
P G R S P T N V I Y E N D Q R P S G V P T R F S G S V D R S S N S A S L T I S G
L E T E D E A D Y Y C Q S Y D F S T V V F G G G T K L T V L S Q P K A A P S V T
L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K
A G (配列番号 9 1)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K
P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S V S G S G T D F T L T I S R L E
P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P G T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N (配
列番号 9 2)

30

D V V M T Q S P L S L P V T L G Q P A S I S C R S S Q S L Y Y R D G Y T F L D W
Y V Q K P G Q S P Q L L I Y L S S K R D S G V P D R I S G S G S G T D F T L R I
S R V E A E D V G V Y Y C M Q G T H W P Y T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
S G N (配列番号 9 3)

40

D V V M T Q S P L S L A V T P G E P A S I S C R S S Q S L L Y S N G Y N Y L D W
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
S R V E A E D V G V Y Y C M Q A L Q T P I T F G P G T K V D I K R T V A A P S V
F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
S G N (配列番号 9 4)

E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C R A S G F S F T T Y Y M H W V R Q A
P G Q G L E W M G I I N P S G G S T S Y A Q K F Q G R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D L V V P A A T L D Y W G Q G T L V T V S S

50

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T (配列番号 9 5)

E V Q L V Q T G G G A V Q P G R S L R L S C A A T G F T F S S Y G M H W V R Q A
P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E S Y G G Q F D Y W G P G T L V T V S S A S
T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T (配列番号 9 6)

E V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y A M H W V R Q A
P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D G F G L A V A G P Y W Y F D L W G R G T L
V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E
P V T (配列番号 9 7)

E V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A
P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A G P T R S R D F W S G L G Y Y Y M D V W G K
G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y
F P E P V T (配列番号 9 8)

E V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
P G K G L E W V A V I S Y D G S N K H Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D F Y E A G G W Y F D L W G R G T L V T V S
S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T (配列番号 9 9)

E V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A
P G Q G L E W M G G I I P I F G T A Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y M
E L S S L R S E D T A V Y Y C A R V G A T T S L Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T
V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V
T (配列番号 1 0 0)

E V Q L V Q S G G G L V K P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y S M N W V R Q A
P G K G L E W V S S I S S S S S Y I Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G I I V G P T D A F D I W G Q G T T V T V S
S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T (配列番号 1 0 1)

Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F S F S T Y A M S W V R Q A
P G K G L E W V S G I S G S G G A T H Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T V N
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G L W F G E G Y W G Q G T L V T V S S A S T
K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T (配列番号 1 0 2)

E V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V R Q A
P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S T S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D G S L G V G Y Y Y M D F W G K G T T V T V
S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T
(配列番号 1 0 3)

10

20

30

40

50

【0123】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号86に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号95に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号87に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号96に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号88に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号97に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号89に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号98に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号90に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号99に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号91に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号100に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号101に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号93に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号102に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号94に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号103に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

10

20

【0124】

重鎖及び軽鎖可変ドメインは、可能な全ての対合の組み合わせで組み合わせて、幾つかの抗VEGFR2抗体を生成する。

【0125】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、第2の抗VEGFR2抗体のヒトVEGFR2への結合を競合的に阻害する。幾つかの実施態様において、第2の抗VEGFR2抗体は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LSS（配列番号2）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；及びアミノ酸配列GFSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む抗VEGFR2抗体の変異体であり、ここで該変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び／又は6の1つ又は複数において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様において、変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び／又は6のうちの1つ又は複数において、少なくとも1個、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、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のアミノ酸置換を含む。特定の実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。特定の実施態様において、アミノ酸置換は、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低下させない。例えば、VEGFR2結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、以下の表3に記載のように本明細書で提供される保存的置換）を行うことができる。抗VEGFR2抗体変異体の結合親和性は、以下の実施例に記載の方法を用いて評価することができる。

30

40

【0126】

保存的置換は、「保存的置換」の見出しの下に表3に示されている。「例示的置換」の見出しの下で、そしてアミノ酸側鎖クラスを参照して以下に更に記載されるように、より実質的な変化が表3に提供される。アミノ酸置換は対象の抗体に導入され、生成物は、所

50

望の活性、例えば、保持された／改善された V E G F R 2 結合性、減少した免疫原性、又は改善された A D C C もしくは C D C についてスクリーニングされ得る。

表 3: 保存的置換

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【 0 1 2 7 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちのークラスのメンバーを別のクラスのもと交換することを必要とするであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば本明細書に記載のファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて、簡便に生成することができる。簡潔には、1つ又は複数の C D R 残基が変異され、変異体抗体がファージ上に提示され、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。H V R において、例えば抗体親和性を改善するために、改変（例えば、置換）を行うことができる。このような改変は、H V R の「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程に高頻度で変異を受けるコドンにコードされた残基で（例えば Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008) を参照）、及び／又は S D R (a - C D R) で行うことができ、得られた変異体 V H 又は V L は結合親和性について試験される。二次ライブラリーからの構築及び再選択による親和性成熟が、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001) に記載されている。

【 0 1 2 8 】

親和性成熟の幾つかの実施態様において、多様性が、種々の方法（例えば変異性PCR、鎖シャッフリング又はオリゴヌクレオチド指定突然変異誘発）の何れかにより、成熟のために選択された可変遺伝子に導入される。次に、二次ライブラリーが作製される。次いで、ライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、幾つかのHVR残基（例えば、一度に4-6残基）がランダム化されるHVR指向のアプローチを含む。抗原結合に関与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング突然変異誘発又はモデリングを用いて特異的に同定することができる。特に、CDR-H3及びCDR-L3がしばしば標的とされる。

【0129】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、第2の抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）によって結合されたヒトVEGFR2の同じエピトープに結合する。特定の実施態様において、第2の抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LSS（配列番号2）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；及びアミノ酸配列GFSSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む抗VEGFR2抗体の変異体であり、ここで該変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び／又は6の1つ又は複数において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様において、変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び／又は6のうちの1つ又は複数において、少なくとも1個、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、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のアミノ酸置換を含む。特定の実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。特定の実施態様において、アミノ酸置換は、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低下させない。例えば、VEGFR2結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、上の表3に記載のように本明細書で提供される保存的置換）を行うことができる。

【0130】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LSS（配列番号2）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；及びアミノ酸配列GFSSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む抗VEGFR2抗体の変異体であり、ここで該変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び／又は6の1つ又は複数において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様において、変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び／又は6のうちの1つ又は複数において、少なくとも1個、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、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のアミノ酸置換を含む。特定の実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。特定の実施態様において、アミノ酸置換は、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低下させない。例えば、VEGFR2結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、上の表3に記載のように本明細書で提供される保存的置換）を行うことができる。抗VEGFR2抗体変異体の結合親和性は、以下の実施例に記載の方法を用いて評価することができる。

【0131】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、ヒトVEGFR2に対する第2の抗VEGFR2抗体の結合を競合的に阻害し、ここで第2の抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYR-D/S-GYTF（配列番号22）を含むCDR-L1；アミノ酸配列L/Q/R-SS（配列番号23）を含むCDR-L2；

及びアミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT（配列番号24）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA（配列番号25）を含むCDR-H1；アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T（配列番号26）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I（配列番号27）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0132】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、第2の抗VEGFR2抗体と同じヒトVEGFR2のエピトープに結合し、ここで第2の抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYR-D/S-GYTF（配列番号22）を含むCDR-L1；アミノ酸配列L/Q/R-SS（配列番号23）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT（配列番号24）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA（配列番号25）を含むCDR-H1；アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T（配列番号26）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I（配列番号27）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0133】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYR-D/S-GYTF（配列番号22）を含むCDR-L1；アミノ酸配列L/Q/R-SS（配列番号23）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT（配列番号24）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA（配列番号25）を含むCDR-H1；アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T（配列番号26）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I（配列番号27）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む抗VEGFR2抗体の変異体であり、ここで該変異体は、配列番号1、2、3、4、5、及び/又は6の1つ又は複数において少なくとも1つのアミノ酸置換を含む。幾つかの実施態様において、変異体は、配列番号1、2、3、4、5及び/又は6のうちの1つ又は複数において、少なくとも1個、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、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、又は少なくとも10個のアミノ酸置換を含む。特定の実施態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。特定の実施態様において、アミノ酸置換は、抗体が抗原に結合する能力を実質的に低下させない。例えば、VEGFR2結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、上の表3に記載のように本明細書で提供される保存的置換）を行うことができる。

【0134】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYR-D/S-GYTF（配列番号22）を含むCDR-L1；アミノ酸配列L/Q/R-SS（配列番号23）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列M/L/F-QGTHWPYT（配列番号24）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列G/R-F-S/T/P-FSTYA（配列番号25）を含むCDR-H1；アミノ酸配列I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T（配列番号26）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEG-Y/L/I（配列番号27）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0135】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号1及び16からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1；配列番号2、7、及び8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び配列番号3、9、及び12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに配列番号4、及び13-15からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1；配列番号5、及び17-21からなる群から選択されるアミノ酸配列

を含むCDR-H2；及び配列番号6、及び10-11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。本明細書に記載のCDRの配列を以下の表4に示す。

表4

配列番号1	QSLYYRDGYTF	配列番号8	RSS	配列番号15	RFSFSTYA
配列番号2	LSS	配列番号9	LQGTHWPYT	配列番号16	QSLYYRSGYTF
配列番号3	MQGTHWPYT	配列番号10	KGLWFG EGL	配列番号17	INGSGGAT
配列番号4	GFSFSTYA	配列番号11	KGLWFG EGI	配列番号18	ISGSSGAT
配列番号5	ISGSGGAT	配列番号12	FQGTHWPYT	配列番号19	ISGNNGAT
配列番号6	KGLWFG EGY	配列番号13	GFTFSTYA	配列番号20	ISGSGQAT
配列番号7	QSS	配列番号14	GFPFSTYA	配列番号21	ISGSGGTT

10

【0136】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体（又はその抗原結合断片）は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列LSS（配列番号2）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0137】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0138】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列RSS（配列番号8）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列LQGTHWPYT（配列番号9）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGL（配列番号10）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0139】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列LQGTHWPYT（配列番号9）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSTYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGI（配列番号11）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0140】

50

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列LQGTHWPYT（配列番号9）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSITYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGL（配列番号10）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0141】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列FQGTHWPYT（配列番号12）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSITYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0142】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSITYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0143】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列LQGTHWPYT（配列番号9）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSITYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0144】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列SLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列FQGTHWPYT（配列番号12）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSITYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0145】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFSFSITYA（配列番号4）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGSGGAT（配列番号5）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFG EGL（配列番号10）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0146】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列

50

番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列FQGT HWPYT(配列番号12)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列GF SFS TYA(配列番号4)を含むCDR-H1;アミノ酸配列ISGSGGAT(配列番号5)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列KGLWFG EGL(配列番号10)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0147】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF(配列番号1)を含むCDR-L1;アミノ酸配列QSS(配列番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列LQGT HWPYT(配列番号9)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列GF SFS TYA(配列番号13)を含むCDR-H1;アミノ酸配列INGSGGAT(配列番号17)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列KGLWFG EGY(配列番号6)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0148】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF(配列番号1)を含むCDR-L1;アミノ酸配列QSS(配列番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列LQGT HWPYT(配列番号9)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列GF SFS TYA(配列番号13)を含むCDR-H1;アミノ酸配列INGSGGAT(配列番号17)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列KGLWFG EGL(配列番号10)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0149】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF(配列番号1)を含むCDR-L1;アミノ酸配列QSS(配列番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列LQGT HWPYT(配列番号9)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列GF SFS TYA(配列番号4)を含むCDR-H1;アミノ酸配列ISGSSGAT(配列番号18)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列KGLWFG EGY(配列番号6)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0150】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF(配列番号1)を含むCDR-L1;アミノ酸配列QSS(配列番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列LQGT HWPYT(配列番号9)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列GF SFS TYA(配列番号4)を含むCDR-H1;アミノ酸配列ISGSSGAT(配列番号18)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列KGLWFG EGL(配列番号10)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0151】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF(配列番号1)を含むCDR-L1;アミノ酸配列QSS(配列番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列MQGT HWPYT(配列番号3)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列GF PF S TYA(配列番号14)を含むCDR-H1;アミノ酸配列ISGNNGGAT(配列番号19)を含むCDR-H2;及びアミノ酸配列KGLWFG EGY(配列番号6)を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0152】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRSGYTF(配列番号16)を含むCDR-L1;アミノ酸配列QSS(配列番号7)を含むCDR-L2;及びアミノ酸配列MQGT HWPYT(配列番号3)を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列;並びにアミノ酸配列RFSFS TYA(

50

配列番号 15) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I S G S G Q A T (配列番号 20) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0153】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F (配列番号 16) を含む C D R-L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R-L 2 ; 及びアミノ酸配列 F Q G T H W P Y T (配列番号 12) を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I S G S G G T T (配列番号 21) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

10

【0154】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F (配列番号 16) を含む C D R-L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R-L 2 ; 及びアミノ酸配列 F Q G T H W P Y T (配列番号 12) を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I S G S G G T T (配列番号 21) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G L (配列番号 10) を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

20

【0155】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R-L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R-L 2 ; 及びアミノ酸配列 L Q G T H W P Y T (配列番号 9) を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 13) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I N G S G G A T (配列番号 17) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0156】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R-L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R-L 2 ; 及びアミノ酸配列 L Q G T H W P Y T (配列番号 9) を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 13) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I N G S G G A T (配列番号 17) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G L (配列番号 10) を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

30

【0157】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R-L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R-L 2 ; 及びアミノ酸配列 L Q G T H W P Y T (配列番号 9) を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I S G S S G A T (配列番号 18) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y (配列番号 6) を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

40

【0158】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列 Q S L Y Y R D G Y T F (配列番号 1) を含む C D R-L 1 ; アミノ酸配列 Q S S (配列番号 7) を含む C D R-L 2 ; 及びアミノ酸配列 L Q G T H W P Y T (配列番号 9) を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A (配列番号 4) を含む C D R-H 1 ; アミノ酸配列 I S G S S G A T (配列番号 18) を含む C D R-H 2 ; 及びアミノ酸配列 K G L W F G E G L (配列番号 10) を含む C D R-H

50

3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0159】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSLYYRDGYTF（配列番号1）を含むCDR-L1；アミノ酸配列QSS（配列番号7）を含むCDR-L2；及びアミノ酸配列MQGTHWPYT（配列番号3）を含むCDR-L3を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列GFPFSTYA（配列番号14）を含むCDR-H1；アミノ酸配列ISGNGGAT（配列番号19）を含むCDR-H2；及びアミノ酸配列KGLWFGEGY（配列番号6）を含むCDR-H3を含む重鎖可変ドメイン配列を含む。

【0160】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、配列番号107-113の何れか1つに記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（V_L）を含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、配列番号114-124に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。配列番号107-124のアミノ酸配列を以下に示す。

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRDGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**LSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**MQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 107)

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRDGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**QSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**MQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 108)

10

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRDGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**RSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**LQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 109)

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRDGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**QSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**LQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 110)

20

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRDGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**QSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**FQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 111)

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRSGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**QSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**MQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 112)

30

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSS**QSLY** **YRSGYTF**LDWY VQKPGQSPQL
LIY**QSS**KRDS GVPDRISGSG SGTDFTLRIS RVEAEDVGVY YC**FQGTHWPYT**
FGQGTKLEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPBREAKVQ
WKVDNALQSGN (配列番号 113)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** **TYAMSWVRQA** PGKGLEWVSG
ISGSGGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFEGEGYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT
(配列番号 114)

40

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** **TYAMSWVRQA** PGKGLEWVSG
ISGSGGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFEGEGLWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 115)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
ISGSGGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGIWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 116)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
INGSGGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 117)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFTFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
INGSGGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGLWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 118)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
ISGSSGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 119)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
ISGSSGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGLWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 120)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFPFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
ISGNNGATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 121)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**RFSFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
ISGSGQATHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 122)

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** **TYAM**SWVRQA PGKGLEWVSG
ISGSGGTTHY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT

(配列番号 123)

10

20

30

40

QVQLVQSGGG LVQPGGSLRL SCAAS**GFSFS** TYAMSWVRQA PGKGLEWVSG
ISGSGG**TT**HY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVN LQMNSLRAED TAVYYCA**KGL**
WFGEGLWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVT
(配列番号 124)

【0161】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号107に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号114に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号108に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号114に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号109に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号115に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号116に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号115に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号111に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号114に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0162】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号114に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号111に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号114に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号108に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号115に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号111に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号115に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0163】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号117に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号118に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号119に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号120に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号108に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号121に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号112に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号122に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号112に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号123に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗V

EGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号112に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号124に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0164】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号117に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号118に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0165】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号119に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号120に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号108に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン及び配列番号121に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0166】

重鎖及び軽鎖可変ドメインは、可能な全ての対合の組み合わせで組み合わせ、幾つかの抗VEGFR2抗体を生成する。

【0167】

特定の実施態様において、抗体は、ヒトIgG、例えばヒトIgG1又はヒトIgG4のFc配列を含む。特定の実施態様において、Fc配列は、しばしばFc受容体(FcR)への結合に関連する抗体依存性細胞傷害(ADCC)エフェクター機能を欠如するように改変されるか又はそうでなければ変化している。エフェクター機能を改変し得るFc配列に対する変化又は突然変異の多くの例が存在する。例えば、国際公開第00/42072号及びShields et al. J Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)は、FcRへの結合が改善又は減少した抗体変異体を記載している。これらの出版物の内容は出典明示により本明細書に援用される。抗体は、Fab、Fab'、F(ab)'₂、一本鎖Fv(scFv)、Fv断片；ダイアボディ及び直鎖状抗体の形態であり得る。また、抗体は、EGFRに結合するが、1つ以上の他の標的に結合し、それらの機能を阻害する多重特異性抗体であってもよい。抗体は、治療剤(例えば、細胞傷害性剤、放射性同位元素及び化学療法剤)又は患者試料中若しくはインビボで画像化(例えば、放射性同位元素、蛍光色素及び酵素)によりVEGFR2を検出するための標識にコンジュゲートさせることができる。

【0168】

抗VEGFR2抗体をコードする核酸分子、本明細書に記載のCDR及び／又は重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインをコードする核酸分子を含む発現ベクター並びに核酸分子を含む細胞もまた意図される。これらの抗体は、本明細書中に記載される療法において、かつ患者試料中のVEGFR2タンパク質を(例えば、FACS、免疫組織化学(IHC)、ELISAアッセイを介して)検出するために使用することができる。

【0169】

機能特性

特定の実施態様において、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体は、VEGFR1/FLT1又はVEGFR3/FLT4/PC/L/Chyのような、VEGFR2の相同体に対して有するよりも、VEGFR2に対して強い結合親和性を有する。通常、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体は、VEGFR2に「特異的に結合する」(すなわち、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(K_d)値を有する)が、VEGFR2に対するその結合親和性よりも少なくとも約50倍、又は少なくとも約500倍、又は少なくとも約1000倍弱い、VEGFR2ファミリーのメンバーに対する結合親和性を有する。特定の実施

態様において、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体は、 1×10^{-9} M未満のKdを有する。VEGFR2に特異的に結合する抗VEGFR2抗体は、上で定義した様々な型の抗体の何れでもあり得るが、好ましくはヒト化又はヒト抗体である。

【0170】

幾つかの実施態様において、非標的タンパク質（VEGFR1／FLT1又はVEGFR3／FLT4／PCL／Chyなど）に対する抗VEGFR2抗体の結合の程度は、ELISA、蛍光活性化細胞選別（FACS）分析、又はラジオイムノ沈降（RIA）などの当技術分野で周知の方法によって決定されるように、抗体のVEGFR2への結合の約10%未満である。特異的結合は、例えば、一般には結合活性を有さない類似の構造の分子である対照分子の結合と比較した分子の結合を測定することによって測定することができる。例えば、特異的結合は、標的、例えば標識していない過剰な量の標的に類似した対照分子との競合により決定することができる。この場合、標識された標的のプロープへの結合が、過剰の非標識の標的によって競合的に阻害される場合、特異的結合が示される。本明細書で使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに対する「特異的結合」又は「に特異的に結合する」又は「に特異的である」といった用語は、例えば、少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、又はそれ以上の標的に対するKdを有する分子によって示され得る。一実施態様では、用語「特異的な結合」は、分子が他のいかなるポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合せずに特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する結合を指す。

【0171】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体はVEGFR3にも結合する。

【0172】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、約0.1 pMから200 pM（0.2 nM）の間のKd、例えば、約0.1 pM、約0.25 pM、約0.5 pM、約0.75 pM、約1 pM、約5 pM、約10 pM、約20 pM、約30 pM、約40 pM、約50 pM、約60 pM、約70 pM、約80 pM、約90 pM、約100 pM、約110 pM、約120 pM、約130 pM、約140 pM、約150 pM、約160 pM、約170 pM、約180 pM、約190 pM、又は約190 pMを超える）（これらの値の間の任意の範囲を含む）でヒトVEGFR2に結合する。特定の実施態様において、VEGFR2に対する抗VEGFR2抗体の結合親和性は、VEGFR2に対する1121B（米国特許出願公開第2009/0306348号）又は1121N（米国特許第7,498,414号）の結合親和性よりも、約1%、約5%、約10%、約15%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%、又は約100%超高い（例えば、約105%、約110%、約120%又は約130%）。特定の実施態様において、VEGFR2に対する抗VEGFR2の結合親和性は、VEGFR2に対する1121B（米国特許出願公開第2009/0306348号）又は1121N（米国特許第7,498,414号）の結合親和性よりも、約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.25倍、約2.5倍、約2.75倍、約3倍、約3.25倍、約3.5倍、約3.75倍、約4倍、約4.25倍、約4.5倍、約4.75倍、又は約4.75倍超高い（これらの値の間の任意の範囲を含む）。

【0173】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）に結合する。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体はHUVEC管形成を阻害する。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体はHUVEC遊走を阻害する。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体はHUVEC生存を阻害する。特定の実施態

様において、抗 V E G F R 2 抗体は H U V E C 増殖を阻害する。特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体は H U V E C 発芽を阻害する。

【0174】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体はインビトロで血管新生を阻害する。特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体はインビボで血管新生を阻害する。

【0175】

特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体は V E G F - C 刺激ヒトリンパ内皮細胞 (H L E C) の増殖を阻害する。特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体は V E G F - C 刺激 V E G F R - 2 リン酸化を阻害する。特定の実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体はまた、V E G F - C 刺激 V E G F R - 3 リン酸化を阻害する。

10

【0176】

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、例えば、Kohler and Milstein、Nature、256:495(1975)に記載されているようなハイブリドーマ法を用いて調製することができ、又は組換え D N A 法 (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号) 若しくは以下の実施例において本明細書に記載の方法により作製することができる。ハイブリドーマ法においては、ハムスター、マウス、又は他の適切な宿主動物は、免疫剤に特異的に結合するであろう抗体を産生する、又は産生することができるリンパ球を誘発するために、免疫剤で典型的に免疫される。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。

【0177】

免疫剤は、典型的には、目的のタンパク質のポリペプチド若しくは融合タンパク質又はタンパク質を含む組成物を含む。一般には、ヒト起源の細胞が所望される場合には、末梢血リンパ球 (「P B L」) が使用され、又は非ヒト哺乳動物供給源が所望される場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞株と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる。Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (New York: Academic Press, 1986), pp. 59-103。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシ及びヒト起源の骨髓腫細胞である。通常、ラット又はマウス骨髓腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、融合されていない不死化細胞の増殖又は生存を阻害する 1 つ又は複数の物質を好ましくは含有する好適な培地で培養することができる。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H G P R T 又は H P R T) を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、H G P R T 欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう (H A T 培地)。

20

30

【0178】

好適な不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、H A T 培地などの培地に対して感受性である細胞である。より好適な不死化細胞株は、例えば、カリフォルニア州サンディエゴの S a l k I n s t i t u t e C e l l D i s t r i b u t i o n C e n t e r 及びバージニア州マナッサスのアメリカンタイプカルチャーコレクションから得ることができるマウス骨髓腫株である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている。Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al. M O N O C L O N A L A N T I B O D Y P R O D U C T I O N T E C H N I Q U E S A N D A P P L I C A T I O N S (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63。

40

【0179】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ (R I A) 又は酵素結合免疫吸着検定 (E L I S A) によって測定することができる。そのような技術及びアッセイは、当技術分野で周知である。モノクローナ

50

ル抗体の結合親和性は、例えば、Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析によって決定することができる。

【0180】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、限界希釈法によってクローンをサブクローニングし、標準的な方法で増殖させることができる。Goding、上記。この目的に対して好適な培地は、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地及びRPMI-1640培地を含む。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳類の腹水としてインビボで増殖させることができる。

【0181】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって培養培地又は腹水から単離又は精製することができる。

【0182】

モノクローナル抗体は、米国特許第4816567号に記載されているような組換えDNA法によっても作製することができる。本明細書で提供されるモノクローナル抗体をコードするDNAは、（例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）従来の手順を用いて容易に単離及び配列決定することができる。本明細書で提供されるハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源としての役割を果たす。ひとたび単離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外ではイムノグロブリンタンパク質を産生しない、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。DNAは、また例えばヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を相同的マウス配列に代えて置換することにより（米国特許第4816567号；Morrisonら、上記）、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって、修飾することができる。そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、本明細書で提供される抗体の定常ドメインと置換することができ、又はキメラ二価抗体を作製するために本明細書で提供される抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインと置換することができる。

【0183】

抗体は、一価抗体であり得る。一価抗体を調製するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、1つの方法は、免疫グロブリン軽鎖及び修飾された重鎖の組換え発現を含む。重鎖は、重鎖の架橋を防止するために、Fc領域の任意の点で一般的に切断される。あるいは、関連するシステイン残基を別のアミノ酸残基で置換するか、又は架橋を防止するために欠失させる。

【0184】

インビトロ法はまた、一価抗体を調製するために適している。抗体断片、特にFab断片を産生するための抗体の消化は、限定されないが、当技術分野で周知の技術を用いて達成され得る。

【0185】

ヒト及びヒト化抗体

抗体は、ヒト化抗体又はヒト抗体であり得る。非ヒト（例えばマウス）抗体のヒト化型とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列）であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を典型的に含むものである。ヒト化抗体はレシピエントのCDR由来の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）のCDR由来の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレーム

ワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含むことができる。ヒト化抗体は、好ましくは、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含むであろう。Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)。

【0186】

一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。一実施態様によれば、ヒト化は、Winter及び共同研究者（Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al. *Science*, 239: 1534-1536 (1988)）の方法に従って、げっ歯類のCDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することによって本質的に実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換された抗体（米国特許第4816567号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が、げっ歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されているヒト抗体である。

【0187】

ヒト化の代わりに、ヒト抗体を生成することができる。例えば、内在性免疫グロブリン産生の非存在下で、免疫化により、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することが可能なトランスジェニック動物（例えば、マウス）を生み出すことが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（JH）遺伝子のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖系列突然変異体マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生をもたらすであろう。例えば、Jakobovits et al. *PNAS USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al. *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); 米国特許第5545806号、第5569825号、第5591669号；第5545807号；及び国際公開第97/17852号を参照。あるいは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することができる。チャレンジすると、遺伝子再構成、アセンブリ、及び抗体レパートリーを含む、ヒトの全ての点で見られるものに非常に類似したヒト抗体産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5545807号；第5545806号；第5569825号；第5625126号；第5633425号；及び第5661016号、並びにMarks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al. *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)に記載されている。

【0188】

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 [1990]）を使用して、免疫化されていないドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーからヒト抗体及び抗体断片をインビトロで産生させることができる。この技術の一実施態様によれば、抗体Vドメイン配列は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdのメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子の何れかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として提示される。ファ

ージディスプレイは、例えば以下の実施例の項で説明するように、又は例えば、Johnson, Kevin S.及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)に総説されたように、様々なフォーマットで実施することができる。V遺伝子セグメントの幾つかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)は、免疫マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫化されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイに対する抗体をMarks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)、又はGriffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

