(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2015-134791
(P2015-134791A)
(43)公開日　平成27年7月27日(2015.7.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	ZNAN	4B024
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00		4B064
A61P 31/12	***(2006.01)***	A61P	31/12		4C076
A61K 51/00	***(2006.01)***	A61K	39/395	L	4C084
A61K 49/00	***(2006.01)***	A61K	49/02	A	4C085

審査請求 有　請求項の数 1　OL　（全 240 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2015-36157(P2015-36157)
(22)出願日　平成27年2月26日(2015.2.26)
(62)分割の表示　特願2013-165247(P2013-165247)の分割
原出願日　平成15年7月15日(2003.7.15)
(31)優先権主張番号　60/396,263
(32)優先日　平成14年7月15日(2002.7.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　500039463
ボード・オブ・リージエンツ，ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国、テキサス・７８７０１、オーステイン、ウエスト・セブンス・ストリート・２０１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　フィリップ　イー.　ソープ
アメリカ合衆国　テキサス　７５２０５，ダラス，　ビバリー　ドライブ　４３２１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合する選択された抗体およびデュラマイシンペプチド、ならびにウイルス感染およびガンの処置においてそれらの使用

(57)【要約】
【課題】安全かつ有効な腫瘍血管標的化、抗新脈管形成および腫瘍破壊のための新規な方法および組成物を提供すること。
【解決手段】腫瘍脈管構造における、そしてウイルス進入および伝播における陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質の役割に関与する驚くべき発見、ならびにガンおよびウイルス感染の処置においてこれらの知見を利用するための組成物および方法が開示される。また、ガン、ウイルス感染および関連の疾患の安全かつ有効な処置における使用のための、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合しかつ阻害する、有利な抗体、免疫複合体およびデュラマイシンベースの組成物および組み合わせも開示される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書中に記載の発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（発明の背景）
本出願は、明細書、特許請求の範囲、図面および配列を含む、その出願の開示が放棄声明（ディスクレイマー）なしに本明細書中に参考として詳細に援用される２００２年７月１５日出願の同時係属の米国仮特許出願第６０／３９６，２６３号に対する優先権を主張する。
【０００２】
（１．本発明の分野）
本発明は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の生物学、腫瘍血管およびウイルス感染の分野に関する。本発明は、腫瘍脈管構造標的化およびガン処置のため、ウイルスの進入および伝播を阻害するため、およびウイルス感染を処置するための、驚くべき新規な組成物、方法および組み合わせを提供する。本発明はさらに、ガン、ウイルス感染および関連の疾患の処置における使用のためのアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合かつ阻害する、多数の好ましい抗体、免疫複合体およびデュラマイシンベースの組成物を提供する。
【背景技術】
【０００３】
（２．関連分野の説明）
化学療法剤に抵抗性の腫瘍細胞は、臨床腫瘍学において重大な問題を示す。腫瘍処置における取り組みのための別の主な問題は、「総細胞殺傷（ｔｏｔａｌ　ｃｅｌｌ　ｋｉｌｌ）」、すなわち、全てのいわゆる、制御なしに増殖して、治療によって除去され得るあらゆる腫瘍塊を置き換える能力を有する「クローン原性（ｃｌｏｎｏｇｅｎｉｃ）」悪性細胞を殺傷することが所望されるということである。この分野でのある程度の進歩にかかわらず、なぜヒトのガンの一般的な形態の多くが有効な化学療法介入に抵抗性であるかについての２つの大きな理由が存在する。
【０００４】
総細胞殺傷に取り組む処置を開発するという目的に起因して、特定のタイプの腫瘍は、他の腫瘍よりも治療に敏感であった。例えば、軟部組織腫瘍、例えば、リンパ腫、ならびに血液および血液形成器官の腫瘍、例えば、白血病は一般に、固形腫瘍、例えばガン腫よりも化学療法に対してさらに応答性であった。
【０００５】
化学療法に対する、軟部腫瘍および血液に基く腫瘍の感受性についての理由の１つは、化学療法の介入に対してリンパ球および白血病細胞の接近可能性が大きいということである。要するに、ほとんどの化学療法剤については、軟部腫瘍および血液に基く腫瘍よりも、固形腫瘍塊の全ての細胞に到達することがかなり困難であり、従って、総細胞殺傷を達成することがさらにかなり困難である。化学療法剤の用量が増大するにつれてほとんどの場合、毒性の副作用が生じ、これが一般に従来の抗腫瘍剤の有効性を制限する。
【０００６】
別の腫瘍処置ストラテジーは、「免疫毒素（ｉｍｍｕｎｏｔｏｘｉｎ）」の使用であって、抗腫瘍細胞抗体を用いて、腫瘍細胞に毒素を送達する。しかし、化学療法アプローチと共通して、免疫毒素療法はまた、固形腫瘍に適用された場合、顕著な欠陥を被る。例えば、抗原陰性または抗原欠損の細胞は、腫瘍を生存させて再増殖させ得るか、またはさらなる転移をもたらし得る。抗体ベースの治療に対して抵抗性の固形腫瘍についてのさらなる理由は、抗体および免疫毒素のような高分子の薬剤に対して腫瘍塊が一般に不浸透性であるということである。腫瘍内の物理的拡散距離および間質性の圧力の両方が、このタイ

プの治療に対する重大な制限である。

【０００７】

処置ストラテジーの改善は、固形腫瘍の脈管構造を標的とする。腫瘍細胞自体ではなく腫瘍の血管を標的することは、耐性の腫瘍細胞の発達をもたらす可能性が低く、標的された細胞が容易に接近可能であるという点で特定の利点を有する。さらに、血管の破壊は、抗腫瘍効果の増幅をもたらす。なぜなら、多くの腫瘍細胞は、その酸素および栄養を単一の血管に依存しているからである。例示的な血管標的因子（ＶＴＡ）は、米国特許第５，８５５，８６６号、同第５，９６５，１３２号、同第６，２６１，５３５号、同第６，０５１，２３０号および同第６，４５１，３１２号に記載されており、これらは、腫瘍脈管構造のマーカーへの抗細胞性因子および毒素の標的化送達を記載する。

【０００８】

血管標的化アプローチの別の有効なバージョンは、腫瘍脈管構造または間質内で発現されるかまたは吸着されたマーカーに対して凝固因子を標的することである（Ｈｕａｎｇら、１９９７；米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、５，８７７，２８９号、および同第６，０３６，９５５号）。腫瘍脈管構造に対する、毒素ではなく凝固因子の送達は、免疫原性低下というさらなる利点を有し、そしてさらには毒性の副作用のリスクも低下させる。米国特許第５，８７７，２８９号に開示されるとおり、このような腫瘍特異的「コアグリガンド（ｃｏａｇｕｌｉｇａｎｄｓ）」における使用のための好ましい凝固因子は、血液凝固の主な開始因子である、短縮バージョンのヒト凝固誘導性タンパク質、組織因子（Ｔｉｓｓｕｅ　Ｆａｃｔｏｒ）（ＴＦ）である。

【０００９】

近年では、アミノリン脂質ホスファチジルセリン（ＰＳ）およびホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）が、腫瘍脈管構造の特異的なマーカーとして同定された（Ｒａｎら、１９９８）。これによって、抗細胞性因子、毒素および凝固因子を腫瘍血管に送達するための新規な抗ＰＳおよび抗ＰＥ免疫複合体の開発がもたらされた（米国特許第６，３１２，６９４号）。さらに、ＰＳおよびＰＥに対する非結合体型抗体は、治療剤に対する結合なしに抗ガン効果を発揮したことが発見されており、これは腫瘍血管の標的化および処置へのアミノリン脂質「裸の抗体（ｎａｋｅｄ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」アプローチとして公知となった（米国特許第６，４０６，６９３号）。

【００１０】

前述の免疫複合体およびアミノリン脂質血管標的化方法は、腫瘍処置に顕著な利点を示すが、特定の末梢腫瘍細胞は、このような治療によって生じる広範な腫瘍破壊から生存し得る。従って、既存の血管および／または循環内皮幹細胞からの新しい血管の発達を阻害する、抗新脈管形成ストラテジーは、ＶＴＡと組み合わせた、米国特許第５，８５５，８６６号、同第６，０９３，３９９号、同第６，３１２，６９４号および同第６，４０６，６９３号のコアグリガンドおよびアミノリン脂質標的化法の使用を意図する。

【００１１】

新脈管形成は生理学的プロセス、例えば、胚形成、創傷治癒および月経において重要な役割を果たすが、また特定の生理学的事象、例えば、腫瘍増殖、関節炎、乾癬、および糖尿病性網膜症にも関与する（Ｆｅｒｒａｒａ，１９９５）。腫瘍処置に対して適用される場合、抗新脈管形成ストラテジーは、血管の出芽の増殖を阻害することに基き、一般には固形腫瘍の末梢で行なわれる。これらの治療はほとんど、さらなる従来の介入（例えば、外科手術または化学療法）の後に、微小転移の危険性を減らすために、または固形腫瘍のさらなる増殖を阻害するために適用される。

【００１２】

米国特許第６，３４２，２１９号、同第６，５２４，５８３号、同第６，３４２，２２１号および同第６，４１６，７５８号は、新脈管形成の主な刺激因子である血管内皮増殖因子Ａ（ＶＥＧＦ、以前には、血管透過性因子、ＶＰＦとして公知）に結合する抗体および免疫複合体を記載する。これらの抗体は、２つの主なＶＥＧＦレセプターのうちの１つだけに対するＶＥＧＦ結合を阻害するという重要な利点を有する。ＶＥＧＦＲ１に対して

ではなく、ＶＥＧＦＲ２へのＶＥＧＦの結合をブロックすることによって、これらの抗体は改善された安全なプロフィールを有し、例えば、マクロファージ、破骨細胞および軟骨吸収細胞の機能においてＶＥＧＦＲ１を介して媒介される有利な効果を維持している。

【００１３】

前述の方法は、腫瘍処置の分野を進歩させたが、さらなるまたは代替的な血管標的化治療の開発は依然として探究されている。腫瘍脈管構造の新規なマーカーの同定は、多数の治療選択肢を展開することを必要とする。抗ガン特性を有する新規の裸の（ｎａｋｅｄ）抗体の開発は、特に重要な進展である。なぜなら、これによって単一薬剤での治療として、および他の薬物の送達のための血管標的化因子としての両方で同じ標的化部分を用いることが可能になるからである。同じ分子内に抗新脈管形成および抗血管の両方、すなわち腫瘍破壊性の特性を有する治療剤は、有用性が大きい。それよりもさらに重要な進歩は、他のシステムでの抗ガン特性および治療効果を用いた治療剤のクラスの同定である。この段階の最も重要な医学的課題のうちの２つであるガンおよびウイルス感染の両方を処置し得る薬剤の開発は、著しくかつ重要な進歩である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１４】

（発明の要旨）

本発明は、安全かつ有効な腫瘍血管標的化、抗新脈管形成および腫瘍破壊のための新規な方法および組成物を提供することによって、当該分野の前述のおよび他の要求に取り組む。この方法および組成物はまた驚くべきことに、ウイルス進入および伝播を阻害することにおいて、そしてウイルス感染および疾患を処置するために有効である。本発明は、腫瘍脈管構造における陰イオン性リン脂質の発現および役割、ならびにウイルス進入および伝播におけるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の関与に関する驚くべき発見に一部は基づく。本発明はさらにアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合する、特に有利な抗体および免疫複合体、ならびにホスファチジルエタノールアミンに結合するペプチドベースの誘導体の新規なクラスを提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

（項目１）

精製された抗体、または抗原結合フラグメント、またはその免疫複合体を含む組成物であって、該抗体がホスファチジルセリンに結合し、かつホスファチジルセリンに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、組成物。

（項目２）

前記抗体がさらに、ホスファチジン酸に結合し、かつホスファチジン酸に対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、項目１に記載の組成物。

（項目３）

前記抗体がさらに、ホスファチジルイノシトールに結合し、かつホスファチジルイノシトールに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、項目１に記載の組成物。

（項目４）

前記抗体がさらに、ホスファチジルグリセロールに結合し、かつホスファチジルグリセロールに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、項目１に記載の組成物。

（項目５）

前記抗体がさらに、カルジオリピンに結合し、かつカルジオリピンに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、項目１に記載の組成物。

（項目６）

前記抗体がさらに、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールおよびカルジオリピンに結合し、かつホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロールおよびカルジオリピンの各々に対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、項目１に記載の組成物。

（項目７）

前記抗体がさらにホスファチジルエタノールアミンに結合する、項目１に記載の組成物。

（項目８）

前記抗体がさらに、ホスファチジルエタノールアミンに結合し、かつホスファチジルエタノールアミンに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する、項目７に記載の組成物。

（項目９）

前記抗体が、表４に記載されるモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じリン脂質結合プロフィールを有する、項目１に記載の組成物。

（項目１０）

前記抗体が、表３に記載されるホスファチジルセリンについてのモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）の親和性と少なくとも等しいホスファチジルセリンについての親和性を有する、項目１に記載の組成物。

（項目１１）

前記抗体が、表４に記載されるモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じリン脂質結合プロフィールを有し、表３に記載されるホスファチジルセリンについてのモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）の親和性と少なくとも等しいホスファチジルセリンについての親和性を有する、項目１に記載の組成物。

（項目１２）

前記抗体がモノクローナル抗体である、項目１に記載の組成物。

（項目１３）

前記抗体がＩｇＧ抗体である、項目１に記載の組成物。

（項目１４）

前記抗体が抗体の抗原結合フラグメントである、項目１に記載の組成物。

（項目１５）

前記抗体がｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、二価抗体、直鎖状抗体または抗体のＦ（ａｂ’）$_2$抗原結合フラグメントである、項目１４に記載の組成物。

（項目１６）

前記抗体がＣＤＲ、一価フラグメント、ラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅ）または単一ドメインの抗体である、項目１４に記載の組成物。

（項目１７）

前記抗体がヒト、ヒト化もしくは部分的ヒト抗体、またはその抗原結合フラグメントである、項目１に記載の組成物。

（項目１８）

前記抗体が、ヒト抗体フレームワークまたは定常領域に作動可能に連結された該抗体の抗原結合領域を含む、項目１７に記載の組成物。

（項目１９）

前記抗体がキメラ抗体である、項目１に記載の組成物。

（項目２０）

前記抗体が二重特異性抗体である、項目１に記載の組成物。

（項目２１）

前記抗体が組み換え抗体である、項目１に記載の組成物。

（項目２２）

前記抗体が操作された抗体である、項目１に記載の組成物。

（項目２３）
前記抗体が、活性化された内皮細胞を用いて動物を免疫する工程と、ホスファチジルセリンに結合し、かつホスファチジルセリンに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と効率的に競合する抗体を該免疫された動物から選択する工程とを包含するプロセスによって調製される、項目１に記載の組成物。
（項目２４）
前記抗体が、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも第一の可変領域を含む、項目１に記載の組成物。
（項目２５）
前記抗体がモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）である、項目１に記載の組成物。
（項目２６）
前記抗体が少なくとも第一の生物学的因子に作動可能に連結される、項目１～２５のいずれか１項に記載の組成物。
（項目２７）
前記抗体が、実質的に不活性なプロドラッグを切断して実質的に活性な薬物を遊離する少なくとも第一の因子に作動可能に連結される、項目２６に記載の組成物。
（項目２８）
前記抗体が、実質的に不活性なプロドラッグを切断して実質的に活性な薬物を遊離する、アリールスルファターゼ、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、カテプシン、Ｄ－アラニルカルボキシペプチダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ノイラミニダーゼ、β－ラクタマーゼ、ペニシリンアミダーゼ、またはシトシンデアミナーゼに作動可能に連結される、項目２７に記載の組成物。
（項目２９）
前記抗体が、実質的に不活性なリン酸塩プロドラッグを切断して実質的に活性な薬物を遊離する、アルカリホスファターゼに作動可能に連結される、項目２７に記載の組成物。
（項目３０）
前記抗体が少なくとも第一の治療因子または診断因子に作動可能に連結される、項目２６に記載の組成物。
（項目３１）
前記抗体が少なくとも第一の治療因子に作動可能に連結される、項目３０に記載の組成物。
（項目３２）
前記抗体が少なくとも第一の化学療法剤、放射性治療剤、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、ステロイド、抗代謝物、アントラサイクリン、ビンカアルカロイド、抗チューブリン薬、抗生物質、サイトカイン、アルキル化剤または凝固剤に作動可能に連結される、項目３１に記載の組成物。
（項目３３）
前記抗体が、ＴＮＦα、ＩＬ－１２またはＬＥＣに作動可能に連結される、項目３２に記載の組成物。
（項目３４）
前記抗体が、内皮細胞の増殖または細胞分裂を殺傷または抑制し得る、細胞傷害性剤、細胞増殖抑制剤または抗細胞性剤に作動可能に連結される、項目３２に記載の組成物。
（項目３５）
前記抗体が植物由来、真菌由来または細菌由来の毒素に作動可能に連結される、項目３４に記載の組成物。
（項目３６）
前記抗体が、鎖毒素、リボソーム不活性化タンパク質、αサルシン、ゲロニン、アスペルギリン、レストリクトシン、リボヌクレアーゼ、エピポドフィロトキシン、ジフテリア毒素またはＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ外毒素に作動可能に連結される、項目３５に記載の組成

物。
（項目３７）
前記抗体が、リシンＡ鎖または脱グリコシル化リシンＡ鎖に作動可能に連結される、項目３６に記載の組成物。
（項目３８）
前記抗体が、血管新生阻害因子に作動可能に連結される、項目３２に記載の組成物。
（項目３９）
前記抗体が、抗チューブリン薬に作動可能に連結される、項目３２に記載の組成物。
（項目４０）
前記抗体が、コルヒチン、タキソール、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデスシンおよびコンブレタスタチンからなる群より選択される抗チューブリン薬に作動可能に連結される、項目３９に記載の組成物。
（項目４１）
前記抗体が、凝固物に作動可能に連結される、項目３２に記載の組成物。
（項目４２）
前記抗体が、診断剤、画像化剤または検出可能因子に作動可能に連結される、項目３０に記載の組成物。
（項目４３）
前記抗体が、Ｘ線検出可能化合物、放射性イオンまたは核磁気スピン共鳴同位体に作動可能に連結される、項目４２に記載の組成物。
（項目４４）
前記抗体が、
（ａ）Ｘ線検出可能化合物ビスマス（ＩＩＩ）、金（ＩＩＩ）、ランタン（ＩＩＩ）または鉛（ＩＩ）；
（ｂ）検出可能な放射性イオン銅^{67}、ガリウム^{67}、ガリウム^{68}、インジウム^{111}、インジウム^{113}、ヨウ素^{123}、ヨウ素^{125}、ヨウ素^{131}、水銀^{197}、水銀^{203}、レニウム^{186}、レニウム^{188}、ルビジウム^{97}、ルビジウム^{103}、テクネチウム^{99m}もしくはイットリウム^{90}；または
（ｃ）検出可能な核磁気スピン共鳴同位体コバルト（ＩＩ）、銅（ＩＩ）、クロム（ＩＩＩ）、ジスプロシウム（ＩＩＩ）、エルビウム（ＩＩＩ）、ガドリニウム（ＩＩＩ）、ホルミウム（ＩＩＩ）、鉄（ＩＩ）、鉄（ＩＩＩ）、マンガン（ＩＩ）、ネオジム（ＩＩＩ）、ニッケル（ＩＩ）、サマリウム（ＩＩＩ）、テルビウム（ＩＩＩ）、バナジウム（ＩＩ）またはイッテルビウム（ＩＩＩ）；
に作動可能に連結される、項目４３に記載の組成物。
（項目４５）
前記抗体が、ビオチン、アビジンまたは色素生産性基質との接触の際に着色された生成物を生成する酵素に作動可能に連結される、項目４２に記載の組成物。
（項目４６）
前記抗体が、少なくとも第一の抗ウイルス因子に作動可能に連結される、項目３１に記載の組成物。
（項目４７）
前記抗体が、表Ｇの抗ウイルス因子に作動可能に連結される、項目４６に記載の組成物。
（項目４８）
前記抗体が、シドフォビルまたはＡＺＴに作動可能に連結される、項目４６に記載の組成物。
（項目４９）
前記生物学的因子をコードするＤＮＡセグメントに作動可能に連結された抗体をコードするＤＮＡセグメントを、同じリーディングフレーム中に含む組み換えベクターを発現することによって調製された融合タンパク質として、生物学的因子に該抗体が作動可能に連結される、項目２６に記載の組成物。

（項目５０）
前記抗体が、生物学的に遊離可能な結合または選択的に切断可能なリンカーを介して、前記生物学的因子に作動可能に連結される、項目２６に記載の組成物。
（項目５１）
前記組成物が、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含む薬学的に受容可能な組成物である、項目１に記載の組成物。
（項目５２）
前記薬学的に受容可能な組成物が非経口投与のために処方される、項目５１に記載の組成物。
（項目５３）
前記薬学的に受容可能な組成物がリポソーム処方物である、項目５１に記載の組成物。
（項目５４）
前記薬学的に受容可能な組成物がステルス化またはＰＥＧ化されたリポソーム処方物である、項目５３に記載の組成物。
（項目５５）
前記薬学的に受容可能な組成物が前記抗体でコーティングされる、ステルス化またはＰＥＧ化されたリポソーム処方物である、項目５３に記載の組成物。
（項目５６）
前記組成物が第二の生物学的因子をさらに含む、項目１に記載の組成物。
（項目５７）
前記組成物が第二の治療因子をさらに含む、項目５６に記載の組成物。
（項目５８）
前記第二の治療因子が血管新生阻害因子である、項目５７に記載の組成物。
（項目５９）
前記第二の治療因子が抗ガン剤である、項目５７に記載の組成物。
（項目６０）
前記抗ガン剤が、ＤＮＡ複製、有糸分裂または染色体分離を干渉する化合物である、項目５９に記載の組成物。
（項目６１）
前記抗ガン剤が、化学療法剤、放射性治療剤、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、抗チューブリン薬または腫瘍標的化化学療法剤、放射性治療剤、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子または抗チューブリン薬である、項目５９に記載の組成物。
（項目６２）
前記抗ガン剤が、シトシンアラビノシド、メトトレキセート、アミノプテリン、デメコルチン、ミトラマイシン、クロラムブシル、メルファラン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ベラパミル、タモキシフェン、タキソール、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、カンプトセシン、アクチノマイシン－Ｄ、マイトマイシンＣ、シスプラチン、ブレオマイシン、コンブレタスタチンまたはシクロフォスファミドである、項目６１に記載の組成物。
（項目６３）
前記抗ガン剤がドセタキセルである、項目６１に記載の組成物。
（項目６４）
前記抗ガン剤が抗チューブリン薬、腫瘍標的化抗チューブリン薬またはチューブリン活性を干渉する化合物である、項目６１に記載の組成物。
（項目６５）
前記抗ガン剤が、腫瘍細胞もしくは腫瘍間質の接近可能な成分に、または腫瘍脈管構造もしくは腫瘍内脈管構造の表面発現された、表面接近可能な、表面局在した、サイトカイン誘導性もしくは凝固剤誘導性の成分に結合する標的化領域に作動可能に連結された治療因子を含む標的化因子－治療剤構築物である、項目６１に記載の組成物。
（項目６６）

前記抗ガン剤がリポソーム処方物内に分散される、項目５９に記載の組成物。
（項目６７）
前記抗ガン剤が、前記抗体でコーティングされているステルス化またはＰＥＧ化リポソーム処方物内に分散される、項目５９に記載の組成物。
（項目６８）
前記第二の治療剤が抗ウイルス因子である、項目５７に記載の組成物。
（項目６９）
前記抗ウイルス因子が表Ｇから選択される抗ウイルス因子である、項目６８に記載の組成物。
（項目７０）
前記抗ウイルス因子がシドフォビルまたはＡＺＴである、項目６８に記載の組成物。
（項目７１）
細胞不浸透性基に作動可能に連結されたデュラマイシンペプチドを含む、実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体を含む組成物。
（項目７２）
前記デュラマイシンペプチドが、生理学的ｐＨで正の電荷を有する基に作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７３）
前記デュラマイシンペプチドが、生理学的ｐＨで負の電荷を有する基に作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７４）
前記デュラマイシンペプチドが、ビオチンに、または硫酸塩、スルホン酸塩、ホスホン酸塩、カルボキシル、フェノール、四級アンモニウムイオンもしくはアミン基に作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７５）
前記デュラマイシンペプチドが、糖、オリゴ糖またはポリ多糖、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチドまたはポリアルコール基に作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７６）
前記デュラマイシンペプチドがタンパク質に作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７７）
前記デュラマイシンペプチドが、不活性なキャリアタンパク質に作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７８）
ニュートラビジン、ストレプトアビジン、アルブミンまたは不活性な免疫グロブリンキャリアタンパク質に、デュラマイシンペプチドが作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目７９）
腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍間質に結合する、標的化タンパク質、抗体、またはその抗原結合領域に、前記デュラマイシンペプチドが作動可能に連結される、項目７１に記載の組成物。
（項目８０）
前記実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体が、図１３Ａ～図１３Ｏのいずれか１つに記載される実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体である、項目７１に記載の組成物。
（項目８１）
少なくとも第一の抗ウイルス因子に作動可能に連結されたデュラマイシンペプチドを含む組成物。
（項目８２）
前記デュラマイシンペプチドが、表Ｇから選択された少なくとも第一の抗ウイルス因子に

作動可能に連結される、項目８１に記載の組成物。
（項目８３）
前記デュラマイシンペプチドがシドフォビルまたはＡＺＴに作動可能に連結される、項目８１に記載の組成物。
（項目８４）
治療における使用のための、項目１～８３のいずれか１項に記載の組成物。
（項目８５）
血管形成を阻害することにおける使用のための、項目１～８４のいずれか１項に記載の組成物。
（項目８６）
ガンを処置するのにおける使用のための、項目１～８５のいずれか１項に記載の組成物。
（項目８７）
ウイルス感染を処置するのにおける使用のための、項目１～８６のいずれか１項に記載の組成物。
（項目８８）
血管形成を阻害することによって疾患を処置するための医薬の製造における項目１～８７のいずれか１項に記載の組成物の使用。
（項目８９）
黄斑変性症、加齢性黄斑変性症、関節炎、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、甲状腺過形成、グレーブス病、血管腫、血管新生緑内障または乾癬を処置するための医薬の製造における項目１～８８のいずれか１項に記載の組成物の使用。
（項目９０）
ガンを処置するための医薬の製造における項目１～８９のいずれか１項に記載の組成物の使用。
（項目９１）
ウイルス感染を処置するための医薬の製造における項目１～９０のいずれか１項に記載の組成物の使用。
（項目９２）
表Ｊに記載のウイルス病を処置するための医薬の製造における項目１～９１のいずれか１項に記載の組成物の使用。
（項目９３）
ＣＭＶ、ＲＳＶまたはアレナウイルスの感染を処置するための医薬の製造における項目１～９２のいずれか１項に記載の組成物の使用。
【００１５】
（概説）
第一の全体的な実施形態において、本発明は、陰イオン性リン脂質、例えば、ホスファチジルリノシトール（ＰＩ）、ホスファチジン酸（ＰＡ）およびホスファチジルグリセロール（ＰＧ）（およびホスファチジルセリン、ＰＳ）が腫瘍脈管構造の接近可能でかつ安定な標的可能マーカーであるという予期せぬ発見に基いた腫瘍血管標的化、腫瘍画像化および処置のための新規な方法を提供する。ＰＡ、ＰＩ、ＰＧおよび他の陰イオン性リン脂質成分に対する抗体が固形腫瘍の脈管構造に特異的に局在するという予期せぬ発見から、この実施形態が得られた。
【００１６】
本実施形態内のさらなる局面は、陰イオン性リン脂質（例えば、ＰＡ、ＰＩおよびＰＧ（およびＰＳ））に対する裸の抗体が、エフェクター分子（例えば、毒素または凝固剤）に対する結合の非存在下でインビボにおいて、腫瘍血管の新脈間形成を特異的に阻害して、腫瘍脈管構造の破壊および腫瘍壊死を誘導するという予期せぬ発見から発展した。従って、本発明は、陰イオン性リン脂質に結合する、単一成分の抗体ベースの治療を用いる、血管標的化、抗新脈管形成および腫瘍処置の安全かつ有効な方法を提供する。
【００１７】

本発明の背景にある驚くべき特徴は、腫瘍脈管内皮細胞の表面に対する陰イオン性リン脂質の移動が、細胞障害およびアポトーシス性または他の細胞死機構とは独立して、少なくともかなりの部分で生じるということである。従って、腫瘍脈管構造における陰イオン性リン脂質発現は、細胞死および破壊の結果ではなく、その要因でもないが、形態学的にインタクトな血管上皮細胞で生じる。これは、腫瘍脈管構造における陰イオン性リン脂質発現が一過性ではなく、治療介入のための標的を提供するのに十分安定であることを意味する。

【００１８】

陰イオン性リン脂質が腫瘍脈管構造において安定に誘導されるという発見を考慮すれば、本発明はさらに、陰イオン性リン脂質に対する抗体の免疫複合体を用いた腫瘍脈管構造の画像化および破壊のための、ある範囲の新規な方法および組成物を提供する。これらの免疫複合体は、治療因子（例えば、毒素および凝固因子）に作動可能に結合された陰イオン性リン脂質に対する抗体を含み、そして腫瘍血管内皮細胞膜の表面への診断剤および治療剤の特異的な送達において有用である。この治療剤は、腫瘍血管内皮細胞膜との最初の接触で送達されて、標的細胞内への急速な進入、または凝固カスケードの成分であるエフェクター細胞との急速な会合のいずれかなどが可能になる。

【００１９】

第二の全体的な実施形態において、本発明は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合する多数の好ましい抗体（および関連の免疫複合体および組成物）を提供するが、この抗体は、当該分野で公知の抗体を上回る利点を提供する構造および特性を有する。これらのいわゆる「第二世代（ｓｅｃｏｎｄ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）」抗体または改良抗体は好ましくは、抗ガンおよび抗ウイルス、ならびに本明細書に開示される他の処置方法において用いられる。