【0189】

上で論じた通り、ヒト抗体はインビトロで活性化されたB細胞によって産生され得る（米国特許第5567610号及び同第5229275号を参照のこと）。

【0190】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当技術分野で周知の様々な技術を用いて産生することができる。Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)。Coleら及びBoernerらの技術はヒトモノクローナル抗体の調製にも利用可能である。Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBoerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)。

【0191】

多重特異性抗体

多重特異性抗体は、2つ以上の異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒト又はヒト化抗体である（例えば、二重特異性抗体は少なくとも2つの抗原に対する結合特異性を有する）。例えば、結合特異性の1つはa5-1タンパク質のためのものであり、他方は任意の他の抗原のためのものであり得る。1つの好ましい実施態様によれば、他の抗原は細胞表面タンパク質又は受容体又は受容体サブユニットである。例えば、細胞表面タンパク質は、ナチュラルキラー（NK）細胞受容体であり得る。従って、一実施態様によれば、本発明の二重特異性抗体は、VEGFR2及び例えば第2の細胞表面受容体の両方に結合することができる。

【0192】

二重特異性抗体を作製するための適切な方法は、当技術分野において周知である。例えば、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの重鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づいている。Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな分類のために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、10種の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生成し、そのうちの1つだけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。類似の手順が国際公開第93/08829号、及びTraunecker et al., *EMBO*, 10: 3655-3659 (1991)に開示されている。

【0193】

所望の結合特異性（抗体－抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインは、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合することができる。融合は、好ましくは、ヒンジの少なくとも一部、CH2及びCH3領域を含むイムノグロブリン重鎖定常ドメインとである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域（CH1）を、融合体の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合体及び必要に応じて免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを別々の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)を参照のこと。

【0194】

10

20

30

40

50

組換え細胞培養物から二重特異性抗体断片を直接作製及び単離するための種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b ' 部分に結合させた。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、次いで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成した。この方法は、抗体ホモ二量体の産生のために利用することもできる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によって記載された「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替の機構を提供している。断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーによってV L に連結されたV H を含む。従って、一方の断片のV H 及びV L ドメインは、別の断片の相補的なV L 及びV H ドメインと強制的に対を形成し、それによって2つの抗原結合部位を形成する。一本鎖F v (s F v) 二量体の使用によって二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照。

【0195】

3価以上の抗体が考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)。

【0196】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体から構成される。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びH I V 感染の治療のために提案されている。国際公開第91/00360号；国際公開第92/200373号；欧州特許第03089号。この抗体は、架橋剤を含むものを含む合成タンパク質化学における既知の方法を用いてインビトロで調製することができると考えられる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合を形成することによって構築することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチルー4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

【0197】

エフェクター機能工学

がん（例えば、結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍）又は眼球疾患（例えば、本明細書の他の箇所に記載されているもの）などの過剰な血管新生に関連する病的状態を治療する際の抗体の有効性を高めるように、エフェクター機能に関して本明細書で提供される抗体を修飾することが望ましい。例えば、例えば、システイン残基をF c 領域に導入することができ、それによってこの領域内に鎖間ジスルフィド結合を形成させることができる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力及び／又は補体媒介性細胞死滅並びに抗体依存性細胞傷害（A D C C）を有することができる。Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992)及びShapes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)を参照。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体は、Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。あるいは、二重のF c 領域を有し、それによって亢進された補体溶解及びA D C C 能を有することができるように抗体を操作することができる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design: 219-230 (1989)を参照。

【0198】

F c 領域の配列の変異又は改変は、F c R 結合（例えば、F c γ R、F c R n）を改善するために行うことができる。一実施態様によれば、本発明の抗体は、天然型I g G 又は親抗体と比較して、A D C C、C D C、及び改善されたF c R n 結合からなる群から選択される少なくとも1つの変化したエフェクター機能を有する。幾つかの有用な特異的変異の例は、例えば、Shields, RL et al. (2001) JBC 276(6)6591-6604; Presta, L.G., (20

10

20

30

40

50

02) Biochemical Society Transactions 30(4):487-490 ; 及び国際公開第 0 0 / 4 2 0 7 2 号に記載される。

【0199】

一実施態様によれば、F c 受容体変異は、F c 領域の 3 8、2 3 9、2 4 6、2 4 8、2 4 9、2 5 2、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 8、2 6 5、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 2、2 7 6、2 7 8、2 8 0、2 8 3、2 8 5、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 6、2 9 8、3 0 1、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 0 9、3 1 2、3 1 5、3 2 0、3 2 2、3 2 4、3 2 6、3 2 7、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 2、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 7、3 3 8、3 4 0、3 6 0、3 7 3、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 8、3 8 9、3 9 8、4 1 4、4 1 6、4 1 9、4 3 0、4 3 4、4 3 5、4 3 7、4 3 8 又は 4 3 9 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置での置換であり、ここで F c 領域の残基の番号付けは E U 番号付けシステムに従う。幾つかの実施態様において、F c 受容体変異は D 2 6 5 A 置換である。幾つかの実施態様において、F c 受容体変異は N 2 9 7 A 置換である。更なる適切な変異は、米国特許第 7, 3 3 2, 5 8 1 号に記載されている。

10

【0200】

特定の実施態様において、本明細書において提供される抗 V E G F R 2 抗体は、アフコシル化される (afucosylated) (すなわち、「アフコシル化抗 V E G F R 2 抗体」又は「非フコシル化抗 V E G F R 2 抗体」)。「アフコシル化抗体」又は「非フコシル化抗体」とは、A s n 2 9 7 での F c 領域のグリコシル化パターンが改変され、フコース残基の量が低下している I g G 1 又は I g G 3 アイソタイプの抗体を指す。ヒト I g G 1 又は I g G 3 のグリコシル化は、コアフコシル化された二分岐複合オリゴ糖のグリコシル化が最大 2 つの G a l 残基で終結している場合、A s n 2 9 7 で生じる。これらの構造は、末端 G a l 残基の量に応じて、G O、G 1 (a 1, 6 又は a 1, 3)、又は G 2 グリカン残基と命名される (Raju, T.S., Bioprocess Int. 1(2003) 44-53)。抗体の F c 部分の C H O 型グリコシル化は、例えば、Routier, F.H., Glycoconjugate J. 14(1997) 201-207 により記載されている。非糖修飾された C H O 宿主細胞で組換えにより発現している抗体は、通常、少なくとも 8 5 % の量で、A s n 2 9 7 でフコシル化されている。特定の実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、低下したレベルのフコース残基を有する。特定の実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、そのグリコシル化パターンにおいてフコースを有しない。抗体における典型的なグリコシル化残基の位置は、E U 番号付けシステムに従って位置 2 9 7 のアスパラギン (「A s n 2 9 7」) であることが一般に知られている。

20

30

【0201】

従って、特定の実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、そのグリコシル化パターンにおいて低下したレベルのフコース残基を有するか又はフコースを有しないように、改変されるか又はさもなければ変化した F c 配列を含む。特定の実施態様において、本明細書で提供される抗 V E G F R 2 抗体は、E U 番号付けシステムに従って位置 2 9 7 に改変を有する F c 配列を含む。

【0202】

特定の実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、低又はアフコシル化グリカンを産生することができる宿主細胞によって産生される。アフコシル化抗体を産生することができる安定な哺乳動物宿主細胞株が樹立されており、例えば、Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng. 87, 614-622; Mori et al. (2004) Biotechnol Bioeng. 88, 901-908; Kanda et al (2006) Biotechnol Bioeng. 94, 680-688; Kanda (2007) J Biotechnol. 130, 300-310; Imai-Nishiya (2007) BMC Biotechnol 7, 84; Yamane-Ohnuki and Satoh (2009) mAbs 1, 230-236 に記載される。特定の実施態様において、本明細書において提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、b (1, 4) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I 活性を発現するように操作された糖修飾宿主細胞において発現される。特定の実施態様において、本明細書

40

50

において提供されるアフコシル化抗 E G F R 抗体は、1, 6-フコシルトランスフェラーゼ活性が減少又は消失した糖修飾宿主細胞において発現される。糖修飾された宿主細胞の生産に関する詳細については、例えば、米国特許第 6 9 4 6 2 9 2 号を参照されたい。抗体のフコシル化の量は、例えば、発酵条件（例えば発酵時間）によって又はフコシル化した量が異なる少なくとも二つの抗体の組み合わせによっての何れかにより、予め決定することができる。このようなアフコシル化抗体及びそれぞれの糖操作方法は、国際公開第 2 0 0 5 / 0 4 4 8 5 9 号、国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 5 5 4 0 号、国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 1 8 7 5 号、Umana et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180、国際公開第 9 9 / 1 5 4 3 4 2 号、国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 8 5 7 2 号、国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 6 2 6 0 号、国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 4 7 0 0 号、国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 1 7 3 5 号、国際公開第 2 0 0 5 / 0 2 7 9 6 6 号、国際公開第 9 7 / 0 2 8 2 6 7、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 3 4 7 0 9 号、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 5 4 0 4 8 号、米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 5 2 8 9 4 号、国際公開第 2 0 0 3 / 0 3 5 8 3 5 号、国際公開第 2 0 0 0 / 0 6 1 7 3 9 号に記載されている。これらの糖操作された抗体は、増加した A D C C を有する。本発明によるアフコシル化抗体を産生する他の糖鎖工学方法は、例えば、Niwa, R. et al., J. Immunol. Methods 306 (2005) 151-160; Shinkawa, T., et al., J. Biol. Chem, 278 (2003) 3466-3473; 国際公開第 0 3 / 0 5 5 9 9 3 号又は米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 4 9 7 2 2 号に記載される。

【0203】

特定の実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、インビトロ技術を用いて産生される。特定の実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、化学的に合成される。（例えば、単球走化性タンパク質 3 (M C P - 3) の非フコシル化形態の化学合成を記載している Yamamoto et al. (2008) JACS 130, 501-510 を参照されたい）。特定の実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、I g G 上のフコース残基を除去するためにフコシダーゼを使用することによって産生される。（例えば、Yazawa et al. (1986) Biochem Biophys Res Commun. 136, 563-569 を参照）。

【0204】

特定の実施態様において、本明細書で提供されるアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体は、当業者に周知のアッセイによって示されるように、フコシル化抗 V E G F R 2 抗体と比較して、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) エフェクター機能を改善している。例えば、Suzuki et al. (2007) Clin Cancer Res 13, 1875 を参照。例えば、特定の実施態様において、本明細書に記載のアフコシル化抗 V E G F R 2 抗体の A D C C エフェクター機能活性は、フコシル化抗 V E G F R 2 抗体の A D C C エフェクター機能活性の少なくとも約 1 4 0 %、少なくとも約 1 5 0 %、少なくとも約 1 6 0 %、少なくとも約 1 7 0 %、少なくとも約 1 8 0 %、少なくとも約 1 9 0 %、少なくとも約 1 9 0 %、少なくとも約 2 0 0 %、少なくとも約 2 1 0 %、少なくとも約 2 2 0 %、少なくとも約 2 3 0 %、少なくとも約 2 4 0 %、少なくとも約 2 5 0 %、少なくとも約 2 6 0 %、少なくとも約 2 7 0 %、少なくとも約 2 8 0 %、少なくとも約 2 9 0 %、又は少なくとも約 3 0 0 % であり、これらの値の間の任意の範囲を含む。特定の実施態様において、本明細書に記載の抗 V E G F R 2 抗体の A D C C エフェクター機能活性は、フコシル化抗 V E G F R 2 抗体の A D C C エフェクター機能活性の約 3 0 0 % 超であり、フコシル化抗 V E G F R 2 抗体の A D C C エフェクター機能活性の少なくとも約 3 5 0 %、少なくとも約 3 6 0 %、少なくとも約 3 7 0 %、少なくとも約 3 8 0 %、少なくとも約 3 9 0 %、少なくとも約 4 0 0 %、少なくとも約 4 1 0 %、少なくとも約 4 2 0 %、少なくとも約 4 3 0 %、少なくとも約 4 4 0 %、少なくとも約 4 5 0 %、少なくとも約 4 6 0 %、少なくとも約 4 7 0 %、少なくとも約 4 8 0 %、少なくとも約 4 9 0 %、少なくとも約 5 0 0 %、少なくとも約 5 1 0 %、少なくとも約 5 2 0 %、少なくとも約 5 3 0 %、少なくとも約 5 4 0 %、少なくとも約 5 5 0 %、少なくとも約 5 6 0 %、少なくとも約 5 7 0 %、少なくとも約 5 8 0 %、少なくとも約 5 9 0 %、又は少なくとも約 6 0 0 % を含み、これらの値の間の任意の範囲を含む。

【0205】

イムノコンジュゲート

本発明はまた、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、又はその断片）などの細胞傷害性剤、あるいは放射性同位体（すなわち、放射性コンジュゲート）にコンジュゲートした抗体を含むイムノコンジュゲートに関する。

【0206】

使用可能な酵素的に活性な毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖（シュドモナス・アエルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン（*moderatin*）A鎖、アルファーサルシン（*sarcin*）、アレウライツ・フォルディイ（*Aleurites fordii*）プロテイン、ジアンチンタンパク質、フィトラッカ・アメリカナ（*Phytolacca americana*）プロテイン（PAPI、PAPII及びPAP-S）、モモルディカ・キャランティア（*momordica charantia*）阻害剤、クルシン（*curcin*）、クロチン、サパオナリア（*saponaaria*）オフィシナリス阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（*mitogellin*）、レストリクトシン（*restrictocin*）、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテシン（*tricothecenes*）が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例として、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re が挙げられる。このようなイムノコンジュゲートの生成に有用な例示的な化学療法剤としては、本明細書の他の箇所に記載されているものが挙げられる。

【0207】

抗体及び細胞傷害性剤の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートHCL等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン等）、ビスジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン2, 6-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等）を用いて作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。国際公開第94/11026号を参照。

【0208】

別の実施態様では、腫瘍プレターゲティングに利用するために、抗体を「受容体」（例えば、ストレプトアビジン）に結合させることができ、ここでは抗体-受容体コンジュゲートを患者に投与し、続いてクリアリング剤を用いて循環から未結合コンジュゲートを除去し、次いで細胞傷害性剤（例えば放射性ヌクレオチド）にコンジュゲートした「リガンド」（例えばアビジン）を投与する。

【0209】

共有結合性修飾

抗VEGFR2抗体及びその断片の共有結合性修飾は、本発明の範囲内に含まれる。共有結合性修飾の1つのタイプは、ポリペプチドの標的化アミノ酸残基を、ポリペプチドの選択された側鎖又はN-又はC-末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることを含む。二官能性薬剤による誘導体化は、例えば、抗体を精製するための方法における使用のためにポリペプチドを水不溶性支持マトリックス又は表面に架橋するのに有用であり、逆もまた同様である。一般に用いられる架橋剤は、例えば、1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシン

イミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス（スクシンイミジル-プロピオナート）のようなジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンのような二官能性マレイミド、及びメチル-3-[（p-アジドフェニル）-ジチオ]プロピオイミダートなどの薬剤が挙げられる。

【0210】

他の修飾は、グルタミル残基及びアスパラギン残基の、それぞれ対応するグルタミル残基及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、並びに任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。 10

【0211】

他の修飾には、メイタンシン及びメイタンシノイド、カリケアマイシン並びに他の細胞傷害性剤のようなアンタゴニストへの毒素のコンジュゲーションが含まれる。

【0212】

ポリペプチドの共有結合性修飾の別のタイプは、ポリペプチドを種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへ、米国特許第4640835号；第4496689号；第4301144号；第4670417号；第4791192号又は第4179337号に記載された方法で結合させることを含む。 20

【0213】

キメラ分子

本発明の抗VEGFR2抗体（又はその断片）は、別の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列（例えば、イムノアドヘシン又はペプチボディ）に融合されたポリペプチドを含むキメラ分子を形成する方法において有利であれば修飾することもできる。

【0214】

一実施態様において、このようなキメラ分子は、例えば、ヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質のタンパク質導入ドメインを用いて、ポリペプチドと、そのポリペプチドを様々な組織へ、より具体的には脳血液関門を越えて送達するための標的とするタンパク質導入ドメインとの融合を含む (Schwarze et al., 1999, *Science* 285: 1569-72)。 30

【0215】

別の実施態様において、そのようなキメラ分子は、ポリペプチドと、抗タグ抗体が選択的に結合することができるエピトープを提供するタグポリペプチドとの融合を含む。エピトープタグは、一般に、ポリペプチドのアミノ又はカルボキシル末端に配置される。そのようなエピトープタグが付加された形態のポリペプチドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する別のタイプの親和性マトリックスを用いたアフィニティー精製によってポリペプチドを容易に精製することを可能にする。様々なタグポリペプチド及びそれらのそれぞれの抗体は、当技術分野で周知である。例としては、ポリHis（ポリHis）又はポリヒスチングリシン（ポリHis-gly）タグ；インフルエンザHAタグポリペプチド及びその抗体12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]；並びに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D(gD)タグ及びその抗体 [Pabor sky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)] が挙げられる。他のタグポリペプチドは、Fla g-ペプチド [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]； α -チューブリンエピトープペプチド [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth et al., *Proc.* 40 50

Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)] を含む。

【0216】

代替的な実施態様において、キメラ分子は、ポリペプチドと免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（例えば、「イムノアドヘシン」）について、このような融合は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。本発明のIg融合物は、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域の代わりに、およそ又は僅かにヒトの残基94-243、残基33-53又は残基33-52を含むポリペプチドを含む。特に好ましい実施態様において、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子の、ヒンジ、CH2及びCH3の領域、又はヒンジ、CH1、CH2、CH3の領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日に発行された米国特許第5428130号も参照のこと。

10

【0217】

免疫リポソーム

本明細書中に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、Epstein et al., PNAS USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., PNAS USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4485045号及び同第4544545号に記載されるような当技術分野で周知の方法によって調製される。循環時間が増したりリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

【0218】

特に有用なりポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームは、所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、Martinet al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームにコンジュゲートすることができる。抗腫瘍剤、増殖阻害剤、又は化学療法剤（例えば、ドキソルビシン）も任意でリポソーム内に含まれる。Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989)を参照。

20

【0219】

抗血管内皮増殖因子受容体2（VEGFR2）抗体を用いた治療

本発明の別の態様では、血管新生を阻害するために抗VEGFR2抗体が使用される。血管内皮のVEGFR刺激は、血管新生疾患及び腫瘍の血管新生に関連する。従って、本明細書で提供されるヒト抗VEGFR2抗体は、血管新生腫瘍又は新生物又は血管新生疾患を有する被験体を治療するために有効である。そのような腫瘍及び新生物には、例えば、芽細胞腫、癌腫又は肉腫などの悪性腫瘍及び新生物、並びに高度に血管性の腫瘍及び新生物が含まれる。本発明によって提供される方法によって治療され得るがんには、例えば、脳のがん、尿生殖器のがん、リンパ系のがん、胃がん、腎臓がん（腎がん）、結腸がん、喉頭がん及び肺がん及び骨のがんが含まれる。非限定的な例は、類表皮腫瘍、扁平上皮腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、腹膜がん、結腸直腸腫瘍、結腸直腸がん、直腸腫瘍、直腸がん、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、子宮頸部の持続性、再発性又は転移性の癌腫、肺腺がん及び小細胞肺がん及び非小細胞肺がんを含む肺腫瘍、膵臓腫瘍、甲状腺腫瘍、卵管腫瘍、卵巣腫瘍（例えば、再発上皮卵巣癌）及び肝腫瘍を更に含む。この方法は、扁平上皮癌、基底細胞癌、及び皮膚癌であって悪性ケラチノサイト、例えばヒト悪性ケラチノサイトの増殖を抑制することによって治療することができるものを含む、血管形成された皮膚がんの治療にも使用される。治療できる他のがんには、カポジ肉腫、CNS新生物（神経芽細胞腫、毛細血管芽細胞腫、髄膜腫及び脳転移）、メラノーマ、胃腸癌及び腎細胞癌、及び肉腫、横紋筋肉腫、多形神経膠芽腫を含む神経膠芽腫、及び平滑筋肉腫が挙げられる。

30

40

【0220】

本発明の更なる態様は、例えば、アテローム性動脈硬化症、リウマチ性関節炎（RA）、新血管新生緑内障、増殖性糖尿病性網膜症を含む増殖性網膜症、血管腫、血管線維腫、及び乾癬などの血管新生及び／又は炎症を含む、過剰な血管新生を特徴とする病的状態を

50

治療又は予防する方法である。非腫瘍性血管新生疾患の他の非限定的な例は、未熟児網膜症（後天性線維化症）、角膜移植拒絶、インスリン依存性真性糖尿病、多発性硬化症、重症筋無力症、クローン病、自己免疫性腎炎、原発性胆汁性肝硬変、急性膵炎、同種移植片拒絶反応、アレルギー性炎症、接触性皮膚炎及び遅延過敏反応、炎症性腸疾患、敗血症性ショック、骨粗鬆症、変形性関節症、ニューロンの炎症によって誘導される認知欠損、オスラー-ウェーバー症候群、再狭窄、並びにサイトメガロウイルス感染を含む真菌感染、寄生虫感染及びウイルス感染が挙げられる。特定の実施態様において、過剰な血管新生を特徴とする病的状態は眼疾患である。特定の実施態様において、眼疾患は、網膜症、加齢性黄斑変性症（例えば、湿性AMD）、糖尿病性黄斑浮腫、ルベオ-シス、乾癬に起因するブドウ膜炎、炎症性腎疾患、溶血性尿毒症性症候群、糖尿病性腎症（例えば、増殖性糖尿病性網膜症）、炎症性腸疾患、慢性炎症、慢性網膜剥離、慢性ブドウ膜炎、慢性硝子体炎、角膜移植拒絶、角膜血管新生、角膜移植血管新生、近視、眼の新生血管疾患、パジェット病、類天疱瘡、多発動脈炎、ポストレーザー放射状角膜切開、網膜血管新生、ソグレン症候群、潰瘍性大腸炎、移植片拒絶反応、肺炎症、ネフローゼ症候群、浮腫、及び新生血管性緑内障からなる群から選択される。特定の実施態様において、本発明は、例えば上に記載される眼疾患の治療のための医薬の製造における使用のための抗VEGFR2抗体（又はその断片）を提供する。特定の実施態様において、本発明は、被験体において眼疾患（上記のものなど）を治療するために使用のための抗VEGFR2抗体（又はその断片）を提供する。特定の実施態様において、治療される被験体は哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど）である。特定の実施態様において、被験体はヒトである。特定の実施態様において、被験体は、臨床患者、臨床試験ボランティア、実験動物などである。特定の実施態様において、被験体は、眼疾患（上記のものなど）を有するか、又は有するリスクがあると疑われている。特定の実施態様において、被験体は、眼疾患（上記のものなど）と診断されている。

10

20

【0221】

本明細書で提供される抗VEGFR2抗体（又はその断片）及び／又は組成物は、例えば、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）又は過剰な血管新生を特徴とする病的状態（上記のものなど）を含む異常なVEGFR2活性に関与する疾患及び障害を治療するために被験体（例えば、ヒトなどの哺乳動物）に投与することができる。特定の実施態様において、本発明は、被験体における、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）又は過剰な血管新生を特徴とする病的状態（上記のものなど）の治療のための医薬の製造における使用のための抗VEGFR2抗体（又はその断片）を提供する。特定の実施態様において、本発明は、被験体において、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）又は過剰な血管新生を特徴とする病的状態（上記のものなど）を治療するために使用のための抗VEGFR2抗体（又はその断片）を提供する。特定の実施態様において、治療される被験体は哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど）である。特定の実施態様において、被験体はヒトである。特定の実施態様において、被験体は、臨床患者、臨床試験ボランティア、実験動物などである。特定の実施態様において、被験体は、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）又は過剰な血管新生を特徴とする病的状態を有するか、又は有するリスクがあると疑われている。特定の実施態様において、被験体は、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）又は過剰な血管新生を特徴とする病的状態（上記のものなど）と診断されている。

30

40

【0222】

がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）又は過剰な血管新生を特徴とする病的状態（上記のものなど）のための多くの診断方法及びこれらの疾患の臨床的描写は当技術分野で周知である。そのような方法としては、限定されないが、例えば、免疫組織化学、PCR、蛍光インサイツハイブリダイゼーシ

50

ョン (F I S H) が挙げられる。異常な V E G F R 2 活性又は発現の診断方法に関する更なる詳細は、例えば、Gupta et al. (2009) Mod Pathol. 22(1): 128-133; Lopez-Rios et al. (2013) J Clin Pathol. 66(5): 381-385; Ellison et al. (2013) J Clin Pathol 66(2): 79-89; 及び Guha et al. (2013) PLoS ONE 8(6): e67782 に記載される。当業者は、個体が本明細書に記載の抗 V E G F R 2 抗体による治療のための候補である場合、例えば、臨床試験、身体検査及び医学／家族歴の使用によって容易に決定することができる。

【0223】

投与は、例えば、静脈内、筋肉内、又は皮下などの任意の適切な経路によって行うことができる。幾つかの実施態様において、異常な V E G F R 2 活性に關与する疾患又は障害を治療するために、本明細書で提供される抗 V E G F R 2 抗体（又はその断片）及び／又は組成物は、第 2、第 3 又は第 4 の薬剤（例えば、抗悪性腫瘍薬、増殖阻害剤、細胞傷害性剤、又は化学療法剤を含む）と併用して投与される。そのような薬剤には、例えば、ドセタキセル、ゲフィチニブ、F O L F I R I（イリノテカン、5-フルオロウラシル及びロイコボリン）、イリノテカン、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ペバシズマブ（抗 V E G F 抗体）、F O L F O X-4（注入フルオロウラシル、ロイコボリン、及びオキサリプラチン、アファチニブ、ゲムシタビン、カペシタビン、ペメトレキセド、チバンチニブ、エベロリムス、C p G-ODN、ラパマイシン、レナリドマイド、ベムラフェニブ、エンドスタチン、ラパチニブ、P X-866、I m p r i m e P G G 及びエルロチニブを含む。幾つかの実施態様において、抗 V E G F R 2 抗体（又はその断片）は、付加的薬剤にコンジュゲートされる。

【0224】

治療すべき適応症及び当該分野の医師が熟知している用量に関連する因子に依存して、本明細書で提供される抗体は、毒性及び副作用を最小限に抑えながらその適応症の治療に有効な用量で投与されるであろう。がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）及び過剰な血管新生を特徴とする病的状態（本明細書の他の箇所に記載されるようなもの）の治療のために、典型的な用量は、例えば、0.001 から 1000 μ g とすることができるが；しかしながら、この例示的な範囲より下又は上の用量が本発明の範囲内である。1日の用量は、約 0.1 μ g/kg から約 100 mg/kg 全体重（例えば、約 5 μ g/kg、約 10 μ g/kg、約 100 μ g/kg、約 500 μ g/kg、約 1 mg/kg、約 50 mg/kg、又は上記の値の何れか 2 つによって規定される範囲）、好ましくは約 0.3 μ g/kg から約 10 mg/kg 全体重（例えば約 0.5 μ g/kg、約 1 μ g/kg、約 50 μ g/kg、約 150 μ g/kg、約 300 μ g/kg、約 750 μ g/kg、約 1.5 mg/kg、約 5 mg/kg、又は上記の値の何れか 2 つによって定義される範囲）、より好ましくは約 1 μ g/kg から 1 mg/kg 全体重（例えば、約 3 μ g/kg、約 15 μ g/kg、約 75 μ g/kg、約 300 μ g/kg、約 900 μ g/kg、又は上記の値の任意の 2 つによって規定される範囲）、更により好ましくは約 0.5 から 10 mg/kg 体重/日（例えば、約 2 mg/kg、約 4 mg/kg、約 7 mg/kg、約 9 mg/kg、又は上記の値の任意の 2 つの値によって規定される範囲）とすることができる。上記のように、治療的又は予防的有効性は、治療された患者の定期的な評価によってモニターすることができる。数日又はそれ以上にわたる反復投与では、状態に応じて、治療は疾患症状の所望の抑制が生じるまで反復される。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であり得、本発明の範囲内である。所望の投与量は、組成物の単回ボーラス投与、組成物の複数回のボーラス投与、又は組成物の連続注入投与によって送達することができる。

【0225】

抗 V E G F R 2 抗体を含む医薬組成物は、1日に1、2、3又は4回投与することができる。組成物はまた、毎日よりも少ない頻度で、例えば、週に6回、週に5回、週に4回、週に3回、週に2回、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、6ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回投与することができる。組成物はまた、ある期間にわたって使用するために組成物を徐々に放出し、かつ組成物の投与頻度を1ヶ月に1

回、2から6ヶ月に1回、毎年1回、又は実に1回の投与など低くすることができるインプラントのような徐放性製剤で投与することができる。持続放出デバイス（ペレット、ナノ粒子、微粒子、ナノスフェア、マイクロスフェアなど）は、注射によって投与することができる。

【0226】

抗体（又はその抗原結合断片）は、1日1回の投与で投与してもよく、又は1日総用量を1日2回、3回又は4回の分割投与で投与してもよい。組成物はまた、毎日よりも少ない頻度で、例えば、週に6回、週に5回、週に4回、週に3回、週に2回、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、6ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回投与することができる。組成物はまた、ある期間にわたって使用するために組成物を徐々に放出し、かつ組成物の投与頻度を1ヶ月に1回、2から6ヶ月に1回、毎年1回、又は実に1回の投与など低くすることができるインプラントのような徐放性製剤で投与することができる。持続放出デバイス（ペレット、ナノ粒子、微粒子、ナノスフェア、マイクロスフェアなど）は、注射によって投与することができ、又は様々な場所に外科的に埋め込むことができる。

【0227】

がん治療は、限定するものではないが、例えば、腫瘍再発、腫瘍重量ないしサイズの収縮、進行時間、生存期間、進行がない生存、全体の応答速度、応答の継続期間、生活の質、タンパク質の発現及び／又は活性などで評価されてもよい。例えば放射線画像法による応答の測定を含む、治療の有効性を判定するためのアプローチを用いることができる。

【0228】

幾つかの実施態様において、治療の有効性は、式 $100 - (T/C \times 100)$ を用いて計算した腫瘍増殖阻害率（%TGI）として測定され、ここで、Tは治療された腫瘍の平均相対腫瘍体積であり、Cは非治療腫瘍の腫瘍体積である。特定の実施態様において、%TGIは、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、又は95%超であり、これらの値の間の任意の範囲を含む。特定の実施態様において、抗VEGFR2の%TGIは、1121B（米国特許出願公開第2009/0306348号）又は1121N（米国特許第7498414号）の%TGIと同じか又はそれ以上であり、例えば1121B（米国特許出願公開第2009/0306348号）又は1121N（米国特許第7498414号）の%TGIの約1.1倍、約0.7倍、約0.9倍、約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍、約1.4倍、約1.5倍、約1.6倍、約1.7倍、約1.8倍、約1.9倍、約2倍、約2.1倍、約2.2倍、約2.3倍、約2.4倍、約2.5倍、約2.6倍、約2.7倍であるか、又はそれより約2.7倍以上大きい。

【0229】

薬学的製剤

抗VEGFR2抗体（又はその断片）は、それらが投与に適しているように、適切な担体又は賦形剤と共に製剤化することができる。抗体の適切な製剤は、所望の純度を有する抗体（又はその断片）を任意の薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で得ることができる。許容される担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノ

ース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。例示的な抗体製剤は、参照により本明細書に援用される国際公開第97/56418号に記載されている。皮下投与に適した凍結乾燥製剤は、国際公開第97/04801号に記載されている。そのような凍結乾燥製剤は、適切な希釈剤を用いて高タンパク質濃度まで再構成することができ、再構成製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与することができる。

【0230】

本明細書の製剤は、治療される特定の徴候に必要な2つ以上の活性化合物、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものも含み得る。例えば、抗腫瘍剤、増殖阻害剤、細胞傷害性剤、又は化学療法剤を更に提供することが望ましい場合がある。そのような分子は、意図される目的のために有効な量で組み合わせられて適切に存在する。そのような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、疾患若しくは障害又は治療の種類、及び上記の他の要因に依存する。これらは一般には本明細書に記載されるように同じ投薬量及び投与経路で又はこれまでに用いられている投薬量のおよそ1から99%で使用される。活性成分もまた、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれコロイド薬剤送達系（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入され得る。このような技術は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の好適な例は、アンタゴニストを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形をしている。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3773919号）、L-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えばLUPRON DEPOSITTM（乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア）、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

【0231】

リポフェクチン又はリボソームを用いて、本発明のポリペプチド及び抗体（又はその断片）又は組成物を細胞に送達することができる。抗体断片が使用される場合には、標的タンパク質の結合ドメインに結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、ペプチド分子は、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するように設計できる。そのようなペプチドは、化学的に合成することができ、及び／又は組換えDNA技術によって産生することができる。例えば、Marasco et al., PNAS USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照。

【0232】

活性成分もまた、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれコロイド薬剤送達系（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに封入され得る。このような技術は、上記のRemington's PHARMACEUTICAL SCIENCESにおいて開示される。

【0233】

徐放性製剤を調製することができる。徐放性製剤の好適な例は、抗体（又はその断片）を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは成形品、

10

20

30

40

50

例えばフィルム又はマイクロカプセルの形をしている。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２-ヒドロキシエチルメタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第３７７３９１９号）、Ｌ-グルタミン酸及びγ-エチル-L-グルタメートの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸共重合体、例えばLUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア）、及びポリ-D-（-）-３-ヒドロキシ酪酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、１００日以上にわたって分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、より短い期間、タンパク質を放出する。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは３７℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こり得る免疫原性の変化をもたらす。関与する機序に応じて、安定化のために合理的な戦略を講じることができる。例えば、凝集の機序が、チオージスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結、水分含有率の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマー基質組成物の開発により、安定化させることができる。

【０２３４】

特定の実施態様において、製剤は、本明細書に記載の抗VEGFR2抗体を、約０．５mg/ml超、約１mg/ml超（例えば約１．１mg/ml、約１．２mg/ml、約１．３mg/ml、約１．４mg/ml、約１．５mg/ml、約１．６mg/ml、約１．７mg/ml、約１．８mg/ml、約１．９mg/ml、又は約１．９mg/ml超）、約２mg/ml超（例えば約２．１mg/ml、約２．２mg/ml、約２．３mg/ml、約２．４mg/ml、約２．５mg/ml、約２．６mg/ml、約２．７mg/ml、約２．８mg/ml、約２．９mg/ml、又は約２．９mg/ml超）、約３mg/ml超、約４mg/ml超、約５mg/ml超、約６mg/ml超、約７mg/ml超、約８mg/ml超、約９mg/ml超、約１０mg/ml超、約１１mg/ml超、約１２mg/ml超、約１３mg/ml超、約１４mg/ml超、約１５mg/ml超（これらの値の間の任意の範囲を含む）の濃度で含む。

【０２３５】

特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、クエン酸塩、ヒスチジン、酢酸塩、リン酸塩、スクロース、NaCl、コハク酸塩、グリシン、ポリソルベート８０（Tween 80）、又はこれらの任意の組み合わせを含む緩衝液中に処方される。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、約１０mMのクエン酸塩、約１０mMの酢酸塩、又は約１０mMのリン酸塩を含む緩衝液中に処方される。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、約５０mMから約１００mMのNaClを含む緩衝液中に処方される。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、約０．５％～約３％のグリシンを含む緩衝液中に処方される。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、約０．００５％～約０．０２％のポリソルベート８０（Tween 80）を含む緩衝液中に処方される。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、約５．５～６．５のpHを有する緩衝液中に処方される。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、１０mMのクエン酸塩、７５mMのNaCl、２％のグリシン、２％のスクロース及び０．０２％のポリソルベート８０を含む緩衝液中に処方され、ここでその製剤はpH＝６．０である。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、１０mMの酢酸塩、７５mMのNaCl、２％のグリシン、２％のスクロース及び０．０２％のポリソルベート８０を含む緩衝液中に処方され、ここでその製剤はpH＝６．０である。特定の実施態様において、抗VEGFR2抗体は、１０mMのリン酸、７５mMのNaCl、２％のグリシン、２％のスクロース及び０．０２％のポリソルベート８０を含む緩衝液中に処方され、ここでその製剤はpH＝６．０である。

【０２３６】

特定の実施態様において、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体を含む製剤は、約０．５週間、１．０週間、１．５週間、２．０週間、２．５週間、３．５週間、４．０週

間、4.5週間、又は5.0週間（これらの値の間の任意の範囲を含む）、 -80°C で安定である。特定の実施態様において、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体を含む製剤（10mMのクエン酸塩、75mMのNaCl、2%のグリシン、2%のスクロース及び0.02%のポリソルベート80を含み、その製剤が $\text{pH}=6.0$ である製剤など）は、約0.5週間、1.0週間、1.5週間、2.0週間、2.5週間、3.5週間、4.0週間、4.5週間、又は5.0週間（これらの値の間の任意の範囲を含む）、加速条件下で（約 40°C での保存など）安定である。

【0237】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成される。

【0238】

抗上皮増殖因子受容体抗体を用いた診断及び画像化の方法

VEGFR2ポリペプチドに特異的に結合する、標識抗VEGFR2抗体、その断片、及びその誘導体及び類似体は、VEGFR2の発現、異常な発現及び／又は活性に関連する疾患及び／又は障害を検出、診断又はモニターする診断目的のために使用することができる。例えば、本明細書において提供される抗VEGFR2抗体（又はその断片）は、インサイツ、インビボ、エクスビボ、及びインビトロ診断アッセイ又は画像化アッセイにおいて使用され得る。（a）本発明の1つ以上の抗体を用いて個体の細胞（例えば、組織）又は体液中のポリペプチドの発現をアッセイすること及び（b）遺伝子発現のレベルを標準的な遺伝子発現レベルと比較することを含む、VEGFR2ポリペプチドの発現を検出するための方法であって、それによって、標準的な発現レベルと比較してアッセイされた遺伝子発現レベルの増加又は減少が、異常な発現を示す、方法。

【0239】

本明細書で提供される更なる実施態様は、動物（例えば、ヒトなどの哺乳動物）におけるVEGFR2の発現又は異常発現に関連する疾患又は障害を診断する方法を含む。本方法は、哺乳動物においてVEGFR2分子を検出することを含む。特定の実施態様において、診断は、（a）有効量の標識抗VEGFR2抗体（又はその断片）を哺乳動物に投与すること、（b）標識抗VEGFR2抗体（又はその断片）が、VEGFR2分子が発現される被験体の部位に優先的に集中すること（未結合の標識分子がバックグラウンドレベルまでクリアされること）を可能にするために、投与後の時間間隔を待機する；（c）バックグラウンドレベルを決定すること；（d）バックグラウンドレベルを上回る標識分子の検出が、被験体がEGFRの発現又は異常発現に関連する特定の疾患又は障害を有することを示すように、被験体における標識分子を検出することを含む。バックグラウンドレベルは、検出された標識分子の量を、特定の系について以前に決定された標準値と比較することを含む様々な方法によって決定することができる。

【0240】

本明細書で提供される抗VEGFR2抗体（又はその断片）は、当業者に周知の古典的な免疫組織学的方法を用いて、生物学的試料中のタンパク質レベルをアッセイするために使用することができる（例えば、Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)を参照）。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体ベースの方法には、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）及びラジオイムノアッセイ（RIA）のようなイムノアッセイが含まれる。適切な抗体アッセイ標識は、当技術分野で周知であり、酵素標識、例えば、グルコースオキシダーゼ；放射性同位体、例えば、ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、及びテクネチウム（ $^{99\text{Tc}}$ 、 $^{99\text{mTc}}$ ）、タリウム（ ^{201}Tl ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru ；ルミノール

10

20

30

40

50

；及びフルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、及びビオチンが挙げられる。

【0241】

当技術分野で周知の技術は、本明細書で提供される標識抗体（又はその断片）に適用され得る。そのような技術には、限定されないが、二官能性コンジュゲート剤の使用が含まれる（例えば、米国特許第5756065号；5714631号；5696239号；5652361号；5505931号；5489425号；5435990号；5428139号；5342604号；5274119号；4994560号；及び5808003号を参照）。あるいは、又はそれに加えて、例えば、EGFRをコードする核酸又はその相補物に対応する核酸ベースのプロブを用いた蛍光インサイツハイブリダイゼーションを介して、細胞内のVEGFR2ポリペプチドをコードする核酸又はmRNAのレベルを測定することができる；（FISH；1998年10月公開の国際公開第98/45479号を参照）、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又はリアルタイム定量PCR（RT-PCR）などのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術。例えば抗体に基づくアッセイを用いて、血清などの生物学的液体中のshed抗原を測定することによってVEGFR2過剰発現を研究することもできる（例えば、1990年6月12日に発行された米国特許第4933294号；1991年4月18日に公開された国際公開第91/05264号；1995年3月28日に発行された米国特許第5401638号；及びSias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)も参照）。上記のアッセイとは別に、様々なインビボ及びエクスビボアッセイが当業者に利用可能である。例えば、哺乳動物の体内の細胞を、検出可能な標識、例えば、放射性同位元素で任意に標識された抗体に曝露することができ、それに対する抗体の結合は、例えば、放射能の外部走査によって、又は抗体に前もって曝露された哺乳動物から採取された試料（例えば、生検又は他の生物学的試料）を分析することによって評価することができる。

【0242】

製造品及びキット

本発明の別の実施態様は、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）及び過剰な血管新生を特徴とする病的状態（本明細書の他の箇所に記載されるようなもの）の治療に有用な物質を含有する製造品である。製造品は、容器と、容器上又は容器に付随したラベル又は添付文書を含むことができる。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な物質から形成され得る。一般に、容器は、症状の治療に有効である組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本明細書で提供される抗VEGFR2抗体（又はその断片）である。ラベル又は添付文書は、組成物が特定の疾患の治療に用いられることを示す。ラベル又は添付文書は、抗体組成物を患者に投与するための説明書を更に含むであろう。また、本明細書中に記載の併用治療薬を含む製造品及びキットも考慮される。

【0243】

添付文書は、そのような治療用製品の使用に関する適応症、使用法、用量、投与、禁忌及び／又は警告に関する情報を含む治療用製品の市販パッケージに慣例的に含まれる説明書を指す。一実施態様において、添付文書は、組成物が、がん（結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん及び固形腫瘍など）及び過剰な血管新生を特徴とする病的状態（本明細書の他の箇所に記載されるようなもの）を治療するために使用されることを示す。

【0244】

更に、製造品は、静菌注射用水（BWFI）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液及びデキストロス溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第2の容器を更に含み得る。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む商業的及びユーザーの観点から望ましい他の物質を更に含み得る。

【0245】

任意に製造品と組み合わせて、様々な目的、例えば患者における V E G F R 2 の単離又は検出のために有用なキットも提供される。E G F R の単離及び精製のために、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合した本明細書で提供される抗 V E G F R 2 抗体（又はその断片）を含み得る。例えば、E L I S A 又はウエスタンブロットにおいて、V E G F R 2 を検出及び定量するための抗体（又はその断片）を含むキットが提供され得る。製造品と同様に、キットは、容器と容器上の又は容器に付随するラベル又は添付文書とを含む。例えば、容器は、本明細書で提供される少なくとも 1 つの抗 V E G F R 2 抗体を含む組成物を保持する。例えば、希釈剤及び緩衝液、対照抗体を含有する追加の容器を含めることができる。ラベル又は添付文書は、組成物の説明並びに意図されたインビトロ又は診断用途のための指示書を提供することができる。

10

【実施例】**【0246】**

実施例 1 抗血管内皮増殖因子受容体 2（V E G F R 2）抗体の生成、親和性成熟、及び特徴づけ

10 個の陽性抗 V E G F R 2 抗体クローン（すなわち V 1 - V 1 0）を、ヒトファージディスプレイライブラリーを V E G F R 2 - F c でスクリーニングすることによって同定した。以下で更に詳細に説明し、表 5 に要約したインビトロ機能アッセイを実施してクローンを特徴づけた。アッセイは 1 1 2 1 B（本明細書では R e f - A と称される）、すなわち米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 3 0 6 3 4 8 号に記載されている抗 V E G F R 2 抗体、及び／又は 1 1 2 1 N（本明細書では R e f - B と称される）、すなわち陽性対照として米国特許第 7, 4 9 8, 4 1 4 号に記載されている抗 V E G F R 2 抗体を用いて実施した。

20

表 5

アッセイ/抗体	V1	V2	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	Ref-A
ECD (D1-7)	++/+++	+++	++	++	+++	++	++	+++	++	++++
ドメイン 2-3	-	-	-	+	-	-	++	-	-	++++
ドメイン 1-3	-	-	-	+	+++	-	++	-	-	++++
ドメイン 1-4	-	-	-	+	++/+++	-	+++	-	-	+
配列	K	K	K	K	K	λ	K	K	K	K
リガンド結合のプロッ キング	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
競合アッセイ(IMC- 1121Bと競合する)	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	+++
管形成(2-D 血管新 生)の阻害(BD HUVEC)	-	+++	-	-	++++	++	++++	++	+	+++
管形成の阻害 (BD+BCRC HUVEC)	-	+++	ND	ND	++++	++	++++	++	+	+++
HUVEC 遊走の阻害 (BD+BCRC HUVEC)	++++	++++	ND	ND	-	-	+	+	+	+
HUVEC 生存の阻害 (BD+BCRC HUVEC)	++++	-	ND	ND	-	-	-	++++	++/+++	+++/++++
HUVEC 増殖の阻害 (BD+BCRC HUVEC)	+++/++++	-	ND	ND	-/+	+	-	++++	+	+++
発芽アッセイ(3-D 血 管新生)	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++	ND	+++
マトリゲルプラグアッセ イ(インビボ血管新生)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	++++	ND	++++

【0247】

表5の第1-4行は、VEGFR2のドメイン1-7、VEGFR2のドメイン2-3、VEGFR2のドメイン1-3及びVEGFR2のドメイン1-4のそれぞれに対するV1-V10の結合を評価するために実施されたELISAアッセイの結果を提供する。第2行に示すように、V5及びV8は、VEGFR2のドメイン2-3に結合することができる；しかしながら、V5は低親和性で結合する。

【0248】

VEGFR2のドメイン5-7に対するV1、V9、V10及び1121Bの結合を評価するために、更なるELISAアッセイを実施した。簡潔には、V1、V9、V10及び1121Bの連続希釈物を、マイクロタイターディッシュのウェル中においてヒツジ抗ヒトfd抗体で捕捉した。VEGFR2-D5-7結合は、VEGFR2-D5-7-A P融合タンパク質をウェルに添加することによって測定した。インキュベーション及び洗浄後、pNPPをウェルに添加し、30分間インキュベートした。AP活性は、405nmにおける吸光度の増加をモニターすることによって測定した。抗体濃度をAP活性の関数としてプロットした(図1)。図1に示すように、クローンV1、V9及びV10はVEGFR2のドメイン5-7に結合するが、1121Bは結合しない。

【0249】

表5の第6行は、クローンV1-V10がVEGFR2のVEGFへの結合をブロックすることが見出されなかったことを示す。簡潔には、各クローンの連続希釈物を、VEGFR2-APと共に28℃で2時間インキュベートした。各抗体：抗原混合物をマイクロタイターディッシュのVEGF被覆ウェルに添加した。インキュベーション及び洗浄後、pNPPをウェルに添加し、30分間インキュベートした。AP活性は、405nmにおける吸光度の増加をモニターすることによって測定した。抗体濃度をAP活性の関数としてプロットした(図2)。図2に示すように、1121BはVEGFR2のVEGFへの結合をブロックしたが、クローンV1-V10はブロックしなかった。V1、V9、及びV10も、競合ELISAにおいてVEGFR2への結合について1121Bと競合しないことが決定された。(表5の第7行を参照)。

10

【0250】

次に、ヒト臍帯静脈内皮細胞(VEGFR2を発現するHUV EC)に対するクローンV1-V10の結合をアッセイした。簡単には、HUV EC(2×10^5)をPBSで1回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで4℃で30分間固定し、FACS緩衝液(PBS中の1%ウシ胎仔血清)で洗浄し、96ウェルプレートのウェルに移した(2×10^5 細胞/ウェル)。4℃で500×gで5分間遠心分離した後、100μlの抗体(3μl/mlのストックから3倍に希釈)をウェルに添加し、4℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、抗FcγR-1抗体と共に4℃で30分間インキュベートした。次いで、細胞をFACS緩衝液で3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで4℃で30分間固定し、4℃で5分間500×gで遠心分離した。上清を捨てた。細胞をFACS緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。図3に示すように、クローンV9はHUV ECに結合することが見出されたが、1121B(Ref A)も1211N(Ref B)もHUV ECに結合しないことが見出された。

20

【0251】

表5の第8行及び9行は、血管新生を阻害するクローンV1-V10の能力を評価するために実施されたHUV EC管形成アッセイの定性的結果を提供する。増殖因子が減少した基底膜抽出物のゲル上で培養すると、HUV ECは毛細管様の管状構造を形成する。アッセイは以下に行った：解凍したマトリゲル(増殖因子を減少させたもの)をμ-Slides(IBIDI)に添加し、37℃で1時間重合させた。培養したHUV EC(BD Biosciences製)をプレートから剥離し、3回洗浄し、培地(EBM-2+10%の「使用した」EGM-2(すなわち、2晩培養し、次いで収集し、濾過した)+5ng/mlのbFGF)に再懸濁した。50μlのHUV ECを0.2μg/ml又は5μg/mlの各抗体と共に37℃で20分間インキュベートした。50ng/mlのVEGF-165(すなわち、VEGF-Aの165アミノ酸スプライス変異体)を各プレートに加え、プレートを37℃で6時間インキュベートした。各抗体5μg/mlを試験したとき、V8は1121BよりもHUV EC管形成のより強い阻害を示した。1121Bは、V5、V6又はV9よりもHUV EC管形成のより強い阻害を示した。V5、V6及びV9は、V2又はV10よりもHUV EC管形成のより強い阻害を示した。V7、V4、及びV1は、5μg/mlでHUV EC管形成の阻害を示さなかった。(データ非表示)。各抗体0.2μg/mlを試験したとき、V8及び1121Bは、V2又はV6よりもHUV EC管形成のより強い阻害を示した。V2及びV6は、V10、V9、V4、及びV4よりもHUV EC管形成のより強い阻害を示した。V5及びV1は、0.2μg/mlでHUV EC管形成の阻害を示さなかった。(データ非表示)。

30

40

【0252】

BD BiosciencesとBioresource Collection and Research CenterからのHUV ECの混合物を用いてHUV EC管形成アッセイを繰り返した。2500ng/ml、50ng/ml、及び1ng/mlの各抗体を試験した。2500ng/mlの各抗体を使用したとき、1121B、V7、V8、V9、及びV10は、V1、V2、及びV6よりもより強いHUV EC管形成の阻害を示した。(データ非表示)。各抗体50ng/mlを試験したとき、1121B及び

50

V 6 は、V 1、V 2、V 7、V 8、及び V 9 よりも H U V E C 管形成のより強い阻害を示した。V 1 0 は 50 ng/ml で H U V E C 管形成の阻害を示さなかった。（データ非表示）。各抗体 1 ng/ml を試験したとき、1 1 2 1 B 及び V 7 は、V 6 及び V 1 0 よりも H U V E C 管形成のより強い阻害を示した。V 8、V 9、V 1 及び V 2 は 1 ng/ml で H U V E C 管形成の阻害を示さなかった。（データ非表示）。

【0253】

表 5 の第 1 0 行は、H U V E C の遊走活性を阻害するクローン V 1－V 1 0 の能力を評価するために実施された H U V E C 遊走アッセイの定性的結果を提供する。アッセイは以下のように行った：コンフルエントな H U V E C (8×10^5 細胞/プレート) を 2 6 時間継代培養した後、剥離し、E B M－2（内皮基礎培地－2）で 3 回洗浄し、約 5×10^5 細胞/ μl の濃度で E B M－2 に再懸濁した。0. 1 ml の細胞懸濁液を $30 \mu\text{g/ml}$ の抗体と共に 37°C で 2 0 分間インキュベートした。8 ミクロンの細孔サイズのトランスウェル透過性支持体インサート（Millipore）を 5 0 ml の P B S ですすぎ、 $50 \mu\text{l}$ の $10 \mu\text{g/ml}$ フィブロネクチン ($2 \mu\text{g/cm}^2$) で 3 時間被覆した。コーティング溶液を除去し、細胞懸濁液/抗体混合物をトランスウェルに移した。トランスウェルを、 400 ng/ml の V E G F 1 6 5－F c を含む又は含まない 0. 7 ml の E B M－2 を含む下部区画を有するウェルに移した。1 6－1 7 時間のインキュベーション後、残りの細胞を除去し、トランスウェルを P B S で 2 回洗浄した。遊走した細胞を 1 0 0 % メタノールで 2 0 分間固定し、乾燥させ、次いで 0. 1 M ホウ酸塩 / 2 % エタノール ($\text{pH}=9$) 中の 0. 1 5 % クリスタルバイオレットで 3 0 分間染色した。次いで、染色されたトランスウェルを dH_2O で洗浄し、トランスウェルの上面を綿棒で洗浄した。染色した細胞を $60 \mu\text{l}$ の 1 0 % 酢酸で抽出した。吸光度値は 590 nm で測定した。 % 遊走は以下の式に従って決定した：

$$\% \text{遊走} = \frac{\text{OD}_{590(\text{試料})} - \text{OD}_{590(\text{VEGF を含まず})}}{\text{OD}_{590(\text{VEGF を含む})} - \text{OD}_{590(\text{VEGF を含まず})}} \times 100$$

【0254】

V 1 及び V 2 は、V 8、V 9、V 1 0、及び 1 2 1 1 B よりも H U V E C 遊走のより強い阻害を示した。図 4 を参照。

【0255】

表 5 の第 1 1 行は、H U V E C 生存を阻害するクローン V 1－V 1 0 の能力を評価するために実施された H U V E C 生存アッセイの定性的結果を提供する。簡潔には、H U V E C をコンフルエントになるまで $800 \mu\text{l}$ の E G M－2 培地を含む 4 8 ウェル培養プレート中で増殖させ、次いで P B S で 3 回洗浄した。抗 V E G F R 2 抗体の連続希釈物をウェルに添加し、 37°C で 3 0 分間インキュベートした。V E G F－1 6 5－F c を各ウェルに添加した後、細胞を 37°C ($5\% \text{CO}_2$) で 2 日間インキュベートした。3 日目に、 $80 \mu\text{g}$ の 5 mg/ml の M T T（すなわち、生存細胞中の紫色ホルマザンに還元される黄色テトラゾール）を各ウェルに添加し、3 時間インキュベートした。各ウェルに $100 \mu\text{l}$ の D M S O を添加し、各ウェルについて 565 nm で吸光度を測定した。V 9、V 1 及び 1 1 2 1 B（R e f A）は、V 1 0 よりも H U V E C 生存のより強い阻害を示した。V 7、V 6、V 2 及び V 8 は H U V E C 生存の阻害を示さなかった。（図 5 を参照）。