【００２０】

本発明によって提供されるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合する新しいクラスの抗体は、当該分野において、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体に通常ともなう病原性の特性のない治療抗体を提供することによって、先行技術における種々の欠点を克服する。本発明は、部分的には、腫瘍血管内皮細胞におけるリン脂質の挙動に対する本発明者らの固有の観察から開発された新規な免疫化およびスクリーニングの技術を用い、そして疾患に伴う抗リン脂質抗体から生成された抗体を遠ざけることで、開発された。このような抗体は固有の特性および安全性の改善を有するだけでなく、競合研究において既存の抗体以上に有効である。本発明のこれらの局面の組成物および方法はまた、提供された特定のカテゴリーの抗体を用いる免疫複合体および組み合わせの使用にまで拡大される。

【００２１】

本発明の前には、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合し、かつ本明細書に開示される新しい抗体の特性を有する抗体は、未知であった。しかし、本明細書に開示された本発明の開示を考慮して、新規な候補抗体を生成するための方法論、およびこのような抗体を試験してさらなる有用な抗体を候補物のプールから同定するための技術を有する技術がここで提供される。従って、本発明を考慮して、先行技術の抗体にともなう顕著な欠点および副作用を被ることのない、有利な特性、ならびにアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質結合プロフィールを有する、ある範囲の抗体を作製することができる。従って、このような抗体は、ガンおよびウイルス感染の血管形成の阻害および処置を含む、種々の実施形態で用いることができる

本明細書に提供される新規な免疫化技術およびスクリーニング技術に加えて、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合して、かつ多数の有利な特性を有する抗体を、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４を用いて競合アッセイおよび／または機能的アッセイによって同定することができる。現在では、１Ｂ１２、３Ｂ１０、９Ｄ２および３Ｇ４抗体が好ましい。なぜなら、これらの抗体はリン脂質結合のために血清を要さないからである。モノクローナル抗体９Ｄ２および

３Ｇ４がさらに好ましく、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）が現在最も好ましい。前述の抗体のいずれか、好ましくは３Ｇ４と競合するさらなる抗体を特定するために、好ましいアッセイは、現在のところＥＬＩＳＡベースの競合アッセイであり、その多数を本明細書に記載しており、その作用する実施例を開示している。

【００２２】

第三の全体的な実施形態において、本発明は、アミノリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）に結合する細胞不透過性ペプチドベースの誘導体の新規なクラスを提供する。これらの「ＰＥ－結合ペプチド誘導体（ＰＥ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｅｐｔｉｄｅ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ）」は、少なくとも第一のＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンを含むが、これらは、好ましくはＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンを改変して、実質的に細胞不透過性または実質的に非細孔形成のＰＥ結合構築物を形成することによって、非特異的な毒性を実質的に防止するように改変されている。

【００２３】

「実質的に細胞不透過」なＰＥ結合構築物またはデュラマイシンの生成は好ましくは、少なくとも第一の細胞不透過性基に対してＰＥ結合ペプチドまたはデュラマイシンを結合することによって達成される。多数の例示的なデュラマイシン誘導体の合成が本明細書に記載される。この「細胞不透過性基（単数または複数）」は、低分子であっても、不活性キャリアであってもよいし、またはそれ自体が、得られた構築物へさらなる標的機能、例えば、腫瘍脈管構造への標的化を付与する標的化因子であってもよい。従って、ＰＥ結合ペプチドは、不活性キャリアに連結された唯一の標的化因子であってもよく、または各々がこの構築物に標的化機能を付与する２つの因子のうちの１つであってもよい。さらに、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンは、エフェクターに作動可能に連結され、その結果ＰＥ結合ペプチドまたはデュラマイシンが、標的化機能を提供し、この結合された因子は、一旦標的細胞に送達されれば、実質的な治療効果を有する。好ましい実施形態は、抗ウイルス因子、例えば、ヌクレオシドに連結されたＰＥ結合ペプチドまたはデュラマイシンである。

【００２４】

ＰＥは、正常な条件下で正常細胞の表面から本質的に欠失するので、本発明の実質的に細胞不透過性のＰＥ結合ペプチドは、疾患に関連する異常な細胞（単数または複数）、例えば、腫瘍脈管内皮細胞、増殖している細胞および／またはウイルス感染した細胞の表面でＰＥに選択的に結合するように機能する。このような異常な標的細胞に対する結合の際、ＰＥ結合構築物または誘導体がそれらの細胞におけるＰＥ機能を阻害するかまたは遮断し、これによって、例えば、腫瘍の処置および／またはウイルス疾患において、全体的な治療の利点を生じる。ウイルスの侵入および伝播を阻害することにおける、実質的に細胞不透過性のＰＥ結合ペプチドの首尾よい使用が本明細書において開示される。ＰＥ結合ペプチドが抗ウイルス剤、例えば、シドフォビル（ｃｉｄｏｆｏｖｉｒ）に結合される実施形態では、増強されかつさらに安全な抗ウイルス処置が提供される。

【００２５】

第四の全体的な実施形態では、本発明はさらに、ウイルスの感染および疾患の処置における使用のための、ウイルスの複製、感染および伝播を阻害するために重要な新規なクラスの組成物および方法を提供する。これらの方法は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えば、ＰＳ、ＰＥ、ＰＩ、ＰＡおよびＰＧ、特にＰＳおよびＰＥに結合する抗体およびペプチドが安全かつ有効な抗ウイルス因子であるという驚くべき洞察に基づく。この洞察が正しいことを証明しているだけでなく、本発明は、ウイルス伝播と戦うことにおける、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合する抗体およびペプチドの予期せぬ有効な用途を示すデータを提供する。このデータは、これらの因子が、ある範囲のウイルス感染および関連の疾患の処置において広範に適用可能であることを意味する。

【００２６】

これらの発見はさらに、新しいカテゴリーの免疫複合体、組成物、キットおよび使用の方法を包含するが、ここでは、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、詳細にはＰＳ

およびＰＥに対する抗体が抗ウイルス剤に作動可能に連結される。実質的に細胞不透過性のＰＥ結合ペプチド誘導体、例えばデュラマイシンペプチド誘導体がまた、抗ウイルス剤に連結されてもよい。これによって、これらの因子の各々が、ウイルス感染した細胞に固有に標的化された新しい抗ウイルス薬を提供する。

【００２７】

従って、異常な新脈間形成、ガンおよびウイルス感染および疾患の処置において有効な新規で安全な治療因子の開発が当該分野における進歩である。

【００２８】

本発明の種々の方法および組成物はまた、比類なく有効であるが、併用処置方法を提供するために他の治療および因子と組み合わせて、そして本発明の関連の組成物、薬学的組成物およびキットと組み合わせて、有利に用いることができる。従って、第五の全体的実施形態において、本発明はさらに、本明細書においてさらに詳細に例示される、驚くべきことに十分一緒に働くように選択されかつ開発されている、例えば、ガンの処置のための、特定の併用組成物、方法およびキットを提供する。

【００２９】

（第二世代の抗体）

探究された特性を有する抗体の生成において十分に機能するように開発された特定の方法が、本明細書の実施例ＩＶにおいて記載されて、添付の未決のクレーム中に具体化されている。これらの方法によって、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２および３Ｇ４、特に、３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）によって例示されるような本発明の有利な抗体の生成が可能になった。

【００３０】

従って、本発明は精製された抗体、その抗原結合フラグメントおよび免疫複合体を提供し、これが少なくとも１つのアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに結合して、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対する結合について、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４、好ましくは９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）、そして最も好ましくは３Ｇ４と効率的に競合する。

【００３１】

本出願全体を通じて用いる場合、１つの（「ａ」および「ａｎ」）という用語は、その後に上限が特に言及される場合を除いて、参照される構成要素または工程の「少なくとも１つの」、「少なくとも第一の」、「１つ以上の」、または「複数の」を、意味するという意味で用いられる。従って、本明細書において用いられる場合、「抗体」とは、「少なくとも第一の抗体」を意味する。組み合わせの作動可能な限界およびパラメーターは、任意の単一の因子の量と同様に、本開示に照らして当業者には公知である。

【００３２】

特定の局面において、抗体は、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対する結合について、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４、好ましくは９Ｄ２または３Ｇ４、そして最も好ましくは３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）と効率的に競合するか、または表４に示される、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４、好ましくは９Ｄ２または３Ｇ４、そして最も好ましくは３Ｇ４のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質結合プロフィールを有する；そして血清依存性ではなく、すなわち、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する結合のために血清を要しない；疾患を有する患者から由来しない、そしてインビトロにおいて凝固反応を有意に阻害せず、インビボで顕著な血栓を生じるか、またはループス性抗凝固因子活性を有する。

【００３３】

好ましくは、このような抗体はまた、文献の抗体（例えばＩｇＧ）に比較して、コントロールの研究における有利な機能的特性の構造的特性、または範囲もしくは程度において、改善を実証しており、高い親和性を有するか、または活性化された内皮細胞に対する結

合の増強、内皮細胞増殖もしくは新脈管形成の阻害の増大、腫瘍血管局在化の改善、抗ガンおよび／もしくは抗ウイルス効果を示す。

【００３４】

従って、本発明の特定の局面は、前述の他の開示および固有の有利な特性を有する抗体の、本発明者らの独自の驚くべき生成に基づく。ここで、好ましい抗体のパネルおよび多数の特定の好ましい抗体が提供されており、本発明はさらに規定のエピトープ特異性のあるクラスの抗体を包含する。ここでこのような抗体またはその抗原結合フラグメントは、抗原結合について、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４、好ましくは９Ｄ２または３Ｇ４、そして最も好ましくは３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）と効率的に競合し、その結果それらは、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４、好ましくは９Ｄ２または３Ｇ４、そして最も好ましくは３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）と本質的に同じエピトープに結合する。

【００３５】

特許請求される本発明は、本明細書および容易に利用可能な技術的参考文献、ノウハウ、および出発材料に従って可能になる。それにもかかわらず、本出願人、Ｂｏａｒｄ ｏｆ Ｒｅｇｅｎｔｓ，Ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｔｅｘａｓ Ｓｙｓｔｅｍのために、３Ｇ４モノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞株のサンプルを、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ），１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ ２０１１０－２２０９，Ｕ．Ｓ．Ａ．に寄託のために提出した。このサンプルは、Ａｖｉｄ Ｂｉｏｓｅｒｖｉｃｅｓ，Ｉｎｃ．，１４２７２ Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ａｖｅｎｕｅ，Ｔｕｓｔｉｎ，ＣＡ ９２７８０，Ｕ．Ｓ．Ａ．特許権者の子会社、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，によって、２００２年７月０８日の週に提出され、２００２年７月１０日および７月１２日に受領されて、生存可能であることが示され、２００２年７月３０日にＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ４５４５が与えられた。

【００３６】

この寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項およびその規則（ブタペスト条約）のもとで行なわれた。ハイブリドーマは、付属の特許請求の範囲を有する米国特許の刊行物に基づきブタペスト条約の条件のもとでＡＴＣＣによって入手可能になる。寄託されたハイブリドーマの利用可能性は、その特許法に従って任意の政府の権限のもとで認可された権利に反して、本発明の実施のための許諾として解釈されるべきではない。

【００３７】

抗体のパネル、本明細書に開示され、当該分野で公知の好ましい抗体および技術の観点から、当業者は、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合して、有利な特性を有する、新しいクラスの抗体が提供される。これらの抗体は、モノクローナル抗体１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、９Ｄ２または３Ｇ４「に類似している」かまたは、それら「ベースである」。好ましくは、本発明の抗体は、「９Ｄ２ベースか、または９Ｄ２様の抗体」であり、最も好ましくは、本発明の抗体は、「３Ｇ４ベースか、または３Ｇ４様の抗体」である。「類似している」抗体の以下の説明は、簡便のために３Ｇ４抗体（ＡＴＣＣ４５４５）に関して提供されるが、１Ｂ９、１Ｂ１２、３Ｂ１０、２Ｇ７、７Ｃ５、および９Ｄ２抗体の各々に適用可能であるとして参考として本明細書中に詳細に援用される。

【００３８】

３Ｇ４様抗体は、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合するか、またはモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）と本質的に同じエピトープで、少なくとも第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに結合する、抗体、またはその抗原結合フラグメントである。好ましくは、抗体またはその抗原結合フラグメントは、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５

）と同じエピトープに結合する。

【００３９】

モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）と「ほぼ、実質的に、もしくは本質的に同じ、または同じエピトープに結合する」という用語は、ある抗体がモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）と「交差反応する」ということを意味する。「交差反応性の抗体」とは、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）と実質的にもしくは本質的に同じ、あるいは同じエピトープ、エピトープ部位または共通のアミノリン脂質もしくは陰イオン性リン脂質のエピトープを認識するか、それに結合するか、またはそれに免疫特異性を有する抗体であり、その結果、少なくとも１つのアミノリン脂質もしくは陰イオン性リン脂質、２つ以上のアミノリン脂質もしくは陰イオン性リン脂質、または、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）が結合する全てのアミノリン脂質もしくは陰イオン性リン脂質へ結合し得るモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）と効率的に競合し得る。「３Ｇ４－交差反応性抗体」は、簡潔に「３Ｇ４様抗体」および「３Ｇ４ベースの抗体」と名付けられ、このような用語は、本明細書中で、交換可能に用いられて、組成物、用途および方法に適用される。

【００４０】

モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）とほぼ、実質的に、本質的に同じかまたは同じエピトープに結合する１つ以上の抗体の同定は、いまや直接的な技術的問題であって、有利な特性を有する３Ｇ４が提供されている。交差反応性抗体の同定は参照抗体に対する比較で決定されるので、参照抗体（３Ｇ４）および試験抗体が結合するエピトープを実際に決定することは、モノクローナル抗体３Ｇ４と同じかまたは実質的に同じエピトープに結合する抗体を同定するために必要な方法ではないことが理解される。しかし、３Ｇ４によって結合されるエピトープ上のかなりの情報が、本明細書に含まれており、エピトープマッピングをさらに行なうことができる。

【００４１】

交差反応性抗体の同定は、抗体競合を評価し得る種々の免疫学的スクリーニングアッセイのいずれか１つを用いて容易に決定できる。このようなアッセイの全てが当該分野で慣用的であり、本明細書においてさらに詳細に記載される。米国特許第６，３４２，２１９号および同第６，３４２，２２１号の各々が、所定の抗体、例えば３Ｇ４と同じであるかまたは実質的にもしくは本質的に同じエピトープに結合するか、あるいは抗原への結合について所定の抗体と効率的に競合する抗体を作製する方法に関与する本発明の教示をさらに補足するという目的で参考として本明細書に詳細に援用される。

【００４２】

例えば、試験されるべき試験抗体が異なる起源の動物から得られるか、または異なるアイソタイプの動物である場合でさえ、コントロール（３Ｇ４）および試験抗体が混合される（かまたは予め吸着される）、そしてアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質抗原組成物、好ましくはＰＳに適用される、簡易な競合アッセイが使用され得る。「アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質抗原組成物」とは、本明細書に記載される、例えば表４に記載されるような３Ｇ４結合抗原を含む任意の組成物を意味する。従って、ＥＬＩＳＡおよびウエスタンブロッティングベースのプロトコールは、このような簡易な競合研究における使用に適切である。

【００４３】

特定の実施形態では、当業者は、抗原組成物への添加の前に、一定時間、コントロール抗体（３Ｇ４）と種々の量の試験抗体とを事前混合する（例えば、１：１０または１：１００）。他の実施形態では、コントロールおよび種々の量の試験抗体は、抗原組成物への曝露の間に、単に混合されてもよい。任意の事象では、種またはアイソタイプの二次抗体を用いることによって、実質的に同じエピトープを認識する試験抗体の存在によってその結合が減少される、結合したコントロール抗体だけを検出することができる。

【００４４】

コントロール抗体と任意の試験抗体（種またはアイソタイプにかかわらず）との間の抗

体競合研究を行なうことにおいて、例えば、引き続く同定を可能にするビオチンまたは酵素（または、さらに、放射性）標識のような検出可能な標識を用いてコントロール（３Ｇ４）を最初に標識してもよい。これらの場合、当業者は、標識されたコントロール抗体を試験されるべき試験抗体とともに種々の比（例えば、１：１０、１：１００または１：１０００）で事前混合するかまたはインキュベートし、次いで（必要に応じて、適切な期間後に）標識されたコントロール抗体の反応性をアッセイして、これを、競合する可能性のある試験抗体がインキュベーション中に含まれないコントロール値と比較する。

【００４５】

アッセイはここでも、抗体ハイブリダイゼーションに基づくある範囲の免疫学的アッセイのうちの任意の１つであってもよい。そしてコントロール抗体は、それらの標識を検出する手段によって（例えば、ビオチン化抗体の場合には、ストレプトアビジンを用いて）、または酵素標識と組み合わせた色素生産性基質（例えば、ペルオキシダーゼ酵素と組み合わせた３，３’５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）基質）を用いることによって、または放射性標識を簡易に検出することによって検出される。コントロール抗体と同じエピトープに結合する抗体は、結合について効率的に競合し得、従って、結合標識の低下で証明されるとおり、コントロール抗体結合を有意に低下させる。

【００４６】

完全に無関係な抗体が非存在下でこの（標識された）コントロール抗体の反応性は、コントロールの高値である。コントロールの低値は、競合が生じて標識された抗体の結合が減少する場合、標識された（３Ｇ４）抗体と、正確に同じタイプの未標識の抗体（３Ｇ４）とをインキュベートすることによって得られる。試験アッセイでは、試験抗体の存在下での標識された抗体反応性の有意な低下は、同じエピトープを認識する試験抗体、すなわち、標識された（３Ｇ４）抗体と「交差反応する」試験抗体の指標である。

【００４７】

有意な低下は、「再現性（ｒｅｐｒｏｄｕｃｉｂｌｅ）」であり、すなわち、結合の低下が一貫して観察される。「有意な低下（ｓｉｇｎｉｆｉｃａｎｔ　ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ）」とは、本出願に関しては、約１：１０～約１：１０００の間の任意の比で、少なくとも約７０％、約７５％または約８０％の再現性の低下（ＥＬＩＳＡにおける、１つ以上のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対する３Ｇ４の結合において）として規定される。さらによりストリンジェントな交差ブロッキング活性を有する抗体は、約１：１０～約１：１０００の間の任意の比で、少なくとも約８２％、約８５％、約８８％、約９０％、約９２％または約９５％程度の再現性の低下（ＥＬＩＳＡまたは他の適切なアッセイにおける、１つ以上のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対する３Ｇ４の結合において）を示す。１つ以上のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する３Ｇ４結合における約９７％または約９６％程度の再現性の低下を示すような完全またはほぼ完全な交差ブロッキングは、決して本発明を行なうために必要ではないが、特に除外はされない。

【００４８】

第二世代の抗体全体に関しては、この第二世代の抗体がホスファチジルセリンへの結合について効率的に競合する場合、少なくともホスファチジルセリンに結合する抗体を参照して；この第二世代の抗体がホスファチジン酸への結合について効率的に競合する場合、少なくともホスファチジン酸に結合する抗体を参照して；この第二世代の抗体がホスファチジルイノシトールへの結合について効率的に競合する場合、少なくともホスファチジルイノシトールに結合する抗体を参照して；この第二世代の抗体がホスファチジルグリセロールへの結合について効率的に競合する場合、少なくともホスファチジルグリセロールに結合する抗体を参照して；この第二世代の抗体がカルジオリピンへの結合について効率的に競合する場合、少なくともカルジオリピンに結合する抗体を参照して；そして必要に応じて、この第二世代の抗体がホスファチジルエタニールアミンへの結合について効率的に競合する場合、少なくともホスファチジルエタノールアミンに結合する抗体を参照して；競合が測定され得る。

【００４９】
特定の実施形態において、第二世代の抗体は、この第二世代の抗体が第一および第二のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する結合について効率的に競合する場合、少なくとも第一および第二のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体を参照して；この第二世代の抗体が第一、第二および第三のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する結合について効率的に競合する場合、少なくとも第一、第二および第三のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体を参照して；この第二世代の抗体が第一、第二、第三および第四のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する結合について効率的に競合する場合、少なくとも第一、第二、第三および第四のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体を参照して；あるいはこの第二世代の抗体が第一、第二、第三、第四および第五のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する結合について効率的に競合する場合、少なくとも第一、第二、第三、第四および第五のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体を参照して；測定され得る。

【００５０】
さらなる実施形態において、第二世代の抗体は、少なくとも１つのアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する顕著な結合を示し、コリン含有の中性のリン脂質に対する検出可能な結合を示さず、そして本発明のモノクローナル抗体、好ましくは３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）と効率的に競合する抗体として特徴付けられ得る。

【００５１】
特定の実施形態では、この抗体は、陰イオン性リン脂質、ＰＳ、ＰＡ、ＰＩ、ＰＧおよびＣＬに対する有意な結合を示し；ＰＳ＝ＰＡ＝ＰＩ＝ＰＧ＞ＣＬ＞＞ＰＥというリン脂質結合プロフィールを有し、ここで、＞はこのようなリン脂質に対する結合における少なくとも２倍の相違を示し、そして＞＞は、このようなリン脂質に対する結合における少なくとも１０倍の相違を示し；ホスファチジルコリンまたはスフィンゴミエリンに対する検出可能な結合を示さず；そして各々の陰イオン性リン脂質ＰＳ、ＰＡ、ＰＩ、ＰＧおよびＣＬに対する結合についてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）と効率的に競合する。

【００５２】
好ましくは、第二世代の抗体は、前述の特徴を有し、また活性化された細胞、分裂中の細胞、傷害された細胞、アポトーシス性の細胞、またはウイルス感染した細胞の細胞表面に存在する少なくとも１つの陰イオン性リン脂質に対する顕著な結合を示す。さらに好ましくは、この抗体はまた、静止期の細胞を有意に変更することなく分裂している内皮細胞の増殖を有意に阻害して、さらに好ましくは、有意な狼瘡性抗凝固因子活性を有さない。

【００５３】
機能的に、第二世代の抗体は好ましくは、新脈管形成を抑制し、抗腫瘍効果および抗ウイルス効果を好ましくはインビボで有し、そしてさらに好ましくは、その際に、動物または患者において重大な血栓合併症を生じることがない。従って、好ましい抗体は、抗新脈管形成剤、抗腫瘍血管剤、抗腫瘍剤および抗ウイルス剤の組み合わせた特性を保有する。

【００５４】
本発明は、ハイブリドーマＡＴＣＣ４５４５によって生成されたモノクローナル抗体３Ｇ４、またはこのようなモノクローナル抗体の抗原結合フラグメントによって例示される。モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）と実質的に同じエピトープに結合するモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマは、本発明の別の局面である。

【００５５】
本発明に従う組成物、免疫複合体、医薬、組み合わせ、反応混液、キット、第一および第二の医薬の用途、ならびにすべての方法の以下の説明において、「抗体」および「免疫複合体」、またはその抗原結合領域という用語は、他に特定して言及するか、または科学用語から明らかにならない限り、ある範囲の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質の抗体、ならびに特定の３Ｇ４交差反応性抗体をいう。

【００５６】
「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、本明細書において用いる場合、広義には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を含む、任意の免疫学的結合因子をいう。重鎖の定常ドメインのタイプに依存して、抗体は５つの主なクラス（ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭ）のうちの１つが割り当てられる。これらのうちのいくつかはさらにサブクラスまたはアイソタイプ、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４などに分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γおよびμと命名される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元構成は周知である。
【００５７】
概して、本発明において抗原結合領域以外の抗体が用いられる場合、ＩｇＧおよび／またはＩｇＭが好ましい。なぜなら、それらは生理学的な状況で最も一般的な抗体であるからであり、それらは実験設定において最も容易に作製されるからである。哺乳動物抗体の「軽鎖（ｌｉｇｈｔ　ｃｈａｉｎ）」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、２つの明白に別個のタイプ：カッパ（κ）およびラムダ（λ）のうちの１つに割り当てられる。本発明の抗体におけるκまたはλ軽鎖の使用に対して本質的に優先性はない。
【００５８】
モノクローナル抗体（ＭＡｂ）またはその誘導体の使用はかなり好ましい。ＭＡｂは、特定の利点、例えば、再現性および大規模生産性を有することが認識されており、これによって臨床での処置に適切になる。このように、本発明はマウス、ヒト、サル、ラット、ハムスター、ウサギおよびさらにはカエルまたはニワトリにさえ起源するモノクローナル抗体を提供する。マウス、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体が一般に好ましい。
【００５９】
当業者に理解されるように、「抗体」という言葉によって包含される免疫学的結合試薬は、全ての種に由来する全ての抗体、およびその抗原結合フラグメントまで伸展し、これには、二量体抗体、三量体抗体および多量体抗体；二価特異的抗体；キメラ抗体；ヒトおよびヒト化抗体；組み換え抗体、操作された抗体およびラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ（ｃａｍｅｌｉｓｅｄ））抗体、ならびにそれらのフラグメントが挙げられる。
【００６０】
従って、「抗体」という用語は抗原結合領域を有する任意の抗体様分子をいうために用いられる。そしてこの用語は、抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_2$、単一ドメイン抗体（ＤＡＢｓ）、Ｆｖ、ｓｃＦｖ（単鎖Ｆｖ）、直鎖状抗体、二価抗体、ラクダ化抗体など）を包含する。種々の抗体ベースの構築物およびフラグメントを調製して用いるための技術は、当該分野で周知である（詳細には、本明細書中に参考として援用される、Ｋａｂａｔら、１９９１を参照のこと）。二価抗体は詳細には、さらにＥＰ　４０４，０９７およびＷＯ９３／１１１６１に記載され、その各々は本明細書において参考として詳細に援用されている；一方直鎖状抗体はさらに、参考として本明細書中に詳細に援用される、Ｚｅｐａｔａら（１９９５）に記載される。
【００６１】
特定の実施形態において、本発明の組成物は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列に対して少なくとも約７５％、より好ましくは少なくとも約８０％、さらに好ましくは、少なくとも約８５％、さらに好ましくは、少なくとも約９０％、そして最も好ましくは少なくとも約９５％程度のアミノ酸配列同一性のアミノ酸配列領域を含む少なくとも第一の可変領域を含む少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を含む；ここでこの抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体は、３Ｇ４抗体によって例示されるように、少なくとも実質的に、本発明の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の生物学的特性を維持する。
【００６２】
本発明のこれらおよび他の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の配列に対する同一性または相同性は、本明細書中では、必要であれば、最大の配列同一性パーセ

ントを達成するように配列および導入ギャップを整列させた後に、配列番号２もしくは配列番号４の配列に対して、または本発明の別の抗アミノリン脂質もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体の配列に対して同一である、候補配列における、アミノ酸残基の割合として規定される。配列比較のために用いられる抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の実質的に同じかまたはさらに有効な生物学的特性の維持は特に重要である。このような比較は、例えば、本明細書に詳細に記載される種々のアッセイのうちの１つ以上を用いて、容易に行なわれる。

【００６３】

特定の好ましい実施形態において、本発明の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体は、配列番号１または配列番号３の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列領域を含む可変領域によって例示されるような、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列領域を含む少なくとも第一の可変領域を含む。このような配列は、重鎖および軽鎖の可変領域のＣＤＲ１－３（相補性決定領域）を含む３Ｇ４　ＳｃＦｖのＶｈおよびＶκの配列である。

【００６４】

他の好ましい実施形態では、オリジナルの抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体、例えば３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）に比較して、強化されるかまたは優れた特性を有する第二世代の抗体が提供される。

【００６５】

特定の実施形態では、使用される抗体は、「ヒト化された」部分的ヒト抗体またはヒト抗体である。「ヒト化された」抗体は一般にはマウス、ラットまたは他の非ヒト種由来のキメラモノクローナル抗体であって、ヒトの定常領域および／または可変領域のドメイン（「部分的ヒトキメラ抗体」を保有する。本発明における使用のための種々のヒト化モノクローナル抗体は、キメラ抗体であり、ここではマウス、ラットまたは他の非ヒトモノクローナル抗体の少なくとも第一の抗原結合領域、または相補性決定領域（ＣＤＲ）が、ヒト抗体定常領域または「フレームワーク」上に作動可能に結合されるかまたは「接合」される。

【００６６】

本明細書における使用のための「ヒト化」モノクローナル抗体はまた、１つ以上の選択されたアミノ酸がヒト抗体においてさらに一般的に観察されるアミノ酸について変化されている非ヒト種由来のモノクローナル抗体であってもよい。これは慣用的な組み換え技術、詳細には部位特異的突然変異形成の使用によって容易に達成できる。

【００６７】

「ヒト化」された抗体ではなく、ヒト抗体全体をまた調製して、本発明において用いてもよい。このようなヒト抗体は、抗原提示細胞および抗体産生細胞を含むヒト被験体から混合された末梢血リンパ球の集団を簡単に得ることによって、そしてこの細胞集団を、免疫学的に有効な量のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質サンプルと混合することによってインビトロで刺激することによって、健常被験体から得ることができる。ヒト抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体産生細胞は、一旦得られれば、ハイブリドーマおよび／または組み換え抗体産生において用いられる。

【００６８】

ヒトモノクローナル抗体産生のためのさらなる技術は、ヒト抗体ライブラリーを含むトランスジェニック動物、好ましくはトランスジェニックマウスを、免疫学的に有効な量のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質サンプルを用いて免疫する工程を包含する。これはまた、ハイブリドーマおよび／または組み換え抗体産生におけるさらなる操作のためのヒト抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体産生細胞を生成するが、これは末梢血球ではなく脾臓細胞がトランスジェニック動物またはマウスから容易に得られ得るという利点を伴う。

【００６９】

本発明による抗体は、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実

質的に交差反応するかまたはそれと競合する抗体を選択することによって容易に調製され得る。適切な調製プロセスおよび方法は：
（ａ）候補の抗体産生細胞を調製する工程；および
（ｂ）この候補の抗体産生細胞から、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応するかまたはそれと競合する抗体を選択する工程、
を包含する。

【００７０】
適切な抗体産生細胞を調製して、それから抗体を獲得する１つのプロセスは、所定の患者においてインサイチュで行なわれてもよい。すなわち、要するに免疫原性のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質のサンプルの免疫学的に有効な量を患者に提供することで、適切な抗体産生を生じる。従って、この抗体は、なお抗体産生細胞から「得られる」が、それは宿主から単離されて引き続いて患者に提供されなければならないわけではなく、腫瘍脈管構造に自然に局在することが可能であって、その生物学的な抗腫瘍効果を発揮することが可能である。しかし、このような実施形態は、現在好ましくない。

【００７１】
インビトロでアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質を用いて末梢血リンパ球を刺激することによって、適切な抗体産生細胞をまた得ることが可能であり、抗体は引き続き単離され、そして／または精製されることが可能である。

【００７２】
他の方法は、少なくとも第一の免疫原性アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質成分を含む免疫組成物を動物に投与する工程、および、この免疫された動物からモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応するかまたは競合する抗体を選択する工程とを包含する。これらの方法は一般に：
（ａ）免疫学的に有効な量の免疫原性アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質を含有する組成物の少なくとも１回の用量および必要に応じて２回以上の用量を動物に投与することによってこの動物を免疫する工程と；
（ｂ）この免疫された動物から適切な抗体産生細胞、例えば、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応するか、または、競合する抗体を産生する抗体産生細胞を獲得する工程、
を包含する。

【００７３】
本明細書において用いる場合、好ましい「免疫学的に有効な量の免疫原性アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質を含む組成物」とは、活性化された内皮細胞を含む組成物である。「活性化された内皮細胞」は好ましくは、細胞生存度を実質的に維持して、内皮細胞の表面で少なくとも１つの陰イオン性リン脂質の発現を刺激するのに有効な時間、内皮細胞を活性化して、そして／または腫瘍環境を模倣する、少なくとも第一の条件下に、または少なくとも第一の因子と接触させて内皮細胞をおくことによって調製される。

【００７４】
活性化された内皮細胞を調製するのに有効な例示的な「条件」は、低酸素性および／または酸性環境である。活性化された内皮細胞を調製するのに有効な「要因」の例は、有効な濃度のH_2O_2、トロンビン、炎症性サイトカイン（単数または複数）（例えば、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、インターフェロンまたはＴＮＦα）であって、そして一般的には腫瘍環境を模倣する条件および／または要因の組み合わせである。

【００７５】
免疫プロセスの性質、または免疫された動物のタイプにかかわらず、適切な抗体産生細胞が免疫された動物から得られ、そして好ましくはヒトの手によってさらに操作される。「免疫された動物」とは、本明細書において用いる場合、他に特に言及しない限り、非ヒト動物である。任意の抗体産生細胞が用いられてもよいが、最も好ましくは、抗体産生細胞の供給源として脾臓細胞が得られる。抗体産生細胞は：
（ａ）適切な抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体産生細胞と不死細胞と

を融合して、本発明に従うモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマを調製する工程；および
（ｂ）ハイブリドーマから本発明に従う適切な抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を獲得する工程、
を包含する調製的プロセスにおいて用いられ得る。
【００７６】
「適切な」抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を産生する細胞、ハイブリドーマおよび抗体とは、抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体、好ましくはモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応するかまたは競合する抗体を産生するか、またはそのような抗体として存在するものである。
【００７７】
従って、ハイブリドーマベースのモノクローナル抗体の調製方法は：
（ａ）免疫学的に有効な量の免疫原性アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質を含む組成物、好ましくは活性化された内皮細胞を含む組成物の少なくとも１回の用量および必要に応じて２回以上の用量を動物に投与することによって動物を免疫する工程；
（ｂ）この免疫された動物からモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの収集物を調製する工程；
（ｃ）本発明による少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質モノクローナル抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応するかまたは競合する抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を産生する、少なくとも第一のハイブリドーマをこの収集物から選択する工程；および
（ｄ）少なくとも第一の抗体産生ハイブリドーマを培養して、少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質モノクローナル抗体を提供する工程と；そして好ましくは
（ｅ）この培養された少なくとも第一のハイブリドーマから少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質モノクローナル抗体を獲得する工程、
を含む方法を包含する。
【００７８】
モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応する抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を同定する工程において、選択工程は：
（ａ）アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質サンプル、好ましくはＰＳサンプルと、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）および候補抗体の有効量とを接触させる工程；および
（ｂ）この候補抗体が、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳサンプルに対する３Ｇ４抗体の結合を実質的に低下させる能力を決定する工程であって；ここでこの候補抗体のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳサンプルに対する３Ｇ４抗体の結合を実質的に低下させる能力が、モノクローナル抗体　３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の指標である、工程、
を包含し得る。
【００７９】
この選択工程はさらに：
（ａ）第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質サンプル、好ましくはＰＳと、有効な結合量のモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）とを接触させる工程、およびアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対して結合する３Ｇ４の量を決定する工程；
（ｂ）第二のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質サンプル、好ましくはＰＳと、有効な結合量のモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）とを有効な競合量の候補抗体と組み合わせて接触させる工程、およびこの候補抗体の存在下で、アミノ

リン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対して結合する３Ｇ４の量を決定する工程；および
（ｃ）アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳに対して結合する３Ｇ４の量を、好ましくは少なくとも約８０％まで低下させる候補抗体を選択する工程によって、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を同定する工程、
を包含してもよい。

【００８０】

本明細書において用いられる全ての選択基準は好ましくは、タンパク質と結合体化されているアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する、患者の病理学的抗体を模倣し得る抗体を産生することに伴う欠点を回避するために、血清の非存在下で行なう。

【００８１】

非ヒト動物が免疫に用いられる場合、このようなハイブリドーマから得られたモノクローナル抗体は、多くの場合、非ヒト構成を有し得る。このような抗体は、当業者に公知であり本明細書中にさらに開示されるように、必要に応じてヒト化プロセス、移植または変異に供されてもよい。あるいは、ヒト抗体遺伝子ライブラリーを含むトランスジェニック動物（例えばマウス）を用いてもよい。従って、このような動物の免疫化は直接、適切なヒト抗体の産生を生じる。

【００８２】

適切な抗体産生細胞の産生後に、最も好ましいハイブリドーマを、これがヒト抗体または非ヒト抗体のいずれを産生しようと、モノクローナル抗体コード核酸をクローニングして、「組み換え」モノクローナル抗体を調製してもよい。任意の組み換えクローニング技術を利用してもよいが、これには、抗体コード核酸配列の合成をプライムするＰＣＲ^{TM}の使用が包含される。従って、さらに適切なモノクローナル抗体調製方法としては、以下：
（ａ）少なくとも第一の適切な抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体をコードする核酸分子またはセグメントを、適切な抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体産生細胞、好ましくはハイブリドーマから得る工程；および
（ｂ）組み換え宿主細胞において核酸分子またはセグメントを発現して、本発明による組み換え抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質モノクローナル抗体を得る工程
のように、抗体産生細胞を用いる工程を含む方法が挙げられる。

【００８３】

しかし、組み換えモノクローナル抗体の調製に理想的に適切である、他の強力な組み換え技術が利用可能である。このような組み換え技術としては、ファージミドライブラリーベースのモノクローナル抗体調製方法が挙げられ、これは：
（ａ）免疫学的に有効な量の免疫原性アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質を含む組成物、好ましくは活性化された内皮細胞を含む組成物の少なくとも１つの用量および必要に応じて２つ以上の用量を動物に投与する工程によって動物を免疫する工程；
（ｂ）この免疫された動物の抗体産生細胞から、好ましくは脾臓から単離されたＲＮＡを発現する組合せの免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製する工程；
（ｃ）少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に交差反応するかまたは競合する抗体を発現する少なくとも第一のクローンをこのファージミドライブラリーから選択する工程；
（ｄ）抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体をコードする核酸を、少なくとも第一の選択されたクローンから獲得して、組み換え宿主細胞においてこの核酸を発現して、少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を提供する工程；および、好ましくは
（ｅ）少なくとも第一の選択されたクローンから得られた核酸によって発現される少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体を獲得する工程、を包含

する。
【００８４】
ここでも、このようなファージミドライブラリーベースの技術において、ヒト抗体遺伝子ライブラリーを保有するトランスジェニック動物を使用して、これによって組み換えヒトモノクローナル抗体を産生してもよい。
【００８５】
第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体核酸セグメントの調製の様式にかかわらず、さらなる適切な抗体核酸セグメントは、標準的な分子生物学的技術によって容易に調製され得る。任意の改変体、変異体または第二世代の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体核酸セグメントが本発明における使用に適切であることを確認するために、核酸セグメントを試験して本発明による抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の発現を確認する。好ましくは、この改変体、変異体または第二世代の核酸セグメントをまた、標準的な、より好ましくは標準的なストリンジェントのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイゼーションを確認するために試験する。例示的に適切なハイブリダイゼーション条件としては、約７％のドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、約０．５Ｍ　$NaPO_4$、約１ｍＭ　ＥＤＴＡにおける約５０℃でのハイブリダイゼーション；および約１％ＳＤＳを用いた約４２℃での洗浄が挙げられる。
【００８６】
種々の組み換えモノクローナル抗体が、ヒト起源であろうと非ヒト起源であろうと、容易に調製できるので、本発明の任意の処置方法は、患者において少なくとも第一の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の生物学的に有効な量を発現する少なくとも第一の核酸セグメントを動物または患者に提供することによって実行できる。「抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質、３Ｇ４様または３Ｇ４ベースの抗体を発現する核酸セグメント」は、一般に少なくとも発現構築物の形態であり、そしてウイルス内または組み換え宿主細胞内に含まれる発現構築物の形態であってもよい。本発明の好ましい遺伝子治療ベクターは、一般に、ウイルスベクターであり、例えば、組換えレトロウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス（ＡＡＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）などに含まれる。
【００８７】
（細胞不透過性デュラマイシン誘導体）
本発明はさらに、実質的に細胞不透過性のＰＥ結合構築物を形成するように改変されている少なくとも第一のＰＥ結合ペプチドを含む、実質的に細胞不透過性のホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）結合ペプチド構築物および誘導体を提供する。
【００８８】
好ましくは、本発明は、薬学的に受容可能なキャリア中に、生物学的にまたは治療上有効な量の少なくとも第一の実質的に細胞不透過性のＰＥ結合構築物を含む薬学的組成物を提供するが、これは、実質的に細胞不透過性のＰＥ結合構築物を形成するように改変されている少なくとも第一のＰＥ結合ペプチドを含む。従って、実質的に細胞不透過性のＰＥ結合構築物は、薬学的、薬理学的および治療的、すなわち、医学用途のため、好ましくはウイルス感染を処置するのにおける使用のための構築物である。特定の実施形態では、本発明はビオチンに連結されたシンナマイシン以外に実質的に細胞不透過性のＰＥ結合構築物を提供する。
【００８９】
最も好ましくは、本発明の実質的に細胞不透過性のＰＥ結合ペプチド誘導体は、実質的に細胞不透過性のデュラマイシンペプチド誘導体およびその薬学的組成物である。デュラマインペプチドは代表的に、少なくとも第一の細胞不透過性基に対する作動可能な結合によって、実質的に細胞不透過性のデュラマイシン誘導体を形成するように改変される。細胞不透過性基の作動可能な結合は、配列番号９におけるアミノ酸位置２のリジン残基を介してもよい。
【００９０】

細胞不透過性基は、生理学的なｐＨで正または負の電荷を有してもよいし、または極性であってもよい。例示的な基としては、硫酸基、スルホン酸基、リン酸基、カルボキシル基、フェノール基、４級アンモニウムイオン、およびアミノ基が挙げられる。ビオチンに連結されたデュラマイシンを含む薬学的組成物は、本発明内の特定の例である。

【００９１】

実質的に細胞不透過性のデュラマイシンはまた、糖、オリゴ糖、または多糖、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質またはポリアルコール基に作動可能に連結されてもよい。特定の細胞不透過性デュラマイシンは、不活性なキャリアタンパク質（例えば、ニュートラビジン、ストレプトアビジン、アルブミンまたは不活性な免疫グロブリンキャリアタンパク質）に作動可能に連結されたものであり、その中でもヒトＩｇＧ（ＨＩｇＧ）に結合されたデュラマイシンが特に好ましい。細胞不透過性デュラマイシンの他の例は、標的因子に連結されたもの、好ましくは腫瘍細胞、腫瘍脈管構造もしくは腫瘍間質に、またはウイルスに感染された細胞に結合したものである。腫瘍細胞、腫瘍脈管構造または腫瘍間質の成分に結合する標的化因子の例は、その各々が本明細書において参考として明確に援用される、米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号および同第６，０３６，９５５号に教示される。

【００９２】

腫瘍処置：本発明はさらに、少なくとも第一の精製された抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体であって、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープ、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体に結合するものを含む組成物を提供する。このような組成物は好ましくは、薬学的に受容可能な組成物であって、これには非経口投与のため、例えば静脈内投与のため、またはリポソームとしてもしくはエアロゾルとしての投与のために処方された組成物が挙げられる。

【００９３】

本発明は、３Ｇ４交差反応性抗体、３Ｇ４様抗体、または３Ｇ４に基づく抗体を含む抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体、ならびに実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の多数の方法および用途を提供する。全ての方法に関与して、用語「１つの（「ａ」および「ａｎ」）」は、特に言及される場合を除いて、言及される方法における工程のうち「少なくとも１つの（ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ）」、「少なくとも第一の（ａｔ　ｌｅａｓｔ　ａ　ｆｉｒｓｔ）」、「１つ以上の（ｏｎｅ　ｏｒ　ｍｏｒｅ）」または「複数の（ａ　ｐｌｕｒａｌｉｔｙ）」を意味するために用いられる。これは特に、処置される方法における投与工程に関連する。したがって、本発明は異なる用量が使用され得るだけでなく、異なる回数の用量、例えば、複数回の注射または吸入に及ぶ、注射または吸入が用いられてもよい。併用療法が用いられ、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または免疫結合体もしくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の投与の前後かまたは間に投与されてもよい。

【００９４】

重要な生物学的意味を有する種々の有用なインビトロ方法および用途が提供される。最初に提供されるのは、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳまたはＰＥを結合する方法およびその結合における用途であって、これは一般に、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくはＰＳまたはＰＥを含む組成物と、少なくとも第一の抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体とを、あるいは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体とを、効率的に接触させる工程を包含する。この「接触させる工程」は、結合された複合体の形成を可能にするのに有効な条件下であり、そしてそのように形成された任意の複合体が検出される。この検出方法および用途は、生物学的サンプルと関連して、例えば、アポトーシス、腫瘍およびウイルスに感染した細胞の診断において用いられても

よく、そしてそれに基づく診断キットがまた提供される。

【００９５】

好ましくは本発明の抗体、抗原結合フラグメントおよび免疫結合体を使用する増殖阻害方法および用途が提供される。内皮細胞増殖および／または遊走を阻害する方法は一般に、内皮細胞の集団を含む細胞または組織の集団と、生物学的に有効な量の少なくとも第一の抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む組成物とを、内皮細胞増殖および／または遊走を阻害するのに有効な条件下で接触させる工程を包含する。

【００９６】

前述の方法および用途は、インビトロおよびインビボで行なうことができる。後者の場合、組織または細胞は、動物内部に位置し、そして抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体がこの動物に投与される。両方の場合とも、この方法および用途は、血管形成を阻害するための方法および用途となり、これは潜在的に血管形成性の血管を含む組織かまたはその血管の集団と、生物学的に有効な量の少なくとも第一の抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントを含む血管新生阻害組成物とを、血管形成を阻害するのに有効な条件下で接触させる工程を包含する。

【００９７】

潜在的に血管形成性の血管の集団をエキソビボで維持する場合、本発明は薬物開発プログラムにおいて有用性を有する。インビトロのスクリーニングアッセイにおいて確実な陽性および陰性のコントロールを用いることは、血管形成を阻害するかまたは促進する薬物の開発において、そして血管形成性のプロセスに対するさらなる情報の描写において、第一の工程として有用である。潜在的に血管形成性の血管の集団が動物または患者内に位置する場合、血管新生阻害組成物を、治療の形態でこの動物に投与する。

【００９８】

所望されない、不適切な、異常な、過剰なそして／または病理的な血管形成によって特徴付けられる任意の疾患または障害を有するかまたは発症しているリスクのある動物および患者について、血管新生阻害および抗血管性治療が提供される。広範な疾患および障害において異常な血管形成が生じるので、所定の血管新生阻害治療は、任意の受け入れ可能なモデルシステムで有効であることが一旦示されれば、血管形成に関連する疾患および障害の範囲全体を処置するために用いられ得ることが当業者には十分理解される。

【００９９】

本発明の方法および用途は、任意の形態の血管新生した腫瘍；加齢性黄斑変性症を含む黄斑変性症；関節リウマチを含む関節炎；アテローム性動脈硬化症およびアテローム斑；糖尿病性網膜症および他の網膜症；グレーブス病を含む甲状腺過形成；血管腫；血管新生緑内障；および乾癬を有するかまたは発症するリスクを有する動物および患者における使用を特に意図する。

【０１００】

本発明の方法および用途はさらに、動静脈奇形（ＡＶＭ）、髄膜腫および、血管形成術後の再狭窄を含む血管再狭窄を有するかまたは発症するリスクのある動物および患者の処置を意図する。治療方法および用途の他の意図される標的は、血管線維症、皮膚炎、子宮内膜症、血友病性関節、肥厚性瘢痕、炎症性疾患および障害、化膿性肉芽腫、強皮症、滑膜炎、トラコーマおよび血管接着を有するかまたは発症するリスクを有する動物および患者である。

【０１０１】

参考として本明細書に詳細に援用される、米国特許第５，７１２，２９１号に開示されるとおり、前述の処置群の各々は、本発明によって処置されるべき状態の決して網羅的なタイプではない。米国特許第５，７１２，２９１号は、特定の特異的な目的のために参考

として本明細書に援用される。この目的としては、血管新生阻害治療によって有効に処置され得る多数の他の状態を同定する目的；一旦血管形成阻害化合物の規定のカテゴリーが開示され請求されれば（この場合、抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体）、全ての血管新生性疾患の処置が統合された概念に相当することを示す目的；ならびに全ての血管形成性疾患の処置が単一のモデル系のみに由来するデータによって可能になることを示す目的が挙げられる。

【０１０２】

血管形成性および血管の疾患の処置に加えて、本発明の重要なかつ統合された局面は、ガンを有するかまたはガンを発症するリスクがある動物および患者を処置するための組成物および方法である。全てのガン処置方法および用途は、少なくとも第一の精製された抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の投与または使用を包含する。このような構築物はガンを有する動物または患者に、治療上有効な量で投与される。

【０１０３】

本発明のガン処置方法は、抗体を用いる方法でさえ、抗血管効果および／または血管新生阻害の効果を発揮することのみには依存しない。本発明のガン処置方法および用途は、血管化した固体腫瘍、転移性腫瘍または原発性腫瘍からの転移を有するかそれらを発症するリスクのある動物および患者を含む、全ての形態のガンを処置するのに適切である。

【０１０４】

未結合体化のまたは「裸の抗体（ｎａｋｅｄ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」およびそのフラグメント、ならびに抗体またはその抗原結合フラグメントが治療剤に作動可能に連結されている免疫結合体の両方とも、本発明の抗ガンの局面において用いることができる。従って、他に特に言及するか、または科学的用語で明確にしない限り、「抗体およびそのフラグメント」という用語は、本明細書において用いる場合、別の因子、特に、治療剤または診断剤に結合されない、「未結合体化または裸の」抗体またはフラグメントを意味する。これらの定義は、抗体の改変、例えば、抗体または他のエフェクターと抗体の組み合わせの生物学的半減期、親和性、結合力または他の特性を改善するための改変などを除外しない。

【０１０５】

ガンを処置するための免疫結合体に基づく方法において、抗体またはその抗原結合フラグメントが、抗ガン効果を直接または間接的に有し得る任意の１つ以上のある範囲の生物学的、治療的および／またはいわゆる第二の抗ガン剤（抗アミノリン脂質抗体自体または抗陰イオン性リン脂質抗体自体、第一の血管新生阻害因子である）に作動可能に連結される。

【０１０６】

従って、本発明はさらに、腫瘍に対して選択された治療剤または診断剤を送達するための方法、およびその送達における使用を提供する。このような実施形態は、診断または治療の因子が抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメント、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体に作動可能に連結される少なくとも第一の免疫結合体を含む生物学的有効量の組成物を、腫瘍を有する動物または患者に投与する工程を包含する。

【０１０７】

従って、本発明の組成物、ならびに方法および使用は、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体であって、必要に応じて少なく

とも第一の生物学的、治療的または診断的な因子に作動可能に連結される抗体を含む組成物を包含する。この抗体は、好ましくは、放射性療法剤、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、抗チューブリン薬、抗細胞性、細胞傷害性因子またはサイトカインに（または以下に考察されるような抗ウイルス薬に）連結される。

【０１０８】

結合のための特定の好ましい因子は、例えば、複合体を化学療法のための代理のマーカーとして用いることを可能にする、インビボの診断剤である。

【０１０９】

抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４ベースの治療複合体における使用のために好ましい因子は、その抗体および／または特定の腫瘍タイプまたは患者について選択された抗体の効果を補完または増強する因子である。「抗体の効果を補完または増強する治療剤」としては、放射性因子、血管浸透性増強因子、特定のサイトカイン、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、および抗チューブリン薬で、このうち任意の１つ以上を一緒に用いることができる。

【０１１０】

現在好ましい因子は、細胞毒性因子、ゲロニン；ＴＮＦα、ＩＬ－１２およびＬＥＣ（肝臓発現ケモカイン）のようなサイトカイン；表Ｅに示されるような血管新生阻害効果を有する抗ガン剤；表Ｆにおけるような、アポトーシスを誘導する抗ガン剤；およびコンブレタスタチン（ｃｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎ）ファミリー由来の抗チューブリン薬である。特に好ましい因子はドセタキセルである。

【０１１１】

本発明のガン処置組成物および方法はまた、他の治療剤および診断薬とともに用いることができる。治療剤と組み合わせた抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく抗体に関して、「組み合わせた」使用とはまた、組み合わせた組成物、製剤、カクテル、キット、方法を包含し、ここで治療剤はプロドラッグの形態である。

【０１１２】

組み合わせたガン治療方法は、少なくとも第一の精製された抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と本質的に同じエピトープに結合するもの、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体が、ガンを有する動物または患者に、治療上有効な量の少なくとも第二の治療剤または抗ガン剤と組み合わせて投与される方法である。

【０１１３】

本発明はさらに、組成物、薬学的組成物、治療キットおよび医療用カクテルを提供する。これは必要に応じて、少なくとも第一の組成物または容器中に、生物学的に有効な量の少なくとも第一の抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体；および生物学的に有効な量の少なくとも第二の生物学的因子、成分またはシステム、好ましくは少なくとも第二の治療剤または抗ガン剤を含む。

【０１１４】

「少なくとも第二の生物学的因子、成分またはシステム」はしばしば、治療剤または診断剤、構成要素またはシステムであるが、しばしばそうではない。例えば、少なくとも第二の生物学的因子、構成要素またはシステムは、抗体の改変のため、および／またはこの抗体に対する他の因子の結合のための成分を含んでもよい。特定の好ましい第二の生物学的因子、構成要素またはシステムは、プロドラッグまたはプロドラッグを作製して用いるための成分であり、これには、プロドラッグ自体を作製するための成分、およびこのよう

なプロドラッグまたはＡＤＥＰＴの実施形態において機能する本発明の抗体に適合するための構成要素を含む。

【０１１５】

処置されるべき疾患がガンである場合、「少なくとも第二の治療剤または抗ガン剤」が治療キットまたはカクテルに含まれる。「少なくとも第二の抗ガン剤」は、第一の抗ガン剤である、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４構築物、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体を参照して、選択される。従って、本発明の抗体は化学療法剤、放射線治療剤、サイトカイン、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、または抗ガン免疫毒素またはコアグリガンドと組み合わされてもよい。「化学療法剤（ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ａｇｅｎｔｓ）」としてはまた、遺伝子、ベクター、アンチセンス構築物およびリボザイムが挙げられる。

【０１１６】

現在好ましい第二の抗ガン剤は、表Ｅにあるような血管新生阻害効果を有する抗ガン剤；表Ｆにあるようなアポトーシスを誘導する抗ガン剤、およびコンブレタスタチンファミリー由来の抗チューブリン薬である。特に好ましい因子はドセタキセルである。

【０１１７】

本発明の組成物、キットおよび／または医薬に関して、治療剤の組み合わせた有効量は、単一の容器または容器手段内に含まれてもよく、または別個の容器もしくは容器手段内に含まれてもよい。カクテルは一般に、併用使用（組み合わせた使用）のために一緒に混合される。静脈投与のために処方された因子がしばしば好ましい。画像化成分がまた含まれてもよい。キットもまた、少なくとも第一の抗体を用いるための指示書を含み得、そして１つ以上の他の生物学的因子が含まれる。

【０１１８】

一般的に言えば、少なくとも第二の抗ガン剤がまた、動物または患者に、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４に基づく治療剤または実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体と実質的に同時に投与されてもよい；例えば、単一の薬学的組成物から、またはほぼ一緒に投与された２つの薬学的組成物から。

【０１１９】

あるいは、少なくとも第二の抗ガン剤は、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４に基づく治療剤または実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の投与に対して連続して動物または患者に対して投与されてもよい。「連続して（ａｔａ　ｔｉｍｅ　ｓｅｑｕｅｎｔｉａｌ）」とは、本明細書において用いる場合、少なくとも第二の抗ガン剤が、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４に基づく治療剤または実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の投与とは別の時点で動物または患者に投与されるように「ずらされた（ｓｔａｇｇｅｒｅｄ）」ことを意味する。２つの因子は、２つの因子がそのそれぞれの治療効果を発揮することを可能にするように効率的に離れた時点で投与され、すなわち、それらは、「生物学的に有効な時間間隔で」投与される。少なくとも第二の抗ガン剤は、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４に基づく治療剤または実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の投与前の生物学的に有効な時点で投与されてもよく、あるいはその治療剤投与後の生物学的に有効な時点でこの動物または患者に投与されてもよい。

【０１２０】

好ましくは、検出可能に標識された抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく抗体構築物を用いて、腫瘍画像化をもまた行ない得る。本発明に従う画像化は、アポトーシス前細胞およびアポトーシス細胞を検出し得、それによってこれは代理マーカーとして治療後に用いることができる。あるいは、形成された画像は、用いられるべき治療剤の結合部位の指標であるので、画像化は処置の前に行なってもよい。従って、ガン処置は：

（ａ）腫瘍を有する動物または患者に対して、腫瘍結合剤または抗アミノリン脂質抗体

もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく抗体に作動可能に連結された診断剤を含む、診断上最小量の少なくとも第一の検出可能に標識された腫瘍結合因子、好ましくは抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく抗体構築物を投与して、それによって腫瘍の検出可能な画像を形成することによって、腫瘍の画像を形成する工程；および

（ｂ）次に、同じ動物または患者に対して、少なくとも第一の裸の抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４抗体またはこのような抗体を用いる治療剤－抗体構築物の治療上最適の量を投与して、これによって抗腫瘍効果を生じる工程、によって実行され得る。

【０１２１】

従って、一般には：

（ａ）検出可能に標識された腫瘍結合因子、好ましくは抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく抗体構築物の診断上有効な量を含む第一の薬学的組成物であって、この腫瘍結合因子または抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく抗体に作動可能に連結された検出可能な因子を含む組成物；および

（ｂ）治療上有効な量の少なくとも１つの裸の抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４抗体またはこのような抗体を用いる治療剤－抗体構築物を含む第二の薬学的組成物、

を含む、画像および処置処方物または医薬が提供される。

【０１２２】

ウイルス感染の処置：本発明の特に重要かつ驚くべき成果は、ウイルス感染を処置または予防するための組成物、組み合わせ、キット、方法、使用、および医薬に関する。本発明の抗ウイルス処置方法は、本発明の前述の任意の１つ以上、およびさらなる治療剤の投与または使用に関する。

【０１２３】

最初の例において、本発明の抗ウイルス組成物および処置方法は、組成物に関して、そしてガン処置に関して上記されるように、少なくとも第一の精製された抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメント、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体もしくは抗原結合フラグメント、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の投与および使用に関する。実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体のうち、使用に好ましいのは、実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体、例えば、ビオチンに連結されたデュラマイシン、またはＨＩｇＧに連結されたデュラマイシンである。

【０１２４】

本発明の抗体およびペプチドと、ウイルス感染との間の驚くべき相関を考慮すれば、本発明はさらに、ウイルス感染を処置する際の使用のための一連の新規な治療剤を提供する。特に、本発明は、少なくとも第一の抗ウイルス剤に作動可能に連結された、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、特にＰＳおよびＰＥに対する抗体を提供する。本発明はさらに、少なくとも第一の抗ウイルス剤に作動可能に連結された、実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくはデュラマイシンペプチド誘導体を提供する。本発明の抗体およびペプチドに対する結合のための適切な抗ウイルス剤としては、表Ｇに示されるものが挙げられる。

【０１２５】

従って、全体として、本発明の抗ウイルス組成物および処置方法は、治療上有効な量の少なくとも第一の精製された抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、またはその抗原結合フラグメントもしくは抗ウイルス免疫結合体、必要に応じて、モノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体または抗原結合フラグメント、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘

導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体、またはその抗ウイルス免疫結合体を含む組成物を、ウイルス感染した動物または患者に投与する工程に関する。

【０１２６】

本発明の抗ウイルス処置方法および使用は、動物および患者において、さらには植物においてさえ全てのウイルスを処置するのに適切である。本発明の治療剤は、ウイルス進入を阻害し得るが、好ましくは、感染された宿主細胞からのウイルスの複製、出現および伝播を阻害し得る。本発明は、表Ｈにおいて本明細書に列挙されるような、脊椎動物（特にヒト）に感染する全てのウイルス、および特にヒトにおいて病原性であるウイルスを、処置するために適切である。本発明によって処置され得るウイルス感染および関連の疾患としては、ＣＭＶ、ＲＳＶおよびアレナウイルス感染を処置することによって例示されるような、表Ｊに記載されるウイルスおよび疾患、ならびに肝炎、インフルエンザ、肺炎、ラッサ熱およびＡＩＤＳが挙げられる。

【０１２７】

本発明の抗ウイルス処置組成物および方法はまた、他の治療剤および診断剤と組み合わせて用いられてもよい。これらの「組み合わされた」使用は、組み合わせた組成物、製剤、カクテル、キットおよび処置方法において別の抗ウイルス剤と組み合わされる。