【0256】

表 5 の第 1 2 行は、H U V E C 増殖を阻害するクローン V 1－V 1 0 の能力を評価するために実施された H U V E C 細胞増殖アッセイの定性的結果を提供する。アッセイは以下のように行った：H U V E C を培養プレートから剥離し、E B M－2 培地に再懸濁し、4 8 ウェル組織培養プレートのウェルに播種した。各抗体の連続希釈物をウェルに添加し、 37°C で 3 0 分間インキュベートした。V E G F－1 6 5 を各ウェルに添加した後、細胞を 37°C ($5\% \text{CO}_2$) で 3 日間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、 $80 \mu\text{l}$ の 5 mg/ml の M T T を各ウェルに添加し、3 時間インキュベートした。各ウェルに $100 \mu\text{l}$ の D M S O を添加し、各ウェルについて 565 nm で吸光度を測定した

。V 9 は、V 1 及び 1 1 2 1 B よりも H U V E C 増殖のより強い阻害を示した。V 1 及び 1 1 2 1 B は、V 1 0 及び V 7 よりも H U V E C 生存のより強い阻害を示した。V 6、V 2 及び V 8 は H U V E C 増殖の阻害を示さなかった。（図 6 を参照）。

【0257】

表 5 の第 1 3 行は、血管新生因子によって誘導される H U V E C 発芽（すなわち、三次元血管新生）を阻害するクローン V 1 - V 1 0 の能力を評価するために実施されたインビトロ H U V E C 発芽アッセイの定性的結果を提供する。簡潔には、2 5 n g / m l の V E G F ₁₆₅ (e B i o s c i e n c e)、2 0 n g / m l の b F G F (e B i o s c i e n c e)、及び漸増濃度の 1 1 2 1 B (R e f A)、A v a s t i n、V 1 又は V 9 を、培地：メトセル（4 0 : 6 0）溶液（1 0 0 μ l）に添加した。次いでこれを作業（w o r k i n g）コラーゲン溶液（1 x P B S、p H 7. 0 中）と 1 : 1 で混合した。混合直後に、マトリックスを予熱した 4 8 ウェルプレートに加え、3 7 °C に戻した。一方、未処置の無菌 9 6 ウェルマイクロプレート中で 7 5 0 個の細胞のスフェロイドを 1 8 時間形成させるように誘導された H U V E C が収集され（1 5 0 × g、ブレーキなし）、P B S で 1 回洗浄し、次いで E B M - 2 （約 5 0 個のスフェロイド / m L）中に懸濁させた。懸濁したスフェロイドをマイクロチューブに移し、ペレット化した。上清を吸引した後、増殖因子及び抗体を含む培地：メトセル溶液（1 5 0 μ l）をペレット上に重層し、続いて 1 5 0 μ l の作業（working）コラーゲンストックを添加した。溶液を直ちに混合し、マトリックスのベースコートを含むプレートに移した。3 7 °C で 2 時間インキュベートした後、増殖因子及び抗体を含む 1 5 0 μ l の培地を各ウェルの表面に添加した。発芽は、3 7 °C で 4 8 - 6 4 時間のインキュベーション後に画像化された。

【0258】

表 5 の第 1 4 行は、インビボで血管新生を阻害する V 1 - V 9 の能力を評価するために実施されたマトリゲルプラグアッセイの定性的結果を提供する。実験は、重症複合免疫不全マウス（S C I D）マウスで行われた。H U V E C スフェロイドは、一晚のスフェロイド形成を可能にするために、未処置の 9 6 ウェルマイクロプレート上における垂下液滴中に 1 0 0 0 個の H U V E C をピペティングすることによって調製した。翌日、H U V E C スフェロイドを回収し、マトリゲル溶液中で単一の H U V E C と混合し、注入したプラグ当たりスフェロイドとして最終的に 1 0 0 個の H U V E C 及び 2 0 0, 0 0 0 個の単一 H U V E C を得た。V E G F 1 6 5 及び線維芽細胞増殖因子 2（F G F - 2）を 1 0 0 0 n g / m L の最終濃度で添加した。処置群当たり 2 匹の S C I D マウスに、急速に重合した 0. 5 m L の細胞 / マトリックス懸濁液を皮下注射した。週 2 回の抗体の投与は、0 日目から開始した（細胞 / マトリックス接種の 4 時間後）。1 8 日目に研究を終了した。マトリゲルプラグを除去し、写真撮影し、4 % パラホルムアルデヒド中、室温で 4 - 1 2 時間固定した。その後、プラグを標準的な手順でパラフィン包埋した。ヒト脈管構造の組織学的検査のために、全てのプラグからパラフィン切片（厚さ 8 - 1 0 μ m）を調製した。ヒト血管形成を、マウス抗ヒト C D 3 4（D a k o、カタログ番号 M 7 1 6 5 0 1）及び F I T C コンジュゲートウサギ抗マウス二次抗体（D a k o、カタログ番号 F 0 2 6 1 0 2）で染色することにより検出した。プラグ毎に 2 つの切片を分析し、E c l i p s e T E 2 0 0 0 - U 顕微鏡（N i k o n）を用いて 2 0 0 倍の倍率で各切片から 5 枚の画像が撮影された。ヒト脈管構造のレベルは、F I T C 陽性（C D 3 4 陽性）領域の平均パーセンテージによって決定された。図 7 に示すように、V 9 は 1 2 1 1 B（R e f A）と同程度にインビボで血管新生を阻害した。

【0259】

ヒト H C T - 1 1 6 ヒト結腸癌腫瘍異種移植片を保有するマウスを、クローン V 1、V 9、及び V 1 0 の治療有効性をアッセイするために使用した。簡潔には、ヒト H C T - 1 1 6 ヒト結腸がん細胞（接種 = 1 × 1 0⁶ 個の細胞）を雌の B A L B / c ノードマウスに移植した。マウスを無作為に 7 群に分けた。各群は、以下の表 6 に記載の投与計画の 1 つにより処置した：

表 6

群	動物	腫瘍	処置剤(抗体)	用量	処置スケジュール
1	BALB/c NU 雌 5 週齢 4 匹のマウス ／群	HCT-116 接種=1×10 ⁶ 個の細胞	1121B	100mg/kg	接種後 3 日 目; 5 週間、1 週間に 2 回
2			V9	100mg/kg	
3			1121B	50mg/kg	
4			V9	50mg/kg	
5			V1	50mg/kg	
6			V10	50mg/kg	
7			プラセボ	10ml/kg	

【 0 2 6 0 】

処置の開始後 21 日目に、V9 (100mg/kg) で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを投与したマウスの腫瘍より約 51% 小さく、1121B (100mg/kg) で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを投与したマウスの腫瘍より約 61% 小さかった。処置の開始後 21 日目に、V9 (50mg/kg) で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを投与したマウスの腫瘍より約 43% 小さく、1121B (50mg/kg) で処置したマウスの腫瘍は、プラセボを投与したマウスの腫瘍より約 31% 小さかった。図 8 及び下記の表 7 を参照。

10

20

30

表 7

	TV ¹ (21 日 目)	RTV ² (21 日目)	TV/CV % ³ (21 日間)	TGI % ⁴ (21 日目)	TV のp値 ⁵ (21 日目)	
1121B (100 mg/kg)	462	304%	50%	61%	0.010	<0.05*
V9 (100 mg/kg)	542	317%	59%	51%	0.0308	<0.05*
1121B (50 mg/kg)	689	431%	75%	31%	0.121	>0.05
V9 (50 mg/kg)	596	358%	65%	43%	0.060	>0.05
V1 (50 mg/kg)	684	406%	74%	32%	0.146	>0.05
V10 (50 mg/kg)	700	429%	76%	29%	0.148	>0.06
プラセボ	919	640%	—	—	—	—

¹TV：腫瘍体積²RTV：最初に対する腫瘍体積³TV/CV%：処置群の体積/対照群の体積⁴TGI%：腫瘍増殖阻害率 = $1 - (T21 - T0) / (C21 - C0) \%$ ⁵p 値：<0.05 = * <0.01 = ** <0.001 = ***

【0261】

次いで、クローンV9を、改善された結合性能を有する更なるクローンを生成するために、更なるインビトロファージディスプレイに基づく親和性成熟実験に使用した。最初に、CDR-L2/CDR-L3/CDR-H3 核酸ライブラリーをPCRにより生成し、ファージディスプレイベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換してファージライブラリーを作製した。3ラウンドのパンニングの後、77のFabクローンをELISAによってスクリーニングし、5つのクローン（すなわち、29、30、32、34、及び67）がV9と同等又はそれ以上の結合性能を有することが判明した（図9参照）。

【0262】

更なるELISAを、以下の軽鎖/重鎖の組合せを含む全長IgGクローンを用いて行った：V9/V9、29/V9（LC/HC）、34/V9（LC/HC）、67/V9（LC/HC）、29/34（LC/HC）、34/34（LC/HC）、及び67/34（LC/HC）。1121B及び2つの陰性対照抗体も試験した。各クローン、1121B及び2つの陰性対照抗体の連続希釈物を、マイクロタイターディッシュのウェル中のVEGFR2-Fcで捕捉した。抗ヒトカップーHRPコンジュゲート二次抗体を用いて各ウェル中の捕捉された抗体の量を定量した。HRPコンジュゲート二次抗体をウェルに添加し、インキュベーション後、過剰の二次抗体を洗い流した。TMBをウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、HRP活性を450nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した（図10A）。34/V9（LC/HC）、34/34（LC/HC）、及び67/V9（LC/HC）は、試験されたクローンのうちVEGFR2に対する最も強い結合を示した。

【0263】

V9/V9、29/V9（LC/HC）、34/V9（LC/HC）、67/V9（LC/HC）、29/34（LC/HC）、34/34（LC/HC）、67/34（LC/HC）の完全長IgGクローン、1121B、及び2つの陰性対照抗体がマイクロタイターディッシュのウェル中で抗Fdにより捕捉される第3セットのELISAが実施され

た。各ウェルにおける捕捉抗体の量を、A PコンジュゲートV E G F R 2を用いて定量した。インキュベーション後、過剰のV E G F R 2－A Pを洗い流した。アルカリホスファターゼ基質をウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、A P活性を405nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した（図10B）。34/V9（LC/H C）、34/34（LC/H C）、29/V9（LC/H C）、及び29/34（LC/H C）は、試験されたクローンのうちV E G F R 2に対する最も強い結合を示した。

【0264】

S P Rが、V9/V9（LC/H C）、34/34（LC/H C）、34/V9（LC/H C）、67/34（LC/H C）、67/V9（LC/H C）、29/34（LC/H C）及び29/V9（LC/H C）で実施された。結果を以下の表8A－8Cに示す。

10

表 8A

LC/H C	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)
V9/V9	6.53 x 10 ⁵	6.37 x 10 ⁻⁴	9.76 x 10 ⁻¹⁰
34/34	8.25 x 10 ⁵	3.89 x 10 ⁻⁴	4.71 x 10 ⁻¹⁰
34/V9	7.48 x 10 ⁵	2.72 x 10 ⁻⁴	3.64 x 10 ⁻¹⁰
67/34	5.49 x 10 ⁵	2.63 x 10 ⁻⁴	4.79 x 10 ⁻¹⁰
67/V9	6.41 x 10 ⁵	3.17 x 10 ⁻⁴	4.94 x 10 ⁻¹⁰
29/34	7.97 x 10 ⁵	3.36 x 10 ⁻⁴	4.26 x 10 ⁻¹⁰
29/V9	9.64 x 10 ⁵	2.10 x 10 ⁻⁴	2.18 x 10 ⁻¹⁰

20

表 8B

30

LC/H C	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)
V9/V9	6.9 x 10 ⁵	3.6 x 10 ⁻⁴	5.1 x 10 ⁻¹⁰
34/34	8.3 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁻⁴	2.9 x 10 ⁻¹⁰
34/V9	4.4 x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁻⁴	5.3 x 10 ⁻¹⁰
67/34	5.8 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁻⁴	2.5 x 10 ⁻¹⁰
67/V9	6.9 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁻⁴	2.8 x 10 ⁻¹⁰
29/34	6.0 x 10 ⁵	1.6 x 10 ⁻⁴	2.7 x 10 ⁻¹⁰
29/V9	7.2 x 10 ⁵	4.8 x 10 ⁻⁵	6.7 x 10 ⁻¹¹

40

表 8C

LC/HC	k_a (1/(M*s))	k_d (1/s)	K_D (M)
V9/V9	8.55×10^5	5.28×10^{-4}	6.17×10^{-10}
34/34	1.22×10^6	2.55×10^{-4}	2.09×10^{-10}
34/V9	9.23×10^5	2.37×10^{-4}	2.57×10^{-10}
67/34	7.98×10^5	6.53×10^{-5}	8.19×10^{-11}
67/V9	6.69×10^5	9.00×10^{-5}	1.34×10^{-10}
29/34	8.45×10^5	9.22×10^{-5}	1.09×10^{-10}
29/V9	9.32×10^5	2.23×10^{-4}	2.39×10^{-10}
1121B (Ref A)	7.52×10^5	9.62×10^{-4}	1.28×10^{-9}

【0265】

29/V9 (LC/HC) は、試験した他のクローンよりも一貫してより強い K_D を示した。67/34 (LC/HC) は一貫して最低の k_{off} を示し、34/34 (LC/HC) は一貫して最高の k_{on} を示した。34/34 (LC/HC)、34/V9 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、29/34 (LC/HC) 及び 29/V9 (LC/HC) は全て、V9/V9 (LC/LC) と比較して解離の改善を示している。

【0266】

HUVEC 増殖アッセイを、クローン V9/V9 (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、29/34 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びアバスタチン (Avastin) を用いて上記のように実施した。図 11A 及び 11B に示すように、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、及び 29/V9 (LC/HC) は、試験した全てのクローンのうち HUVEC 増殖の最も強い阻害を示した。

【0267】

HUVEC 生存アッセイを、クローン V9/V9 (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、29/34 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びアバスタチン (Avastin) を用いて上記のように実施した。図 12A 及び 12B に示すように、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、及び 29/V9 (LC/HC) は、試験した全てのクローンのうち HUVEC 生存の最も強い阻害を示した。

【0268】

HUVEC 管形成アッセイを、クローン V9/V9 (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、29/34 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びアバスタチン (Avastin) を用いて上記のように実施した。1121N (Ref B) は、HUVEC 管形成の最も強い阻害を示した。V9/V9 (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、67/V9 (LC/HC)、及び 1121B (Ref A) は、29/34 (LC/HC) よりも強い HUVEC 管形

成を示した。(データ非表示)。

【0269】

HUVEC発芽アッセイを、クローンV9/V9(LC/HC)、29/V9(LC/HC)、34/V9(LC/HC)、67/V9(LC/HC)、29/34(LC/HC)、34/34(LC/HC)、67/34(LC/HC)、1121B(Ref A)、1121N(Ref B)、及びアバスタチン(Avastatin)を用いて上記のように実施した。1121N(Ref B)は、HUVEC発芽の最も強い阻害を示した。67/34(LC/HC)及び34/34(LC/HC)は、1121B(Ref A)よりもHUVEC発芽のより強い阻害を示した。1121B(Ref A)は、34/V9(LC/HC)よりもHUVEC発芽のより強い阻害を示した。34/V9(LC/HC)は、29/34(LC/HC)よりも強い発芽阻害を示したV9/V9(LC/HC)及び67/34(LC/HC)よりもHUVEC発芽のより強い阻害を示した。29/V9(LC/HC)はHUVEC発芽の強い阻害を示さなかった。(データ非表示)。

10

【0270】

CDR-H1/CDR-H1/CDR-H2ライブラリーを作製するための基礎として、クローン29、34、及び67を選択して使用した。CDR-H1/CDR-H1/CDR-H2核酸ライブラリーをPCRにより生成し、ファージディスプレイベクターにクローニングし、大腸菌に形質転換してファージライブラリーを作製した。2ラウンドのパニング後、7つのクローン、すなわち80A、80B、86A、86B、88、109、110A及び110BをELISAによってスクリーニングし、改善された結合特性を有することが見出された。

20

【0271】

更なるELISAを、以下のように以下の軽鎖/重鎖の組合せを含む抗VEGFR2抗体を用いて実施した：V9/V9(LC/HC)、34/80A(LC/HC)、34/80B(LC/HC)、34/86A(LC/HC)、34/86B(LC/HC)、29/88(LC/HC)、109/109(LC/HC)、110A/110A(LC/HC)、110B/110B(LC/HC)、29/V9(LC/HC)、34/34(LC/HC)、及び67/34(LC/HC)。各クローン及び1121B(Ref A)の連続希釈物を、マイクロタイターディッシュのウェル中の抗Fc抗体で捕捉した。各ウェルにおける捕捉抗体の量を、APコンジュゲートVEGFRを用いて定量した。インキュベーション後、過剰のVEGFR2-APを洗い流した。アルカリホスファターゼ基質をウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、AP活性を405nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した(図13A及び13B)。1121B(Ref A)は、VEGFR2に対する最も強い結合を示し、次に34/86A(LC/HC)、34/86B(LC/HC)、及び34/34(LC/HC)が続く、次に29/88(LC/HC)、109/109(LC/HC)、及び29/V9(LC/HC)が続いた。

30

【0272】

更なるELISAが実施され、V9/V9(LC/HC)、34/80A(LC/HC)、34/80B(LC/HC)、34/86A(LC/HC)、34/86B(LC/HC)、29/88(LC/HC)、109/109(LC/HC)、110A/110A(LC/HC)、110B/110B(LC/HC)、29/V9(LC/HC)、34/34(LC/HC)、67/34(LC/HC)、及び1121Bがマイクロタイターディッシュのウェル中で抗fdにより捕捉された。各ウェルにおける捕捉抗体の量を、APコンジュゲートVEGFRを用いて定量した。インキュベーション後、過剰のVEGFR2-APを洗い流した。アルカリホスファターゼ基質をウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、AP活性を405nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した(図13C及び13D)。1121B(Ref A)は、VEGFR2に対する最も強い結合を示し、次に34/86A(LC/HC)、34/86B(LC/HC)、及び34/34(LC/HC)が続く、次に29/88(LC/HC)、10

40

50

9/109 (LC/HC)、及び29/v9 (LC/HC)が続いた。試験された全てのクローンはV9よりもVEGFR2に対して強い結合を示した(図13D参照)。

【0273】

ELISAの第3セットが実施された。簡潔には、V9/V9 (LC/HC)、34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、及び1121Bがマイクロタイターディッシュのウェル中でVEGFR2-Fcにより捕捉された。抗ヒトカップーHRPコンジュゲート二次抗体を用いて各ウェル中の捕捉された抗体の量を定量した。HRPコンジュゲート二次抗体をウェルに添加し、インキュベーション後、過剰の二次抗体を洗い流した。TMBをウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、HRP活性を450nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した(図14A及び14B)。34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、及び67/34 (LC/HC)はVEGFR2に対する最も強い結合を示し、次にV9/V9 (LC/HC)及び34/86B (LC/HC)が続いた。試験された全てのクローンは1121B (Ref A)よりもVEGFR2に対して強い結合を示した。

【0274】

更なるELISAが実施され、簡潔には、V9/V9 (LC/HC)、34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、67/34 (LC/HC)、及び1121Bがニュートラアビジン被覆マイクロタイターディッシュのウェル中に固定化したビオチン化VEGFR2-Fcで捕捉された。抗ヒトカップーHRPコンジュゲート二次抗体を用いて各ウェル中の捕捉された抗体の量を定量した。HRPコンジュゲート二次抗体をウェルに添加し、インキュベーション後、過剰の二次抗体を洗い流した。TMBをウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、HRP活性を450nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した(図14C及び14D)。34/80A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、29/V9 (LC/HC)、34/34 (LC/HC)、及び67/34 (LC/HC)はVEGFR2に対する最も強い結合を示し、次にV9/V9 (LC/HC)及び34/86B (LC/HC)が続いた。試験された全てのクローンは1121B (Ref A)よりもVEGFR2への強い結合を示した。

【0275】

SPRが、V9/V9 (LC/HC)、34/80A (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、及び29/V9 (LC/HC)で実施された。結果を以下の表9A-9Bに示す。

表 9A

LC/HC	k_a (1/(M*s))	k_d (1/s)	K_D (M)
V9/V9	1.1×10^6	8.49×10^{-4}	7.74×10^{-10}
34/V9	7.84×10^5	2.27×10^{-4}	2.89×10^{-10}
34/80A	2.15×10^5	2.98×10^{-4}	1.38×10^{-9}

10

表 9B

LC/HC	k_a (1/(M*s))	k_d (1/s)	K_D (M)
V9/V9	7.90×10^5	8.82×10^{-4}	1.12×10^{-9}
34/80A	4.12×10^4	1.31×10^{-4}	3.17×10^{-9}
110A/110A	2.28×10^6	1.88×10^{-4}	8.26×10^{-11}
34/80B	4.88×10^4	2.44×10^{-4}	5.01×10^{-9}
110B/110B	1.70×10^6	2.19×10^{-4}	1.29×10^{-10}
29/V9	8.67×10^5	3.47×10^{-4}	4.01×10^{-10}

20

【0276】

110A/110A (LC/HC) は試験した他のクローンと比較して改善された k_a 、 k_d 及び K_D を示す。110A/110B (LC/HC) の結合は110A/110A (LC/HC) よりもわずかに低い。34/80B (LC/HC) の結合は34/80A (LC/HC) よりもわずかに低い。

30

【0277】

SPR 動態解析が、V9/V9 (LC/HC)、34/80A (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、及び29/V9 (LC/HC) で実施された。結果を以下の表10A-10C に示す。

表 10A

LC/HC	k_a (1/(M*s))	k_d (1/s)	K_D (M)	Rmax
V9/V9	2.02×10^6	3.94×10^{-4}	1.95×10^{-10}	42
110A/110A	1.80×10^6	8.76×10^{-6}	4.88×10^{-12}	107
34/86	6.12×10^5	1.00×10^{-4}	1.64×10^{-10}	79
34/80A	6.12×10^5	5.75×10^{-5}	9.39×10^{-11}	40
109/109	1.67×10^6	7.08×10^{-5}	4.25×10^{-11}	118
29/88	8.90×10^5	7.80×10^{-5}	8.76×10^{-11}	63

40

表 10B

LC/HC	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax	Fold KD
V9/V9	9.89 × 10 ⁵	3.47 × 10 ⁻⁴	3.51 × 10 ⁻¹⁰	62.9	1
110A/110A	1.64 × 10 ⁶	4.78 × 10 ⁻⁵	2.92 × 10 ⁻¹¹	92.2	12
109/109	1.71 × 10 ⁶	7.88 × 10 ⁻⁵	4.61 × 10 ⁻¹¹	108.4	8
67/V9	6.20 × 10 ⁵	6.03 × 10 ⁻⁵	9.72 × 10 ⁻¹¹	73.3	4
34/34	9.30 × 10 ⁵	1.39 × 10 ⁻⁴	1.49 × 10 ⁻¹⁰	69.2	2

10

表 10C

LC/HC	ka (1/(M*s))	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax	Fold KD
V9/V9	9.98 × 10 ⁵	4.24 × 10 ⁻⁴	4.25 × 10 ⁻¹⁰	70.69	1.0
110A/110A	1.35 × 10 ⁶	1.21 × 10 ⁻⁴	8.92 × 10 ⁻¹¹	104.93	4.8
109/109	1.54 × 10 ⁶	8.19 × 10 ⁻⁵	5.33 × 10 ⁻¹¹	116.29	8.0
67/V9	6.14 × 10 ⁵	7.88 × 10 ⁻⁵	1.28 × 10 ⁻¹⁰	91.8	3.3
34/34	8.92 × 10 ⁵	1.38 × 10 ⁻⁴	1.54 × 10 ⁻¹⁰	80.53	2.8

20

【0278】

110A/110A (LC/HC) 及び109/109 (LC/HC) は、V9/V9 よりも一貫して高い k_a 及び低い k_d を示した。従って、110A/110A (LC/HC) 及び109/109 (LC/HC) の K_D は低かった。更に、110A/110A (LC/HC) 及び109/109 (LC/HC) の R_{max} は一貫して高かった。

30

【0279】

クローン34/V9 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、及び110B/110Bを、以下のようにHUVEC全細胞に結合する能力について評価した：HUVECを回収し、PBSで洗浄し、4℃で30分間パラホルムアルデヒドで固定した。次いで、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、マイクロタイタープレートのウェルに添加し、次いでこれを遠心分離した。各ウェルに34/V9 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、又は110B/110Bを添加し、4℃で30分間インキュベートした。ウェルをFACS緩衝液で2回洗浄した後、ビオチン化ウサギ抗ヒトIgGを各ウェルに添加し、4℃で30分間インキュベートした。FACS緩衝液で更に2回洗浄した後、ストレプトアビジン-PE (すなわち、フィコエリトリンにコンジュゲートしたストレプトアビジン) を各ウェルに添加し、インキュベートした。ウェルをFACS緩衝液で2回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、遠心分離した。上清を廃棄し、細胞をFACS緩衝液に再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。図15に示すように、クローン110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、及び109/109 (LC/HC) は、34/V9 (LC/HC) よりもHUVECに対して強い結合を示した1121Nよりも、HUVECに対して強い結合を示した。試験された全てのクローンは1121BよりもHUVECに対して強い結合を示した。そのような結果は、上記のELISA

40

50

結果に対応する。

【0280】

HUVEC増殖アッセイを、クローンV9/V9 (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びアバスチン (Avastin) を用いて上記のように実施した。図16A及び16Bに示すように、110A/110A (LC/HC) 及び110B/110B (LC/HC) は、1121B (Ref A) 及び1121N (Ref B) を含む、試験した全てのクローンのうちHUVEC増殖の最も強い阻害を示した。109/109 (LC/HC) は、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、及びV9/V9 (LC/HC) よりもHUVEC増殖のより強い阻害を示した1121N (Ref B) よりもHUVEC増殖のより強い阻害を示した。34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/99 (LC/HC)、及びV9/V9 (LC/HC) は、34/80A (LC/HC) よりもHUVEC増殖のより強い阻害を示した1121B (Ref A) よりもHUVEC増殖のより強い阻害を示した。

【0281】

HUVEC生存アッセイを、クローンV9/V9 (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びアバスチン (Avastin) を用いて上記のように実施した。図17A及び17Bに示すように、110A/110A (LC/HC) 及び110B/110B (LC/HC) は、1121B (Ref A) 及び1121N (Ref B) を含む、試験した全てのクローンのうちHUVEC生存の最も強い阻害を示した。109/109 (LC/HC) は、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、及びV9/V9 (LC/HC) よりもHUVEC生存のより強い阻害を示した1121N (Ref B) よりもHUVEC生存のより強い阻害を示した。34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/99 (LC/HC)、及びV9/V9 (LC/HC) は、34/80A (LC/HC) よりもHUVEC生存のより強い阻害を示した1121B (Ref A) よりもHUVEC生存のより強い阻害を示した。

【0282】

HUVEC管形成アッセイを、クローンV9/V9 (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、110B/110B (LC/HC)、1121B (Ref A)、1121N (Ref B)、及びアバスチン (Avastin) を用いて上記のように実施した。1121N (Ref B) は、試験した全てのクローンのうちHUVEC管形成の最も強い阻害を示した。110A/110A (LC/HC) 及び110B/110B (LC/HC) は、29/88 (LC/HC) よりもHUVEC管形成のより強い阻害を示したアバスチン (Avastin) よりもHUVEC管形成のより強い阻害を示した。29/88 (LC/HC) は、34/80B (LC/HC) 及び34/86A (LC/HC) よりもHUVEC管形成のより強い阻害を示した109/109 (LC/HC) よりもHUVEC管形成のより強い阻害を示した。34/80B (LC/HC) 及び34/86A (LC/HC) は、34/86B (LC/HC) よりもHUVEC管形成のより強い阻害を示したV9/V9 (LC/HC) よりもHUVEC管形成のより強い阻害を示した。

【0283】

HUVEC発芽アッセイを、クローンV9/V9 (LC/HC)、34/80B (LC/HC)、34/86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、11