【０１２８】

前述のガン処置および抗ウイルス処置の方法および使用はしばしば、動物または患者への、薬学的に有効な組成物の全身的な投与（例えば、経皮注射、筋肉内注射、静脈内注射などによる投与)を包含する。ウイルス感染、特に呼吸ウイルス感染を処置するために、エアロゾルを用いて達成され得る場合、肺への送達が好ましい。しかし、治療剤が腫瘍またはウイルス感染部位へ局在することを可能にする投与の任意の経路が採用される。従って、他の適切な送達の経路としては、経口、直腸、経鼻、局所および膣が挙げられる。参考として本明細書に詳細に援用される米国特許第５，７５３，２３０号における他の免疫学的因子について記載されるように、関節炎の処置のための使用および方法、例えば、滑膜内投与が使用され得る。眼に関連する条件については、眼科の処方物および投与を企図する。

【０１２９】

本明細書において用いる場合「投与」とは、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体または３Ｇ４に基づく治療剤、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくはデュラマイシン誘導体の、治療効果を発揮するのに有効な量（単数または複数）で、かつ時間（単数または複数）での供給および送達を意味する。タンパク様治療剤の受動的投与は、一般に、一部は、その単純さおよび再現性のために好ましい。

【０１３０】

しかし、「投与」という用語は、本明細書において、治療剤が送達される任意のかつ全ての手段を意味するとして用いられる。従って、「投与」とは、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４に基づく治療剤またはデュラマイシン誘導体の治療剤を有効な様式で生成する細胞の供給を包含する。このような実施形態では、一般に治療を中止するために除去し得る、選択的に透過性の膜、構造物または不浸透性のデバイス中に細胞を処方またはパッケージングすることが所望され得る。この用量が厳密にモニターされかつ制御されることを可能にする非侵襲的な方法を表す場合、外因性の投与が、なお一般に好ましい。

【０１３１】

本発明の治療方法および使用はまた、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体をコードする核酸、３Ｇ４に基づく治療剤またはデュラマイシン誘導体治療剤の、そのインビボでの発現を生じるのに有効な様式での提供におよぶ。任意の遺伝子治療技術、例えば、裸のＤＮＡ送達、組換え遺伝子およびベクター、細胞に基づく送達が使用され得、これは、患者の細胞のエキソビボ操作などを含む。リポソームおよびステルス化リポソームは、いくつかの実施形態における使用に好ましい。

【０１３２】
本発明の薬学的組成物および処置方法は、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、必要に応じてモノクローナル抗体３Ｇ４（ＡＴＣＣ　ＰＴＡ　４５４５）と実質的に同じエピトープに結合する抗体、またはこのような抗体の抗原結合フラグメントもしくは免疫結合体、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくは実質的に細胞不浸透性のデュラマイシン誘導体の「治療的に有効な量」を使用する。「治療効果」および結果として「治療上有効な量」は、ガン処置対抗ウイルス処置における異なるパラメーターによって測定される。
【０１３３】
ガン処置においては、因子の量は、腫瘍細胞、腫瘍または腫瘍内血管内皮細胞の少なくとも一部を特異的に殺傷するために；腫瘍細胞、腫瘍または腫瘍内血管内皮細胞の少なくとも一部においてアポトーシスを特異的に誘導するために；腫瘍または腫瘍内血管の少なくとも一部において凝固を特異的に促進するために；腫瘍の血液輸送血管の少なくとも一部を特異的に閉塞または破壊するために；腫瘍の少なくとも一部において壊死を特異的に誘導するために；そして／または動物または患者に対する投与の際に腫瘍退行または寛解を誘導するために、有効である。
【０１３４】
ウイルス感染および関連の疾患を処置するのにおいて、因子の量は、ウイルス感染を進行させるための要件、例えば、ウイルス進入、および好ましくはウイルス複製、出現および感染した宿主細胞からの伝播のうちの１つ以上を阻害するために有効である。この量はまた、ウイルス複製、伝播および感染の進行を妨げる様式でウイルス感染した細胞の少なくとも一部を殺傷または除去し得る。全体的に、この因子の量は、動物または患者に対する投与の際にウイルス感染を低下させるか、有意に低下させるかまたは根絶させるために有効である。
【０１３５】
本明細書において用いる場合、「優先的に」および「特異的に」という用語は、抗アミノリン脂質抗体もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、３Ｇ４に基づく治療剤、または実質的に細胞不浸透性のＰＥ結合ペプチド誘導体、好ましくはデュラマイシン誘導体が、疾患部位に実質的に規定されて、動物または被験体の正常な健常な組織における凝固、破壊および／または組織壊死を実質的に生じない、抗ガンまたは抗ウイルスの効果を達成することを意味する。従って、健常な細胞および組織の構造および機能は本発明の実施によって維持され、実質的に損なわれない。
本明細書の図面の部分は、本発明特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書において提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の１つ以上を参照することによってよりよく理解され得る。本特許の米国出願は、少なくとも１つのカラー図面を含む。このカラー図面を含む本特許のコピーは、必要な料金の要求および支払いに応じて特許商標庁から提供される。
【図面の簡単な説明】
【０１３６】
【図１】マウスにおけるＬ５４０ヒトホジキンリンパ腫、３ＬＬマウス肺ガン腫およびＢ１６マウス黒色腫瘍における血管内皮細胞への抗ＰＳ抗体（３ＳＢ）の局在化。腫瘍保有ＳＣＩＤマウスに２０μｇの抗ＰＳ（３ＳＢ）または抗ＣＬ（Ｄ１１）マウスＩｇＭを静脈内注射した。１時間後に生理食塩水を用いて血液循環を行なった。１時間後にマウスを屠殺して、腫瘍および器官を回収して急速凍結した。ヤギ抗マウスＩｇＭペルオキシダーゼ結合体を用いて凍結切片からマウスＩｇＭを検出した。抗ＰＳ抗体は全ての腫瘍において血管（矢印で示す）に特異的に局在する。コントロールの抗ＣＬ　ＩｇＭを注射したマウスでは局在化は観察されなかった。
【図２】プラスチックに吸着されたリン脂質に対する９Ｄ２抗体およびアネキシンＶの結合。リン脂質は、プラスチックのマイクロタイタープレートに吸着された。１０％血清を用いたブロッキング後、９Ｄ２抗体（図２Ａ）またはアネキシンＶ（図２Ｂ）を１０％血

清の存在下で６．６６ｎＭ～０．００５ｎＭの範囲の濃度で添加した。このプレートを洗浄して、それぞれ、ヤギ抗ラットＩｇＭ－ＨＲＰおよびウサギ抗アネキシンＶ　ＩｇＧ、続いて抗ウサギＨＲＰを用いて、結合した９Ｄ２抗体およびアネキシンＶを検出した。

【図３】リン脂質リポソームと競合するH_2O_2処理した内皮細胞上の陰イオン性リン脂質に対する９Ｄ２抗体およびアネキシンＶの結合の阻害。９Ｄ２抗体およびアネキシンＶ（６．６６ｎＭ）を、１０％血清を含有する種々のリン脂質リポソーム（２００μｇ／ｍｌ）ＤＰＢＳ緩衝液を用いて事前にインキュベートした。それぞれ、ヤギ抗ラットＩｇＭ－ＨＲＰおよびウサギ抗アネキシンＶ　ＩｇＧ、続いて抗ウサギＨＲＰを用いて、結合した９Ｄ２抗体およびアネキシンＶを検出した。競合するリポソームの有無における結合が検出された。三連の測定の標準偏差は、平均値の１０％未満であった。

【図４】マウスにおける正常位ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ヒト乳ガンでの血管内皮細胞および腫瘍細胞へのビオチン化した９Ｄ２抗体およびアネキシンＶの局在化。その乳房脂肪パッドにＭＤＡ－ＭＢ－２３１腫瘍を保有するＮｕ／ｎｕマウスに５０μｇのビオチン化９Ｄ２抗体または１００μｇのビオチン化アネキシンＶを静脈内注射した。１時間後、生理食塩水を用いてその血液循環を行なった。腫瘍および器官を取り出して急速凍結させた。局在する９Ｄ２およびアネキシンＶを、ストレプトアビジンＨＲＰ結合体を用いて凍結切片上で検出した。生理食塩水またはコントロールのラットＩｇＭを注射したマウス由来の腫瘍切片を陰性コントロールとして使用した。

【図５】ＰＳ暴露に対する低酸素症および炎症性サイトカインの併用効果。正常酸素状態（白のバー）および低酸素状態（灰色のバー）のもとでＩＬ－１αおよびＴＮＦαを用いてｂＥｎｄ．３細胞を２４時間処理した。細胞の単層はこれらの条件下で依然としてインタクトでありかつ生存していた。^{125}ＩアネキシンＶの結合を測定することによってＰＳ外面化を決定した。アクチノマイシンＤおよびＴＮＦαの組み合わせで処理した細胞におけるＰＳ露出のパーセンテージとしてＰＳ露出のレベルを表現した。

【図６】同系腫瘍および異種腫瘍を有する動物での抗ＰＳ抗体（３ＳＢ）の抗腫瘍効果。マウス結腸直腸ガン腫Ｃｏｌｏ２６（図６Ａ）またはヒトホジキンリンパ腫Ｌ５４０（図６Ｂ）の1×10^7個の細胞を、それぞれＢＡＬＢ／ｃマウス（図６Ａ）または雄性ＣＢ１７　ＳＣＩＤマウス（図６Ｂ）の右脇腹に皮下注射した。腫瘍を約０．６～０．９cm^3のサイズまで増殖させて、次いでマウス（１群あたり４動物）に２０μｇの裸の抗ＰＳ抗体（白ぬき四角）または生理食塩水（白抜き丸）を腹腔内（ｉ．ｐ．）注射した。４８時間の間隔で処置を３回繰り返した。腫瘍量および体重について動物を毎日測定した。腫瘍が２cm^3に達したときか、または腫瘍が壊死または潰瘍の兆候を示す前に、マウスを屠殺した。コントロールマウスＩｇＭによって生理食塩水と同様の結果が得られた。

【図７】Ｌ５４０ヒトホジキンリンパ腫を保有するマウスにおける９Ｄ２抗体の抗腫瘍効果。腫瘍保有マウスの群に、コントロール（白ぬき四角）に対して、１週あたり３回、１００μｇの９Ｄ２抗体（黒丸）を腹腔内注射した。週に２回カリパスによって腫瘍サイズを測定した。腫瘍細胞注射後の日数に対して腫瘍容積をプロットする。カッコ内の数は、退行した腫瘍を有するマウスの数／１群あたりの総マウス数を示す。

【図８－１】同系腫瘍および異種腫瘍を有する動物における抗ＰＳ抗体３Ｇ４の抗腫瘍効果。マウスＭｅｔｈ　Ａ腫瘍（図８Ａ）、ヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガン（図８Ｂ）およびヒトホジキンリンパ腫Ｌ５４０（図８Ｃ）の細胞をマウスに注射した。腫瘍を処置前に示したサイズまで増殖させた。ヒトホジキンリンパ腫細胞が大きい腫瘍を形成するようにさせた。各々の群のマウスに、コントロール（３Ｇ４は図８Ａ、図８Ｂ、図８Ｃで示す）に対して、１週あたり３回、１００μｇの３Ｇ４抗体を腹腔内注射した。腫瘍測定のために週に２回動物をモニターした。腫瘍接種後の日数に対して（図８Ａ）、または処置の日数に対して（図８Ｂおよび図８Ｃ）、２０～３０日間の腫瘍容積をプロットする（図８Ａ、図８Ｂおよび図８Ｃ；カッコ内の数は退行した腫瘍を有するマウスの数／１群あたりの総マウス数を示す）。

【図８－２】同系腫瘍および異種腫瘍を有する動物における抗ＰＳ抗体３Ｇ４の抗腫瘍効果。ヒトホジキンリンパ腫Ｌ５４０（図８Ｄ）、ヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガン（図８

Ｅ）およびＭＤＡ－ＭＢ－２３１ガン（図８Ｆ）の細胞をマウスに注射した。腫瘍を処置前に示したサイズまで増殖させた。ヒトホジキンリンパ腫細胞が大きい腫瘍を形成するようにさせた。各々の群のマウスに、コントロール（３Ｇ４は、図８Ｄ、図８Ｅ、図８Ｆに白丸によって示される）に対して、１週あたり３回、１００μｇの３Ｇ４抗体を腹腔内注射した。腫瘍測定のために週に２回動物をモニターした。処置の日数に対して、腫瘍容積を６０日間プロットする。

【図８－３】同系腫瘍および異種腫瘍を有する動物における抗ＰＳ抗体３Ｇ４の抗腫瘍効果。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ガンの細胞をマウスに注射した。腫瘍を処置前に示したサイズまで増殖させた。各々の群のマウスに、コントロールに対して、１週あたり３回、１００μｇの３Ｇ４抗体を腹腔内注射した。腫瘍測定のために週に２回動物をモニターした。３Ｇ４抗体およびキメラ３Ｇ４抗体（ｃｈ３Ｇ４）を用いて、コントロールに対して、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ガン細胞を処置した。

【図９－１】３Ｇ４抗体によるインビトロでのＣＭＶ複製の阻害。ＣＭＶ感染ＨＨＦ－Ｒ２細胞を３Ｇ４で処理した（上の２つのパネル）。コントロールウェルは未処理のまま（下の２つのパネル）であるか、アイソタイプマッチングしたコントロールＩｇＧ$_3$抗体ＧＶ３９Ｇで処理した（真ん中の２つのパネル）。異なる時点で細胞を観察した：３日（左列）および９日（右列）。感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑になる。１００μｇ／ｍｌでの抗体処理。

【図９－２】３Ｇ４抗体によるインビトロでのＣＭＶ複製の阻害。ＣＭＶ感染ＨＨＦ－Ｒ２細胞を３Ｇ４で処理した（上の２つのパネル）。コントロールウェルは未処理のまま（下の２つのパネル）であるか、アイソタイプマッチングしたコントロールＩｇＧ$_3$抗体ＧＶ３９Ｇで処理した（真ん中の２つのパネル）。異なる時点で細胞を観察した：３日（左列）および９日（右列）。感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑になる。５０μｇ／ｍｌでの抗体処理。

【図１０】インビトロにおけるＣＭＶ複製の濃度依存性阻害。ＣＭＶ感染ＨＨＦ－Ｒ２細胞を異なる濃度の３Ｇ４で処理した（上部パネル）。コントロールウェルは未処理のまま（下のパネル）であるか、アイソタイプマッチングしたコントロールＩｇＧ$_3$抗体ＧＶ３９Ｇで処理した（真ん中のパネル）。細胞を９日目に観察した。感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑になる。

【図１１－１】抗体処理された細胞におけるＣＭＶウイルスロードの定量およびウイルス複製周期の後期段階での複製の阻害。ヒト線維芽細胞の単層を、０．０１ｐｆｕ／細胞という低いｍ．ｏ．ｉ．でＣＭＶで感染させて、示した濃度の３Ｇ４抗体；コントロール抗体ＧＶ３９Ｇ；またはコントロール抗コルヒチン抗体Ｃ４４（図１１Ａ；未処理、未処理コントロール）を用いて処理した。ヒト線維芽細胞の単層を、３ｐｆｕ／細胞という高いｍ．ｏ．ｉ．でＣＭＶで感染させて、５０μｇ／ｍｌまたは１００μｇ／ｍｌの３Ｇ４抗体またはコントロール抗体ＧＶ３９Ｇ（図１１Ｂ）を用いて処理した。図１１Ａおよび図１１Ｂの各々において、細胞および上清におけるウイルスロードを標準的なプラークアッセイを用いて定量した。

【図１１－２】抗体処理された細胞におけるＣＭＶウイルスロードの定量およびウイルス複製周期の後期段階での複製の阻害。ヒト線維芽細胞の単層を、ＣＭＶを高いｍ．ｏ．ｉ．で用いて感染させて、３Ｇ４抗体またはコントロール抗体ＧＶ３９Ｇを感染後に示した時点で加えた。図１１Ｃにおいて、細胞および上清におけるウイルスロードを標準的なプラークアッセイを用いて定量した。

【図１２】３Ｇ４、１Ｂ９および３ＳＢ抗体によるインビトロでのＲＳＶ複製の阻害。ＲＳＶ感染したＡ－５４９細胞を３Ｇ４、１Ｂ９もしくは３ＳＢを用いて処理するか、またはコントロールとして未処理のままにした。１Ｂ９（緑）および３ＳＢ（赤）を用いた処理によって、ウイルス複製の対数減少が得られた（対コントロールは青）。３Ｇ４のさらに顕著な抗ウイルス効果はピンクで示される。

【図１３－１】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。化合物の各々について、構築物が有意な非特異的な毒

性効果を発揮することを妨げるために、細胞不浸透性基に対してＰＥ結合ペプチドデュラマイシンを結合させた。
【図１３－２】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。化合物の各々について、構築物が有意な非特異的な毒性効果を発揮することを妨げるために、細胞不浸透性基に対してＰＥ結合ペプチドデュラマイシンを結合させた。
【図１３－３】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。化合物の各々について、構築物が有意な非特異的な毒性効果を発揮することを妨げるために、細胞不浸透性基に対してＰＥ結合ペプチドデュラマイシンを結合させた。
【図１３－４】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。化合物の各々について、構築物が有意な非特異的な毒性効果を発揮することを妨げるために、細胞不浸透性基に対してＰＥ結合ペプチドデュラマイシンを結合させた。
【図１３－５】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。化合物の各々について、構築物が有意な非特異的な毒性効果を発揮することを妨げるために、細胞不浸透性基に対してＰＥ結合ペプチドデュラマイシンを結合させた。
【図１３－６】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。化合物の各々について、構築物が有意な非特異的な毒性効果を発揮することを妨げるために、細胞不浸透性基に対してＰＥ結合ペプチドデュラマイシンを結合させた。
【図１３－７】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。親のデュラマイシン環状ペプチドの模式的な構造を図１３Ｐに示す。
【図１３－８】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。線状の配列を配列番号９で示し、この配列における改変されたアミノ酸の構造を図１３Ｑに示す。
【図１３－９】デュラマイシン誘導体の構造。実施例ＸＶ由来の例示的なデュラマイシン誘導体についての化学構造を示す。図１３Ｒは、デュラマイシンがシドフォビルに連結される例示的なデュラマイシン抗ウイルス構築物を示す。
【図１４－１】デュラマイシン誘導体の結合特異性。デュラマイシン誘導体を実施例ＸＶに記載されたように調製して、その特異性を実施例ＸＶＩに記載されたようにＥＬＩＳＡおよび競合ＥＬＩＳＡを用いて決定した。図１４Ａは、ＰＥについての特異性を示す、リン脂質のパネルに対するデュラマイシン誘導体のリン脂質結合プロフィールである。
【図１４－２】デュラマイシン誘導体の結合特異性。デュラマイシン誘導体を実施例ＸＶに記載されたように調製して、その特異性を実施例ＸＶＩに記載されたようにＥＬＩＳＡおよび競合ＥＬＩＳＡを用いて決定した。図１４Ｂは、血清はＰＥ結合に対して有意な効果を有さないことを示す。
【図１４－３】デュラマイシン誘導体の結合特異性。デュラマイシン誘導体を実施例ＸＶに記載されたように調製して、その特異性を実施例ＸＶＩに記載されたようにＥＬＩＳＡおよび競合ＥＬＩＳＡを用いて決定した。図１４Ｃおよび図１４Ｄは、ＰＥについてのデュラマイシン誘導体の特異性を確認する競合ＥＬＩＳＡからの結果である。
【図１５】デュラマイシン誘導体によるインビトロでのＣＭＶ複製の阻害。ＣＭＶ感染したＨＨＦ－Ｒ２細胞を、デュラマイシン誘導体（ＤＬＢ）$_4$ＮＡおよび（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧを用いて処理した。コントロールウェルは、未処理のまま残した。細胞を異なる時点で観察した：４日目（左パネル）および６日目（右パネル）。感染した細胞は蛍光顕微鏡下で緑になる。（ＤＬＢ）$_4$ＮＡおよび（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧは、単一の感染した細胞からのウイルス伝播を阻害する。
【図１６】抗ＰＳ抗体による内皮細胞の分裂の選択的阻害。実施例ＸＶＩＩＩに記載のと

おりインビトロにおいて、内皮細胞上の阻害性効果について抗ＰＳ抗体３ＳＢ、９Ｄ２および３Ｇ４を試験した。３ＳＢ、９Ｄ２および３Ｇ４の抗体の各々が静止期（コンフルエント）細胞に対して（サブコンフルエントな）内皮細胞の分裂の選択的阻害を示す。９Ｄ２および３Ｇ４抗体の両方が３ＳＢよりも大きい阻害性効果を有する。

【図１７－１】腫瘍保有マウスにおける３Ｇ４抗体の血管新生阻害効果および脈管標的効果。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１正常位腫瘍を保有するヌードマウスを、１００μｇ／用量の３Ｇ４抗体を用いて（処置、右パネル）、または同じ用量のアイソタイプマッチしたコントロール抗体を用いて（コントロール、左パネル）週に３回処置した。処置の終わりに、動物を灌流させて、腫瘍を急速凍結させて、切断し、マウス脈管構造の汎内皮（ｐａｎ－ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ）マーカーであるマウスＣＤ３１に対する抗体（ラット、抗マウスＣＤ３１）を用いて染色した。コントロール動物および処置動物由来の腫瘍切片を比較することによって、３Ｇ４の投与によって血管新生阻害効果が得られることが示される。

【図１７－２】腫瘍保有マウスにおける３Ｇ４抗体の血管新生阻害効果および脈管標的効果。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１正常位腫瘍を保有するヌードマウスを、１００μｇ／用量の３Ｇ４抗体を用いて（処置、右パネル）、または同じ用量のアイソタイプマッチしたコントロール抗体を用いて（コントロール、左パネル）週に３回処置した。処置の終わりに、動物を灌流させて、腫瘍を急速凍結させて、切断し、パラフィン中に包埋してＨ＆Ｅで染色した。コントロール動物および処置動物由来の腫瘍切片を比較することによって、３Ｇ４の投与によって脈管標的効果が得られることが示される。

【図１８－１】３Ｇ４抗体の相補性決定領域（ＣＤＲｓ）のＤＮＡおよびアミノ酸配列。重鎖（図１８Ａ；配列番号１および配列番号２）のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示しており、ＤＮＡ配列における制限部位を示す。リーダー配列は、成熟タンパク質から識別され、これは図１８Ａにおける最初の矢印によって示されるように開始する。各々の可変配列とヒト定常領域を接合する例示的な手段を記載しているが、ここでは、それぞれのヒト定常領域配列（配列番号７および配列番号８）の第一の部分が、図１８Ａにおいて第二の矢印で示される。

【図１８－２】３Ｇ４抗体の相補性決定領域（ＣＤＲｓ）のＤＮＡおよびアミノ酸配列。軽鎖（配列番号１８Ｂ；配列番号３および配列番号４）のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示しており、ＤＮＡ配列における制限部位を示す。リーダー配列は、成熟タンパク質から識別され、これは図１８Ｂにおける最初の矢印によって示されるように開始する。各々の可変配列とヒト定常領域を接合する例示的な手段を記載しているが、ここでは、それぞれのヒト定常領域配列（配列番号７および配列番号８）の第一の部分が、図１８Ｂの各々において第二の矢印で示される。

【図１９－１】ＩｇＭ抗ＰＳ抗体３ＳＢ結合とのＩｇＧ抗ＰＳ抗体３Ｇ４のＰＳ結合の比較。ＩｇＭ抗体３ＳＢ（黒菱形）および２つのＩｇＧ抗体である３Ｇ４（黒三角）および３Ｂ１０（黒四角）のＰＳ結合を、３．３７５ｎＭにおよぶ抗体濃度を用いてＥＬＩＳＡによって決定した。

【図１９－２】ＩｇＭ抗ＰＳ抗体３ＳＢ結合とのＩｇＧ抗ＰＳ抗体３Ｇ４のＰＳ結合の比較。０．０６ｎＭにおよぶ濃度での３ＳＢ抗体（黒菱形）、３Ｇ４抗体（黒三角）および３Ｂ１０抗体（黒四角）のＰＳ結合を別々に示す。

【図２０】競合するリン脂質リポソームを用いる、固定されたＰＳに対する３Ｇ４抗体の結合の阻害。３Ｇ４抗体（０．１μｇ／ｍｌ）を、純粋なリン脂質から作製された種々のリポソーム（ＰＳ－Ｌ、ＰＥ－Ｌ、ＰＩ－Ｌ、ＰＣ－Ｌ、ＣＬ－Ｌ、ＰＡ－ＬおよびＰＧ－Ｌ）または緩衝液単独（コントロール）とともに３０分間プレインキュベートした。次いでこの混合物をＰＳコーティングされたＥＬＩＳＡプレートに添加して、洗浄し、結合した抗体を、二次抗体およびＯＰＤを用いて検出した。列挙したリポソームの存在下での結合を示しており、任意のリポソームの非存在下における３Ｇ４抗体結合と比較する。

【図２１】リン脂質に対するキメラ３Ｇ４の結合。キメラ３Ｇ４抗体（ｃｈ３Ｇ４）を実施例ＸＩＸに記載されたとおり調製した。リン脂質（ＰＳ、ＰＩ、ＰＥ、ＰＣ、ＳＭ、ＣＬ、ＰＧおよびＰＡ）を、マイクロタイタープレートのプラスチックに対して吸着させた

。ブロッキング後、キメラ３Ｇ４抗体を、示した濃度で添加した。プレートを洗浄して、結合したキメラ３Ｇ４抗体を、二次抗体結合および発色によって検出した。
【図２２】インビボでの腫瘍血管内皮細胞に対するキメラ３Ｇ４の局在化。ビオチン化ｃｈ３Ｇ４（上部パネル）およびコントロールＩｇＧ（底部パネル）をＭＤ－ＭＢＡ－４３５腫瘍を保有するマウスに投与した。Ｃｙ３結合体化ストレプトアビジンを用いて腫瘍切片を染色して、ビオチン化抗体（左パネル）を検出した。ＭＥＣＡ３２抗体とその後のＦＩＴＣ標的化抗ラットＩｇＧ二次抗体を用いた染色を行なって、血管内皮を検出した（中央のパネル）。赤色および緑色の画像を１つにし（右パネル）、その上で腫瘍血管内皮に結合したビオチン化タンパク質は黄色になる。脈管内皮の局在した３Ｇ４抗体およびＭＥＣＡ３２マーカーの同時染色は、重ね合わせた画像上で黄色によって示される（上の右側）。
【図２３】３Ｇ４によるＰＳ陽性細胞のマクロファージ食作用の強化。ＨＬ－６０腫瘍細胞を緑色蛍光色素ＣＦＤＡで標識して、ＰＳ露出を２００μＭのH_2O_2によって誘導した。処理した細胞を収集して、５μｇ／ｍｌの３Ｇ４またはアイソタイプマッチングしたコントロール抗体（ＢＢＧ３）を用いて１時間オプソニン化した。次いで、標識細胞をマクロファージに添加して、これをマウス骨髄から単離して、５ｎｇ／ｍｌのＧＭ－ＣＳＦを含有する培地中で５日間チャンバスライドにおいて培養した。２時間後、このスライドを固定して、蛍光顕微鏡下で食作用を視覚的にカウントした。結果は食菌するマクロファージ（少なくとも１つの腫瘍細胞を食菌したマクロファージ）の割合として示される。
【図２４－１】ドセタキセルによる、内皮細胞上のＰＳ露出の誘導。ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）およびヒト微小血管内皮細胞（ＨＭＶＥＣ）を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処理した。細胞を収集して、ＰＢＳを用いて洗浄して、１０μｇ／ｍｌの３Ｇ４とともに氷上で３０分間インキュベートした。次いで細胞を２回洗浄して、ＦＩＴＣ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを添加して、細胞を氷上でさらに３０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄して、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ取得ソフトウェアを備えるＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いてＦＡＣＳによって解析した。処理したＨＵＶＥＣは、未処理の細胞に比べて３Ｇ４結合の有意な増大を示す。
【図２４－２】ドセタキセルによる、内皮細胞上のＰＳ露出の誘導。ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）およびヒト微小血管内皮細胞（ＨＭＶＥＣ）を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処理した。細胞を収集して、ＰＢＳを用いて洗浄して、１０μｇ／ｍｌの３Ｇ４とともに氷上で３０分間インキュベートした。次いで細胞を２回洗浄して、ＦＩＴＣ標識したヤギ抗マウスＩｇＧを添加して、細胞を氷上でさらに３０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄して、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ取得ソフトウェアを備えるＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いてＦＡＣＳによって解析した。処理したＨＭＶＥＣは、未処理の細胞に比べて３Ｇ４結合の有意な増大を示す。
【図２５－１】ドセタキセルによる腫瘍細胞株上のＰＳ露出の誘導。マウスのルイス肺ガン腫３ＬＬ、マウス結腸ガン腫Ｃｏｌｏ２６およびヒト乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－４３５細胞を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処理した。細胞を収集して、ＰＢＳを用いて洗浄して、３Ｇ４を１０μｇ／ｍｌで用いて氷上で３０分間インキュベートした。次いで細胞を２回洗浄して、ＦＩＴＣ標識されたヤギ抗マウスＩｇＧを添加して、この細胞をさらに３０分間、氷上でインキュベートした。次いで、細胞を洗浄して、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ取得ソフトウェアを備えるＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いてＦＡＣＳによって解析した。処理した３ＬＬ細胞は、未処理の細胞に比べて３Ｇ４結合の有意な増大を示す。
【図２５－２】ドセタキセルによる腫瘍細胞株上のＰＳ露出の誘導。マウスのルイス肺ガン腫３ＬＬ、マウス結腸ガン腫Ｃｏｌｏ２６およびヒト乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－４３５細胞を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処理した。細胞を収集して、ＰＢＳを用いて洗浄して、３Ｇ４を１０μｇ／ｍｌで用いて氷上で３０分間インキュベートした。次いで

細胞を２回洗浄して、ＦＩＴＣ標識されたヤギ抗マウスＩｇＧを添加して、この細胞をさらに３０分間、氷上でインキュベートした。次いで、細胞を洗浄して、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ取得ソフトウェアを備えるＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いてＦＡＣＳによって解析した。処理したＣｏｌｏ２６細胞は、未処理の細胞に比べて３Ｇ４結合の有意な増大を示す。

【図２５－３】ドセタキセルによる腫瘍細胞株上のＰＳ露出の誘導。マウスのルイス肺ガン腫３ＬＬ、マウス結腸ガン腫Ｃｏｌｏ２６およびヒト乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－４３５細胞を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処理した。細胞を収集して、ＰＢＳを用いて洗浄して、３Ｇ４を１０μｇ／ｍｌで用いて氷上で３０分間インキュベートした。次いで細胞を２回洗浄して、ＦＩＴＣ標識されたヤギ抗マウスＩｇＧを添加して、この細胞をさらに３０分間、氷上でインキュベートした。次いで、細胞を洗浄して、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ取得ソフトウェアを備えるＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒサイトメーター（Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いてＦＡＣＳによって解析した。処理したＭＤＡ－ＭＢ－４３５細胞は、未処理の細胞に比べて３Ｇ４結合の有意な増大を示す。

【図２６】ドセタキセルによるヒト乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞上のＰＳ露出の誘導。ヒトの乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処理した。細胞を収集して、ＰＢＳを用いて洗浄して、キメラ３Ｇ４（ｃｈ３Ｇ４）またはコントロールのヒトＩｇＧを用いて氷上で３０分間インキュベートした。次いで細胞を２回洗浄して、ＦＩＴＣ標識された抗ＩｇＧを添加して、この細胞を上記のようにＦＡＣＳによって解析した。コントロールのヒトＩｇＧに比べてｃｈ３Ｇ４結合における有意な増大がある。

【図２７】抗ＰＳ抗体を用いた処置は、ｍＣＭＶ感染マウスの生存を向上させる。Ｂａｌｂ／ＣマウスをｍＣＭＶで感染させて、実施例ＸＸＩに記載のとおり３Ｇ４またはｃｈ３Ｇ４で処置した。感染後９０日経過の生存についてマウスをモニターした。

【図２８】デュラマイシン－ビオチン誘導体、ＤＬＢでの処置は、ｍＣＭＶ感染マウスの生存を向上する。Ｂａｌｂ／ＣマウスをｍＣＭＶで感染させて、実施例ＸＸＩＩに記載のとおりＤＬＢで処置した。感染後９０日経過の生存についてマウスをモニターした。

【図２９】ワクシニアウイルスで感染させた細胞に対するキメラ３Ｇ４の結合。Ｕ９３７細胞をワクシニアウイルスで感染させて、感染の２日後に、キメラ３Ｇ４抗体（ｃｈ３Ｇ４）またはコントロールヒトＩｇＧ（ＨＩｇＧ）を用いて染色した。図２９Ａは、未感染のＵ－９３７細胞。図２９Ｂ、ワクシニアウイルス感染Ｕ９３７細胞。図２９Ａおよび図２９Ｂにおけるピークは以下のとおりである：左（赤）ピークは二次抗体単独コントロール；中央（青）ピークはコントロールのＨＩｇＧ；右（緑）ピークは、ｃｈ３Ｇ４。

【図３０】３Ｇ４抗体によるインビトロでのＰｉｃｈｉｎｄｅウイルス複製の阻害。Ｖｅｒｏ細胞を、０．０１ｐｆｕ／細胞のｍ．ｏ．ｉで、Ｐｉｃｈｉｎｄｅウイルスを用いて感染させた。感染した細胞を１００μｇ／ｍｌの３Ｇ４（図３０Ａ）またはアイソタイプマッチングしたコントロール抗体ＧＶ３９Ｇ（図３０Ｂ）を用いて処理した。感染後２日で、細胞をトリプシンで回収して、スライドに付着させた。細胞をアセトンで固定して、抗ＰＩＣウサギポリクローナル血清で、続いてヤギ抗ウサギビオチン結合体化二次抗体で染色した。感染した細胞は赤褐色に染色される。二次抗体単独では染色を生じなかった（図３０Ｃ）。３Ｇ４対コントロール処理細胞における感染した細胞の％も示す（図３０Ｄ）。

【図３１】デュラマイシンヒトＩｇＧ（ＨＩｇＧ）結合体は、インビボにおいてＭｅｔｈＡ腫瘍増殖を阻害する。ＭｅｔｈＡ腫瘍細胞を保有するＢＡＬＢ／ｃマウスを、デュラマイシン－ＨＩｇＧ結合体（Ｄ－ＳＩＡＢ）$_n$ＨＩｇＧで処置して、デュラマイシンを、ＳＩＡＢリンカーを用いて、ＨＩｇＧに結合体化するか、または実施例ＸＸＶに記載されるとおり、コントロールＨＩｇＧと結合体化する。

【図３２】デュラマイシン複合体は、細胞毒性ではない。ＭＴＴアッセイを用いてヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）上で、細胞毒性効果について、天然に存在するデュラマイシ

ン化合物およびビオチン化デュラマイシン構築物ＤＬＢを試験した。
【図３３】デュラマイシン抗体結合体は、アポトーシス細胞のマクロファージ食作用を増強する。Ｃ４４、マウスＩｇＧ$_{2a}$抗体に対してデュラマイシンを連結してデュラマイシン－Ｃ４４（ＤｕＣ４４）を作製することによってデュラマイシン抗体結合体を構築した。ＤｕＣ４４、コントロールマウス抗体、ＢＢＧ３および３Ｇ４抗体の存在下でマウス骨髄由来マクロファージを用いてアポトーシスＨＬ－６０細胞をインキュベートした。食作用は、取り込みについての食作用陽性のパーセントとして評価した。データは平均値±Ｓ．Ｅ．である。
【発明を実施するための形態】
【０１３７】
（例示的な実施形態の詳細）
固体腫瘍およびガン腫は、ヒトにおける全てのガンの９０％より多くに相当する。モノクローナル抗体および免疫毒素の使用は、リンパ腫および白血病の治療において検討されている（Ｖｉｔｅｔｔａら，１９９１）が、これらの因子は、ガン腫および他の固体腫瘍に対する臨床試験においては失望すべきことに有効ではなかった（ＡｂｒａｍｓおよびＯｌｄｈａｍ，１９８５）。抗体に基づく処置が有効でないことについての主な理由は、高分子は固体腫瘍に容易に輸送されないということである。一旦、腫瘍塊内になっても、これらの分子は、腫瘍細胞、線維性間質、間質性圧力勾配および結合部位障壁の間の緊密な結合の存在に一様に起因して分布することができない（Ｄｅｎｅｋａｍｐ，１９９０；Ｄｖｏｒａｋら，１９９１）。
【０１３８】
固体腫瘍を処置するための新規なストラテジーを開発することにおいて、腫瘍細胞ではなく腫瘍の脈管を標的する工程を包含する方法によって別個の利点が得られる。腫瘍血管の有効な破壊または遮断は、腫瘍を通じた血流を停止させ、腫瘍細胞死亡の崩壊を生じる。抗体毒素および抗体凝固構築物、腫瘍血管を選択的に破壊および／または閉塞するＶＴＡの例は既に、腫瘍脈管構造の特定の標的および破壊において大きな効果を発揮しており、腫瘍壊死を生じる（Ｂｕｒｒｏｗｓら，１９９２；ＢｕｒｒｏｗｓおよびＴｈｏｒｐｅ，１９９３；ＷＯ　９３／１７７１５；ＷＯ　９６／０１６５３；Ｈｕａｎｇら，１９９７；各々が参考として本明細書に援用される）。
【０１３９】
ＶＴＡは、固体腫瘍の既存の血管に対してその一次的な作用を発揮し、新しい血管形成を妨げる血管新生阻害因子とは異なる。他のガン治療を上回るＶＴＡの多くの利点がある。第一に、単一の血管によって、栄養が供給されて、数百または数千の腫瘍細胞からの代謝物の廃棄物の除去が促進されており、血流の上流および下流をブロックするためには１つのポイントを損傷させるだけでよい。従ってＶＴＡは樹立された腫瘍には特に有効である。第二に、内皮細胞殺傷は有用な機構の１つであるが必要ではない。血液凝固の形状または開始位置の変化は十分であり得る。第三に内皮細胞は血流に隣接し、十分な薬物送達を保障する。第四に、標的は、薬物耐性を付与する遺伝的変異を獲得する可能性の低い正常な二倍体細胞である。第五に生物学的活性の代理のマーカーすなわち血流は測定可能である。
【０１４０】
第六に、血管機能に対する一時的な効果は有意な抗腫瘍効果について十分であり得る。研究によって、インビボにおいて９９％を上回る腫瘍細胞が、虚血の２時間の間に殺傷され得ることが示される。最終的に、脈管形成インヒビターとは異なり、ＶＴＡは、数ヶ月または数年を超える慢性的な投与ではなく、従来の処置と協同作用するためには間欠的な投与しか必要としない。
【０１４１】
細胞傷害性ＶＴＡは、以下の特許に記載されている：各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第５，６６０，８２７号、同第５，７７６，４２７号、同第５，８５５，８６６号、同第５，８６３，５３８号、同第５，９６５，１３２号、同第６，００４，

５５４号、同第６，０５１，２３０号、同第６，２６１，５３５号、および同第６，４５１，３１２号。腫瘍脈管構造に対して凝固因子を特異的に送達するために抗体、成長因子または他の結合リガンドが用いられる場合、このような因子は「コアグリガンド（ｃｏａｇｕｌｉｇａｎｄｓ）」と名付けられる。コアグリガンドＶＴＡは、以下の特許に記載される：各々が参考として援用される、米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号および同第６，０３６，９５５号。

【０１４２】

コアグリガンドにおける使用のための現在好ましい凝固因子は、短縮型組織因子（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｆａｃｔｏｒ）（ｔＴＦ）（Ｈｕａｎｇら、１９９７；ＷＯ９６／０１６５３；米国特許第５，８７７，２８９号）である。ＴＦは、血液凝固の主な開始因子である（Ｒｕｆら、１９９１；Ｅｄｇｉｎｇｔｏｎら、１９９１）。損傷の部位で、血液中の第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子は、血管周囲の組織における細胞上のＴＦに接触して結合する。ＴＦ：ＶＩＩａ複合体は、リン脂質表面の存在において、因子ＩＸおよびＸを活性化する。これが次に、トロンビンおよびフィブリンの形成を導き、最終的に血液凝固をもたらす（ＲｕｆおよびＥｄｇｉｎｇｔｏｎ，１９９４）。

【０１４３】

細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠く、組換えの短縮型の組織因子（ｔＴＦ）は、ネイティブなＴＦよりも凝固を誘導する能力の大きさが約５分の１である可溶性のタンパク質である（Ｓｔｏｎｅら、１９９５；Ｈｕａｎｇら、１９９７）。この理由は、ＴＦが、効率的にＩＸａまたはＸａを活性化する、ＶＩＩａとの複合体についてリン脂質と関連する必要があるということである。しかし、抗体または因子を標的化する手段によって腫瘍血管内皮に対してｔＴＦが送達される場合、これは脂質表面に近位に戻されて血栓形成性の活性を回復する（Ｈｕａｎｇら、１９９７；米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号および同第６，０３６，９５５号）。従って、腫瘍脈管構造を選択的に血栓症にさせるコアグリガンドが作製される。

【０１４４】

短縮されたＴＦは、脈管標的化コアグリガンドにおける使用が推奨されるいくつかの利点を有する：ヒトｔＴＦは容易に利用可能であり、ヒトタンパク質は、ヒトにおいては免疫原性が無視できるかまたは低い；ヒトｔＴＦは、マウスを含む実験動物において完全に機能的である；標的されたｔＴＦは非常に強力である。なぜなら、凝固タンパク質のカスケードの活性化を誘引して、大きく増幅された効果を生じるからである（米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号、および同第６，０３６，９５５号）。

【０１４５】

腫瘍内皮から入手できるが、正常な内皮細胞からはかなり損なわれている、一連の適切な標的分子が記載されている。例えば、発現された標的、例えば、エンドグリン、Ｅセレクチン、Ｐセレクチン、ＶＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－１、ＰＳＭＡ、ＴＩＥ、ＬＡＭ－１と反応性のリガンド、ＶＥＧＦ／ＶＰＦレセプター、ＦＧＦレセプター、$\alpha_v\beta_3$インテグリン、プレイオトロピンまたはエンドシアリンが利用されてもよい（各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第５，８５５，８６６号、同第５，８７７，２８９号；Ｂｕｒｒｏｗｓら．，１９９２；ＢｕｒｒｏｗｓおよびＴｈｏｒｐｅ，１９９３；Ｈｕａｎｇら，１９９７；Ｌｉｕら，１９９７；Ｏｈｉｚｕｍｉら，１９９７）。

【０１４６】

吸着された標的は、別の適切な群、例えば、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＴＧＦβ、ＨＧＦ、ＰＦ４、ＰＤＧＦ、ＴＩＭＰ、ＴＩＥに結合するリガンド、腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォーム（米国特許第５，８７７，２８９号、同第５，９６５，１３２号、同第６，０５１，２３０号および同第６，００４，５５５号）。フィブロネクチンアイソフォームは、インテグリンファミリーのレセプターに結合するリガンドである。腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームは、腫瘍脈管および腫瘍間質の両方の標的可能成分である。モノクローナル抗体ＢＣ－１（Ｃａｒｎｅｍｏｌｌａら、１９８９）は腫瘍関連フィブロネクチ

ンアイソフォームに特異的に結合する。

【０１４７】

天然の腫瘍環境によって、またはその後のヒトによる介入によって誘導可能な他の標的はまた、米国特許第５，７７６，４２７号、同第５，８６３，５３８号および同第６，０３６，９５５号に記載のとおり、標的可能な実体である。正常な組織および腫瘍血管誘導における以前の抑制と組み合わせて用いる場合、ＭＨＣクラスＩＩ抗原も、標的として用いることができる（米国特許第５，７７６，４２７号、同第５，８６３，５３８号、同第６，００４，５５４号および同第６，０３６，９５５号）。

【０１４８】

臨床的適用のために現在好ましい１つの標的は、脈管内皮接着分子－１（ＶＣＡＭ－１）である（米国特許第５，８５５，８６６号、同第５，８７７，２８９号、同第６，０５１，２３０号、同第６，００４，５５５号および同第６，０９３，３９９号）。ＶＣＡＭ－１は細胞接着分子であって、炎症性サイトカインＩＬ－１α、ＩＬ－４（Ｔｈｏｒｎｈｉｌｌら、１９９０）およびＴＮＦα（Ｍｕｎｒｏ，１９９３）によって誘導され、そしてそのインビボでの役割は、急性炎症の部位に対して白血球を補充することである（Ｂｅｖｉｌａｃｑｕａ，１９９３）。

【０１４９】

ＶＣＡＭ－１は、神経芽細胞腫（Ｐａｔｅｙら、１９９６）、腎臓ガン腫（Ｄｒｏｚら，１９９４）、非小細胞性肺ガン（Ｓｔａａｌ－ｖａｎ　ｄｅｎ　Ｂｒｅｋｅｌら、１９９６）、ホジキン病（Ｐａｔｅｙら、１９９６）および肉管肉腫（Ｋｕｚｕら、１９９３）を含む多数のヒト悪性腫瘍において、そして良性腫瘍、例えば、血管腫（ａｎｇｉｏｍａ）（Ｐａｔｅｙら、１９９６）および血管腫（ｈｅｍａｎｇｉｏｍａ）（Ｋｕｚｕら、１９９３）において、脈管内皮細胞に存在する。ヒトのＶＣＡＭ－１の構成的発現は、甲状腺、胸腺および腎臓においてわずかな血管に（Ｋｕｚｕら、１９９３；ＢｒｕｉｊｎおよびＤｉｎｋｌｏ，１９９３）、そしてマウスにおいては、心臓および肺における血管に対して限定される（Ｆｒｉｅｓら、１９９３）。

【０１５０】

本明細書において提示される特定のデータは、米国特許第５，８５５，８６６号、同第５，８７７，２８９号、同第６，０５１，２３０号、同第６，００４，５５５号および同第６，０９３，３９９号に提供されるデータをさらに補足し、抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドの投与から生じる血栓および腫瘍梗塞の選択的誘導を示す。提示される結果は、Ｌ５４０ヒトホジキンリンパ腫を保有するマウスを用いて生成した。ＳＣＩＤマウスにおいて異種移植片として成長させた場合、この腫瘍は、炎症性サイトカインの発現（Ｄｉｅｈｌら、１９８５）ならびにその脈管構造におけるＶＣＡＭ－１および他の内皮細胞活性化分子の存在に関してヒト疾患に対して密接な類似性を示す。

【０１５１】

ｔＴＦが抗ＶＣＡＭ－１抗体に直接結合した、共有結合した抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドを用いて、固体Ｌ５４０ホジキン腫瘍を有するマウスにおいて、コアグリガンドが腫瘍血管に対して選択的に局在し、これらの血管の血栓を誘導し、腫瘍全体を通じた壊死の発生を生じ、そして腫瘍増殖を遅延させることが、本明細書中で示される。腫瘍は一般に、コアグリガンドに対して応答するには少なくとも約０．３ｃｍの直径である必要があった。なぜなら、ＶＣＡＭ－１はさらに小さい腫瘍からは欠失していたからである。推定上、小さい腫瘍では、腫瘍に浸潤する腫瘍細胞または宿主細胞によって分泌されるサイトカインのレベルは、ＶＣＡＭ－１誘導には低すぎる。これは、米国特許第５，８５５，８６６号、同第５，８７７，２８９号、同第６，０５１，２３０号、同第６，００４，５５５号および同第６，０９３，３９９号における研究によるが、ここでは、本発明はさらに大きい固体腫瘍において最も有用であることが示された。

【０１５２】

ＶＣＡＭ－１染色は、腫瘍の末梢において最初にさらに観察されたが、コアグリガンドは明白に血液輸送血管に対して結合して閉塞した。そのとき、それによって全ての腫瘍領

域において血流を短縮することができた。さらに、本発明者らの１人は、コアグリガンドの最初の投与によって生じたトロンビン生成が、中央の血管でのＶＣＡＭ－１のさらなる誘導を導く可能性が高く（Ｓｌｕｉｔｅｒら、１９９３）、これによって腫瘍内領域の増幅されたシグナルおよび明白な破壊が生じると考える。さらなる標的可能マーカーのこのタイプの凝固剤誘導性発現、およびこれによるシグナル増幅はまた、米国特許第６，０３６，９５５号に開示される。

【０１５３】

本明細書に示されるとおり、マウスの心臓および肺におけるＶＣＡＭ－１発現血管に対する局在化は、抗ＶＣＡＭ－１コアグリガンドの投与の際に観察されたが、この構築物は、このような非腫瘍部位において血栓を誘導しなかった。さらに、抗ＶＣＡＭ－１コアグリガンドは、特異性の無関係なコントロールのコアグリガンドほどマウスに対して毒性ではなかった。そしてこれによってもやはり、心臓および肺の血管におけるＶＣＡＭ－１の構成的発現は毒性を導かなかったことが示された。このデータは、ＶＣＡＭ－１がヒトにおける腫瘍血管内皮の天然に存在するマーカーであることを考えれば、コアグリガンド治療の直接的な臨床的進歩に重要である。しかし、この現象によって、また本発明者らは、腫瘍脈管構造破壊に対する全体的に異なるアプローチにつながる固有の洞察を得た。

【０１５４】

（Ａ．アミノリン脂質に対する裸の抗体を用いた腫瘍処置）

本発明者らは、抗ＶＣＡＭ－１コアグリガンドが、心臓および肺における血管上で構成的に発現されるＶＣＡＭ－１に対して結合するが、その血管において血栓は生じない能力の背景の機構を理解しようと努めた。心臓および肺における腫瘍環境のプロトロンビン性質および任意の線維素溶解性素因と一般的に結び付いた、この実験的な観察については多くの科学的な可能性がある。

【０１５５】

概して、凝固系（フィブリン沈着）と線維素溶解系（酵素によるフィブリンの分解）との間に生物学的平衡がある。しかし、悪性疾患において、特にガン腫において、この平衡は崩壊されて、凝固の異常な活性化（凝固性亢進または「プロトロンビン状態（ｐｒｏｔｈｒｏｍｂｏｔｉｃ　ｓｔａｔｅ）」が生じる。広範な研究にもかかわらず、腫瘍環境のプロトロンビン性質について明白な分子説明は、最近まで認識できなかった。

【０１５６】

多くの可能性のある選択肢の詳細な解析後、本発明者らは、抗ＶＣＡＭ－１コアグリガンドが正常な組織の血管において血栓を生じ得ないことはアミノリン脂質、ホスファチジルセリン（ＰＳ）がこのような血管の内面から欠失したことに起因したと判断した。従って、この理論を完成させるために、ホスファチジルセリンがこれらの正常な血管から欠失することを示さなければならないだけでなく、腫瘍関連血管の内面上のその存在が実証されなければならない。

【０１５７】

従って、本発明者らは、免疫組織化学染色を用いて、腫瘍保有マウスへ静脈内注射したモノクローナル抗ホスファチジルセリン（抗ＰＳ）抗体の分布を評価した。これらの研究によって、心臓および肺におけるＶＣＡＭ－１発現血管がＰＳを欠くことが明らかになったが、ＶＣＡＭ－１発現血管は腫瘍においてＰＳを発現した。ＰＳに結合するアネキシンＶがインビトロおよびインビボの両方で抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンド作用をブロックするという本発明者らの知見によって、コアグリガンド作用における表面ＰＳ発現の必要性がさらに示される。

【０１５８】

従って、正常な心臓および肺の血管において抗ＶＣＡＭ－１コアグリガンドの血栓性の影響がないことが少なくとも部分的に説明された：アミノリン脂質、ホスファチジルセリンの非存在は、凝固複合体が集合し得る凝固促進性の表面が正常な血管に欠けるということを意味する。表面ＰＳの非存在下で、抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦがＶＣＡＭ－１を発現する心臓および肺血管に結合するが、血栓を誘導できない。対照的に、腫瘍におけるＶＣＡ

Ｍ－１発現血管は、表面ＰＳの同時発生的な発現を示す。従って、コアグリガンドは、腫瘍血管に結合して、凝固因子を活性化し、局所的に閉塞性血栓を形成する。

【０１５９】

抗ＶＣＡＭ－１コアグリガンドの腫瘍特異性血栓効果を描写することに加えて、腫瘍血管の管腔表面におけるアミノリン脂質、ホスファチジルセリンの特異的発現によってまた、本発明者らは、観察はされたが、初期の研究では理解できなかったプロトロンビン表現型を説明することができた。ＰＳ発現は、腫瘍脈管構造のプロトロンビン状態における有意な役割を示す。

【０１６０】

代表的なアミノリン脂質、ホスファチジルセリンが腫瘍血管の管腔表面上に特異的に発現されたが正常な血管では発現されなかったという発見後に、本発明者らは、他のアミノリン脂質が、治療介入についての標的として能力を有したことを判断した。従って、本発明者らは、アミノリン脂質、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）を標的することに基づいて、腫瘍脈管構造標的化および処置方法を開発した。

【０１６１】

本発明者らの研究の特に驚くべき局面は、未結合の抗アミノリン脂質抗体の投与が腫瘍処置において有効であったことである。これは、アミノリン脂質に結合する未結合または「裸の（ｎａｋｅｄ）」抗体を用いる腫瘍処置の重要な新しい手段を生じる。これらの腫瘍脈管構造標的化および処置方法は、本明細書において参考として援用される米国特許第６，４０６，６９３号に記載される。当該分野で受容される動物モデルにおける抗腫瘍効果は、米国特許第６，４０６，６９３号に実証され、本明細書で拡張されるが、アミノリン脂質が腫瘍脈管構造の安全かつ有効な標的可能なマーカーとして作用する能力は、米国特許第６，４０６，６９３号の以前の研究からは予測できなかった。

【０１６２】

腫瘍脈管構造の特定のマーカーとしてのアミノリン脂質の発見が証明されるとすぐに、本発明者らは、腫瘍処置における使用のための、ある範囲のアミノリン脂質標的免疫毒素およびコアグリガンドの開発を開始した。米国特許第６，４０６，６９３号において例示されるように、これによって腫瘍処置における使用のための裸の抗アミノリン脂質抗体の予期されない発見が導かれた。腫瘍脈管構造に対して毒素または凝固因子を送達する状況では、アミノリン脂質標的化の能力を検討することにおいて、裸の抗ＰＳ抗体が任意のさらなるエフェクター部分の非存在においてインビボで腫瘍脈管構造に対する破壊的効果を有したことを、本発明者らは、思いがけなくも見出した。腫瘍壊死をもたらす、抗アミノリン脂質抗体が腫瘍脈管構造に特異的に局在する能力および付随する破壊的効果を発揮する能力の両方ともほとんど予期されなかった。

【０１６３】

本発明は、数ある実施形態の中でも、腫瘍処置における裸の抗体としての使用のための驚くべきかつ改善された「第二世代」の抗ＰＳ抗体を提供する。一群の第二世代の抗ＰＳ抗体が本明細書に開示されており、そのうちモノクローナル抗体９Ｄ２および３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）が、このような有利な特性を有するさらなる抗体の生成および選択のための特定の免疫およびスクリーニングの技術とともに、現在好ましい。抗ＰＳ抗体による腫瘍血管に対する脈管構造の損傷は、少なくとも一部は宿主エフェクターを通じて媒介されることも本明細書に示される。本発明者らのこれらおよび他の洞察によって、裸の抗体での処置を、本明細書で教示されるように、単独で用いられる場合でも、他の抗癌因子と組み合わせて用いられる場合でも、最適化することが可能になる。

【０１６４】

（Ｂ．陰イオン性リン脂質に対する抗体を用いる腫瘍処置）

米国特許第６，４０６，６９３号は、アミノリン脂質であるホスファチジルセリンおよびホスファチジルエタノールアミンが、異なる細胞における原形質膜二重層の内面に正常に隔離されること（Ｇａｆｆｅｔら、１９９５；Ｊｕｌｉｅｎら、１９９５）、ならびにこのリン脂質隔離が非対称な二重層貫通を生み出すことを説明する。膜非対称性の存在は

何度か考察されているが、その存在の理由ならびにその生成および制御のための機構についての理由は、特に血小板以外の細胞については、十分には理解されていない（ＷｉｌｌｉａｍｓｏｎおよびＳｃｈｌｅｇｅｌ，１９９４）。

【０１６５】

ＰＳが腫瘍血管内皮細胞の表面にトランスロケートすること、およびこれが少なくとも主な部分では、アポトーシスまたは他の細胞死機構とは独立して生じることを本発明者らは、初期に実証した（米国特許第６，４０６，６９３号）。従って、腫瘍環境におけるＰＳ表面発現は、細胞死の結果ではなく、即時の細胞破壊を誘引することもない。種々の固形腫瘍におけるインタクトな血管内皮細胞において一貫して検出されるＰＳ露出にもかかわらず、腫瘍血管内皮は、実のところアポトーシス性ではないが、形態学的に健常（正常な組織におけるものとは異なるが）かつ代謝的に活性である。これは、ＰＳ標的化に基づく治療方法には重要であり、このことは腫瘍血管内皮細胞における外膜へのＰＳのトランスロケーションがＰＳについて十分に安定性であって、首尾よい治療（裸の抗体または治療複合体のいずれかを用いる）のために標的可能な部分として機能することを意味する。

【０１６６】

米国特許第６，４０６，６９３号（および以下の同第６，３１２，６９４号）の重要な発見にもかかわらず、腫瘍血管内皮細胞のリン脂質ベースの標的化の示唆は、ＰＳおよびＰＥのようなアミノリン脂質の標的化に限定された。異なるリン脂質およびアミノリン脂質についての精巧な特異性を有する生物学的ツールの開発を通じて、本発明者らはここで、腫瘍血管内皮細胞上で驚くべき上方制御される新しいカテゴリーのリン脂質を同定した。これらは腫瘍脈管構造の特異的かつ安定なマーカーでもあり、これによって陰イオン性リン脂質に結合する裸の抗体および免疫複合体の両方を用いる治療介入が可能になることが本明細書において示される、陰イオン性リン脂質である。

【０１６７】

陰イオン性リン脂質は正常な条件のもとで休止状態である哺乳動物細胞の表面からは大きく損なわれている。原形質膜の最も豊富な陰イオン性リン脂質である、ホスファチジルセリンは、正常な条件下でほとんどの細胞型における原形質膜の内部小葉部分に厳密に隔離される（ＷｉｌｌｉａｍｓｏｎおよびＳｃｈｌｅｇｅｌ，１９９４；ＺｗａａｌおよびＳｃｈｒｏｉｔ，１９９７）。別の主な陰イオン性リン脂質であるホスファチジルイノシトール（ＰＩ）はまた、原形質膜の内部小葉部分に優先的に位置する（ＣａｌｄｅｒｏｎおよびＤｅＶｒｉｅｓ，１９９７）。少量の陰イオン性リン脂質であるホファファチジン酸（ＰＡ）およびホスファチジルグリセロール（ＰＧ）は、わずかな細胞型においてのみ調べられているが、それらはまた原形質膜の内部小葉部分に主に位置すると思われる（Ｈｉｎｋｏｖｓｋａ－Ｇａｌｃｈｅｖａら、１９８９）。別の陰イオン性リン脂質であるカルジオリピン（Ｃａｒｄｉｏｌｉｐｉｎ）（ＣＬ）はミトコンドリア膜に存在しており、原形質膜には存在しない（Ｄａｕｍ，１９８５）。

【０１６８】

天然のリン脂質はまた、原形質膜において非対称的に分布する。中性のアミノリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）は、優位に内部小葉部分上にある。コリン含有中性リン脂質であるホスファチジルコリン（ＰＣ）およびスフィンゴミエリン（ＳＭ）は、優位に外部小葉部分上にある。

【０１６９】

ＰＳ非対称性は、ＰＥの非対称性とともに、外部小葉部分から原形質膜の内部小葉部分へのアミノリン脂質の輸送を触媒する、ＡＴＰ依存性輸送体であるアミノリン脂質転位酵素（Mg^{2+} ＡＴＰアーゼ）によって維持される（ＳｅｉｇｎｅｕｒｅｔおよびＤｅｖａｕｘ、１９８４）。ＰＳおよびＰＥの非対称性の損失または崩壊は、原形質膜におけるこれらのリン脂質の外向きの動きから生じ、そして転位酵素の阻害（Ｂｉｔｂｏｌら、１９８７；Ｃｏｍｆｕｒｉｕｓら、１９９０）、ＰＳ輸送体の活性化および／またはスクランブラーゼ（ｓｃｒａｍｂｌａｓｅ）酵素である全てのリン脂質を双方向的に輸送するCa^{2+}依存性酵素の活性化のいずれかによって生じる（Ｚｈａｏら、１９９８）。