0 B / 1 1 0 B (L C / H C) 、 1 1 2 1 B (R e f A) 、 1 1 2 1 N (R e f B) 、 及びアバスタチン (A v a s t i n) を用いて上記のように実施した。1 1 2 1 N (R e f B) は、試験した全てのクローンのうちH U V E C 発芽の最も強い阻害を示した。1 1 0 A / 1 1 0 A (L C / H C) 及び1 1 0 B / 1 1 0 B (L C / H C) は、3 4 / 8 6 A (L C / H C) よりもH U V E C 発芽のより強い阻害を示した1 0 9 / 1 0 9 (L C / H C) よりもH U V E C 発芽のより強い阻害を示した。3 4 / 8 6 A (L C / H C) は、2 9 / 8 8 (L C / H C) よりもH U V E C 発芽のより強い阻害を示した3 4 / 8 6 B (L C / H C) よりもH U V E C 発芽のより強い阻害を示した。2 9 / 8 8 (L C / H C) は、V 9 / V 9 (L C / H C) よりもH U V E C 発芽のより強い阻害を示した3 4 / 8 0 B (L C / H C) よりもH U V E C 発芽のより強い阻害を示した。

10

【0284】

1 1 2 1 B (R e f A) 、 1 1 2 1 N (R e f B) と比較して、クローン3 4 / V 9 (L C / H C) 、 1 0 9 / 1 0 9 (L C / H C) 、 1 1 0 A / 1 1 0 A (L C / H C) 、 及び1 1 0 B / 1 1 0 B (L C / H C) の異種間活性を評価するために別のセットのE L I S A を実施した。マウスV E G F R 2 - F c を捕捉試薬として使用し、抗ヒトカップ- H R P コンジュゲート二次抗体を用いて各ウェル中の捕捉された抗体の量を定量した。H R P コンジュゲート二次抗体をウェルに添加し、インキュベーション後、過剰の二次抗体を洗い流した。T M B をウェルに添加し、インキュベーション後、反応を停止させ、H R P 活性を4 5 0 n m での吸光度の増加をモニターすることによって測定した。図1 8 A 及び1 8 B は、1 1 0 B / 1 1 0 B がマウスV E G F R 2 に対する最も強い結合親和性を示す二重E L I S A 実験の結果を示す。

20

【0285】

次に、1 1 2 1 N (R e f B) と比較して、1 1 0 / 1 1 0 B (L C / H C) がV E G F R 2 のリン酸化を阻害する能力を評価するためにアッセイを実施した。簡潔には、 8×10^5 個のH U V E C 細胞を1 0 c m のディッシュに播種し、コンフルエントになるまで増殖させた。次いで、血清飢餓のために培地を3 7 °C でE B M - 2 と交換した。抗体を各ディッシュに添加し、3 7 °C で3 0 分間インキュベートした。次に、2 5 μ g / m l のV E G F 1 6 5 (e B i o s c i e n c e 、カタログ番号6 8 - 8 7 8 4 - 8 2) を各ディッシュに3 7 °C で1 0 分間添加してV E G F R 2 を刺激した。V E G F 1 6 5 の添加後、培地を吸引し、細胞を冷P B S で洗浄した。P B S を廃棄し、細胞溶解緩衝液 (C e l l S i g n a l i n g 、カタログ番号9 8 0 3 S) + 1 x H a l t プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤カクテル (P i e r c e 、カタログ番号P I E 7 8 4 4 0) + 5 m M の Na_3VO_4 を各ディッシュに添加した。4 °C で5 分間のインキュベーションの後、細胞を回収し、溶解させ、2 回の凍結- 解凍サイクルを行い、1 4 , 0 0 0 $\times$ g で4 °C で1 5 分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、B C A 試薬 (P i e r c e 、カタログ番号P I E 2 3 2 2 5) を用いて各チューブの全タンパク質を定量した。1 5 0 μ g の各全溶解物を、5 μ g のI M C - 1 1 2 N (すなわち、R e f B 、社内で調製、ロット番号1 4 0 5 0 9 0 5 1 6) との免疫沈降反応で使用した。免疫沈降反応を、傾斜回転を伴って4 °C で一晩インキュベートした。次いで、免疫沈降反応をプロテインA ビーズを用いて精製し、洗浄し、マウス抗ホスホチロシン (4 G 1 0) 抗体 (M i l l i p o r e 、カタログ番号0 5 - 1 0 5 0) 、続いてH R P コンジュゲート二次抗体を用いてウェスタンで分析した。E C L を添加し、抗ホスホチロシン抗体結合をX 線フィルムにより検出した。次いで、膜を、ストリッピング緩衝液 (T h e r m o 、カタログ番号2 1 0 5 9) を用いて剥離し、ウサギ抗V E G F R 2 (5 5 B 1 1) 抗体 (C e l l S i g n a l i n g 、カタログ番号2 4 7 9) 、続いてH R P コンジュゲート二次抗体でプローブした。E C L を添加し、抗V E G F R 2 抗体結合をX 線フィルムにより検出した。図1 9 A に示すように、1 1 2 1 N (R e f B) は、1 1 0 / 1 1 0 B (L C / H C) よりも低濃度でV E G F R 2 リン酸化をより強く阻害した。図1 9 A の結果は図1 9 B に定量化される。

30

40

【0286】

上記の遊走アッセイを実施して、クローンV 9 、3 4 / 8 0 A (L C / H C) 、 3 4 /

50

86A (LC/HC)、34/86B (LC/HC)、29/88 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110/110A (LC/HC)、及び110/110B (LC/HC)のHUVECの遊走活性を阻害する能力を評価した。図20に示すように、109/109 (LC/HC)は、1211N (Ref-B)よりもHUVEC遊走のより強い阻害を示した。

【0287】

次に、抗体110/110BがVEGFR2ファミリーの他のメンバーに結合することができるかどうかを決定するためにELISA実験を実施した。簡潔には、組換えヒトVEGFR1-Fc融合タンパク質 (R&D Systems) を96ウェルプレートのウェル中に固定化した。抗体1121N (Ref-B)、抗体110/110B、及びマウス抗ヒトVEGFR1 (10 µg/mlからの3倍希釈) をウェルに添加した。固定化VEGFR1-Fcに対する抗体の抗体への結合を検出するために、ヤギ抗ヒトF(ab)₂-HRP又はヤギ抗マウスF(ab)₂-HRPの何れかを各ウェルに添加した。TMBをウェルに添加し、室温で5分間のインキュベーション後、反応を停止させ、HRP活性を450 nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した。図24Aに示すように、110/110Bも1121N (Ref-B) もVEGFR1-Fcに結合しないことが見出された。

【0288】

同様のセットのELISAにおいて、1121N (Ref-B)、110/110B、及びマウス抗ヒトVEGFR3 (10 µg/mlからの3倍希釈) をVEGFR3-Fc (R&D Systems) が固定化された96ウェルプレートのウェルに添加した。固定化VEGFR3-Fcに対する抗体の抗体への結合を検出するために、ヤギ抗ヒトF(ab)₂-HRP又はヤギ抗マウスF(ab)₂-HRPの何れかを各ウェルに添加した。TMBをウェルに添加し、室温で15分間のインキュベーション後、反応を停止させ、HRP活性を450 nmでの吸光度の増加をモニターすることによって測定した。図24Bに示されるように、110/110Bは、1121N (Ref-B) よりもヒトVEGFR3-Fcに対してより良好な結合活性を有することが見出された。

【0289】

VEGF-Cの主な機能の1つはリンパ脈管新生であり、ここでそれはLECの生存、増殖及び遊走を促進するためにVEGFR-3を介してリンパ管内皮細胞 (LEC) に作用する。実験は、VEGF-C誘導ヒトリンパ管内皮細胞 (HLEC) 増殖に対する抗体110/110Bの効果を決定するために実施された。HLEC (ScienCell; P5) をプレートから剥離し、遠心分離により収集し、内皮細胞培地 (ECM) (ScienCell; カタログ番号1001) に3×10⁴細胞/mlで再懸濁した。100 µlの細胞懸濁液を96ウェルプレートの各ウェルに播種した (すなわち、3000細胞/ウェルのカウントを達成するため)。約24時間後、HLECをPBSで1回洗浄し、70 µlの基底内皮細胞培地 (ECM-b) (ScienCell; カタログ番号1001-b) を各ウェルに添加した。1121 (Ref-B)、110/110B、Avastin (登録商標) の何れかを含み50 µlのECM-bをウェルに4×連続希釈で添加し (すなわち240 µg/mlから、これは80 µg/ml/ウェルの最終濃度を達成した)、37℃で30分間インキュベートした。2.5 µg/mlのVEGF-C (PeproTech、カタログ番号100-20C) 30 µlをウェルの半分に添加し (すなわち、500 ng/ウェルの最終濃度を達成するため)、プレートを37℃で5% CO₂ で約3日間 (72時間) インキュベートした。30 µlのMTS/PMS混合物 (MTS (テトラゾリウム化合物): Promega、カタログ番号G1112; PMS (電子カップリング試薬): Gene Labs、カタログ番号AC-A2212.0005) を各ウェルに添加し、プレートを37℃で3.5時間インキュベートした。ホルマザンへのMTSの変換は、代謝的に活性な細胞中に見出されるデヒドロゲナーゼ酵素によって達成される。490 nmの吸光度の量によって測定されたホルマザン生成物の量は、培養物中の生存細胞の数に正比例する。図25に示すように、1121N (Ref-B) 及び110/1

10

20

30

40

50

1 Bの両方が、VEGF-C誘導HEL増殖を阻害する。

【0290】

次に、VEGF-C刺激VEGFR2リン酸化に対する抗体110/110Bの効果を以下のように測定した。10cmディッシュ上に 1×10^6 個のHEL (Sciencell: P5)を播種し、内皮細胞培地 (ECM) (Sciencell; カタログ番号1001) 中で80-90%コンフルエンスまで増殖させた。次いで、培地をECM-b (Sciencell; カタログ番号1001-b) と置換し、37℃で一晩インキュベートした。抗体1121N (Ref-B) 又は110/110Bを2セットのディッシュに添加した。一セットのディッシュでは、 $0.288 \mu\text{g/ml}$ の抗体を添加して50mMの最終濃度を達成し、第2セットのディッシュでは、 $7.2 \mu\text{g/ml}$ の抗体を添加して2mMの最終濃度を達成した。 200mg/ml のVEGF-C (PeproTech; カタログ番号100-210C) を添加し、ディッシュを37℃で10分間インキュベートして、VEGFR2のリン酸化を刺激した。インキュベーション後、培地を吸引し、各ディッシュを冷たい1xPBSで1回洗浄した。PBSを廃棄後、各皿に300-400 μl の細胞溶解緩衝液 (Cell Signaling; カタログ番号9803S) を添加し、続いて1xHALTプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤カクテル (Pierce; カタログ番号PIE78440) 及び5mMの Na_3VO_4 を添加した。4℃で5分間のインキュベーション後、各ディッシュから各細胞溶解物を収集し、27G針を通して均質化した。ホモジナイズした細胞溶解物をチューブに移し、ドライアイス上で2回の凍結-解凍サイクルを行い、次いで14,000xgで4℃で15分間遠心分離した。上清を新しいチューブに移し、各チューブ中の全タンパク質濃度をBCA試薬 (Pierce; カタログ番号PIE23225) により測定した。

【0291】

150 μg の各溶解物を、以下のように実施される免疫沈降実験に使用した。抗体1121N (Ref-B) 5 μg を各溶解物に添加し、4℃で一晩傾斜回転させてインキュベートした。次に、樹脂Aを各抗体/溶解物混合物に添加し、4℃で2時間傾斜回転させてインキュベートした。次いで、各混合物をPierce Micro-A Pinカラム (Pierce; カタログ番号89879) に添加し、カラムを2000xgで1分間遠心分離した。次いで、カラムを500 μl の洗浄緩衝液 (0.02% PBST + 5mMの Na_3VO_4) で5回洗浄した。各樹脂A試料に10-15 μl の5x試料緩衝液を添加し、混合物を95℃で5分間煮沸した。各試料を回転させて樹脂Aをペレット化し、各試料を6%のSDS-PAGEゲル上で分離した。次いで、タンパク質を標準的な方法を用いてPVDF膜上に移した。移した後、膜を5%のBSA/PBSでブロックした。

【0292】

最初に、膜を1%のBSA/0.05% PBST中の1000x希釈マウス抗ホスホチロシン (4G10) (Millipore; カタログ番号05-1050) でプローブし、0.1%のPBST中で5分間3回洗浄した。次に、膜を0.05%のPBST中の1000xヤギ抗マウスIgG (H+L) を用いて室温で1時間プローブし、0.1%のPBST中で5分間3回洗浄した。ECLを添加し、抗ホスホチロシン抗体結合をX線フィルムにより検出した。

【0293】

膜を室温で15分間ストリッピング緩衝液 (Thermo; Cat # 21059) で剥離し、0.05%のPBSTで5分間洗浄した。次いで、膜を5%のBSA/PBSで再びブロックした。

【0294】

次に、膜を1%のBSA/0.05% PBST中の1000x希釈ウサギ抗VEGFR2 (55BB1) (Cell Signaling; カタログ番号2479) でプローブし、0.1%のPBST中で5分間3回洗浄した。次に、膜を0.05%のPBST中の1000xヤギ抗ウサギIgG (H+L) を用いて室温で1時間プローブし、0.1%のPBST中で5分間3回洗浄した。ECLを添加し、抗ホスホチロシン抗体結合をX線フィ

ルムにより検出した。

【0295】

図26Aに示すように、1121N (Ref B) 及び110/110Bの両方が、VEGF-C刺激VEGFR2リン酸化を阻害することができた。図26Aの定量結果を図26Bに示す。抗体1121N (Ref B) は、抗体110/110Bよりもより強くVEGFR2のリン酸化を阻害した。

【0296】

同様の実験が、VEGF-C刺激VEGFR3リン酸化に対する抗体110/110Bの効果を測定するために実施された。実験は、免疫沈降において5 µgの抗体1121N (Ref B) の代わりに1 µlのヤギ抗ヒトVEGFR3 (R&D; カタログ番号AF349) 又は3 µlのマウス抗VEGF3 (Millipore; カタログ番号MAB3757) を使用し; 抗体/VEGFR3複合体を沈殿させるためにプロテインG及びプロテインAビーズを使用し; リン酸化VEGF3をプローブするために、マウス抗VEGFR2の代わりに1000x希釈マウス抗VEGFR3 (Millipore; カタログ番号MAB3575) を使用して、上記のように実施した。図27Aに示すように、抗体1121N (Ref B) 及び抗体110/110Bの両方が、VEGF-C刺激VEGFR3リン酸化を阻害することができた。図27Aの定量結果を示す図27Bにおいて、低濃度の110/110Bは、低濃度の1121N (Ref B) よりもVEGFR3リン酸化に対するより良好な阻害効果を有することが示された。

【0297】

1121B (すなわち、Ref A)、1121N (すなわち、Ref B) 及びプラセボと比較して、クローン34/V9 (LC/HC)、109/109 (LC/HC)、110A/110A (LC/HC)、及び110B/110B (LC/HC) の治療有効性をアッセイするために、ヒトHCT-116 ヒト結腸がん腫瘍異種移植片を保有するマウスを用いた。簡潔には、ヒトHCT-116ヒト結腸がん細胞 (接種 = 1×10^6 個の細胞) を雌のBALB/cヌードマウスに移植した。マウスを無作為に7群に分けた。各群は、以下の表11に記載の投与計画の1つにより処置した:

10

20

表 11

群	動物	腫瘍	処置剤(抗体) (LC/HC)	用量	処置スケジュール
1	BALB/c NU 雌 6-7 週齢 4 匹のマウス ／群	HCT-116 接種=1 × 10 ⁶ 個の細胞	34/V9	100mg/kg	接種後 3 日 目; 3-4 週 間、1 週間に 2 回
2			109/109		
3			110A/110A		
4			110B/110B		
5			1121B (Ref A)		
6			1121N (Ref B)		
7			プラセボ	10ml/kg	

10

20

【0298】

処置の開始後46日目に、110B/110B(100mg/kg)で処置したマウスは、34/V9(LC/HC)109/109(LC/HC)、110A/110A(LC/HC)、121B(すなわちRef A)、1121N(すなわちRef B)、及びプラセボと比較して、腫瘍負荷の最大の減少を示した。110B/110B(100mg/kg)で処置したマウスは、109/109(LC/HC)、110A/110A(LC/HC)、121B(すなわち、Ref A)、及びプラセボで処置したマウスよりも腫瘍負荷のより大きな減少を示した。図21及び下記の表12を参照。

30

表 12

	TV ¹ (46 日 目)	RTV ² (46 日目)	TV/CV % ³ (46 日目)	TGI % ⁴ (46 日目)	TV のp値 ⁵ (46 日目)	
34/V9 (100 mg/kg)	1382	905%	84%	18%	3×10^{-2}	p<0.05*
109/109 (100 mg/kg)	1680	981%	102%	-2%	4×10^{-1}	p>0.05
110A/110A (100 mg/kg)	1538	908%	93%	8%	3×10^{-1}	p>0.05
110B/110B (100 mg/kg)	933	579%	56%	48%	3×10^{-3}	p<0.01**
1121B (Ref A) (100 mg/kg)	1553	912%	94%	7%	3×10^{-1}	p>0.05
1121N (Ref B) (100 mg/kg)	1223	787%	74%	29%	6×10^{-2}	p>0.05
プラセボ	1654	989%	-	-	-	-

¹TV : 腫瘍体積²RTV : 最初に対する腫瘍体積³TV/CV% : 処置群の体積/対照群の体積⁴TGI% : 腫瘍増殖阻害率 = $1 - (T_{46} - T_0) / (C_{46} - C_0) \%$ ⁵p 値 : <0.05 = * <0.01 = ** <0.001 = ***

【 0 2 9 9 】

表 1 1 に記載される異種移植実験からの更なるデータが本明細書に提供される。図 2 2 及び下記の表 1 3 に示すように、処置の開始後 4 2 日目に、1 1 0 B / 1 1 0 B (1 0 0 m g / k g) で処置したマウスは、3 4 / V 9 (L C / H C) 1 0 9 / 1 0 9 (L C / H C) 、 1 1 0 A / 1 1 0 A (L C / H C) 、 1 2 1 B (すなわち R e f A) 、 1 1 2 1 N (すなわち R e f B) 、 及びプラセボと比較して、腫瘍負荷の最大の減少を示した。

1 1 0 B / 1 1 0 B (1 0 0 m g / k g) で処置したマウスは、1 0 9 / 1 0 9 (L C / H C) 、 1 1 0 A / 1 1 0 A (L C / H C) 、 1 2 1 B (すなわち、R e f A) 、 及びプラセボで処置したマウスよりも腫瘍負荷のより大きな減少を示した。

表 13

	TV ¹ (42 日 目)	RTV ² (42 日目)	TV/CV % ³ (42 日目)	TGI % ⁴ (42 日目)	TV のp値 ⁵ (42 日目)	
34/V9 (100 mg/kg)	1221	803%	87%	15%	9×10^{-2}	p>0.05
109/109 (100 mg/kg)	1435	833%	102%	-2%	4×10^{-1}	p>0.05
110A/110A (100 mg/kg)	1403	832%	100%	0%	5×10^{-1}	p>0.05
110B/110B (100 mg/kg)	858	525%	61%	44%	8×10^{-3}	p<0.01**
1121B (Ref A) (100 mg/kg)	1404	838%	100%	0%	5×10^{-1}	p>0.05
1121N (Ref B) (100 mg/kg)	1055	660%	75%	29%	4×10^{-2}	p<0.05*
プラセボ	1407	841%	—	—		—

¹TV : 腫瘍体積²RTV : 最初に対する腫瘍体積³TV/CV% : 処置群の体積/対照群の体積⁴TGI% : 腫瘍増殖阻害率 = $1 - (T42 - T0) / (C42 - C0) \%$ ⁵p 値 : <0.05 = * <0.01 = ** <0.001 = ***

【 0 3 0 0 】

抗体 3 4 / V 9 及び抗体 1 1 0 / 1 1 0 B (すなわち、下の表 1 4 に記載の F 1 - F 4) の 4 つの製剤を、表 1 5 に記載の濃度で調製し、試験し、- 8 0 °C 又は 4 0 °C の何れかで 2 週間保存した。

表 14

	緩衝液	賦形剤	PH
F1	10mM のヒスチジン	75mM の NaCl、1%のグリシン、2%のスクロース、0.02% の Tween 80	6
F2	10mM のクエン酸塩	75mM の NaCl、2%のグリシン、2%のスクロース、0.02% の Tween 80	6
F3	10mM の酢酸塩	75mM の NaCl、2%のグリシン、2%のスクロース、0.02% の Tween 80	6
F4	10mM のリン酸塩	75mM の NaCl、1%のグリシン、2%のスクロース、0.02% の Tween 80	6

表 15

抗体	製剤	濃度(μ g/ml)	保存温度
34/V9 (LC/HC)	F1	1974	-80°C
	F1	1527	40°C
	F2	2441	-80°C
	F2	2677	40°C
	F3	1358	-80°C
	F3	1669	40°C
	F4	2033	-80°C
	F4	2225	40°C
110/110B (LC/HC)	F1	1734	-80°C
	F1	1797	40°C
	F2	2172	-80°C
	F2	2773	40°C
	F3	2150	-80°C
	F3	2306	40°C
	F4	2124	-80°C
	F4	2381	40°C

【0301】

次いで、各保存条件下の各製剤からの抗体の試料を、還元条件下及び非還元条件下の両方で電気泳動によって分析した。図23Aに示すように、抗体34/V9の安定性は、F2製剤で最も高かった。34/V9の安定性は、F3及びF4においてほぼ同等であり、34/V9はF1において最も安定でなかった。抗体110/110Bについても同じ結果が見られた。図23Bを参照。

【0302】

ヒトNCI-H460非小細胞肺癌(NSCLC)腫瘍異種移植片を保有するマウスを、プラセボと比較して110B/110Bの治療有効性をアッセイするために使用した。簡潔には、ヒトNCI-H460 NSCLC細胞(接種=3×10⁶個の細胞)を雌のBALB/cヌードマウスに移植した。マウスを無作為に4群に分けた。各群は、以下の表16に記載の投与計画の1つにより処置した：

表 16

群	動物	腫瘍	処置剤(抗体) (LC/HC)	用量	処置スケジュール
1	BALB/c NU 雌 ~6-7 週齢 ~3-4 匹のマ ウス/群	NCI-H460 接種=3×10 ⁶ 個の細胞	110B/110B	100mg/kg	接種後 4 日 目; 3 週間、1 週間に 2 回
2				50 mg/kg	
3				25 mg/kg	
4			プラセボ	10 ml/kg	

10

【0303】

処置の開始後 21 日目に、110/110B (100 mg/kg) で処置したマウスは、110/110B (50 mg/kg)、110/110B (25 mg/kg) 及びプラセボで処置したマウスと比較して、腫瘍負荷の最大の減少を示した。図 28 及び下記の表 17 を参照。

20

表 17

	TV ¹ (21 日 目)	RTV ² (21 日目)	TV/CV % ³ (21 日目)	TGI % ⁴ (21 日目)	TV のp値 ⁵ (21 日目)	
100/100B (100 mg/kg)	893	1181%	58%	42%	0.015	p>0.05
100/100B (50 mg/kg)	1425	1406%	93%	6%	0.392	p>0.05
100/100B (25 mg/kg)	1606	1121%	105%	-4%	0.397	0.392
プラセボ	1529	1302%	-	-		-

30

40

¹TV : 腫瘍体積²RTV : 最初に対する腫瘍体積³TV/CV% : 処置群の体積/対照群の体積⁴TGI% : 腫瘍増殖阻害率 = 1 - (T42-T0)/(C42-C0)%⁵p 値 : <0.05 = * <0.01 = ** <0.001 = ***

【0304】

前述の実施例は、説明の目的でのみ提供されており、決して本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に示され記載されたものに加えて、本発明の様々な改変は、前述の説明から当業者には明らかであり、添付の特許請求の範囲に含まれる。

【0305】

50

実施態様の一覧

1. 抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 の V E G F への結合をブロックしない、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。
2. 抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 のドメイン 5-7 に結合する、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。
3. 抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 の V E G F への結合をブロックせず、かつ抗体又はその抗原結合断片が V E G F R 2 のドメイン 5-7 に結合する、抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。 10
4. 抗体が全 H U V E C 細胞に結合する、実施態様 1-3 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。
5. 抗体又はその抗原結合断片がインビトロで血管新生を阻害しない、実施態様 1-4 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。
6. 抗体又はその抗原結合断片がインビボで血管新生を阻害する、実施態様 1-4 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。 20
7. 抗体又はその抗原結合断片がインビトロで血管新生を阻害せず、かつ抗体又はその抗原結合断片がインビボで血管新生を阻害する、実施態様 1-4 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。
8. (1) アミノ酸配列 R A S Q N I A S Y L N (配列番号 76) 又は R A S Q S V S - S / N - S / N - Y L - G / A (配列番号 83) 又は T R S R G S I A S S Y V Q (配列番号 80) 又は R S S Q S L - L / V / Y - H / Y - G / S / R - D / N - G - N / K / Y - N / T - Y / F - L D (配列番号 84) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L / A / G / K / E - G / A / V / N / S - S / D - N / S / Q / K - R / L - A / K / D / P - S / T (配列番号 60) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M / Q - Q / S - A / S / R / G / Y - L / Y / S / A / D / G / T - Q / S / N / H / F - T / I / W / S - P / T - Y / L / P / V / G / I - T / V (配列番号 72) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 T / S - Y - Y / G / A / S - M / I - H / N / S (配列番号 34) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I / V / G / S - I - N / S / I - P / Y / S / G - S / D / I - G / F / S - G / S - S / N / T / Y / A - T / K / A / I - S / Y / N / H - Y A - Q / D - K / S - F / V - K / Q - G (配列番号 40) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 G L W F G E G Y (配列番号 49) 又は E S Y G G Q F D Y (配列番号 43) 又は D L V V P A A T L D Y (配列番号 42) 又は D / G - F / I - Y / I - E / V - A / G - G / P - G / T - W / D - Y / A - F D - L / I (配列番号 51) 又は R D G S L G V G Y Y Y M D F (配列番号 50) 又は V G A T T S L Y Y Y Y G M D V (配列番号 47) 又は D G F G L A V A G P Y W Y F D L (配列番号 44) 又は P T R S R D F W S G L G Y Y Y Y M D V (配列番号 45) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) 抗体又はその抗原結合断片。 30 40
9. 軽鎖可変ドメイン配列が、(1) 配列番号 75-82 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ; (2) 配列番号 54-59 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ; 及び (3) 配列番号 63-71 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) 配列番号 50

29-33及び85からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H1；(2) 配列番号35-39及び125からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び(3) 配列番号42-50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、実施態様8に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

10.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RSSQSLLHGNGNNYLD (配列番号75) を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列LGSNRAS (配列番号54) を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列MQALQTPYT (配列番号63) を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列TYMH (配列番号29) を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列IINPSGGSTSYAQKFQG (配列番号36) を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列DLVVPAAATLDY (配列番号42) を含むCDR-H3を含む、実施態様1又は2に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

10

11.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RASQNIASYN (配列番号76) を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列AASSLKS (配列番号55) を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列QQSYSHIPYT (配列番号64) を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYGMH (配列番号30) を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列VISYDGSNKYYADSVKG (配列番号37) を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列ESYGGQFDY (配列番号43) を含むCDR-H3を含む、実施態様8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

20

12.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RASQSVSNLYLG (配列番号77) を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列GASSRAT (配列番号56) を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列QQRSNWPLT (配列番号65) を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYAMH (配列番号31) を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列VISYDGSNKYYADSVKG (配列番号37) を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列DGFGLAVAGPYWYFDL (配列番号44) を含むCDR-H3を含む、実施態様8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

30

13.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RSSQSLVYS DGKTYLD (配列番号78) を含むCDR-L1；(2) アミノ酸配列KVSNRDS (配列番号57) を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列MQGAHWPT (配列番号66) を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYAIS (配列番号85) を含むCDR-H1；(2) アミノ酸配列GIIPIFGTANYAQKFQG (配列番号38) を含むCDR-H2；及び(3) アミノ酸配列PTRSRDFWSGLGYYYMDV (配列番号45) を含むCDR-H3を含む、実施態様8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

40

14.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列RASQSVSSSYLA (配列番号79) を含むCDR-L1；(2) GASSRAT (配列番号56) と記載されるアミノ酸配列を含むCDR-L2；及び(3) アミノ酸配列QQRSNWPT (配列番号67) を含むCDR-L3を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列SYGMH (配列番号30) を含むCDR-H1；(2) VISYDGSNKHYYADSVKG (配列番号125) と記載されるアミノ酸配列を含むCDR-H2；及び(3) DFYEAGGWYFDL (配列番号46) と記載されるアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、実施態様8又は9に記載の抗VEGFR2抗体又はその抗原結合断片。

15.