【０１７０】
ＰＳ非対称性の損失は、細胞損傷、プログラムされた細胞死およびアポトーシス（Ｂｌａｎｋｅｎｂｅｒｇら、１９９８；Ｂｏｍｂｅｌｉら、１９９７）、細胞老化（ＨｅｒｒｍａｎｎおよびＤｅｖａｕｘ，１９９０）、血小板の活性化（Ｒｏｔｅら、１９９３；Ｚｗａａｌら、１９８９）、損傷（Ｂｏｙｌｅら、１９９６）および悪性形質転換（Ｓｕｇｉｍｕｒａら、１９９４）を含む、種々の病理学的および生理学的条件下で観察される。ＰＳの露出はまた、筋芽細胞（ＳｅｓｓｉｏｎｓおよびＨｏｒｗｉｔｚ，１９８１）および栄養膜（Ａｄｌｅｒら、１９９５）の細胞内融合、細胞遊走（Ｖｏｇｔら、１９９６）および細胞脱顆粒（Ｄｅｍｏら、１９９９）においてある役割を果たす。内皮細胞は、トロンビン（Ｑｕら、１９９６）、カルシウムイオノフォアまたはホルボールエステル（Ｊｕｌｉｅｎら、１９９７）、高脂血症（Ｌｕｐｕら、１９９３）および非溶解性濃度の補体タンパク質Ｃ５ｂ－９（Ｃｈｒｉｓｔｉａｎｓｅｎら、１９９７）によって誘導されるCa^{2+}フラックスの増大に応答してＰＳを外部移行する。自然発生的ＰＳ露出がまた、外因性の活性化因子も細胞障害も存在しない条件下で悪性細胞において観察されている（Ｕｔｓｕｇｉら、１９９１）。

【０１７１】
いくつかの主な結果は、膜ＰＳ露出を伴う。食作用性マクロファージは、ＰＳ陽性の老化細胞およびアポトーシス細胞を認識し、それに結合して、排除する（ＭｃＥｖｏｙら、１９８６；ＴａｉｔおよびＳｍｉｔｈ，１９９９）。ＰＳはまた、トロンビン活性化内皮細胞に対するＴリンパ球の結合を媒介する（Ｑｕら、１９９６）。補体系は、ＰＳによって活性化されて、ＰＳ陽性細胞の溶解に寄与する（ＴｅｓｔおよびＭｉｔｓｕｙｏｓｈｉ，１９９７）。最終的に、ＰＳ露出は、凝固複合体のアセンブリおよび活性化のために負に荷電された脂質表面を提供することによって（Ｂｅｖｅｒｓら、１９８５；Ｄａｃｈａｒｙ－Ｐｒｉｇｅｎｔら、１９９６）内皮上の凝固促進シフトに対して貢献する（ＷｉｌｌｉａｍｓｏｎおよびＳｃｈｌｅｇｅｌ，１９９４；Ｂｏｍｂｅｌｉら、１９９７）。腫瘍内皮のプロトロンビン形質は久しく認識されている（ＤｏｎａｔｉおよびＦａｌａｎｇａ，２００１）。

【０１７２】
科学的文献におけるＰＳに対する集中、ならびにＰＳおよびＰＥのようなアミノリン脂質に対して限定された本発明者らの初期の研究にもかかわらず（米国特許第６，４０６，６９３号および同第６，３１２，６９４号）、本発明者らは、さらに広いカテゴリーのリン脂質が腫瘍脈管構造上に露出され得ると仮説を立てた。腫瘍微小環境のストレス条件の増大に起因して、本発明者らは、ある範囲の陰イオン性リン脂質が腫瘍脈管構造上で上方制御され得、これによって治療介入のための潜在的な新しい機会が得られると理由付けた。

【０１７３】
腫瘍内皮の損傷および活性化が、以下によって生じることを本発明者らは、理解した：１）内皮を活性化して細胞接着分子の発現を誘導する、インターロイキン－１および腫瘍壊死因子のような腫瘍由来サイトカイン（Ｓｈａｕｇｈｎｅｓｓｙら、１９８９；Ｏｒｒら、２０００）；２）内皮に結合する白血球によって生成された反応性酸素種（ＲＯＳ）（Ｏｒｒら、２０００）；ならびに３）代謝の副産物として（Ｓｈａｕｇｈｎｅｓｓｙら、１９８９；Ｓｏａｒｅｓら、１９９４）、または低酸素への曝露およびそれに続く再酸素化への曝露の結果として腫瘍細胞自体によって生成されたＲＯＳ（Ｚｕｌｕｅｔａら、１９９５）。これらの観察によって、Ca^{2+}フラックスが腫瘍内皮内のこれらのストレスによって生成され得ること、次に、スクランブラーゼの活性化またはアミノリン脂質転位酵素の阻害を通じて、ＰＳおよびＰＥの露出を生じることが示唆された。

【０１７４】
しかし、本発明者らは、アミノリン脂質ＰＳおよびＰＥだけではなく、陰イオン性リン脂質は、腫瘍脈管構造上で上方制御され得るという仮説までこれらの洞察を拡大した。細胞表面陰イオン性リン脂質を検出するために、本発明者らは、陰イオン性リン脂質と反応

するが中性のリン脂質とは反応しない、新しいモノクローナル抗体９Ｄ２を生成した。従って、９Ｄ２は、一般的なアミノリン脂質結合剤とは区別される。なぜなら、９Ｄ２は陰イオン性アミノリン脂質であるＰＳには結合するが、中性のアミノリン脂質であるＰＥには結合しないからである。９Ｄ２抗体はまた、陰イオン性リン脂質に加えてＰＥに強力に結合する、天然のリガンドであるアネキシンＶよりも、陰イオン性リン脂質に特異的である（Ｂｌａｎｋｅｎｂｅｒｇら、１９９８）。

【０１７５】

本出願において詳細に記載されるとおり、本発明者らは、９Ｄ２およびアネキシンＶが、種々の型の固形腫瘍を保有するマウスに対する静脈注射後に腫瘍内皮に特異的に局在することを見出した。この知見によって、陰イオン性リン脂質が腫瘍脈管内皮の表面上に慣用的に露出されて、腫瘍治療（および画像化）の標的分子として用いられ得るという本発明者らの仮説が確証される。従って、本発明は、裸の抗体に関して、そして細胞毒性薬物、サイトカイン、凝固因子などの送達において、陰イオン性リン脂質を標的し、腫瘍を処置するのにおける使用のための、ある範囲の新しい方法および抗体ベースの組成物を提供する。ＰＳを標的化するのに加えて、米国特許第６，４０６，６９３号および同第６，３１２，６９４号に教示のとおり、本発明によって標的化するための現在好ましい陰イオン性リン脂質は、ＰＩ、主な陰イオン性リン脂質、ＰＡおよびＰＧであり、特定の実施形態ではＣＬも標的化することが意図される。

【０１７６】

本発明から得られる主な知見の１つは、陰イオン性リン脂質が腫瘍内皮の表面に露出されるということである（実施例ＶＩ）。この現象は陰イオン性リン脂質に対して選択的に結合する２つの独立した試薬（特にこの点を確証するために本発明者らによって開発されたモノクローナル抗体９Ｄ２、およびアネキシンＶ）を用いて実証された。９Ｄ２抗体および競合抗体は本発明のさらに好ましい成分である。

【０１７７】

９Ｄ２抗体およびアネキシンＶは、リポソームとして、プラスチックに吸着された陰イオン性リン脂質、または活性化された内皮細胞もしくはアポトーシス性内皮細胞の膜表面上に提示された陰イオン性リン脂質に対して、高い親和性および特異性でインビトロで結合する。９Ｄ２はＰＳ、ＰＡおよびＣＬに強力に結合するが、ＰＩおよびＰＧに対しては結合が弱い。アネキシンＶは、前に見出されたとおり、ＰＳ、ＣＬ、ＰＡ、ＰＩおよびＰＧに加えてＰＥに結合する（Ａｎｄｒｅｅら、１９９０；Ｓｃｈｌａｅｐｆｅｒら、１９８７；Ｂｏｕｓｔｅａｄら、１９９３；ＢｌａｃｋｗｏｏｄおよびＥｒｎｓｔ，１９９０）。９Ｄ２抗体による陰イオン性リン脂質の認識は、血清の存在下および非存在下において同一であって、このことは、結合が血清補因子を必要としないことを示す。陰イオン性リン脂質に対する９Ｄ２の結合は、Ca^{2+}イオンを必要としないが、アネキシンＶの結合はCa^{2+}を必要とした。

【０１７８】

ＰＳでコーティングされたプレートに対する交差ブロック研究によって、９Ｄ２およびアネキシンＶは、ＰＳに対する各々の他の結合をブロックしないことが示された。このことによって、２つの試薬が、ＰＳ分子を、またはさらに可能性が高いのは、異なって充填された形態のＰＳの上の異なるエピトープを、認識することが示される。アネキシンＶは、平面ＰＳ表面に対して結合すると考えられるが、抗ＰＳ抗体は、六方充填されたＰＳに結合すると考えられる（ＲａｕｃｈおよびＪａｎｏｆｆ、１９９０）。両方の形態がＰＳコーティングプレート上におそらく存在する。これらの実際的な交差ブロック研究（実施例ＶＩ）はまた、陰イオン性リン脂質に対する結合について効率的に競合する抗体、すなわち本質的に同じエピトープに結合する抗体は、一旦参照抗体（例えば、９Ｄ２）が提供されれば、容易に同定され得るということを示すのに役立つ。

【０１７９】

本出願はまた、９Ｄ２抗体およびアネキシンＶが、インビボで試験された全ての腫瘍の壊死領域およびその周囲において、腫瘍血管に、そして腫瘍細胞に特異的に局在すること

を示す（実施例ＶＩ）。腫瘍における血管の１５～４０％が、陰イオン性リン脂質陽性内皮を有した。対照的に、正常組織において、検出可能な外部移行した陰イオン性リン脂質血管を有する血管はなかった。

【０１８０】

９Ｄ２による腫瘍脈管構造の染色の特異性は、以下によって実証された：１）コントロールラットＩｇＭによる腫瘍血管染色の欠失；２）陰イオン性リン脂質から調製されたリポソームによるインビトロでのH_2O_2処理内皮細胞に対する９Ｄ２結合またはアネキシンＶ結合をブロックするが、ただし中性のリン脂質から調製されたリポソームの場合はブロックしないこと；３）界面活性剤または有機溶媒での腫瘍切片からのリン脂質の抽出が染色を無効にしたという知見；ならびに４）正常な器官における静止期内皮に対する９Ｄ２またはアネキシンＶのいずれかの局在化の欠失。

【０１８１】

腫瘍脈管構造上に９Ｄ２またはアネキシンＶによって局在される主な陰イオン性リン脂質は、ＰＳである可能性が高い。なぜなら、これが最も豊富な陰イオン性リン脂質であって、その細胞表面上での露出は、環境的影響または傷害によって調節されるからである。しかし、他の陰イオン性リン脂質（例えば、ＰＩ、ＰＡ、ＰＧ）はまた、量が少ないが、露出される可能性が高い。

【０１８２】

９Ｄ２によって検出されないが、主な中性リン脂質であるＰＥは、ＰＳとともに、腫瘍血管で観察されるアネキシン局在化に対して寄与する可能性が高い。ＰＥはまた、腫瘍内皮上に露出されることが公知であり、そして原形質膜中のＰＥの位置は、ＰＳに対して類似の様式で調節される（米国特許第６，４０６，６９３号）。ＰＥは、ＰＳよりも遅い速度だが、アミノリン脂質転位酵素によって部分的には原形質膜の内部小葉部分に隔離され（Ｄｅｖａｕｘ，１９９２）、スクランブラーゼによって外部表面に輸送される（Ｚｈｏｕら、１９９７）。ＰＥは、ＰＳ同様に、アポトーシスおよび細胞活性化の間に露出される（Ｅｍｏｔｏら、１９９７；ＵｍｅｄａおよびＥｍｏｔｏ，１９９９）。

【０１８３】

腫瘍内皮細胞上の陰イオン性リン脂質の露出の機構を検討するために、インビトロにおける内皮細胞を、腫瘍微小環境に存在することが公知の種々の要因および条件で処理する一連の研究を行なった（実施例ＶＩＩ）。低酸素とその後の再酸化、酸性度およびトロンビンは、生存している内皮細胞上のＰＳ露出を全ての細胞がアポトーシスである場合にみられるレベルの１０～２２％まで増大した。炎症性サイトカイン（ＴＮＦαおよびＩＬ－１）はまた、ＰＳ露出の弱いが明確な誘導を生じた。

【０１８４】

これらの知見は、腫瘍においては、脈管内皮上の陰イオン性リン脂質の露出が、炎症性サイトカイン、トロンビンおよび酸性度と組み合わせた低酸素／再酸化によって誘導されるという可能性と一致する。本発明を行なうのに正確な機構を理解する必要はないが、ＲＯＳは、代謝の副産物として腫瘍細胞によって、または低酸素に応答して、生成され得る（Ｚｕｌｕｅｔａら、１９９５）。腫瘍細胞によって放出されたサイトカインは、活性化されたマクロファージ、多形核細胞および血小板の腫瘍内皮への接着ならびにＲＯＳのさらなる分泌を媒介する内皮上の白血球接着分子を誘導し得る。次いで、ＲＯＳは、おそらく、Ca^{2+}の流入または細胞内貯蔵からのCa^{2+}の放出（ＷａｎｇおよびＪｏｓｅｐｈ，２０００）を生じることによって、チオール含有輸送分子の酸化、または脂質の過酸化を通じたＰＳトランスロケーションを誘導し得る（ＨｅｒｒｍａｎｎおよびＤｅｖａｕｘ，１９９０）。

【０１８５】

ＰＳおよび他の陰イオン性リン脂質の露出は部分的には、久しく認識されている腫瘍内皮の凝固促進状態を説明する（ＤｏｎａｔｉおよびＦａｌａｎｇａ，２００１）。陰イオン性リン脂質は、凝固因子がその上で濃縮してアセンブルする表面を提供する（Ｂｅｖｅｒｓら、１９８５；Ｄａｃｈａｒｙ－Ｐｒｉｇｅｎｔら、１９９６）。陰イオン性リン脂

質は、腫瘍への白血球浸潤を補助する、循環中のマクロファージ（ＭｃＥｖｏｙら、１９８６）、Ｔリンパ球（Ｑｕら、１９９６）および多形核細胞の付着部位も提供する。

【０１８６】

従って、陰イオン性リン脂質に結合する抗体および他のリガンドは、腫瘍血管の標的化、画像化および／または処理のために用いられ得る。陰イオン性リン脂質は、以下のいくつかの理由のために腫瘍標的血管として魅力的である：それらは豊富である（ＰＳは、細胞１個あたり３×１０^{6}個の分子で存在する）；それらは、血液中の血管標的因子により結合のために直接接近可能である、腫瘍内皮の管腔表面に存在する；それらは、多様な固形腫瘍において大部分の腫瘍内皮細胞上に存在する；そしてそれらは、全ての正常組織において内皮には本質的に存在しない。

【０１８７】

薬物または凝固剤を使用する血管標的化因子は、大きい固形腫瘍を有するマウスでは、高度に有効であり、時には治療的であることが示されている（Ｈｕａｎｇら、１９９７；Ｎｉｌｓｓｏｎら、２００１；米国特許第５，６６０，８２７号、同第５，７７６，４２７号、同第５，８５５，８６６号、同第５，８６３，５３８号、同第５，９６５，１３２号、同第６，００４，５５４号、同第６，０５１，２３０号、同第６，２６１，５３５号、同第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号および同第６，０３６，９５５号）。従って、本発明は、ヒトにおけるガンの診断および処置において腫瘍脈管構造を標的するのにおける使用のための陰イオン性リン脂質に対する裸の抗体および脈管標的化因子を提供する。

【０１８８】

陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する裸の抗体が腫瘍処置においてどのように機能するかという正確な分子的理解は、処置を実施するために必要でないが、本発明者らは、観察された内皮細胞死滅を説明し得るいくつかの機構を熟慮した。好ましい機構（特に、本明細書において記載される３Ｇ４抗体について）は、Ｆｃドメイン媒介性免疫エフェクター機構、例えば抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）および抗体媒介性食作用である。細胞媒介性の細胞傷害、補体媒介性溶解および／またはアポトーシス、抗体誘導性細胞シグナル伝達および／または細胞骨格に対する障害もまた、関与し得る。

【０１８９】

陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対するインタクトな抗体（特に３Ｇ４）の、脈管内皮細胞表面に対する結合は、脈管管腔へ抗体のＦｃ部分が突出するということを意味する。抗体Ｆｃフラグメントは補体経路を活性化するので、観察された細胞破壊は、補体指向性の溶解の結果であり得る。従って、抗体結合は、補体依存性の凝固カスケードを活性化し、多成分複合体をアセンブルさせ、最終的には、標的細胞を透過性にする溶解性複合体を生成させる。「補体活性化ＡＤＣＣ」はまた、補体が抗体コーティング標的細胞に結合し、そして補体のレセプターを有する細胞（例えば好中球）が標的細胞を溶解する破壊において、作動し得る。

【０１９０】

裸の抗体または未結合体化抗体（その抗原結合フラグメントを含む）は、腫瘍脈管内皮細胞の表面で陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合するので、それらの抗体は、管腔表面上で抗体コーティングを形成する。これは、免疫エフェクター細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞および／またはナチュラルキラー（ＮＫ）細胞）を誘引するように機能し得、これが次に脈管内皮細胞上で細胞媒介性細胞傷害性効果を発揮する。

【０１９１】

陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する抗体結合はまた、腫瘍脈管内皮細胞においてアポトーシスを誘導し得る。実際にアポトーシスを誘導するＰＳ（ＰＳがアポトーシスから生じるマーカーであるのではなく）に対する抗体結合の報告は知られていないが、本発明者らは、観察された抗腫瘍効果について、これが別の可能性のある機構であると考える。

【０１９２】
腫瘍血管内皮細胞の表面における陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する抗体結合が、細胞の細胞骨格組織化において障害を生じ得ることも可能である。細胞骨格は表面膜の組織化においてある役割を果たすので、そして抗体結合は膜を破壊（またはさらに破壊）し得るので、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する抗体の結合は、二重層と相互作用する細胞骨格タンパク質に対して変化を伝達し得る。細胞骨格タンパク質の空間的組織化は、膜安定性および細胞形状を制御することが既に公知であり、そしていくつかの細胞骨格平衡の妨害は細胞完全性に対する遠大な結果を有し得る可能性がある。

【０１９３】
本発明の操作のさらなる機構は、内皮細胞表面での陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する抗体の結合が、今のところ規定されていない経路によってシグナル伝達を開始し得るということであるかもしれない。抗体結合はまた、例えば、膜レセプター、シグナル伝達タンパク質、膜チャネルなどの構成および／または相互作用を変更することによって、公知のシグナル伝達経路を妨害し得る。細胞破壊（アポトーシス）のシグナルは、開始されてももしくは模倣されてもよいし、そして／または保存シグナル／恒常性シグナルが阻害されてもよい。

【０１９４】
科学的に興味深いが、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する裸の抗体によって達成された脈管破壊の正確な性質を決定することは、処理を行なう必要はない。これらのカテゴリーの抗体の投与がインビボにおいて特定の抗腫瘍効果を有利に生じることが示されていることを考慮すると、この現象の基礎となる分子機構にかかわりなくこの処置が利用され得る。従って陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合する裸の抗体の使用は、腫瘍治療における重要な進歩を示し、調製および費用において利点が得られる。

【０１９５】
（Ｃ．陰イオン性リン脂質に対する抗体およびアミノリン脂質に対する抗体）
本発明は、腫瘍脈管構造のマーカーの新しいカテゴリーである陰イオン性リン脂質を同定するので、１つ以上の陰イオン性リン脂質に結合する、裸の抗体および免疫複合体を、必要に応じてアミノリン脂質と組み合わせて、腫瘍診断および腫瘍処置において、ここで用いてもよい。

【０１９６】
（Ｃ１．ポリクローナル抗体）
抗体を調製および特徴付けるための手段は、当該分野において周知である。（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、１９８８を参照のこと；本明細書中で参考として援用される）。ポリクローナル抗血清を調製するために、動物を免疫原性陰イオン性リン脂質および／またはアミノリン脂質（本明細書中で教示されるように、H_2O_2および他の薬剤で処理された細胞を含む）を含む組成物で免疫し、そして抗血清をこの免疫した動物から収集する。広範な動物種が、抗血清の生成のために使用され得る。代表的に、抗抗血清の生成のために使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。ウサギの比較的大容量の血液が理由で、ウサギは、ポリクローナル抗体の産生のために好ましい選択である。

【０１９７】
ポリクローナル抗体の産生において使用される免疫原組成物の量は、免疫原ならびに免疫に使用される動物の性質に依存して変動する。以下の種々の経路が、本発明の免疫原を投与するために使用され得る；皮下、筋内、皮内、静脈内、腹腔内、および脾臓内。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の種々の時点で免疫された動物の血液をサンプリングすることによって、モニターされ得る。第２の、追加免疫注射もまた与えられ得る。追加免疫する工程および力価測定する工程のプロセスは、適切な力価が達成されるまで反復される。所望の力価レベルが得られた時点で、この免疫した動物を採血し得、そして血清が単

離および保存され得る。動物はまた、モノクローナル抗体を産生するために使用され得る。

【０１９８】

当該分野において周知のように、特定の組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知の免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって増強され得る。例示的なアジュバントとしては完全フロイントアジュバント（殺傷されたＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓを含有する、免疫応答の非特異的刺激物質）；不完全フロイントアジュバント；および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

【０１９９】

陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質をキャリアと連結することによってか、またはＶＥＧＦをキャリアにカップリングすることによって達成され得るように、宿主免疫系を追加免疫することもまた所望され得る。例示的なキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）およびウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンのような他のアルブミンもまた、キャリアとして使用され得る。

【０２００】

当該分野においてまた公知であるように、所定の組成は、その免疫原性において変動し得る。しかし、ＶＥＧＦに対する抗体の産生は著しくは困難でない。例えば、高度に特異的な抗ホスファチジルセリン抗体は、ホスファチジルセリン含有ポリアクリルアミドゲルおよびホスファチジルセリン－チトクロムｃベシクルの筋肉内注射によって免疫されたウサギにおいて惹起された（Ｍａｎｅｔａ－Ｐｅｙｒｅｔら、１９８８；１９８９；各々が、本明細書中において参考として援用される）。アクリルアミド移植片の使用は、抗体産生を増強した（Ｍａｎｅｔａ－Ｐｅｙｒｅｔら、１９８８；１９８９）。この様式で惹起された抗ホスファチジルセリン抗体は、ヒト血小板においてインサイチュでホスファチジルセリンを検出し得る（Ｍａｎｅｔａ－Ｐｅｙｒｅｔら、１９８８）。Ｉｎｏｕｅ、ＲｏｔｅおよびＲａｕｃｈのグループもまた、抗ＰＳ抗体および抗ＰＥ抗体を開発した（以下を参照のこと）。

【０２０１】

陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する抗体の作製は、種々の手段によって達成され得るが、特定の好ましい方法は、本明細書中において、実施例ＩＶに記載される。

【０２０２】

（Ｃ２．モノクローナル抗体）

モノクローナル抗体（ＭＡｂ）を産生するための種々の方法がまた、現在当該分野において十分に周知である。最も標準的なモノクローナル抗体の産生技術は、一般的に、ポリクローナル抗体を調製するための技術と同じ系に沿って開始する（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、１９８８；本明細書中で参考として援用される）。ポリクローナル抗体応答は、免疫原性陰イオン性リン脂質および／またはアミノリン脂質組成物を用いて動物を免疫することによって開始され、そして所望の力価レベルが得られる時点で、その免疫した動物を用いてＭＡｂを産生し得る。好ましくは、本明細書中に開示される特定のスクリーニングおよび選択技術が、求められる後の特性を有する抗体を選択するために使用される。

【０２０３】

ＭＡｂは、米国特許第４，１９６，２６５号（これは、本明細書中で参考として援用される）に例示される技術のような、周知技術の使用を通して容易に調製され得る。代表的に、この技術は、選択された免疫原組成物を用いて適切な動物を免疫することを含む。免疫する組成物は、抗体産生細胞を刺激するのに有効な様式で投与される。マウスおよびラットのような齧歯類は好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、およびカエルの細胞の使用もまた可能である。ラットの使用は、特定の利点を与え得る（Ｇｏｄｉｎｇ、１９８６

、第６０～６１頁；本明細書中で参考として援用される）が、マウスが好ましい。そして、ＢＡＬＢ／ｃマウスは、最も慣用的に使用され、そして一般により高率で安定な融合物を与えるので最も好ましい。

【０２０４】

免疫後に、所望の抗体を産生する潜在能を有する体細胞（詳細には、Ｂリンパ球（Ｂ細胞））が、ＭＡｂ産生プロトコルにおける使用のために選択される。これらの細胞は、生検された脾臓、扁桃、もしくはリンパ節から、または末梢血サンプルから獲得され得る。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましい。前者は、脾臓細胞が分裂形質芽球段階にある抗体産生細胞の豊富な供給源であるからであり、後者は、末梢血が容易に利用可能であるからである。しばしば、一団の動物が免疫され、そして最高の抗体力価を有する動物の脾臓が取り出され、そして注射器でこの脾臓をホモジネートすることによって脾臓リンパ球が得られる。代表的に、免疫したマウス由来の脾臓は、約5×10^{7}～2×10^{8}のリンパ球を含む。

【０２０５】

次いで、免疫した動物由来の抗体産生Ｂリンパ球は、不死化骨髄腫細胞の細胞（一般的には、免疫された動物と同じ種の細胞）と融合される。ハイブリドーマ産生融合手順における使用に適切な骨髄腫細胞株は、好ましくは非抗体産生であり、高い融合効率を有し、そして、次いで所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地中で増殖し得なくさせる酵素欠損を有する。

【０２０６】

当業者に公知のように、多くの骨髄腫細胞のうちの任意の細胞が使用され得る（Ｇｏｄｉｎｇ、第６５～６６頁、１９８６；Ｃａｍｐｂｅｌｌ、第７５～８３頁、１９８４；各々は、本明細書中で参考として援用される）。例えば、免疫した動物がマウスである場合、Ｐ３－Ｘ６３／Ａｇ８、Ｘ６３－Ａｇ８．６５３、ＮＳｌ／１．Ａｇ　４　ｌ、Ｓｐ２１０－Ａｇ１４、ＦＯ、ＮＳＯ／Ｕ、ＭＰＣ－１１、ＭＰＣ１１－Ｘ４５－ＧＴＧ１．７、およびＳ１９４／５ＸＸ０　Ｂｕｌが使用され得；ラットについて、Ｒ２１０．ＲＣＹ３、Ｙ３－Ａｇ１．２．３、ＩＲ９８３Ｆ、４Ｂ２１０、または上記に列挙されたマウス細胞株のうちの１つが使用され得；そしてＵ－２６６、ＧＭ１５００－ＧＲＧ２、ＬＩＣＲ－ＬＯＮ－ＨＭｙ２、およびＵＣ７２９－６はすべて、ヒト細胞融合に関連して有用である。

【０２０７】

抗体産生脾臓細胞または抗体産生リンパ節細胞、および骨髄腫細胞のハイブリッドを生成するための方法は、通常、細胞膜の融合を促進する因子（化学的または電気的）の存在下で、４：１の比率で体細胞を骨髄腫細胞と混合する工程を包含するが、この比率はそれぞれ約２０：１～約１：１まで変動し得る。センダイウイルスを使用する融合方法は、ＫｏｈｌｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ（１９７５；１９７６；各々、本明細書中で参考として援用される）によって記載されており、そしてポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（例えば、３７％（ｖ／ｖ）ＰＥＧ）を使用する融合方法は、Ｇｅｆｔｅｒら（１９７７；本明細書中で参考として援用される）に記載されている。電気的に誘導された融合方法の使用もまた適切である（Ｇｏｄｉｎｇ、第７１～７４頁、１９８６；本明細書中で参考として援用される）。

【０２０８】

融合手順は通常、低い頻度（約1×10^{-6}～1×10^{-8}）で生存可能なハイブリッドを生成する。しかし、これは問題を提起しない。なぜなら、生存可能な融合ハイブリッドは、選択培地中で培養することによって、親の非融合細胞（特に、通常は無限に分裂しつづける、非融合骨髄腫細胞）から識別されるからである。選択培地は、一般に、組織培養培地中でのヌクレオチドのデノボ合成をブロックする薬剤を含む培地である。例示的かつ好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成をブロックし、一方、アザセリンは、プリン合成のみをブロックする。アミノプテリンまたは

メトトレキサートが使用される場合、ヌクレオチドの供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンを倍地に補充する（ＨＡＴ培地）。アザセリンが使用される場合、ヒポキサンチンを培地に補充する。

【０２０９】

好ましい選択培地は、ＨＡＴである。ヌクレオチドサルベージ経路を機能し得る細胞のみが、ＨＡＴ培地中で生存し得る。骨髄腫細胞は、サルベージ経路の重要な酵素（例えば、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）を欠損し、そしてそれらは生存し得ない。Ｂ細胞はこの経路を機能し得るが、それらは培養中で限られた寿命を有し、そして一般に約２週間以内に死滅する。従って、選択培地中で生存し得る細胞のみが、骨髄腫細胞およびＢ細胞から形成されたそれらのハイブリッドである。

【０２１０】

この培養は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマの集団を提供する。代表的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレート中での単一クローン希釈によって細胞を培養し、次いで所望の抗ＶＥＧＦ反応性について個々のクローンの上清を試験すること（約２～３週間後）によって、実施される。このアッセイは、高感度で、単純で、そして迅速であるべきである（例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫検定法、細胞傷害性アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイ（ｄｏｔ　ｉｍｍｕｎｏｂｉｎｄｉｎｇ　ａｓｓａｙ）など）。