50

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 T R S R G S I A S S Y V Q (配列番号 80) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 E N D Q R P S (配列番号 58) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 Q S Y D F S T V V (配列番号 68) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 S Y A I S (配列番号 85) を含む C D R - H 1 ; (2) G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号 38) と記載されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 V G A T T S L Y Y Y Y G M D V (配列番号 47) を含む C D R - H 3 を含む、実施態様 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

16.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 R A S Q S V S S S Y L A (配列番号 79) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 G A S S R A T (配列番号 56) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 Q Q Y G S S P G T (配列番号 69) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 S Y S M N (配列番号 28) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 S I S S S S S Y I Y Y A D S V K G (配列番号 35) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 G I I V G P T D A F D I (配列番号 48) を含む C D R - H 3 を含む、実施態様 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

17.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 R S S Q S L Y Y R D G Y T F L D (配列番号 81) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L S S K R D S (配列番号 59) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M Q G T H W P Y T (配列番号 70) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 T Y A M S (配列番号 33) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 G I S G S G G A T H Y A D S V K G (配列番号 39) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 G L W F G E G Y (配列番号 49) を含む C D R - H 3 を含む、実施態様 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

18.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 R S S Q S L L Y S N G Y N Y L D (配列番号 82) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L G S N R A S (配列番号 54) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M Q A L Q T P I T (配列番号 71) を含む C D R - L 3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 S Y A I S (配列番号 85) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G (配列番号 38) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 R D G S L G V G Y Y Y M D F (配列番号 50) を含む C D R - H 3 を含む、実施態様 8 又は 9 に記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

19.

(1) アミノ酸配列 Q S L Y Y R - D / S - G Y T F (配列番号 22) を含む C D R - L 1 ; (2) アミノ酸配列 L / Q / R - S S (配列番号 23) を含む C D R - L 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 M / L / F - Q G T H W P Y T (配列番号 24) を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びに (1) アミノ酸配列 G / R - F - S / T / P - F S T Y A (配列番号 25) を含む C D R - H 1 ; (2) アミノ酸配列 I - S / N - G - S / N - G / S - G / Q - A / T - T (配列番号 26) を含む C D R - H 2 ; 及び (3) アミノ酸配列 K G L W F G E G - Y / L / I (配列番号 27) を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む抗血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) 抗体又は抗 V E G F R 2 抗体の変異体である抗原結合断片であって、変異体が、配列番号 22、23、24、25、26、及び／又は 27 の 1 つ又は複数において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (V E G F R 2) 抗体又は抗 V E G F R 2 抗体の変異体である抗原結合断片。

20.

第 2 の抗 V E G F R 2 抗体の V E G F R 2 への結合を競合的に阻害する抗血管内皮増殖

10

20

30

40

50

因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片であって、第 2 の抗 VEGFR2 抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYR-D/S-GYTF (配列番号 22) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 L/Q/R-SS (配列番号 23) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 M/L/F-QGTHWPYT (配列番号 24) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) アミノ酸配列 G/R-F-S/T/P-FSTYA (配列番号 25) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T (配列番号 26) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEG-Y/L/I (配列番号 27) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片。

10

21.

VEGFR2 に対する第 2 の抗 VEGFR2 抗体と同じ VEGFR2 のエピトープに特異的に結合する抗血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片であって、第 2 の抗 VEGFR2 抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYR-D/S-GYTF (配列番号 22) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 L/Q/R-SS (配列番号 23) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 M/L/F-QGTHWPYT (配列番号 24) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) アミノ酸配列 G/R-F-S/T/P-FSTYA (配列番号 25) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T (配列番号 26) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEG-Y/L/I (配列番号 27) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、抗血管内皮増殖因子受容体 2 (VEGFR2) 抗体又はその抗原結合断片。

20

22.

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYR-D/S-GYTF (配列番号 22) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 L/Q/R-SS (配列番号 23) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 M/L/F-QGTHWPYT (配列番号 24) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) アミノ酸配列 G/R-F-S/T/P-FSTYA (配列番号 25) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 I-S/N-G-S/N-G/S-G/Q-A/T-T (配列番号 26) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEG-Y/L/I (配列番号 27) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含み、変異体が、配列番号 22、23、24、25、26、及び/又は 27 の 1 つ又は複数において少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、実施態様 20 又は 21 に記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

30

23.

抗体が、(1) 配列番号 1 及び 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-L1; (2) 配列番号 2、7、及び 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-L2; 及び (3) 配列番号 3、9、及び 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列; 並びに (1) 配列番号 4、13、14、及び 15 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H1; (2) 配列番号 5、7、17、18、19、20、及び 21 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H2; 及び (3) 配列番号 6、10、及び 11 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 20-22 の何れかに記載の抗 VEGFR2 抗体又はその抗原結合断片。

40

24.

軽鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1; (2) アミノ酸配列 LSS (配列番号 2) を含む CDR-L2; 及び (3) アミノ酸配列 MQGTHWPYT (配列番号 3) を含む CDR-L3 を含み、かつ、重鎖可変ドメイン配列が、(1) アミノ酸配列 GFSFSSTYA (配列番号 4) を含む CDR-H1; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含

50

む、実施態様 20-22 の何れかーに記載の抗 VEGFR 2 抗体又はその抗原結合断片。
25.

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 MQGTHWPYT (配列番号 3) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 20-22 の何れかーに記載の抗 VEGFR 2 抗体又はその抗原結合断片。

10

26.

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 LQGTHWPYT (配列番号 9) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 10) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 20-22 の何れかーに記載の抗 VEGFR 2 抗体又はその抗原結合断片。

20

27.

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 FQGTHWPYT (配列番号 12) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 20-22 の何れかーに記載の抗 VEGFR 2 抗体又はその抗原結合断片。

28.

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRDGYTF (配列番号 1) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 LQGTHWPYT (配列番号 9) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 GFSFSITYA (配列番号 4) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGGAT (配列番号 5) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 20-22 の何れかーに記載の抗 VEGFR 2 抗体又はその抗原結合断片。

30

29.

抗体が、(1) アミノ酸配列 QSLYYRSGYTF (配列番号 16) を含む CDR-L1 ; (2) アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及び (3) アミノ酸配列 MQGTHWPYT (配列番号 3) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びに (1) アミノ酸配列 RFSFSITYA (配列番号 15) を含む CDR-H1 ; (2) アミノ酸配列 ISGSGQAT (配列番号 20) を含む CDR-H2 ; 及び (3) アミノ酸配列 KGLWFGEGY (配列番号 6) を含む CDR-H3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 20-22 の何れかーに記載の抗 VEGFR 2 抗体又はその抗原結合断片。

40

30.

抗体が、アミノ酸配列 QSLYYRSGYTF (配列番号 16) を含む CDR-L1 ; アミノ酸配列 QSS (配列番号 7) を含む CDR-L2 ; 及びアミノ酸配列 FQGTHWPYT (配列番号 12) を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変ドメイン配列 ; 並びにアミノ

50

酸配列 G F S F S T Y A（配列番号 4）を含む C D R－H 1；アミノ酸配列 I S G S G G T T（配列番号 2 1）を含む C D R－H 2；及びアミノ酸配列 K G L W F G E G Y（配列番号 6）を含む C D R－H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 2 0－2 2 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

3 1．

抗体が、アミノ酸配列 Q S L Y Y R S G Y T F（配列番号 1 6）を含む C D R－L 1；アミノ酸配列 Q S S（配列番号 7）を含む C D R－L 2；及びアミノ酸配列 F Q G T H W P Y T（配列番号 1 2）を含む C D R－L 3 を含む軽鎖可変ドメイン配列；並びにアミノ酸配列 G F S F S T Y A（配列番号 4）を含む C D R－H 1；アミノ酸配列 I S G S G G T T（配列番号 2 1）を含む C D R－H 2；及びアミノ酸配列 K G L W F G E G L（配列番号 1 0）を含む C D R－H 3 を含む重鎖可変ドメイン配列を含む、実施態様 2 0－2 2 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

10

3 2．

抗体がヒト I g G の F c 配列を含む、実施態様 1－3 1 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

3 3．

抗原結合断片が、F a b、F a b'、F（a b）' 2、一本鎖 F v（s c F v）、F v 断片、ダイアボディ、及び直鎖状抗体からなる群から選択される、実施態様 1－3 2 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体の抗原結合断片。

3 4．

抗体が多重特異性抗体である、実施態様 1－3 3 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体。

20

3 5．

治療剤にコンジュゲートしている、実施態様 1－3 4 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

3 6．

標識にコンジュゲートしている、実施態様 1－3 4 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片。

3 7．

標識が、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される、実施態様 3 6 に記載の抗 V E G F R 2 抗体。

30

3 8．

実施態様 1－3 4 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離された核酸分子。

3 9．

実施態様 3 8 に記載の核酸分子をコードする発現ベクター。

4 0．

実施態様 3 9 に記載の発現ベクターを含む細胞。

4 1．

実施態様 4 0 に記載の細胞を培養すること、及び細胞培養物から抗 V E G F R 2 抗体を回収することを含む、抗 V E G F R 2 抗体を産生する方法。

40

4 2．

実施態様 1－3 5 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片及び薬学的に許容される担体を含む組成物。

4 3．

実施態様 1－3 4 及び 3 6－3 7 の何れかーに記載の抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片を試料に接触させること、及び V E G F R 2 タンパク質に結合した抗 V E G F R 2 抗体を検出することにより、患者からの試料中の V E G F R 2 タンパク質を検出する方法。

4 4．

50

抗 V E G F R 2 抗体又はその抗原結合断片が免疫組織化学アッセイ (I H C) 又は E L I S A アッセイで使用される、実施態様 4 3 に記載の方法。

4 5 .

実施態様 4 2 に記載の組成物の有効量を被験体に投与することを含む、被験体における過剰な血管新生を特徴とする病的状態を治療する方法。

4 6 .

過剰な血管新生を特徴とする病的状態が、がん、眼疾患、又は炎症からなる群から選択される、実施態様 4 5 に記載の方法。

4 7 .

過剰な血管新生を特徴とする病的状態ががんである、実施態様 4 6 に記載の方法。

4 8 .

がんが、結腸がん、結腸直腸がん、胃がん、胃食道がん、膀胱がん、肺がん、又は固形腫瘍である、実施態様 4 7 に記載の方法。

4 9 .

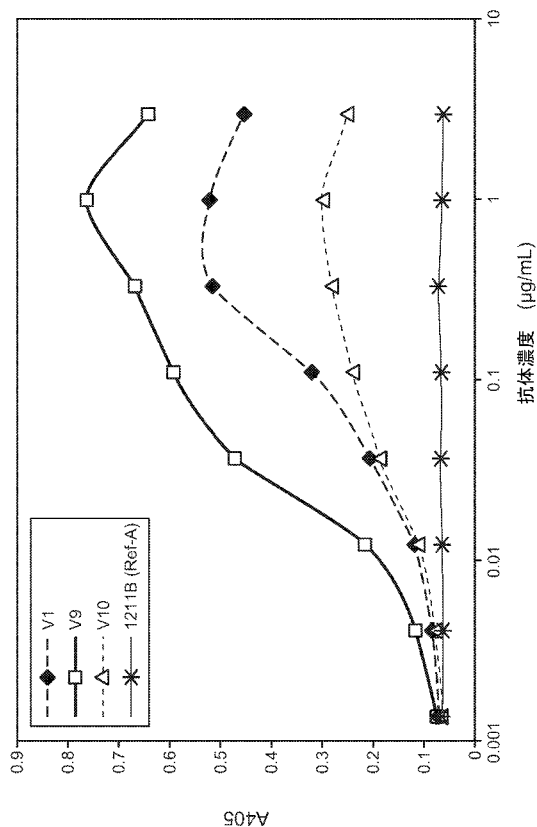
がんが肺がんであり、かつ、該肺がんが非小細胞肺がん (N S C L C) である、実施態様 4 8 に記載の方法。

5 0 .

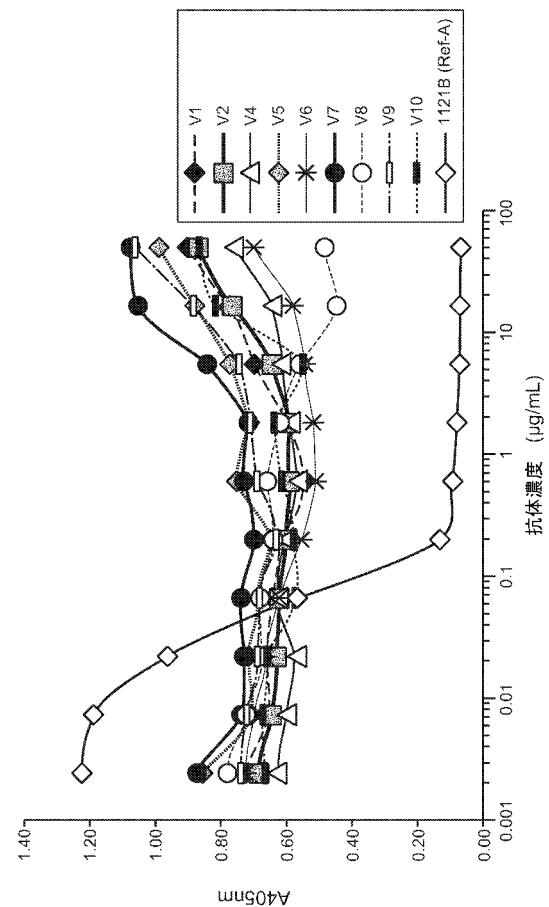
被験体が、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、及び細胞傷害性剤からなる群から選択される治療剤を更に投与される、実施態様 4 5 - 4 9 に記載の方法。

10

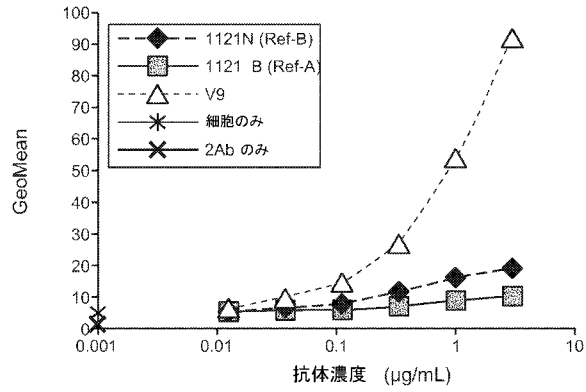
【図 1】



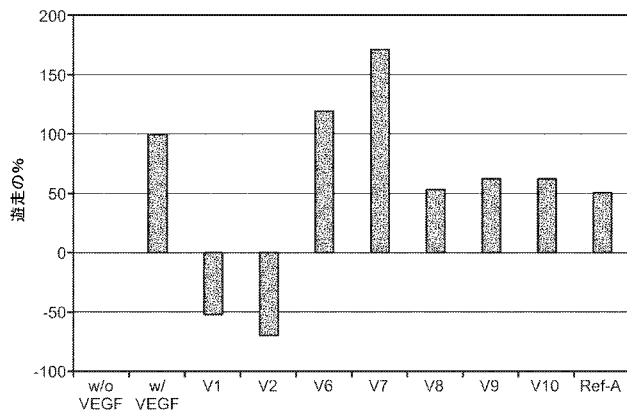
【図 2】



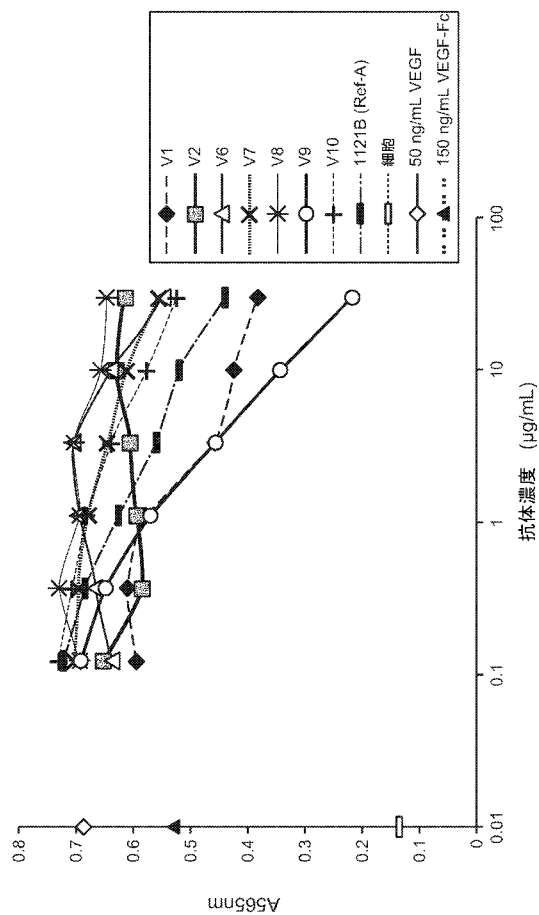
【図 3】



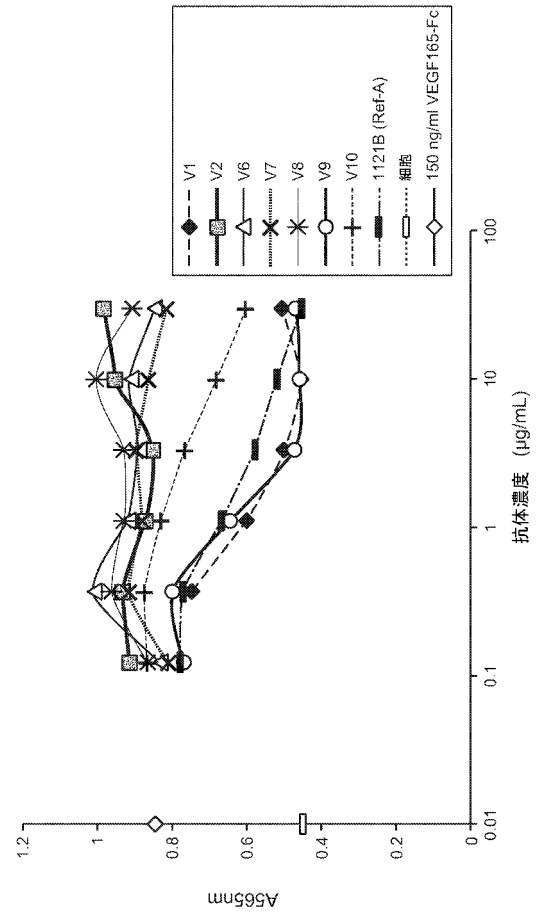
【図 4】



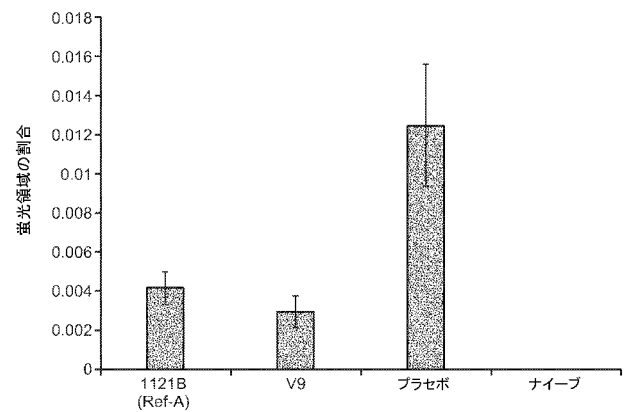
【図 6】



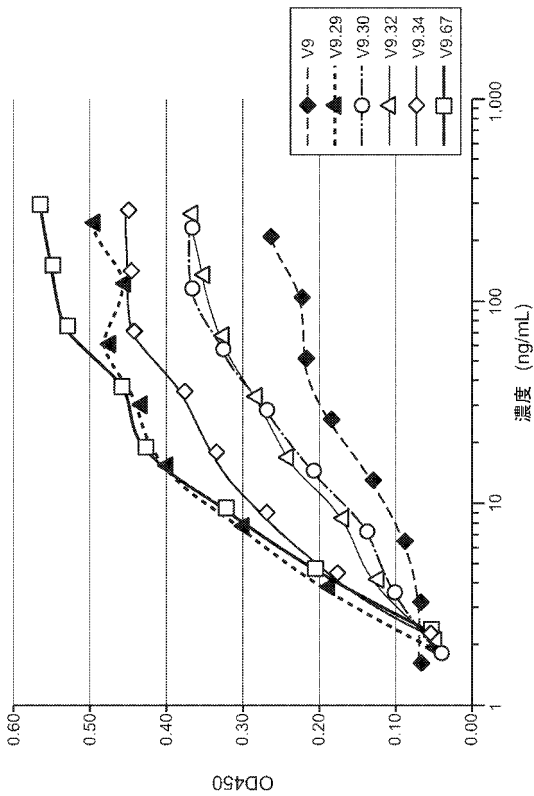
【図 5】



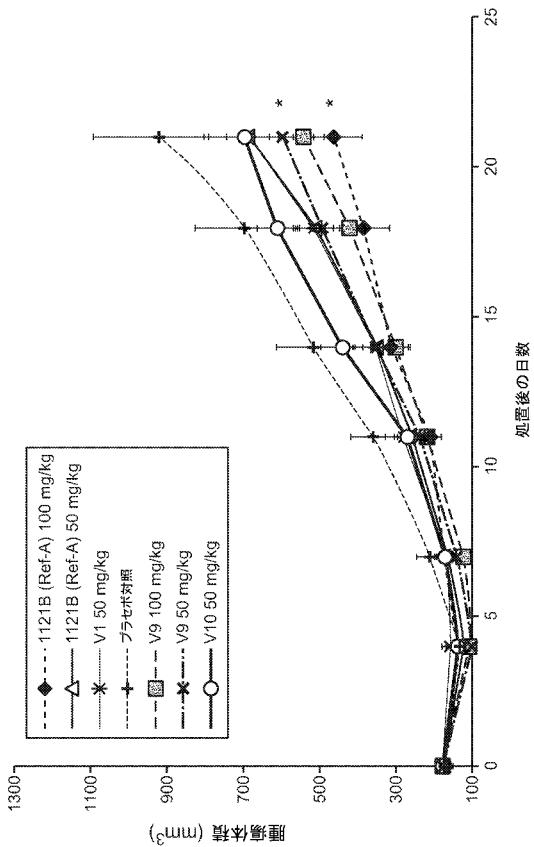
【図 7】



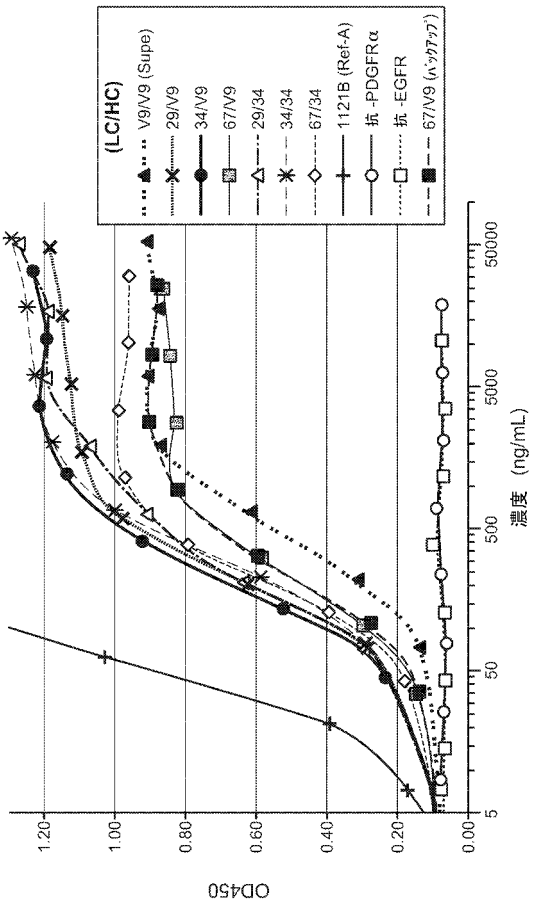
【図6】



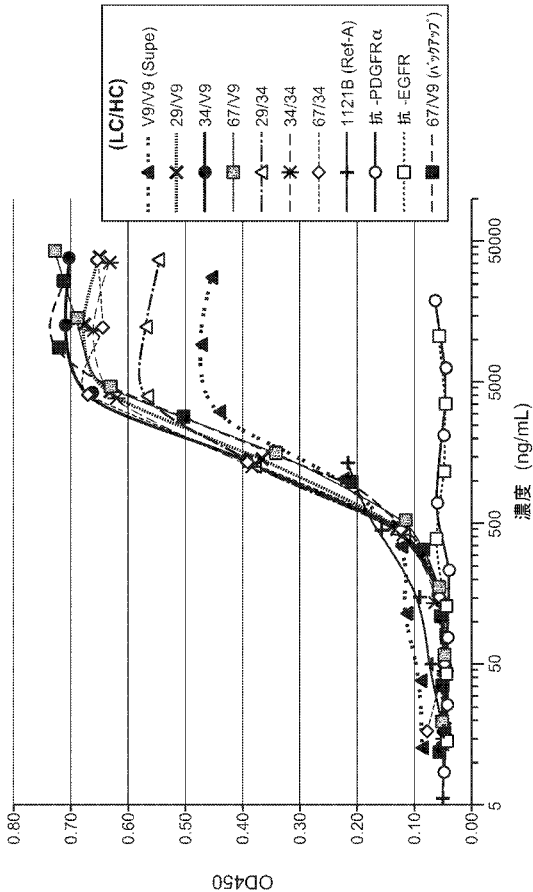
【図8】



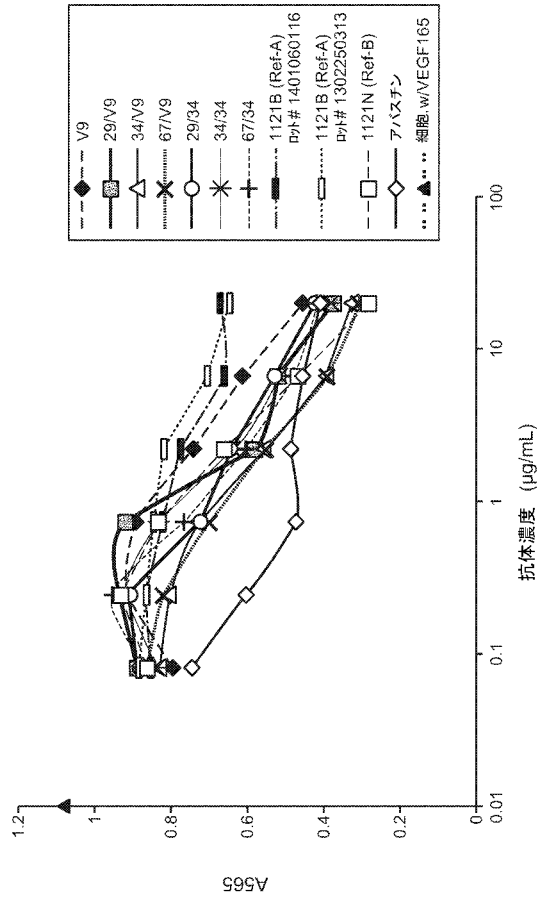
【図10B】



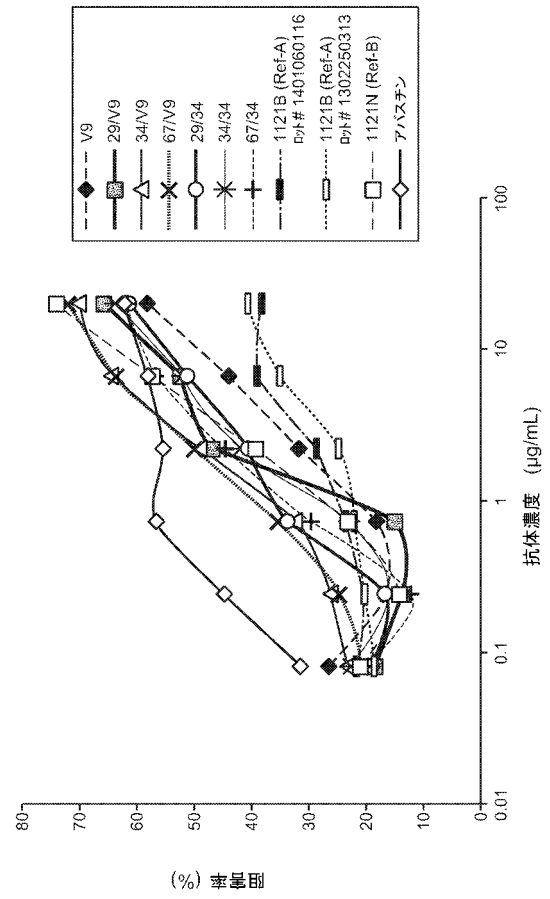
【図10A】



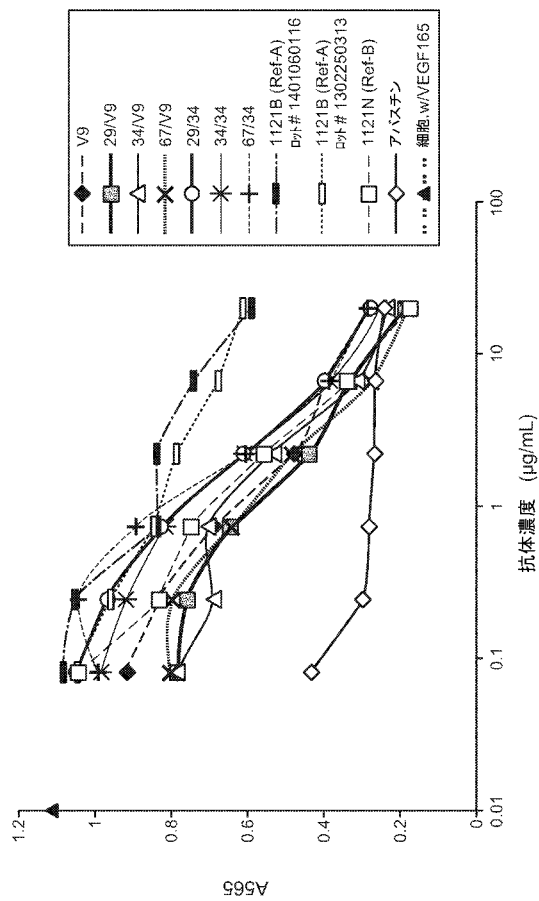
【図 1 1 A】



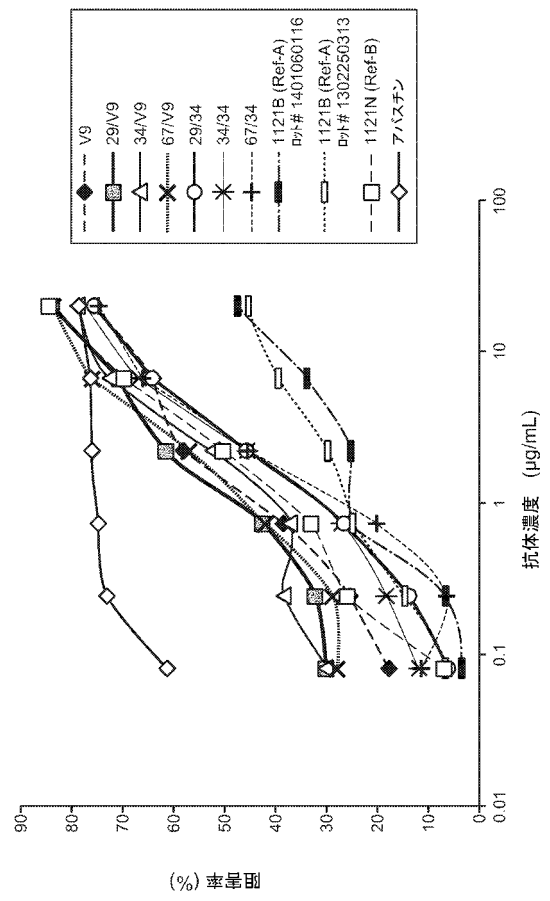
【図 1 1 B】



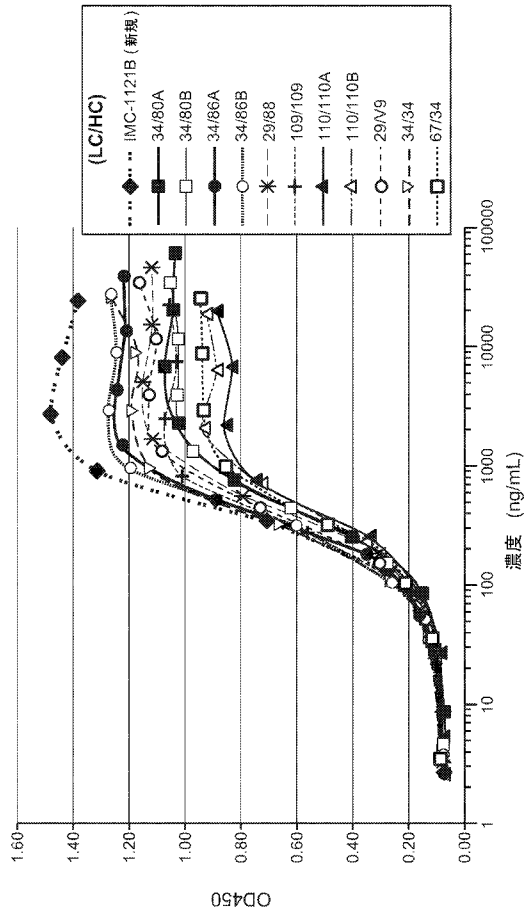
【図 1 2 A】



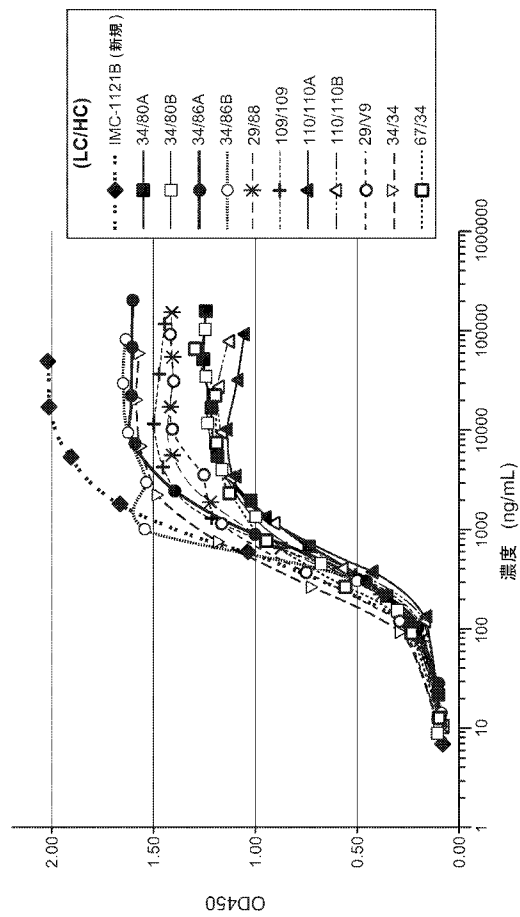
【図 1 2 B】



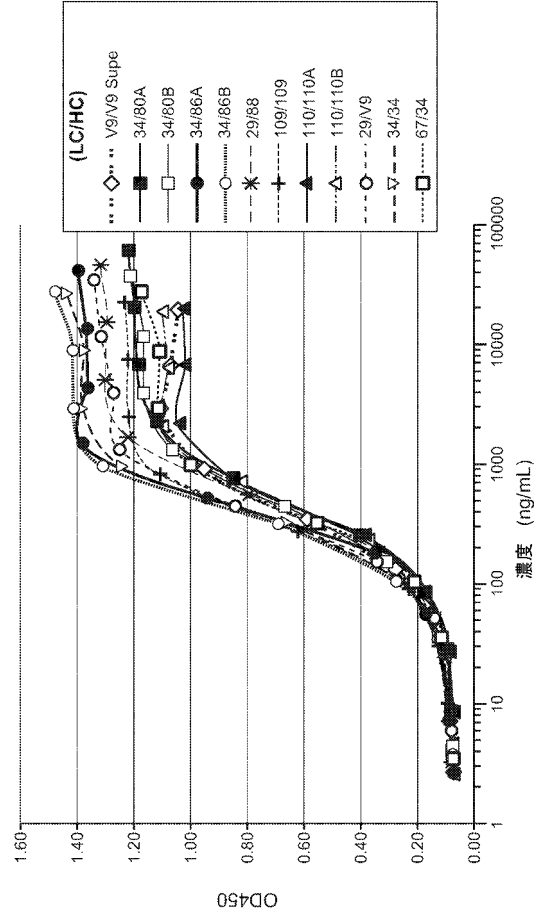
【図 13 A】



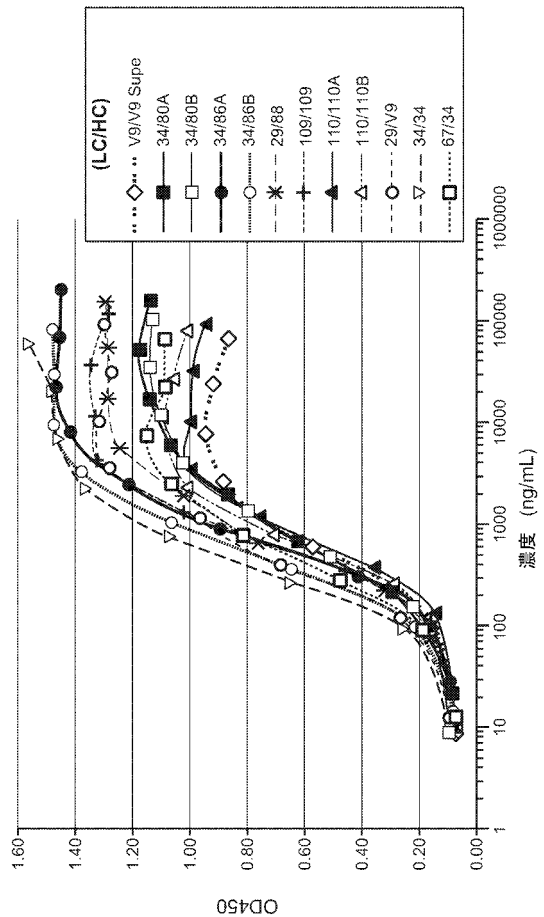
【図 13 C】



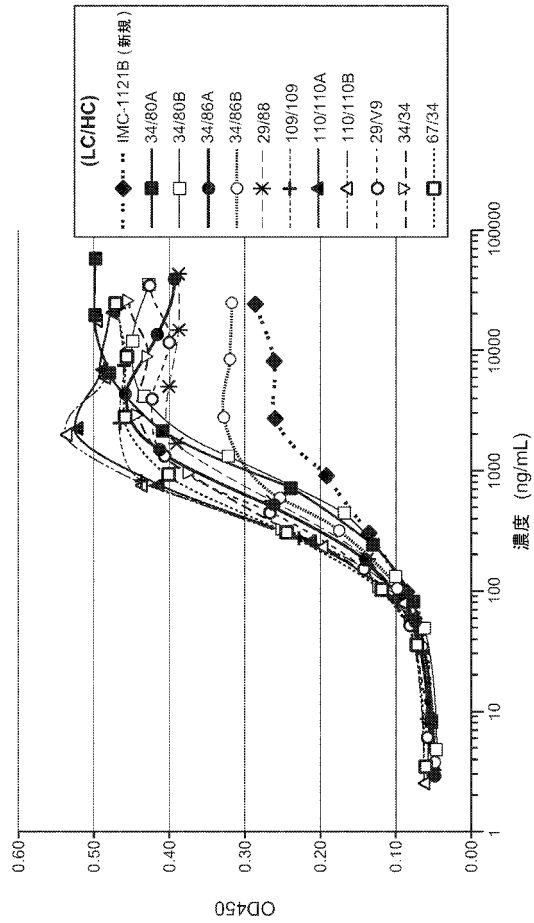
【図 13 B】



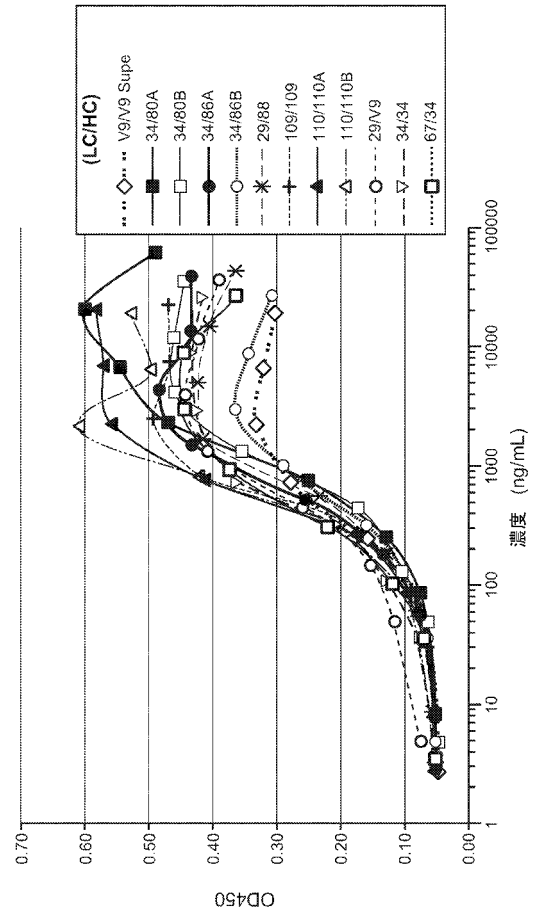
【図 13 D】



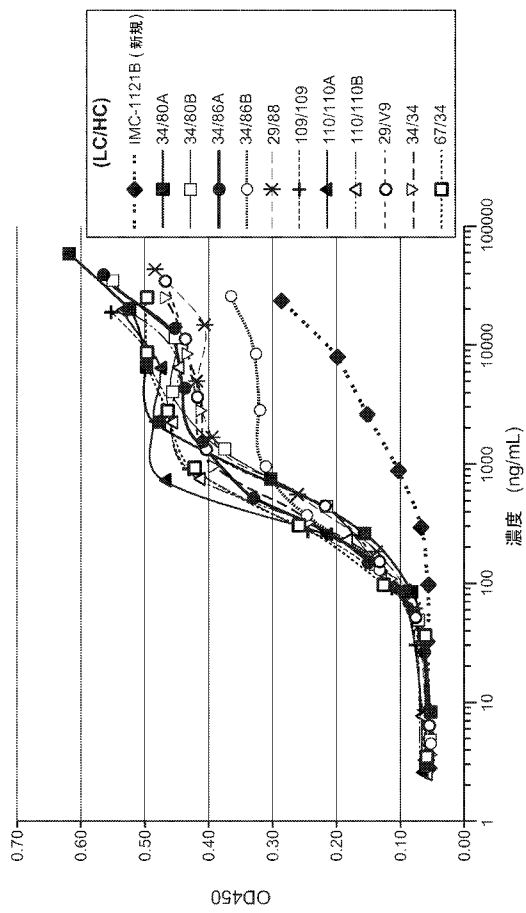
【図 14 A】



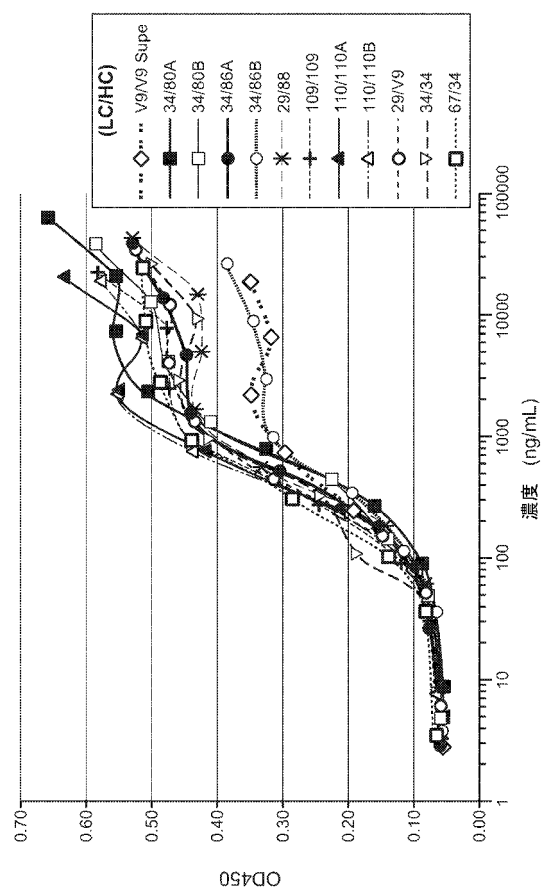
【図 14 B】



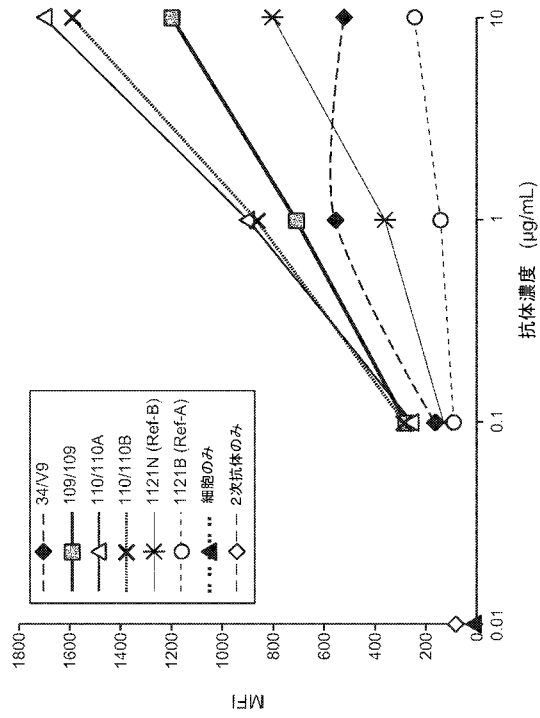
【図 14 C】



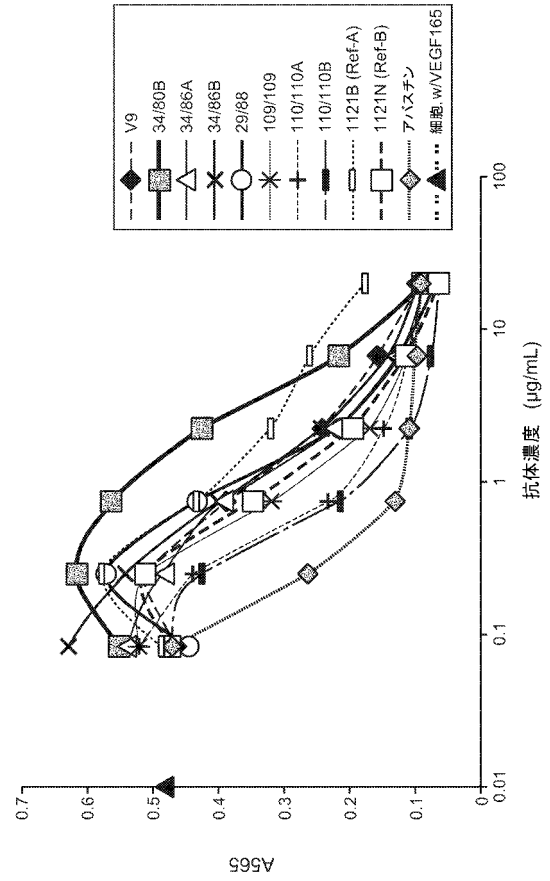
【図 14 D】



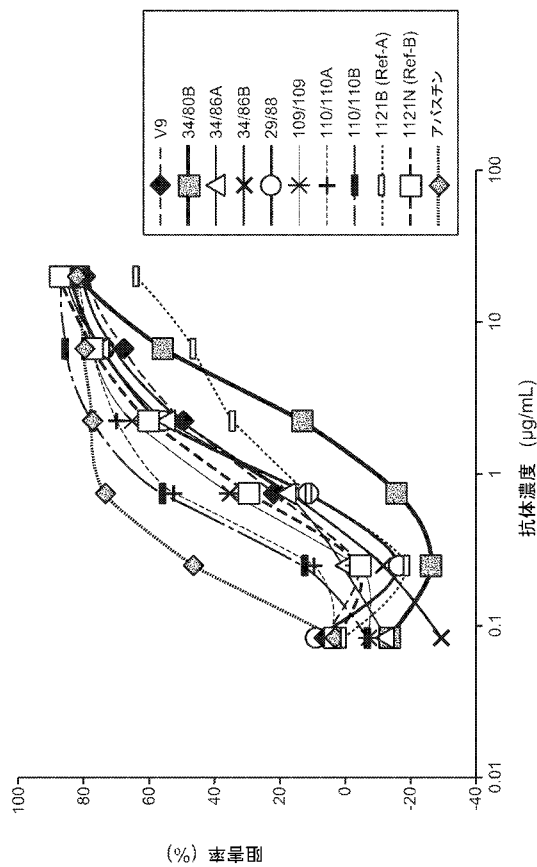
【図 15】



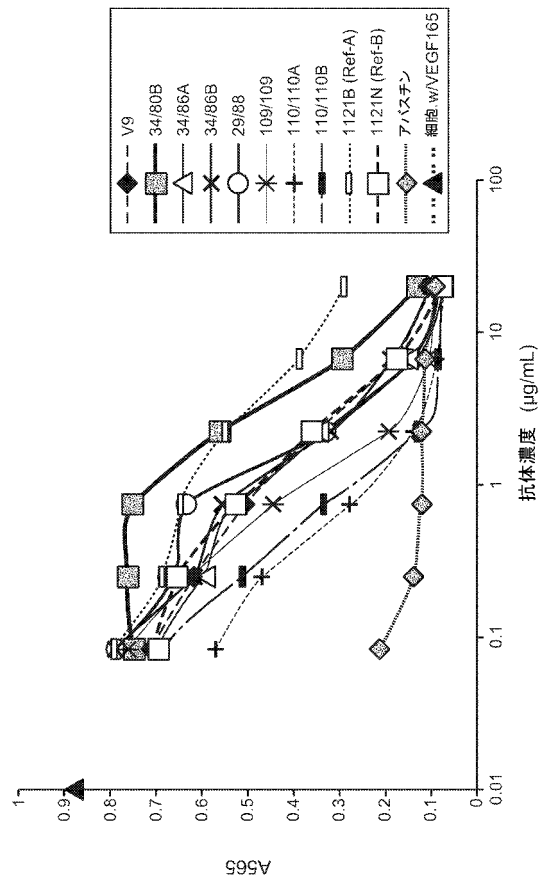
【図 16 A】



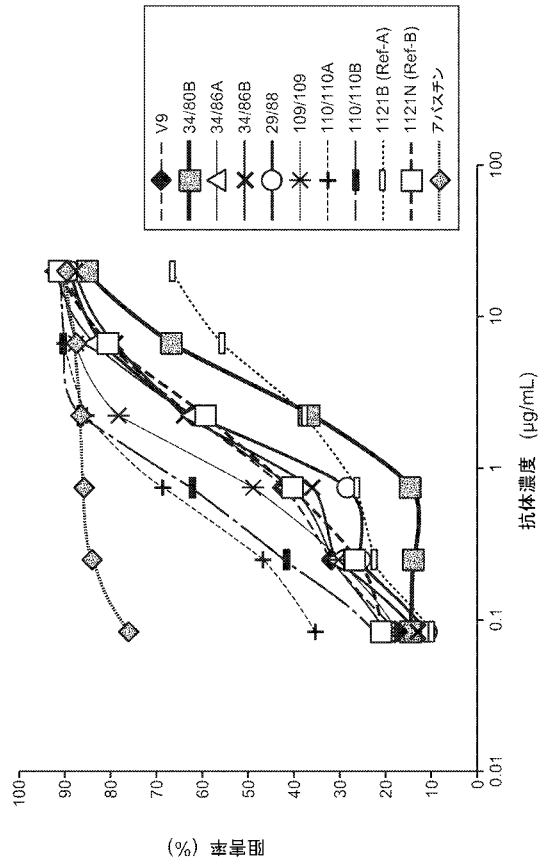
【図 16 B】



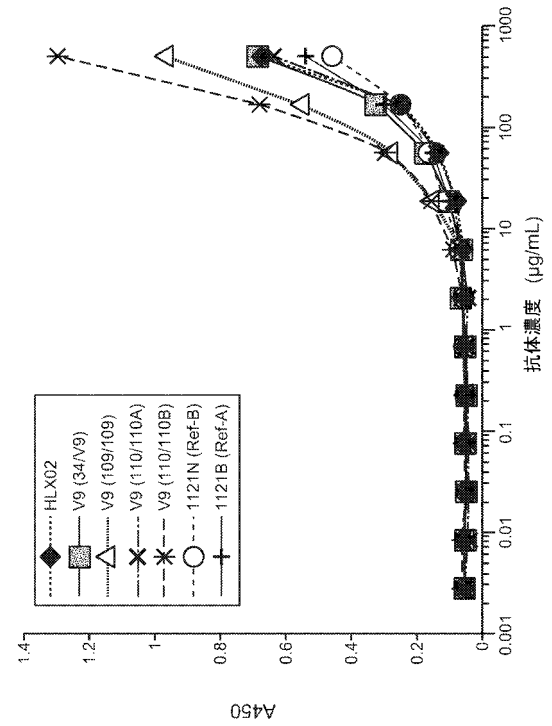
【図 17 A】



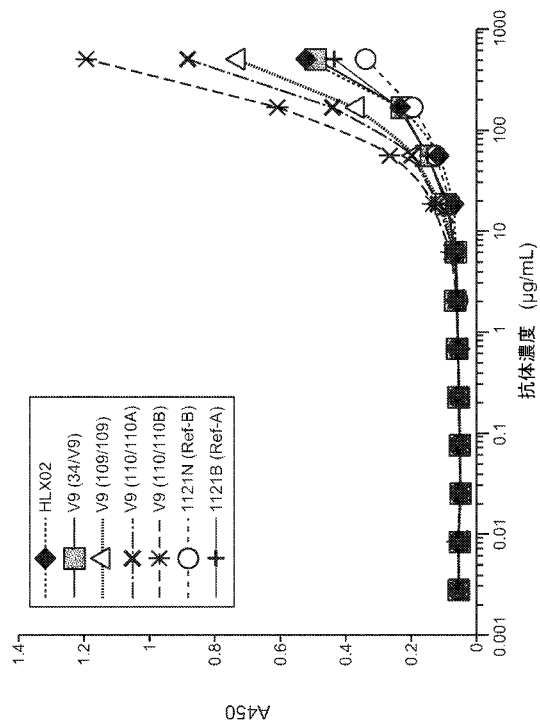
【図 17 B】



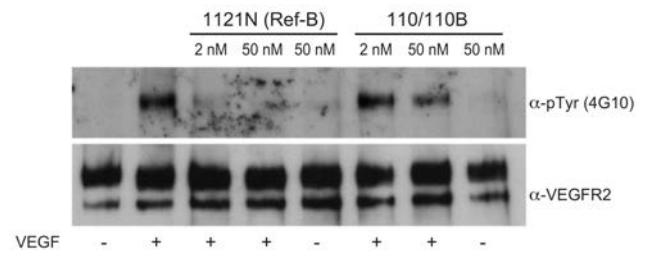
【図 18 A】



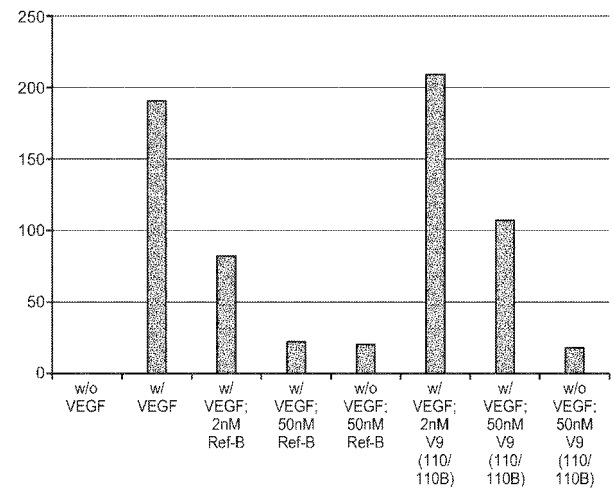
【図 18 B】



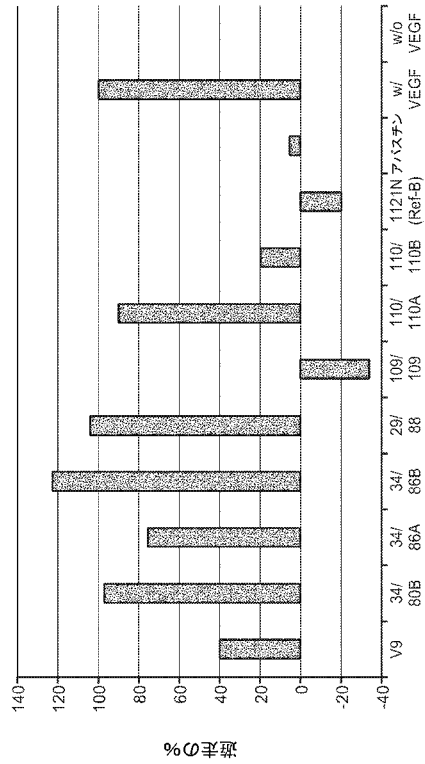
【図 19 A】



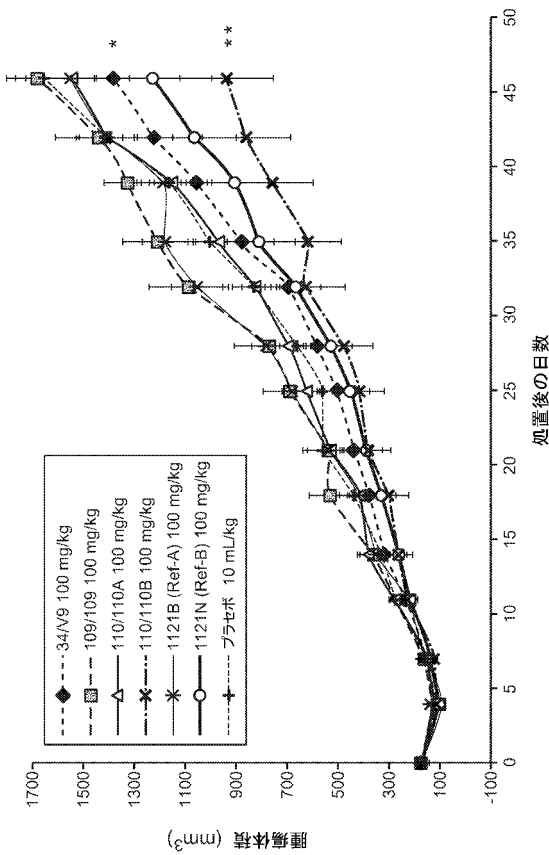
【図 19 B】



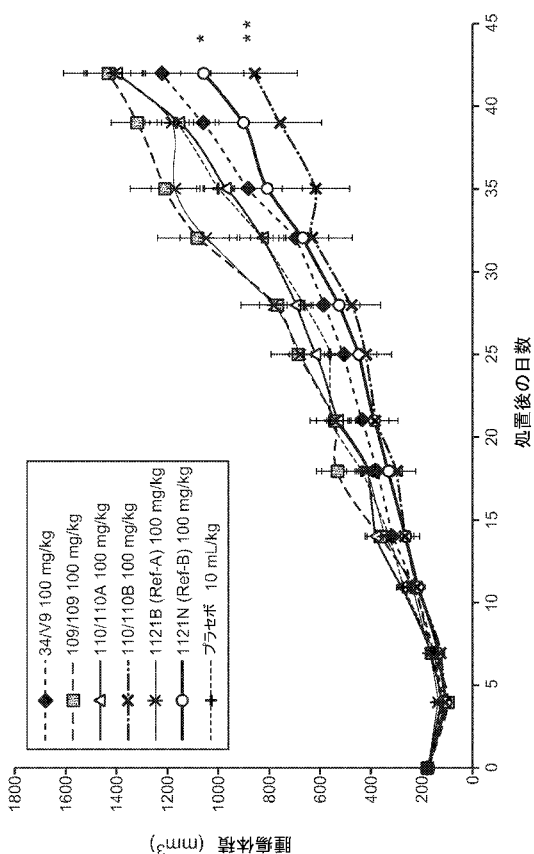
【図 20】



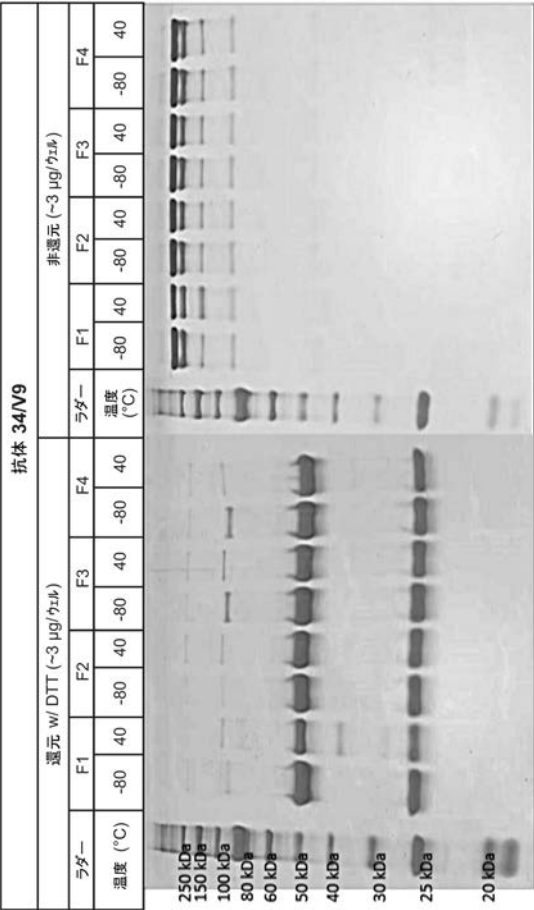
【図 21】



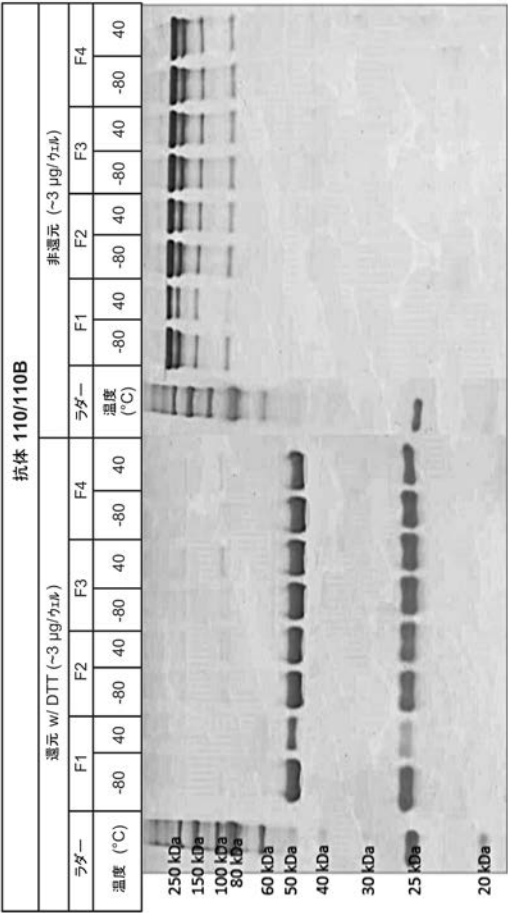
【図 22】



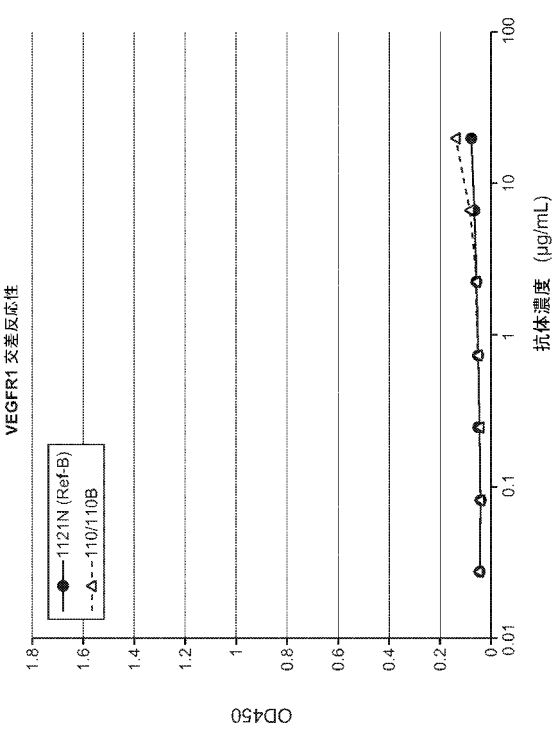
【図 23 A】



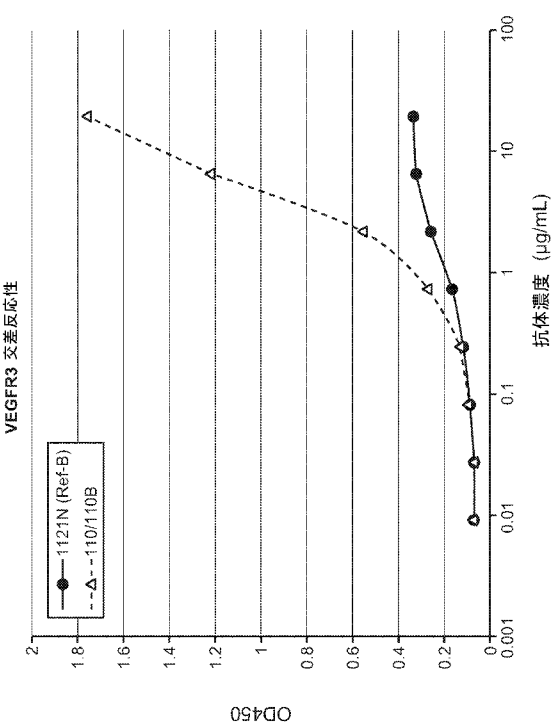
【図 2 3 B】



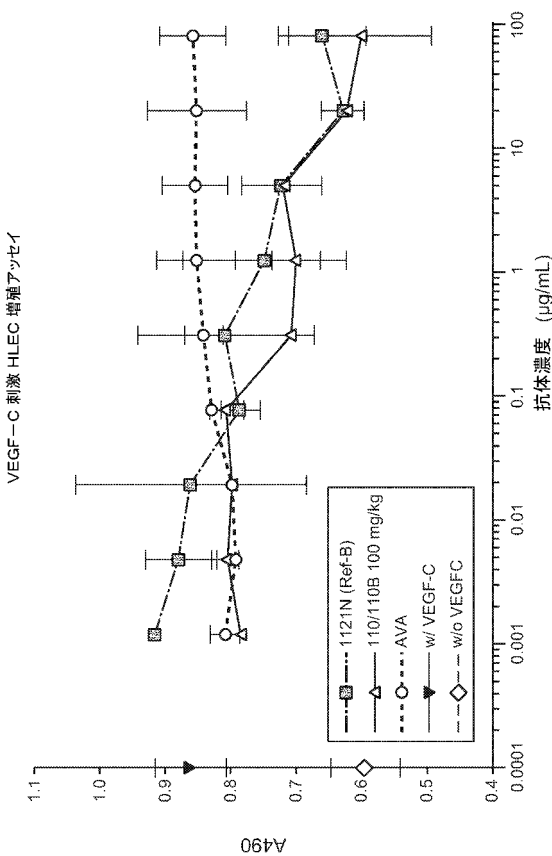
【図 2 4 A】



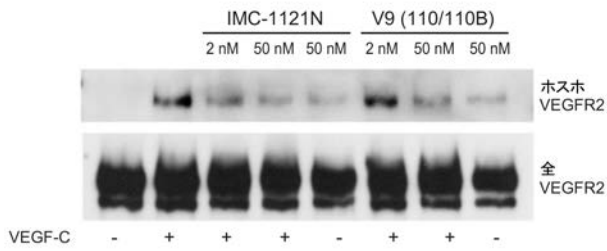
【図 2 4 B】



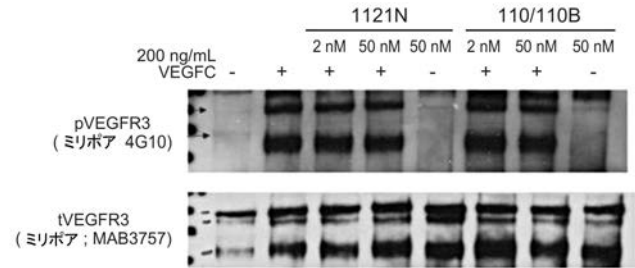
【図 2 5】



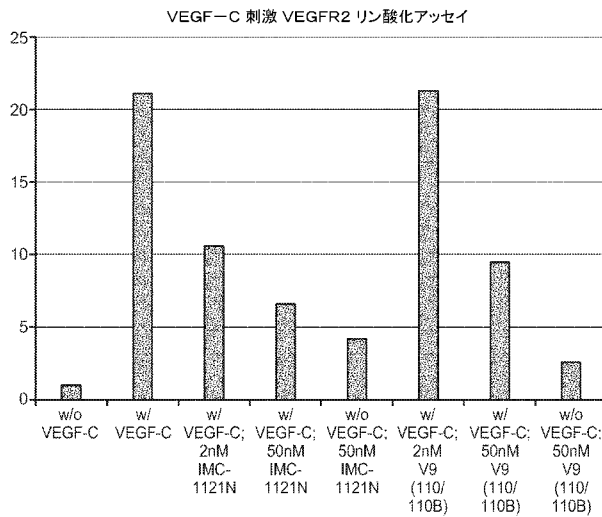
【図 2 6 A】



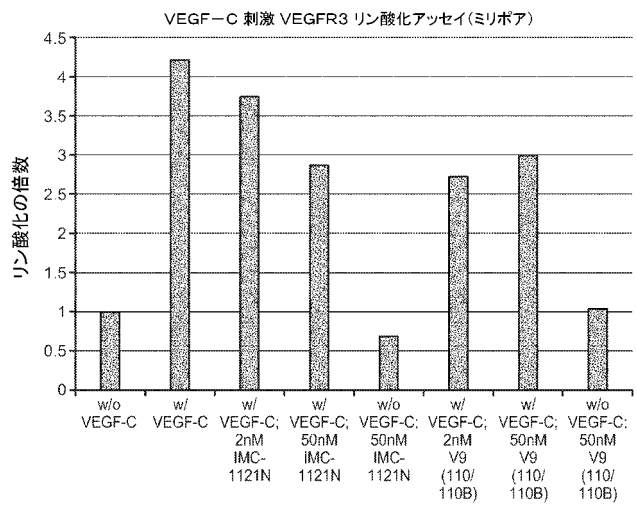
【図 2 7 A】



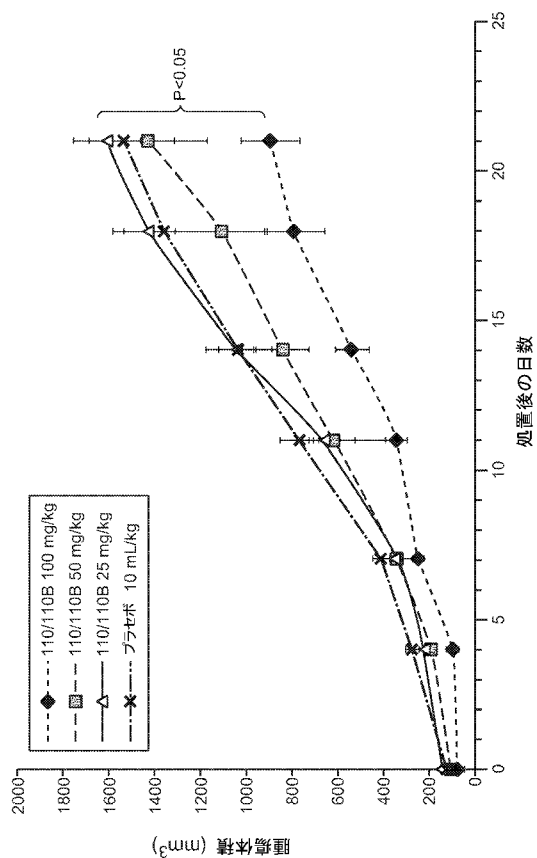
【図 2 6 B】



【図 2 7 B】



【図 2 8】



【配列表】

2018528759000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/40183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395, 38/18; C07K 14/475, 16/22 (2016.01) CPC - A61K 39/3955, 39/39553, 38/1866; C07K 14/475, 14/515, 16/22 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/395, 38/18, 47/48, 9/127; C07K 14/475, 16/22, 16/00, 16/28 (2016.01) CPC: A61K 39/3955, 39/39553, 38/1866; C07K 14/475, 14/515, 16/22, 2713/73, 16/2863, 2317/76, 2317/24, 2317/92 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Lens sequence search database; Google Scholar; Pubmed; EBSO, NCBI BLAST; VEGF, antibody*, domain, CDR, bind*		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(KENDREW, J et al.) An Antibody Targeted to VEGFR-2 Ig Domains 4-7 Inhibits VEGFR-2 Activation and VEGFR-2-Dependent Angiogenesis without Affecting Ligand Binding. Molecular Cancer Therapeutics. 09 March, 2011; Vol. 10, No. 5; pages 770-783; page 779, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1; DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0876	1-3, 4/1-3
A	(GHIOOTTO, F et al.) Immunoglobulin light chain variable region, partial [Homo sapiens]. NCBI PDB Accession No. AAK94852. Immunoglobulin light chain variable region, partial [Homo sapiens]. Submitted 29 June, 2001; downloaded from the internet < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAK94852 > on 24 October, 2016; pages 1-2	8-9
A	US 2011/0027268 A1 (KAHNERT, A et al.) 03 February, 2011; paragraph [0056]; SEQ ID NO: 104	8-9
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 October 2016 (24.10.2016)		Date of mailing of the international search report 09 DEC 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/40183

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/40183

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-7, 23-50
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Please See Supplemental Page-*

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-4, 8-9; SEQ ID NO: 76 (CDR-L1), SEQ ID NO: 54 (CDR-L2), SEQ ID NO: 63 (CDR-L3); SEQ ID NO: 29 (CDR-H1), SEQ ID NO: 36 (CDR-H2), SEQ ID NO: 49 (CDR-H3);

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US16/40183

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

Groups I+, Claims 1-4, 8-18 and SEQ ID NOs: 76, 54, 63, 29, 36 and 49 are directed toward anti-VEGFR2 antibody or antigen binding fragment thereof, wherein the antibody or antigen binding fragment thereof does not block the binding of VEGFR2 to VEGF, and wherein the antibody or antigen binding fragment thereof binds domains 5-7 of VEGFR2.

The anti-VEGFR2 antibody will be searched to the extent it comprises a CDR-L1 encompassing SEQ ID NO: 76 (first exemplary CDR-L1), a CDR-L2 encompassing SEQ ID NO: 54 (first exemplary CDR-L2), a CDR-L3 encompassing SEQ ID NO: 63 (first exemplary CDR-L3); and a CDR-H1 encompassing SEQ ID NO: 29 (first exemplary CDR-H1), a CDR-H2 encompassing SEQ ID NO: 36 (first exemplary CDR-H2) and a CDR-H3 encompassing SEQ ID NO: 49 (first exemplary CDR-H3). Applicant is invited to elect additional CDR(s), with specified SEQ ID NO: representing a fully specified sequence (i.e. no optional or variable residues) for each CDR, or specified substitution(s) at specified site(s) of a CDR SEQ ID NO: to be searched. Additional fully specified CDR sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1-4, 8 (in-part) and 9 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 76 (CDR-L1), SEQ ID NO: 54 (CDR-L2), SEQ ID NO: 63 (CDR-L3); SEQ ID NO: 29 (CDR-H1), SEQ ID NO: 36 (CDR-H2) and SEQ ID NO: 49 (CDR-H3). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CDR sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a CDR-L1 encompassing SEQ ID NO: 75 (first exemplary elected CDR-L1).

Groups II+, Claims 19-22 and SEQ ID NOs: 1-6 are directed toward an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody or antigen binding fragment that is a variant of an anti-VEGFR2 antibody comprising a light chain variable domain sequence and a heavy chain variable domain sequence and antibody that competitively inhibits the binding of a second antibody; and an antibody that binds to the same epitope.