【０２１１】

次いで、選択されたハイブリドーマを段階希釈し、そして個々のＶＥＧＦ抗体産生細胞株にクローン化する。次いで、このクローンは無限に増殖されて、ＭＡｂを提供する。細胞株は、２つの基本的様式でＭＡｂ産生のために利用され得る。ハイブリドーマのサンプルは、もともとの融合物のために体細胞および骨髄腫細胞を提供するために使用された型の組織適合性動物に注射（しばしば、腹膜腔内へ）され得る。この注射された動物は、融合された細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発症する。次いで、この動物の体液（例えば、血清または腹水）を穿刺して、高濃度でＭＡｂを提供し得る。個々の細胞株はまた、インビトロで培養され得る。ここで、ＭＡｂは培養培地中に自然に分泌され、ここからＭＡｂは高濃度で容易に獲得され得る。

【０２１２】

いずれかの手段によって産生されたＭＡｂは、一般に、例えば、濾過、遠心法、および種々のクロマトグラフィー方法（例えば、ＨＰＬＣまたはアフィニティークロマトグラフィー）（これらの精製技術はすべて、当業者に周知である）を使用して、さらに精製される。これらの精製技術は各々、混合物の他の成分から所望の抗体を分離するための分別を含む。抗体の調製に特に適切な分析方法としては、例えば、プロテインＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーおよび／またはプロテインＧ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅクロマトグラフィーが挙げられる。

【０２１３】

（Ｄ．陰イオン性リン脂質に対する第二世代の抗体およびアミノリン脂質に対する第二世代の抗体）

本発明は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対して結合する「第二世代」の抗体を提供する。この抗体は、特性が改善されており、そして／または先行技術における抗体と関連する欠点を被らない。一群のこのような抗体が本明細書に開示されており、そのうちモノクローナル抗体９Ｄ２および３Ｇ４が現在好ましく、３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体が特に好ましい。本発明はまた、特定の免疫技術およびスクリーニングの技術を提供し、これによって、有利な特性を有し、かつ／または欠点が少ない、「～様（ｌｉｋｅ）」抗体または「競合（ｃｏｍｐｅｔｉｎｇ）」抗体を生成することが可能になる。

【０２１４】

（Ｄ１．抗体の特性）

本発明の第二世代の抗体は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合するが、このようなリン脂質に対する抗体に通常は関連する病原性の特性は有さない。これは、本

発明者らによって開発された新規な免疫技術およびスクリーニングの技術によって部分的には可能になった。

【０２１５】

抗リン脂質症候群（ＡＰＳ）は、「抗カルジオリピン（ａｎｔｉ－ｃａｒｄｉｏｌｉｐｉｎ）」抗体および「狼瘡性抗凝固抗体（ｌｕｐｕｓ　ａｎｔｉｃｏａｇｕｌａｎｔ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」と命名された自己抗体と関連する。これらの症候群は、静脈および動脈の血栓塞栓、血小板減少および多数の神経学的症状に対する素因に関連する。従って、これらの患者における抗リン脂質抗体は「病原性抗体」である。

【０２１６】

「抗リン脂質抗体」および「抗ＰＳ抗体」として何年も記載されているが、このような病原性抗体は実際に、カルジオリピン、ＰＳまたはその両方に結合するタンパク質補因子を認識するが、一方、リン脂質自体は認識しない（Ｇａｌｌｉら、１９９０；１９９３；ＭｃＮｅｉｌら、１９９０；Ｒｏｔｅ，１９９６）。抗カルジオリピン抗体は、β２－糖タンパク質Ｉ上の特定の領域（残基２８１と残基２８８との間）を認識するが、狼瘡性抗凝固抗体はプロトロンビンを認識する。同様に、疾患状態で存在する抗ＰＥ抗体は、タンパク質（例えば、低分子量および高分子量のキニノーゲン（ＨＫ）、プレカリクレインおよび第ＸＩ因子）と組み合わせて、ＰＥに結合する（ＳｕｇｉおよびＭｃＩｎｔｙｒｅ，１９９５；１９９６ａ；１９９６ｂ）。この型のタンパク質認識に基づいて、患者における抗リン脂質抗体は、リン脂質からタンパク質補因子に代わって、これによって疾患の症状を生み出す。

【０２１７】

本発明の抗体は、タンパク質補因子と組み合わされたアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対して結合しないことに基づいて特に選択されているが、むしろ「真の（ｔｒｕｅ）」抗リン脂質抗体である。従って、本発明の抗体は、タンパク質補因子に結合せず、リン脂質からタンパク質補因子に代わりもせず、従って投与に安全である。実際に、本発明の抗体を高用量で長期間用いて処理したマウスは、凝固能力の変化を示さなかったが、マウスは、抗カルジオリピン抗体または狼瘡抗凝固抗体を注射した場合、ＡＰＳと反応した。

【０２１８】

背景にある機構にもかかわらず、ヒト集団に存在する抗リン脂質抗体は、自己免疫疾患、例えば、全身性エリテマトーデス（Ｂｒａｎｃｈら、１９８７；Ｓｔａｕｂら、１９８９；ＤｒｏｕｖａｌａｋｉｓおよびＢｕｃｈａｎａｎ、１９９８；Ｓｍｉｒｎｏｖら、１９９５；Ｒａｕｃｈら、１９８６；ＲａｕｃｈおよびＪａｎｏｆｆ、１９９０）および再発性流産（Ｒｏｔｅら、１９９５；Ｒｏｔｅ、１９９６；Ｖｏｇｔら、１９９６；１９９７；Ｋａｔｓｕｒａｇａｗａら、１９９７）と関連する。本発明の抗体がマウスまたはサルに投与される場合、このような症状は関係がない。

【０２１９】

また、本発明の抗体（例えば、９Ｄ２抗体および３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体）によって認識されるエピトープは、アネキシンＶによって認識されるのと同じではない。このことは、本明細書において、この因子がリン脂質に対するお互いの結合を交差ブロックしないと示される。３Ｇ４抗体および９Ｄ２抗体によって認識されるエピトープはおそらく、免疫原性の形態である、ＰＳの六方充填型である。アネキシンＶは、六方晶系の形態に加えて平坦なＰＳに結合する可能性が高い。六方晶系の形態のＰＳは細胞活性化と関連して原形質膜への隆起中に、そしてアポトーシス細胞上の「小胞（ｂｌｅｂ）」中に濃縮される。従って、本発明の抗体（例えば、９Ｄ２抗体および３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体）の制限された分布は、検出可能な毒性の欠失および抗体の凝固に対する効果の欠失にさらに寄与する。

【０２２０】

有利な特性を有するか、および／または副作用が減少しているかもしくは本質的に副作用がない、アミノリン脂質に対する抗体および陰イオン性リン脂質に対する抗体を生成す

るために、本発明は、好ましい免疫方法およびスクリーニングの方法を提供する。他の免疫技術および抗体は文献（Ｕｍｅｄａら、１９８９；Ｉｇａｒａｓｈｉら、１９９１；Ｒｏｔｅら、１９９３）に報告されており、これには、関与する脂肪酸鎖の型について、報告された特異性を有するものを含む（Ｌｅｖｙら、１９９０；Ｑａｍａｒら、１９９０）。しかし、本発明の免疫技術、および詳細には、血清に依存しない抗体の選択によって、特定の利益が得られる。

【０２２１】

Ｕｍｅｄａら（１９８９）は、ホスファチジルセリンの立体特異的エピトープを認識するモノクローナル抗体の生成を報告した。しかし、Ｕｍｅｄａのシステムは、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａでコーティングされたアミノリン脂質サンプルを用いてマウス脾臓へのホスファチジルセリンの直接免疫を用いるという欠点を被る（Ｕｍｅｄａら、１９８９）。Ｕｍｅｄａら（１９８９）によって報告される多くの抗体がまた、抗凝固活性を示すが、これは、本発明の抗体には関係しない欠点である。３Ｇ４抗体の結合プロフィールは、Ｕｍｅｄａら（１９８９）のＰＳＣ８抗体の結合プロフィールとは異なる。

【０２２２】

本発明の抗体はまた、結合についてさらなる標的を提供し得る、全てのまたはほとんどの陰イオン性リン脂質を認識するという利点を有する。従って、本発明の第二世代の抗体は、本明細書において表４に開示されるように、９Ｄ２抗体または３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体と実質的に同じかまたは同じリン脂質特異性を有するとして、そして血清依存性ではないとして、規定され得る。

【０２２３】

Ｉｇａｒａｓｈｉら（１９９１）はまた、抗ＰＳ抗体の誘導を報告しているが、ここでも、脾臓内免疫を使用しており、抗原を再度静脈内注射した場合、力価のごくわずかな増大が観察された。Ｉｇａｒａｓｈｉら（１９９１）由来のほとんどのＭＡｂがＤＮＡと交差反応して、多くが狼瘡性抗凝固活性を示したが、そのうちのどの欠点も、本発明者らによって開発された抗体には存在しなかった。本発明の３Ｇ４抗体の好ましい結合プロフィールはまた、Ｉｇａｒａｓｈｉら（１９９１）の表１における抗体の結合プロフィールとは異なる。

【０２２４】

他の研究者が、１種より多くの陰イオン性リン脂質と交差反応するマウスモノクローナル抗体の狼瘡性抗凝固活性を報告している（Ａｌｖｉｎｇら、１９８７；Ｒａｕｃｈ＆Ｊａｎｏｆｆ，１９９０）が、本発明者らは、狼瘡性抗凝固活性のない抗体を得るのには困難を経験しなかった。これは、本発明による方法、抗体および競合抗体の明確な利点である。

【０２２５】

Ｒａｕｃｈら（１９８６）、Ｈａｓｅｇａｗａら（１９９４）、Ｒａｖｉｒａｊａｎら（１９９５）およびＭｅｎｏｎら（１９９７）に記載されるとおり、患者からの抗体の使用を回避することに加えて、本出願はまた、文献に由来する既存の抗体（例えばＲｏｔｅら（１９９３）によって記載される３ＳＢ抗体）と並行して比較して、本発明によって提供される抗体の有利な特性を実証する。３ＳＢ抗体は本明細書に開示される種々の方法における使用に適切な特性を有するが、本発明者らによって開発された抗体は、それにもかかわらず、例えば、３ＳＢ抗体に対する３Ｇ４抗体の抗ウイルス効果の増大によって本明細書において示されるように、競合的研究において３ＳＢ抗体を凌ぐ（実施例ＸＩＩＩ）。

【０２２６】

本発明の抗体はまた、その親和性によって特徴付けられ得る。本発明の前に、文献中の抗体は比較的弱い親和性を有した（報告されている）。従って、特定の実施形態では、本発明の第二世代の抗体は、詳細には、本明細書に記載されるように表３に開示されるとおりＥＬＩＳＡにおいて測定した場合の親和性が、ＰＳについての９Ｄ２抗体または３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体の親和性に少なくとも等しいというＰＳについての親和性を

有する抗体として、そして血清依存性でないとして、規定される。
【０２２７】
さらに詳細には、本発明の第二世代の抗体は、表３に開示されるように、ＰＳについての９Ｄ２抗体または３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体の親和性に少なくとも等しいというＰＳについての親和性を有する抗体であるとして、そして表４に開示されるように、９Ｄ２抗体または３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体と実質的に同じかまたは同じリン脂質特異性を有するとして、そして血清依存性ではないとして、規定される。最も好ましくは、この第二世代の抗体は、表４に開示されるように３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体と同じリン脂質特異性を有するとして、そして血清依存性ではないとして、表３に開示されるとおり、ＰＳについての３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体の親和性に少なくとも等しいというＰＳについての親和性を有する抗体である。
【０２２８】
（Ｄ２．ＣＤＲ技術）
抗体は、可変領域および定常領域から構成される。抗体に関して本明細書において用いる場合、「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部分が、抗体間で配列が広範に異なることを意味し、そしてその特定の抗原に対する各々の特定の抗体の結合および特異性において用いられる。しかし、この可変性は、抗体の可変ドメインを通じて均一には分散されない。これは、軽鎖および重鎖の可変ドメインの両方において、「超可変領域」と名付けられた３つのセグメントに（以下に考察されるラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）抗体以外は）集中される。
【０２２９】
可変ドメインのさらに高度に保存された部分は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる。ネイティブの重鎖および軽鎖の可変ドメイン各々は、４つのＦＲ（それぞれ、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３およびＦＲ４）を含み、これはループ連結を形成する３つの超可変領域に接続されたβシート構成を主に採用しており、そしてある場合には、βシート構造の一部を形成する。
【０２３０】
各々の鎖における超可変領域は、ＦＲと密接に近接して一緒に保持されて、他の鎖由来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ら、１９９１（本明細書において参考として具体的に援用される））。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害における抗体の関与を示す。
【０２３１】
本明細書において用いる場合、「超可変領域」という用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」（すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメインにおける３１～３５（Ｈ１）、５０～５６（Ｈ２）および９５～１０２（Ｈ３）；本明細書において参考として詳細に援用される、Ｋａｂａｔら、１９９１）、および／または「超可変性ループ」（すなわち、軽鎖可変ドメインにおける残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）および９１～９６（Ｌ３）、ならびに重鎖可変ドメインにおける２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）および９６～１０１（Ｈ３））由来のアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」残基または「ＦＲ」残基は、本明細書に規定される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。
【０２３２】
３Ｇ４抗体（ＡＴＣＣ　４５４５）のＶｈ鎖およびＶκ鎖のＤＮＡ配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ配列番号１、２、３および４として本明細書に提供する。これらの配列は、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域のＣＤＲ１－３を包含する。本明細書に提供される配列および他の情報、ならびに当該分野の知識を考慮して、ある範囲の３Ｇ４様の改善された抗体および抗原結合領域をここで調製することが可能であり、従ってこれは本発明に包含される。

【０２３３】
特定の実施形態において、本発明は、ＡＴＣＣ　４５４５として寄託されたハイブリドーマによって生成された抗体の少なくとも１つのＣＤＲを提供する。他の実施形態において、本発明は、少なくとも第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に結合し、そしてＡＴＣＣ　４５４５として寄託されたハイブリドーマによって生成される抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含む、ＣＤＲ、抗体またはその抗原結合領域を提供する。
【０２３４】
本発明のさらなる局面は、配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列を有する少なくとも１つのＣＤＲ、またはその改変体もしくは変異型に関する。本発明の他の局面は、ＣＤＲ、抗体またはその抗原結合領域に関しているが、これは少なくとも１つの第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に結合し、配列番号２もしくは配列番号４、またはその改変型もしくは変異型のアミノ酸配列を有する少なくとも１つのＣＤＲを含み、ここでこのような改変型もしくは変異型は、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に対する結合を維持する。
【０２３５】
１つの特定の実施形態において、３Ｇ４抗体（ＡＴＣＣ　４５４５）のフレームワーク領域がマウスから、ヒトでの免疫原性を低下させるヒトのＩｇＧ（例えばヒトＩｇＧ$_1$または他のＩｇＧサブクラス）へ変化されている、抗体またはその抗原結合領域を本発明は提供する。他の実施形態において、３Ｇ４抗体（ＡＴＣＣ　４５４５）の配列を、当該分野で公知のように、Ｔ細胞エピトープの存在について検討する。次いで、背景にある配列を変化させて、Ｔ細胞エピトープを除去、すなわち、抗体を「脱免疫（ｄｅｉｍｍｕｎｉｚｅ）」することができる。
【０２３６】
３Ｇ４抗体のＶｈ鎖およびＶκ鎖のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列（配列番号１、２、３および４）の利用可能性は、ある範囲の抗体が、ここでＣＤＲ技術を用いて調製され得ることを意味する。詳細には、無作為な変異をＣＤＲにおいて作製して、その産物をスクリーニングして、高い親和性および／または高い特異性を有する抗体を同定する。このような変異および選択は、慣用的に抗体の分野で行われる。本明細書に開示される有利なスクリーニング技術を考慮すれば、これは本発明における使用に特に適切である。
【０２３７】
これらの技術を用いて、抗体改変体であって、それが調製される親の抗体（例えば９Ｄ２抗体および３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体）に対して改善された生物学的特性を有する抗体改変体を、生成する。このような改変体、または第二世代の化合物は代表的には、親の抗体の１つ以上の置換された超可変領域残基を含む実質的な改変体である。このような置換改変体を生成するための便利な方法は、ファージディスプレイを用いる親和性成熟である。
【０２３８】
ファージディスプレイを用いる親和性成熟において、いくつかの超可変領域部位（例えば、６～７部位）を変異させて、各々の部位で全ての可能なアミノ置換を生成する。このように生成された抗体改変体は、各々の粒子内に充填されたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物に対する融合物として糸状ファージ粒子から一価の様式で提示される。次いで、ファージディスプレイ改変体を、本明細書に開示されるように、その生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。改変のための候補の超可変領域部位を特定するために、抗原結合に対して有意に寄与する同定された超可変領域残基に対してアラニンスキャニング変異誘発を実施してもよい。
【０２３９】
ＣＤＲシャッフリングおよび移植技術はまた、本発明の抗体（好ましくは９Ｄ２抗体および３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体）とともに用いることができる。ＣＤＲシャッフリングは、ＣＤＲ配列を特定のフレームワーク領域に挿入する（参考として本明細書に詳

細に援用される、Ｊｉｒｈｏｌｔら、１９９８）。ＣＤＲ移植技術によって、単一のマスターフレームワークへのＣＤＲ配列の無作為な組み合わせが可能になる（各々が本明細書において参考として詳細に援用される、Ｓｏｄｅｒｌｉｎｄら、１９９９，２０００）。このような技術を用いて、例えば、３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体のＣＤＲ配列を、変異誘発して複数の異なる配列を作製し、これを足場配列に組み込んで、得られた抗体改変体を所望される特徴（例えばより高い親和性）についてスクリーニングする。

【０２４０】

本開示における情報に照らして、抗体（好ましくは９Ｄ２抗体および３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体）の抗原結合フラグメントはまた、安定性の向上を得ながら、最小化され得る。これは、免疫グロブリンV_HドメインおよびV_H様ドメインに基づいて単一ドメインの結合タンパク質を調製することによって達成できる（本明細書において参考として援用される、Ｎｕｔｔａｌｌら、２０００）。

【０２４１】

あるいは、またはさらに、抗原抗体複合体の結晶構造を描写しかつ解析して、抗体と標的のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（例えばＰＳ）との間の接触ポイントを同定し得る。このような接触残基および隣接する残基は、置換についての候補である。一旦このような改変体が生成されれば、本明細書に記載のように、その改変体の群をスクリーニングに供して、１つ以上の関連のアッセイにおいて、類似するが異なるかまたはさらに優れた特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択する。

【０２４２】

（Ｄ３．ラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）抗体）

本発明の抗体のさらなる例は、「ラクダ化（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）」抗体である。ラクダおよびラマ（Ｃａｍｅｌｉｄａｅ、ラクダ科）由来の抗体としては、軽鎖を欠き、従って重鎖のみによって形成される、特有の種類の抗体が挙げられる。これらは、「ラクダ化抗体（ｃａｍｅｌｉｚｅｄ）」と命名されている。このような抗体の抗原結合部位は、V_{HH}（ＶＨＨ）と呼ばれる単一のドメインである。

【０２４３】

３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）抗体のＶｈ鎖およびＶκ鎖のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列は、本明細書に提供されている（配列番号１、２、３および４）ので、３Ｇ４抗体のラクダ化バージョンが調製され得る。変異および構造的適合を行なって、十分な変動性を保持しつつ、単一ドメインH_{VV}へとV_H-V_L対のV_Hを作り直し得る（本明細書において参考として詳細に援用されるＭｕｙｌｄｅｒｍａｎｓら、２００１）。このようなV_{HH}構築物は、強力な抗原結合能力を有する、小さく頑丈でかつ効率的な認識単位（ＲｉｅｃｈｍａｎｎおよびＭｕｙｌｄｅｒｍａｎｓ，１９９９）であり、これによって従来のV_H-V_L対に接近不能である新規なエピトープと相互作用するというさらなる利点を得ることができる。従って、ラクダ化抗体は、Ｆｖフラグメントに対して似ているが、さらなる利点を有し得る。

【０２４４】

米国特許第５，８００，９８８号、同第６，００５，０７９号、ＰＣＴ出願番号ＷＯ９４／０４６７８、ＰＣＴ出願番号ＷＯ９４／２５５９１、ＲｉｅｃｈｍａｎｎおよびＭｕｙｌｄｅｒｍａｎｓ（１９９９）およびＭｕｙｌｄｅｒｍａｎｓら（２００１）は各々が、ラクダ化された抗体の生成をなおさらに記載して可能にするために、参考として本明細書に詳細に援用される。従って、３Ｇ４抗体からのＣＤＲは、Ｃａｍｅｌｉｄａｅ抗体の重鎖免疫グロブリンの可変ドメインのフレームワークに移植され得る。

【０２４５】

（Ｄ４．ＣＤＲ配列）

従って、本発明のさらなる局面は、抗体の重鎖および軽鎖（例えば９Ｄ２および３Ｇ４、そして好ましくは３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）の重鎖および軽鎖）のＣＤＲ領域をコードする単離されたＤＮＡセグメントおよび組み換えベクター、ならびに、ＤＮＡ技術の適用を通じて、このようなＣＤＲ領域を発現する組み換え宿主細胞およびファージを作製

および使用することに関する。

【０２４６】

従って、本発明は、ＡＴＣＣ　４５４５として寄託されたハイブリドーマによって生成された抗体の少なくとも１つのＣＤＲをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明はさらに、ＣＤＲ、抗体またはその抗原結合領域をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを提供するが、このポリヌクレオチドは、少なくとも第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に結合し、そしてＡＴＣＣ　４５４５として寄託されたハイブリドーマによって生成された抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含む。

【０２４７】

本発明のさらなる局面は、配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列、またはその改変体型もしくは変異型を有する、少なくとも１つのＣＤＲをコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドに関する。本発明の他の局面は、ＣＤＲ、抗体またはその抗原結合領域をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドに関し、このポリヌクレオチドは、少なくとも第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に結合し、そして配列番号２もしくは配列番号４のアミノ酸配列、またはその改変体型もしくは変異型のアミノ酸配列を有する、少なくとも１つのＣＤＲ含み、ここでこのような改変体型または変異型は、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に対する結合を維持する。

【０２４８】

本発明の他の局面において、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号１もしくは配列番号３のヌクレオチド配列、またはその改変型もしくは変異型を含む。詳細には、この単離されたポリヌクレオチドは、配列番号１もしくは配列番号３のヌクレオチド配列、またはその改変型もしくは変異型を含み、このヌクレオチド配列は、少なくとも第一のアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に結合する、ＣＤＲ、抗体またはその抗原結合領域をコードし、ここでこのような任意の改変型または変異型は、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくはＰＳ）に対する結合を維持する。

【０２４９】

従って、本発明は、総ゲノムＤＮＡを含まず、そして抗陰イオン性リン脂質または抗アミノリン脂質抗体の重鎖および軽鎖（例えば９Ｄ２および３Ｇ４、そして好ましくは３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）の、重鎖および軽鎖）のＣＤＲ領域を発現し得る、任意の哺乳動物（好ましくはヒトまたはマウス）から単離可能なポリヌクレオチドセグメントおよびＤＮＡセグメントに関する。本明細書において用いる場合、「ポリヌクレオチドセグメント」および「ＤＮＡセグメント」という用語は、特定の種の総ゲノムＤＮＡから単離されているポリヌクレオチド分子およびＤＮＡ分子をいう。「ポリヌクレオチドセグメト」および「ＤＮＡセグメント」という用語内に含まれるのは、ＤＮＡセグメントおよびこのようなセグメントのさらに小さいセグメントであり、これはまた、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、ウイルスなどを含む組み換えベクターでもある。

【０２５０】

同様に、抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質抗体の重鎖および軽鎖（例えば９Ｄ２および３Ｇ４、そして好ましくは３Ｇ４の重鎖および軽鎖）の精製されたＣＤＲ領域をコードするコードセグメントまたは単離された遺伝子部分を含むＤＮＡセグメントとは、このようなコード配列を含むＤＮＡセグメントをいい、そして特定の局面では、調節配列であって、他の天然に存在する遺伝子またはタンパク質コード配列から実質的に単離されたものをいう。これに関して、「遺伝子」という用語は、単に機能的タンパク質コード単位、機能的ポリペプチドコード単位または機能的ペプチドコード単位をいうために用いられる。当業者によって理解されるとおり、この機能的な用語は、適切な抗原結合タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを発現するかまたは発現するように適合され得る、ネイティブな抗体コード配列、およびそれより小さい操作されたセグメントを包含する。

【０２５１】

「他のコード配列から実質的に単離された」とは、目的のコードセグメントまたは単離された遺伝子部分が、ＤＮＡセグメントのコード領域の有意な部分を形成すること、およびこのＤＮＡセグメントが、天然に存在するコードＤＮＡの大部分（例えば、大きな染色体フラグメントまたは他の機能的遺伝子もしくはｃＤＮＡコード領域）を含まないということを意味する。当然ながら、このことは、もともと単離されたＤＮＡセグメントをいい、人為的にこのセグメントに後で付加された遺伝子もコード領域も除外しない。

【０２５２】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号２または配列番号４のアミノ酸配列に対して、少なくとも約７５％、より好ましくは、少なくとも約８０％、より好ましくは、少なくとも約８５％、より好ましくは少なくとも約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％および最も好ましくは、少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％程度のアミノ酸配列同一性のアミノ酸配列領域を含む、少なくとも第一の配列領域を含む、抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体の重鎖および軽鎖（例えば９Ｄ２および３Ｇ４、そして好ましくは３Ｇ４重鎖および軽鎖）のＣＤＲ領域をコードするＤＮＡ配列を組み込む、単離されたコードセグメントまたは単離された遺伝子部分および組み換えベクターに関する；ここでこのＣＤＲ領域は、配列番号２または配列番号２のアミノ酸配列のＣＤＲ領域の生物学的特性を少なくとも実質的に維持する。

【０２５３】

本明細書において開示されるように、この配列は、特定の生物学的に機能的な等価なアミノ酸または「保存的置換」を含んでもよい。他の配列は、当業者によって公知であって本明細書にさらに記載されるように、ＣＤＲまたはＣＤＲを含む抗体の特性を改善するように意図的に操作された、機能的に等価でないアミノ酸または「非保存置換」を含み得る。

【０２５４】

アミノ酸および核酸の配列は、さらなる残基、例えば、さらなるＮ末端もしくはＣ末端のアミノ酸、または５’もしくは３’の配列を含んでもよく、そしてそれでも、好ましくはタンパク質発現が関与する生物学的なタンパク質活性の維持または改善を含む上記の規準をこの配列が満たす限り、本発明の配列に相当する。末端配列の付加は、コード領域およびまたは制御領域の５’または３’部分のいずれかに隣接する種々の非コード配列を含む。

【０２５５】

従って、本発明の核酸セグメントは、他のＤＮＡ配列（例えば、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、マルチクローニング部位、他のコードセグメント）などと組み合わされてもよく、その結果その全体的な長さはかなり変えられ得る。従って、ほとんどの任意の長さの核酸フラグメントが使用され得ると考えられるが、全体の長さは、意図される組み換えＤＮＡプロトコールにおける調製および使用の容易さによって限定されることが好ましい。

【０２５６】

従って、組み換えベクターは本発明のさらなる局面を形成する。特に有用なベクターは、ＤＮＡセグメントのコード部分がプロモーターの制御下に位置するベクターであることが企図される。概して、排他的ではないが、組み換えプロモーターまたは異種のプロモーター（すなわち、その天然の環境におけるコード配列とは通常では関連しないプロモーター）が使用される。このようなプロモーターとしては、このプロモーターが、発現のために選択された細胞型、生物または動物においてさえ、ＤＮＡセグメントの発現に有効に指向する限りは、細菌プロモーター、ウイルスプロモーター、真核生物プロモーターおよび哺乳動物プロモーターを挙げ得る。

【０２５７】

タンパク質発現のためのプロモーターおよび細胞型の組み合わせの使用は、分子生物学の当業者に公知である。使用されるプロモーターは、構成的であってもよく、または誘導性であってもよく、そして組み換えタンパク質または組換えペプチドの大規模産生におい

て有利であるような、導入されたＤＮＡセグメントの高レベルの発現を指向する適切な条件下で用いられ得る。

【０２５８】

本発明の核酸配列の発現は、当業者によって公知であり、本明細書にさらに記載される、任意の１つ以上の標準的技術によって都合よく達成され得る。例えば、融合タンパク質の組み換え発現の後の説明は、核酸レベルで別のコード配列に作動可能に会合されない抗体および抗体フラグメントに対して同等に十分にあてはまる。

【０２５９】

（Ｅ．さらなる抗体調製技術）

（Ｅ１．ファージミドライブラリー由来の抗体）

組換え技術は、今や、一定範囲の抗体をコードする組換え遺伝子に由来する所望の特異性を有する抗体の調製を可能にしている（Ｖａｎ　Ｄｉｊｋら、１９８９；本明細書中に参考として援用される）。特定の組換え技術は、免疫した動物の脾臓から単離されたＲＮＡから調製されるコンビナトリアル免疫グロブリンファージ発現ライブラリーの免疫学的スクリーニングによる抗体遺伝子の単離を包含する（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、１９８６；ＷｉｎｔｅｒおよびＭｉｌｓｔｅｉｎ、１９９１；Ｂａｒｂａｓら、１９９２；各々が本明細書中に参考として援用される）。

【０２６０】

このような方法のために、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーは免疫した動物の脾臓から単離されたＲＮＡから調製され、そして適切な抗体を発現するファージミドは、抗原を発現する細胞およびコントロール細胞を用いてパニングすることにより選択される。従来のハイブリドーマ技術を超えるこのアプローチの利点は、約10^4倍もの多くの抗体が１回で生成およびスクリーニングされ得ること、ならびに新たな特異性がＨ鎖およびＬ鎖の組み合わせにより生成されることである。このことは、生成される適切な抗体の割合をさらに増大させる。

【０２６１】

細菌中で、多様な抗体分子の大きなレパートリーを生成するための１つの方法は、ベクターとしてバクテリオファージλを利用する（Ｈｕｓｅら、１９８９；本明細書中に参考として援用される）。λベクターを使用する抗体の生成は、ＤＮＡ配列の重鎖および軽鎖集団を別々の開始ベクターへクローニングすることを包含する。このベクターは、引き続きランダムに組み合わされて、抗体フラグメントを形成するために重鎖および軽鎖の同時発現を指向する単一のベクターを形成する。重鎖および軽鎖のＤＮＡ配列は、選択された抗原で免疫された動物に由来する脾臓細胞（またはそれらのハイブリドーマ）から単離されたｍＲＮＡの増幅により（好ましくは、ＰＣＲ^{TM}または関連増幅技術により）得られる。重鎖および軽鎖の配列は、代表的には、開始ベクターへの重鎖および軽鎖セグメントのクローニングを容易にするために、増幅されたＤＮＡセグメントの末端に制限部位を組み込むプライマーを使用して増幅される。