The antibody can be searched to the extent that it comprises a CDR-L1 encompassing SEQ ID NO: 1 (first exemplary CDR-L1), a CDR-L2 encompassing SEQ ID NO: 2 (first exemplary CDR-L2), a CDR-L3 encompassing SEQ ID NO: 3 (first exemplary CDR-L3); and a CDR-H1 encompassing SEQ ID NO: 4 (first exemplary CDR-H1), a CDR-H2 encompassing SEQ ID NO: 5 (first exemplary CDR-H2) and a CDR-H3 encompassing SEQ ID NO: 6 (first exemplary CDR-H3). Applicant is invited to elect additional CDR(s), with specified SEQ ID NO: representing a fully specified sequence (i.e. no optional or variable residues) for each CDR, or specified substitution(s) at specified site(s) of a CDR SEQ ID NO: to be searched. Additional fully specified CDR sequence(s) can be searched upon the payment of further additional fees, following payment for a search of Groups I+. It is believed that claims 19 (in-part), 20 (in-part), 21 (in-part) and 22 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims can be searched with payment of a fee for the search of Groups II+ to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (CDR-L1), SEQ ID NO: 2 (CDR-L2), SEQ ID NO: 3 (CDR-L3); SEQ ID NO: 4 (CDR-H1), SEQ ID NO: 5 (CDR-H2) and SEQ ID NO: 6 (CDR-H3). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected CDR sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a CDR-L1 encompassing SEQ ID NO: 16 (first exemplary elected CDR-L1).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include SEQ ID NO: 76, not present in any of Groups II+; the special technical features of Groups II+ include SEQ ID NO: 1, not present in any of Groups I+.

No technical features are shared between the antibody CDR sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori. No technical features are shared between the antibody CDR sequences of Groups II+ (in particular, due to the presence of at least one substitution in at least one CDR of the antibody, wherein the location of said substitution is not limited) and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ and II+ share the technical features including: an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody or antigen binding fragment thereof comprising a light chain variable domain comprising a CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3; and a heavy chain variable domain region comprising a CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3. Groups I+ share the technical features including: an anti-VEGFR2 antibody or antigen binding fragment thereof, wherein the antibody or antigen binding fragment thereof does not block the binding of VEGFR2 to VEGF, and wherein the antibody or antigen binding fragment thereof binds domains 5-7 of VEGFR2. Groups II+ share the technical features including: an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody or antigen binding fragment thereof that competitively inhibits the binding of a second anti-VEGFR2 antibody to VEGFR2; and an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody or antigen binding fragment thereof that specifically binds to the same epitope of VEGFR2 as a second anti-VEGFR2 antibody.

---Continued Within the Next Supplemental Box---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/40183

-***Continued from Previous Supplemental Page:

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0260765 A1 to Barry et al. (hereinafter 'Barry').

Barry discloses an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody (an anti-KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2) antibody; abstract) comprising a light chain variable domain (comprising a light chain variable domain; paragraph [0032]) comprising a CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3 (comprising a CDR-L1, CDR-L2 and CDR-L3; paragraph [0032]); and a heavy chain variable domain (and a heavy chain variable domain; paragraph [0032]) comprising a CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3 (comprising a CDR-H1, CDR-H2 and CDR-H3; paragraph [0032]); an anti-VEGFR2 antibody (an anti-KDR (VEGFR2) antibody; abstract), wherein the antibody or antigen binding fragment thereof does not block the binding of VEGFR2 to VEGF (wherein the antibody binds to the KDR/VEGF complex (wherein the antibody or antigen binding fragment thereof does not block the binding of VEGFR2 to VEGF); paragraphs [0123]-[0125]), and wherein the antibody or antigen binding fragment thereof binds domains 5-7 of VEGFR2 (wherein the antibody inhibits dimerization by binding to one of domains 4-6 (wherein the antibody or antigen binding fragment thereof binds domains 5-7 of VEGFR2); paragraphs [0007], [0009]); an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody (an anti-KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2) antibody; abstract) that competitively inhibits the binding of a second anti-VEGFR2 antibody to VEGFR2 (that competitively inhibits the binding of a second anti-KDR (VEGFR2) antibody to KDR (VEGFR2); paragraph [0048]); and an anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) antibody (an anti-KDR (vascular endothelial growth factor receptor 2) antibody; abstract) that specifically binds to the same epitope of VEGFR2 as a second anti-VEGFR2 antibody (that specifically binds to the same epitope of KDR (VEGFR2) as a second anti-KDR (VEGFR2) antibody; paragraph [0051]).

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Barry reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10			4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28			
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46			
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02		C	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00		1 0 5	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00			
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02			
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00			
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04			
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 13/10			
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00			
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 P 43/00		1 2 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 47/68			
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		D	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		E	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		N	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		T	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395		C	
	A 6 1 K 39/395		L	
	A 6 1 K 51/10		2 0 0	
	A 6 1 K 49/00			
	A 6 1 K 45/00			
	G 0 1 N 33/53		D	
	C 0 7 K 7/06			

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

(72)発明者 リン, ペイーホア
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 1 3 1, サン ノゼ, ウェストバリー ドライブ 1 1 7 5

(72)発明者 ツェン, チーリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 8, フリーモント, ミルモント ドライブ 4 8 8 6 0, スイート 1 0 7 シー, シー/オー ヘンリアス バイオフィーマシューティカルズ インコーポレイテッド

F ターム (参考) 4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA83X AA86X AA87X AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01
AC14 BA01 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 BB13 BB15 BB16 CC04 CC10 CC15 CC16 CC17 CC27
CC41 EE59
4C084 AA19 NA05 ZA331 ZA591 ZA661 ZA811 ZB111 ZB211 ZB212 ZB261
ZB262 ZC751

4C085	AA13	AA14	AA25	BB31	BB36	BB41	BB42	CC01	CC31	DD62
	EE01	EE03	GG02	GG03	GG04	HH03	HH11	HH20	KA03	KA04
	KA27	KA29	KA36	KB82	LL05	LL09	LL11	LL18		
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	BA14	BA15	BA16	CA40	DA50	DA75
	DA76	EA20	FA10	FA74						