【０２６２】

完全にまたは部分的に合成的である抗体結合部位（すなわちパラトープ）の大きなライブラリーを作製およびスクリーニングするための別の方法は、糸状ファージ（例えば、Ｍ１３、ｆｌまたはｆｄ）に由来するディスプレイベクターを利用する。これらの糸状ファージディスプレイベクター（「ファージミド」ともいわれる）は、多様かつ新規な免疫特異性を有するモノクローナル抗体の大きなライブラリーを生じる。この技術は、糸状ファージ複製のアセンブリ段階の間に遺伝子産物および遺伝子を連結するための手段として、糸状ファージコートタンパク質膜アンカードメインを使用し、そしてこれは、コンビナトリアルライブラリーから抗体をクローニングおよび発現するために使用されている（Ｋａｎｇら、１９９１；Ｂａｒｂａｓら、１９９１；各々が本明細書中に参考として援用される）。

【０２６３】

糸状ファージディスプレイのためのこの一般的技術は、米国特許第５，６５８，７２７

号（本明細書中に参考として援用される）に記載される。大部分の一般的認識において、この方法は、単一のベクター系を使用して、抗体遺伝子レパートリーから予め選択されたリガンド－結合特異性を同時クローニングおよびスクリーニングするための系を提供する。予め選択されたリガンド－結合能力についてライブラリーの単離されたメンバーをスクリーニングすることにより、ライブラリーに由来するメンバーをコードする遺伝子を単離するための簡便な手段を用いて、発現された抗体分子の結合能力の相関づけが可能になる。

【０２６４】

発現およびスクリーニングの関連づけは、機能的抗体のアセンブリを可能にするための細菌細胞のペリプラズムへの融合ポリペプチドの標的化と、目的のライブラリーメンバーの簡便なスクリーニングを可能にするためのファージアセンブリの間の糸状ファージ粒子のコートへの融合タンパク質の標的化との組み合わせにより達成される。ペリプラズム標的化は、融合ポリペプチド中の分泌シグナルドメインの存在により提供される。ファージ粒子への標的化は、融合ポリペプチド中の糸状ファージコートタンパク質膜アンカードメイン（すなわち、ｃｐＩＩＩ由来か、またはｃｐＶＩＩＩ由来の膜アンカードメイン）の存在により提供される。

【０２６５】

糸状ファージベースのコンビナトリアル抗体ライブラリーの多様性は、重鎖および軽鎖の遺伝子のシャッフリングにより、ライブラリーのクローニングされた重鎖遺伝子の１つ以上の相補性決定領域を改変することにより、または誤りがちな（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ポリメラーゼ連鎖反応によりライブラリーへランダム変異を導入することにより増大され得る。ファージミドライブラリーをスクリーニングするためのさらなる方法は、米国特許第５，５８０，７１７号；同第５，４２７，９０８号；同第５，４０３，４８４号；および同第５，２２３，４０９号（各々が本明細書中に参考として援用される）に記載される。

【０２６６】

大きなコンビナトリアル抗体ライブラリーをスクリーニングするための別の方法が開発され、この方法は、Ｍ１３、ｆ１またはｆｄのような糸状バクテリオファージの表面での多様な重鎖および軽鎖配列の集団の発現を利用する（米国特許第５，６９８，４２６号；本明細書中に参考として援用される）。多様な重鎖（Ｈｃ）および軽鎖（Ｌｃ）配列の２つの集団は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ^{TM}）により合成される。これらの集団は、発現のために必要なエレメントを含む、別個のＭ１３ベースのベクターにクローニングされる。重鎖ベクターは、重鎖配列の翻訳がｇＶＩＩＩ－Ｈｃ融合タンパク質を生成するように、遺伝子ＶＩＩＩ（ｇＶＩＩＩ）コートタンパク質配列を含む。２つのベクターの集団は、ＨｃおよびＬｃの配列を含むベクター部分のみが単一の環状ベクターに連結されるように、ランダムに組み合わされる。

【０２６７】

組み合わされたベクターは、Ｍ１３での２つのポリペプチドのアセンブリおよび表面発現のためにＨｃおよびＬｃの配列の両方の同時発現を指向する（米国特許第５，６９８，４２６号；本明細書中に参考として援用される）。組み合わせ工程は、単一のベクターに２つの多様な集団内の異なるＨｃコード配列およびＬｃコード配列をランダムに結びつける。各々の独立したベクターから与えられたこのベクター配列は、生存ファージの生成のために必要である。さらに、擬ｇＶＩＩＩ配列は２つの開始ベクターのうちの一方のみに含まれるので、Ｌｃ会合ｇＶＩＩＩ－Ｈｃ融合タンパク質としての機能的抗体フラグメントの同時発現は、ベクター配列が単一のベクター内に連結されるまではファージ表面で達成され得ない。

【０２６８】

抗体ライブラリーの表面発現は、アンバーサプレッサー株において行われる。Ｈｃ配列とｇＶＩＩＩ配列との間のアンバー停止コドンは、非サプレッサー株において２つの成分を連結しない。非サプレッサー株から生成されたファージを単離し、そしてサプレッサー

株を感染させることは、発現の間に、ｇＶＩＩＩ配列にＨｃ配列を連結させる。感染後にサプレッサー株を培養することは、ｇＶＩＩＩ融合タンパク質（ｇＶＩＩＩ－Ｆａｂ融合タンパク質）としてライブラリー内の全ての抗体種をＭ１３ファージの表面で同時発現させることを可能にする。あるいは、このＤＮＡは、非サプレッサー株から単離され得、次いで、同じ効果を達成するようにサプレッサー株に導入され得る。

【０２６９】

表面発現ライブラリーは、標準的アフィニティー単離手順により予め選択された分子を結合する特異的Ｆａｂフラグメントについてスクリーニングされる。このような方法としては、例えば、パニング（ＰａｒｍｌｅｙおよびＳｍｉｔｈ、１９８８；本明細書中に参考として援用される）、アフィニティークロマトグラフィーおよび固相ブロッティング手順が挙げられる。パニングは、高力価のファージが容易に、迅速かつ少容量でスクリーニングされ得るので好ましい。さらに、この手順は、集団内の微量なＦａｂフラグメント種を選択し得る。この微量のフラグメント種は、他の方法では検出不能であり、そして実質的に均質な集団にまで増殖されない。選択されたＦａｂフラグメントは、このファージ集団の増殖後に、ポリペプチドをコードする核酸を配列決定することにより特徴づけられ得る。

【０２７０】

抗体の多様なライブラリーを作製し、所望の結合特異性についてスクリーニングするための別の方法は、米国特許第５，６６７，９８８号および同第５，７５９，８１７号（各々が、本明細書中に参考として援用される）に記載される。この方法は、免疫グロブリン可変重鎖および可変軽鎖の可変ドメインのＣＤＲ領域に縮重、ならびにファージミドの表面での変異誘発したポリペプチドのディスプレイを組み込むために、縮重オリゴヌクレオチドおよびプライマー伸長反応を用いるファージミドライブラリーの形態での、ヘテロダイマーの免疫グロブリン分子のライブラリーの調製を包含する。それ以降、ディスプレイタンパク質は、予め選択された抗原に結合する能力についてスクリーニングされる。

【０２７１】

ヘテロダイマー免疫グロブリン分子を生成するための方法は、一般に、（１）目的の重鎖または軽鎖のＶ領域コード遺伝子をファージミドディスプレイベクターに導入すること；（２）無作為化された結合部位をファージミドディスプレイタンパク質ベクターへ、抗体Ｖ領域遺伝子のＣＤＲに対する相同性の領域を含み、そして無作為化したコード配列を生成するための縮重領域を含むオリゴヌクレオチドでのプライマー伸長により導入して、各々がファージミド表面ディスプレイタンパク質上に提示される異なる推定結合部位を発現し得るディスプレイベクターの大きな集団を形成すること；（３）糸状ファージ粒子の表面でディスプレイタンパク質および結合部位を発現させること；ならびに（４）アフィニティー技術（例えば、予め選択された抗原に対するファージ粒子のパニング）を用いて表面発現したファージ粒子を単離（スクリーニング）し、このことによって、予め選択された抗原に結合する結合部位を含むディスプレイタンパク質を含む１種以上のファージミドを単離することを包含する。

【０２７２】

抗体の多様なライブラリーを作製し、そして所望の結合特異性についてスクリーニングするためのこの方法のさらなるバリエーションは、米国特許第５，７０２，８９２号（本明細書中に参考として援用される）に記載される。この方法においては、重鎖配列のみが用いられ、この重鎖配列は、ＣＤＲＩ超可変領域またはＣＤＲＩＩＩ超可変領域のいずれかをコードする全てのヌクレオチド位置で無作為化され、そしてＣＤＲにおける遺伝的可変性は、任意の生物学的プロセスとは独立して生成される。

【０２７３】

この方法において、２つのライブラリーを操作して、重鎖遺伝子構造の骨格内のオリゴヌクレオチドモチーフを遺伝的にシャッフルする。ＣＤＲＩまたはＣＤＲＩＩＩのいずれかのランダム変異によって、重鎖遺伝子の超可変領域は、高度に多様な配列の収集物を生じるように再構築された。変異した遺伝子配列の収集物によりコードされる重鎖タンパク

質は、２つの免疫グロブリン鎖の一方のみを必要とするが、免疫グロブリンの結合特性の全てを有する潜在能力を保有した。

【０２７４】

詳細には、この方法は、免疫グロブリン軽鎖タンパク質の非存在下で行われる。改変した重鎖タンパク質を提示するファージライブラリーは、固定化されたリガンドとともにインキュベートされて、固定化されたリガンドに特異的に結合する組換えタンパク質をコードするクローンが選択される。次いで、結合したファージを固定化されたリガンドから解離し、そして細菌宿主細胞中での増殖により増幅させる。個々のウイルスプラーク（各々が異なる組換えタンパク質を発現する）は拡大され、次いで、個々のクローンは結合活性についてスクリーニングされ得る。

【０２７５】

（Ｅ２．ヒトリンパ球由来の抗体）

リン脂質に対する抗体は、ヒト集団において存在する。しかし、これらの抗体は、代表的には、疾患と関連し、本発明におけるそれらの使用は、好ましくは、避けられるべきである。しかし、健常な被験体由来のヒトリンパ球は、本発明における使用のための抗体を作製するための開始物質として適切であるとして使用され得る。

【０２７６】

インビトロ免疫、または抗原刺激をまた使用して、ヒト抗体を生成し得る。このような技術を使用して、正常な健全な被験体由来の末梢血リンパ球を単にインビトロにおいて陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質で抗体産生細胞を刺激することにより刺激し得る。

【０２７７】

このような「インビトロ免疫」は、一般的に、リンパ球の混合集団（混合リンパ球培養物、ＭＬＣ）中での非免疫Ｂリンパ球の抗原特異的活性化を含む。インビトロ免疫はまた、Ｂ細胞増殖因子およびＢ細胞分化因子ならびにリンホカインにより支持され得る。これらの方法により産生される抗体は、しばしば、ＩｇＭ抗体である（Ｂｏｒｒｅｂａｅｃｋら、１９８６；本明細書中に参考として援用される）。

【０２７８】

別の方法が記載され（米国特許第５，６８１，７２９号、本明細書中に参考として援用される）、ここで、主にＩｇＧ（またはＩｇＡ）抗体を産生するヒトリンパ球が得られ得る。この方法は、一般的な意味において、免疫不全動物へヒトリンパ球を移植し、その結果、ヒトリンパ球が動物の身体内に「取りこまれ」；抗原に特異的な抗体を産生するヒトリンパ球を生成するように所望の抗原を用いて動物を免疫し；そして動物から抗体を産生するヒトリンパ球を回収する工程を包含する。従って、産生されたヒトリンパ球を使用して、抗体を産生するヒトリンパ球を不死化し、抗体を産生する得られた不死化ヒト起源リンパ球をクローニングし、そしてクローニングされた不死化ヒト起源リンパ球から所望の抗原に特異的なモノクローナル抗体を回収することによりモノクローナル抗体を産生し得る。

【０２７９】

この技術において使用され得る免疫不全動物は、動物にヒトリンパ球が移植された場合に拒絶を示さない免疫不全動物である。このような動物は、物理的、化学的、または生物学的な処置により人工的に調製され得る。任意の免疫不全動物が使用され得る。ヒトリンパ球は、ヒト末梢血、脾臓、リンパ節、扁桃腺などから得られ得る。

【０２８０】

動物における移植されたヒトリンパ球の「取りこみ」は、単に動物にヒトリンパ球を投与することにより達成され得る。投与経路は制限されず、そして例えば、皮下、静脈内、または腹腔内であり得る。ヒトリンパ球の用量は制限されず、そして通常は、動物あたり10^6～10^8のリンパ球であり得る。次いで、免疫不全動物は、所望の抗原で免疫される。

【０２８１】

免疫後、ヒトリンパ球が、任意の慣習的な方法により、血液、脾臓、リンパ節または他のリンパ組織から回収される。例えば、単核細胞は、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｈｙｐａｑｕｅ（比重：１．０７７）遠心法により分離され得、そしてプラスチックディッシュ吸着法により単球が回収され得る。免疫不全動物由来の夾雑細胞は、動物細胞に特異的な抗血清を用いることにより取り除かれ得る。抗血清は、例えば、免疫不全動物の脾臓細胞で第２の異なる動物を免疫し、そして異なる免疫動物から血清を回収することにより得られ得る。抗血清での処置は、任意の段階で実施され得る。ヒトリンパ球はまた、マーカーとして、細胞表面上で発現されるヒト免疫グロブリンを使用する免疫学的方法により回収され得る。

【０２８２】

これらの方法により、一つ以上の選択された陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に特異的なＩｇＧ抗体およびＩｇＡ抗体を主に産生するヒトリンパ球が得られ得る。次いで、モノクローナル抗体が、不死化、選択、細胞増殖、および抗体産生によりヒトリンパ球から得られる。

【０２８３】

（Ｅ３．ヒト抗体ライブラリーを含有するトランスジェニックマウス）

組換え技術は、今や抗体の調製のために利用可能である。上記に開示される組換え免疫グロブリンファージ発現ライブラリーに加えて、別の分子クローニングアプローチは、抗体をヒト抗体ライブラリーを含有するトランスジェニックマウスから調製することである。このような技術は、米国特許第５，５４５，８０７号に記載され、これは、本明細書に参考として援用される。

【０２８４】

最も一般的な意味において、これらの方法は、その生殖系統に、ヒト起源の免疫グロブリンの少なくとも一部をコードする遺伝子材料か、または免疫グロブリンのレパートリーをコードするように再編成され得る遺伝子材料を挿入したトランスジェニック動物の産生を包含する。挿入された遺伝子材料は、ヒト供給源から産生され得るか、または合成により産生され得る。その材料は、公知の免疫グロブリンの少なくとも一部をコードし得るか、または改変された免疫グロブリンの少なくとも一部をコードするように改変され得る。

【０２８５】

挿入された遺伝子材料は、トランスジェニック動物において発現され、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子材料に少なくとも部分的に由来する免疫グロブリンを産生する。その遺伝子材料は、たとえ、その挿入された遺伝子材料が、生殖系列の誤った位置に、または誤った相対位置に組み込まれたとしても、その一部が挿入された遺伝子材料に由来する免疫グロブリンのレパートリーが、産生され得るように、トランスジェニック動物において再編成されることが見出される。

【０２８６】

その挿入された遺伝子材料は、プラスミドおよび／またはコスミドのような原核生物ベクターにクローン化されたＤＮＡの形態であり得る。より大きなＤＮＡフラグメントは、酵母人工染色体ベクターを使用して（Ｂｕｒｋｅら、１９８７；本明細書中に参考として援用される）、または染色体フラグメントを導入することにより（ＲｉｃｈｅｒおよびＬｏ、１９８９；本明細書中に参考として援用される）挿入される。その挿入された遺伝子材料は、従来の様式で宿主に（例えば、注入によって、または他の手順によって、受精卵または胚性幹細胞に）導入され得る。

【０２８７】

好ましい局面において、得られるトランスジェニック動物が、免疫グロブリンを産生するときに、挿入されたヒト遺伝子材料のみを使用するように、免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子材料をはじめから保有しない宿主動物が利用される。これは、関連する遺伝子材料を欠失する天然に存在する変異体宿主を使用して、または人工的に、例えば、細胞株で、関連する遺伝子材料が除去されている宿主を究極的に作製するために、変異体を作製することによってのいずれかで、達成され得る。

【０２８８】

宿主動物が免疫グロブリン定常領域をコードする遺伝子材料を保有する場合、トランスジェニック動物は、天然に存在する遺伝子材料および挿入された遺伝子材料を保有し、そして天然に存在する遺伝子材料、挿入された遺伝子材料、および両方のタイプの遺伝子材料の混合物に由来する免疫グロブリンを産生する。この場合、その所望の免疫グロブリンは、トランスジェニック動物に由来するハイブリドーマを、例えば、抗体遺伝子発現の対立遺伝子排除の現象または示差的染色体損失を利用して、スクリーニングすることによって得られ得る。

【０２８９】

一旦適切なトランスジェニック動物が調製されると、その動物は、所望の免疫原で単に免疫される。挿入される材料の性質に依存して、その動物は、外来起源のその遺伝子材料が、免疫グロブリンの一部のみをコードする場合、例えば、混合されたマウス／ヒト起源のキメラ免疫グロブリンを産生し得る；または、その動物は、外来起源の遺伝子材料が、免疫グロブリン全体をコードする場合、完全に外来の免疫グロブリン（例えば、完全にヒト起源の）を産生し得る。

【０２９０】

ポリクローナル抗血清は、免疫に続いて、トランスジェニック動物から産生され得る。免疫グロブリン産生細胞は、目的の免疫グロブリンを産生する動物から除去され得る。好ましくは、モノクローナル抗体は、トランスジェニック動物から、例えば、その動物由来の脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合し、そして得られるハイブリドーマをスクリーニングして所望の抗体を産生するものを選択することによって、産生される。このようなプロセスのための適切な技術は、本明細書に記載される。

【０２９１】

代替のアプローチにおいて、その遺伝子材料は、所望の抗体が、動物の血清のような体液、またはミルク、初乳もしくは唾液のような外部分泌液において産生されるような様式で、動物に組み込まれ得る。例えば、インビトロでヒト免疫グロブリンの少なくとも一部をコードする遺伝子材料を、ミルクタンパク質をコードする哺乳動物の遺伝子に挿入し、次いで、その遺伝子をその哺乳動物の受精卵に、例えば、注入により、導入することによって、その卵は、挿入されたヒト免疫グロブリン遺伝子材料に少なくとも部分的に由来する免疫グロブリンを含有するミルクを産生する成体雌哺乳動物に成長し得る。次いで、所望の抗体は、ミルクから回収され得る。このようなプロセスを行うための適切な技術は、当業者に公知である。

【０２９２】

上記のトランスジェニック動物は、通常、単一のアイソタイプの、より詳細にはＢ細胞成熟に必須であるアイソタイプ（例えば、ＩｇＭおよびたぶんＩｇＤ）のヒト抗体を産生するために利用される。ヒト抗体を産生するための別の好ましい方法は、米国特許第５，５４５，８０６号；同第５，５６９，８２５号；同第５，６２５，１２６号；同第５，６３３，４２５号；同第５，６１１，０１６号；および同第５，７７０，４２９号（各々が本明細書に参考として援用される）に記載される技術を使用することである。そこでは、Ｂ細胞発生のために必要とされるアイソタイプから他のアイソタイプへ変換し得るトランスジェニック動物が記載される。

【０２９３】

Ｂリンパ球の発生において、その細胞は、まず生産的に再編成されたV_HおよびV_L領域によって決定される結合特異性を有するＩｇＭを産生する。その結果、各Ｂ細胞およびその子孫細胞は、同じＬおよびＨ鎖Ｖ領域を有する抗体を合成するが、これらは、Ｈ鎖のアイソタイプを交換し得る。ミューまたはデルタ定常領域の使用は、交互のスプライシングによって大部分決定され、ＩｇＭおよびＩｇＤが、単一の細胞において同時発現されることを可能にする。他の重鎖アイソタイプ（γ、α、およびε）は、遺伝子再編成事象が、ＣミューエキソンおよびＣデルタエキソンを削除した後に、天然においてのみ発現される。この遺伝子の再編成プロセスは、アイソタイプスイッチングと呼ばれ、代表的には、各重鎖遺伝子のすぐ上流に位置する（デルタを除く）いわゆるスイッチセグメント間の組

換えによって生じる。個々のスイッチセグメントは、２ｋｂと１０ｋｂとの間の長さであり、そして主に短い反復した配列からなる。

【０２９４】

これらの理由により、導入遺伝子は、転写調節配列を、アイソタイプスイッチングに利用されるべき各スイッチ領域の約１～２ｋｂ上流内に組み込んでいることが好ましい。これらの転写調節配列は、好ましくは、プロモーターおよびエンハンサーエレメントを含み、そしてより好ましくは、スイッチ領域に天然に結合する（すなわち、生殖系統の構成において生じる）５’隣接（すなわち、上流）領域を含む。１つのスイッチ領域からの５’隣接配列は、導入遺伝子構築のために異なるスイッチ領域に作動可能に連結され得るが、いくつかの実施形態では、導入遺伝子構築物に組み込まれている各スイッチ領域は、天然に存在する生殖系統構成においてすぐ上流に存在する５’隣接領域を有することが好ましい。免疫グロブリンスイッチ領域配列に関連する配列情報は、公知である（Ｍｉｌｌｓら、１９９０；Ｓｉｄｅｒａｓら、１９８９；各々、参考として本明細書に援用される）。

【０２９５】

米国特許第５，５４５，８０６号；同第５，５６９，８２５号；第５，６２５，１２６号；第５，６３３，４２５号；第５，６６１，０１６号；および第５，７７０，４２９号に記載される方法では、トランスジェニック動物内に含まれるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、アイソタイプのスイッチングに至るＢ細胞発達の経路を通じて正確に機能する。従って、この方法では、これらの導入遺伝子は、アイソタイプスイッチングおよび以下の１つ以上を生成するように構築される：（１）高レベルおよび細胞型特異的発現、（２）機能的遺伝子再配置、（３）対立遺伝子排除の活性化および対立遺伝子排除に対する応答、（４）十分な一次レパートリーの発現、（５）シグナル伝達、（６）体細胞過剰変異、および（７）免疫応答の間の導入遺伝子抗体遺伝子座の支配。

【０２９６】

導入遺伝子機能に対する重要な要件は、広範な範囲の抗原に対する二次免疫応答の引金となるために十分に多様性である一次抗体レパートリーの生成である。再配置された重鎖遺伝子鎖は、各々がいくつかのエキソンによりコードされる、シグナルペプチドエキソン、可変領域エキソンおよび多ドメイン定常領域の領域のタンデムアレイからなる。これらの定常領域遺伝子の各々は、異なるクラスの免疫グロブリンの定常部分をコードする。Ｂ細胞発達の間に、Ｖ領域近位定常領域は欠失し、新たな重鎖クラスの発現に至る。各重鎖クラスについて、ＲＮＡスプライシングの選択的パターンが、膜貫通免疫グロブリンおよび分泌された免疫グロブリンの両方を生じる。

【０２９７】

ヒト重鎖遺伝子座は、２Ｍｂにまたがるほぼ２００Ｖ遺伝子セグメント、約４０ｋｂにまたがるほぼ３０Ｄ遺伝子セグメント、３ｋｂ内のクラスターである６つのＪセグメント、およびほぼ３００ｋｂにわたって広がる９つの定常領域遺伝子セグメントからなる。全長遺伝子座は、第１４染色体の長腕の遠位部分のほぼ２．５Ｍｂにまたがる。６つの公知のV_Hファミリーのすべてのメンバー、ＤおよびＪ遺伝子セグメント、ならびにμ、δ、γ３、γ１およびα１定常領域を含む重鎖導入遺伝子フラグメントは公知である（Ｂｅｒｍａｎら、１９８８；参考として本明細書に援用される）。すべての必要な遺伝子セグメントおよびヒト軽鎖遺伝子座からの調節配列を含むゲノムフラグメントもまた同様に構築される。

【０２９８】

首尾良く再配置された免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子の発現は、通常、トランスジェニック非ヒト動物において内因性免疫グロブリン遺伝子の再配置を抑制することによって優性効果を有する。しかし、特定の実施形態では、例えば、導入遺伝子と内因性Ｉｇ配列との間のトランススイッチングにより、ヒト可変領域および非ヒト（例えばマウス）定常領域を含むハイブリッド免疫グロブリン鎖が形成され得ないように、内因性Ｉｇ遺伝子座の完全不活性化を行うことが所望される。胚性幹細胞技術および相同的組換えを用い、内因性免疫グロブリンレパートリーを容易に排除し得る。さらに、内因性Ｉｇ遺伝

子の抑制は、アンチセンス技法のような種々の技法を用いて達成され得る。

【０２９９】

本発明の他の局面では、トランススイッチされた免疫グロブリンを生成することが所望され得る。このようなキメラトランススイッチ免疫グロブリンを含む抗体は、例えば、宿主細胞においてエフェクター機能の保持のために、非ヒト（例えばマウス）定常領域を有することが所望される種々の適用のために用いられ得る。マウス定常領域の存在は、ヒト定常領域に比べ、例えば、このようなキメラ抗体がマウス疾患モデルにおいて試験され得るように、マウスエフェクター機能（例えば、ＡＤＣＣ、マウス補体固定化）を提供するという利点を与え得る。動物試験の次に、ヒト可変領域コード配列が、例えば、ＰＣＲ[TM]増幅または供給源（ハイブリドーマクローン）からのｃＤＮＡクローニングにより単離され、そしてヒト治療使用により適切なヒト配列抗体をコードするための所望のヒト定常領域をコードする配列にスプライスされ得る。

【０３００】

（Ｅ４．ヒト化抗体）

一般に、ヒト抗体は、ヒト治療における使用に少なくとも３つの可能な利点を有する。第１に、そのエフェクター部分はヒトであるので、例えば、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）または抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）によって標的細胞をより効率的に破壊するために、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用し得る。第２に、ヒト免疫系は、異物として抗体を認識しない。第３に、ヒト循環中の半減期は、天然に存在するヒト抗体と類似であり、より少なくかつより少ない用量を与えることを可能にする。

【０３０１】

ヒト抗体を調製する種々の方法が本明細書中に提供される。ヒト抗体に加えて、「ヒト化」抗体は多くの利点を有する。「ヒト化」抗体は、一般に、ヒト定常および／または可変領域ドメインまたは特定の変更を保持する、マウス、ラット、ハムスター、ウサギまたはその他の種からのキメラまたは変異体モノクローナル抗体である。いわゆる「ヒト化」抗体を生成するための技法は、当業者に周知である。

【０３０２】

ヒト化抗体もまた、先行する利点を共有する。第１に、エフェクター部分はなおヒトである。第２に、ヒト免疫系は、フレームワークまたは定常領域を異物として認識せず、そしてそれ故、このような注入抗体に対する抗体応答は、完全に異物であるマウス抗体に対してより少ない。第３に、注入されたヒト化抗体は、注入されたマウス抗体とは反対に、天然に存在するヒト抗体により類似する半減期を有し、またより少なくかつより少ない頻度の用量を与える。

【０３０３】

ヒト化抗体を産生する多くの方法が記載されている。新たな人工タンパク質分子または「キメラ」抗体を形成するための、タンパク質ジスルフィド結合を通じて連結される抗体ドメインの制御された再配置が利用され得る（Ｋｏｎｉｅｃｚｎｙら、１９８１；本明細書中に参考として援用される）。組換えＤＮＡ技術もまた、マウス抗体可変軽鎖および重鎖ドメインと、ヒト抗体軽鎖および重鎖定常ドメインとをコードするＤＮＡ配列間の遺伝子融合を構築するために用いられ得る（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、１９８４；本明細書中に参考として援用される）。

【０３０４】

マウスモノクローナル抗体の抗原結合部分または相補性決定領域（ＣＤＲ）をコードするＤＮＡ配列を、ヒト抗体重鎖および軽鎖のフレームワークをコードするＤＮＡ配列中に分子手段により挿入し得る（Ｊｏｎｅｓら、１９８６；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、１９８８）。発現された組換え産物は、「新形態」またはヒト化抗体と呼ばれ、そしてヒト抗体軽鎖または重鎖およびマウスモノクローナル抗体の抗原認識部分であるＣＤＲのフレームワークを含む。

【０３０５】

ヒト化抗体を生成する別の方法が、米国特許第５，６３９，６４１号に記載され、本明

細書中に参考として援用される。この方法は、再現により、可変領域においてヒト表面の提示に起因する改良された治療効力を有するヒト化げっ歯類抗体を提供する。この方法では：（１）抗体重鎖および軽鎖可変領域のプールの位置アラインメントを生成し、重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露位置のセットを与える。ここで、すべての可変領域に対するアラインメント位置は、少なくとも約９８％同一である；（２）重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットがげっ歯類抗体（またはそのフラグメント）に対して規定される；（３）このげっ歯類表面曝露アミノ酸残基のセットに最も近接して同一である、重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットが同定される；（４）工程（２）で規定された重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットが、げっ歯類抗体の相補性決定領域の任意の残基の任意の原子の５Å内にあるようなアミノ酸残基を除いて、工程（３）で同定された重鎖および軽鎖可変領域フレームワーク表面曝露アミノ酸残基のセットで置換される；および（５）結合特異性を有するヒト化げっ歯類抗体が産生される。

【０３０６】

ヒト化抗体の産生についての類似の方法は、米国特許第５，６９３，７６２号；同第５，６９３，７６１号；同第５，５８５，０８９号；および同第５，５３０，１０１号（各々が本明細書中で参考として援用される）に記載される。これらの方法は、１以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）およびドナー免疫グロブリンに由来するさらなるアミノ酸ならびに受け入れているヒト化免疫グロブリンに由来するフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリンを産生することを包含する。各々のヒト化免疫グロブリン鎖は、通常、ＣＤＲに加えて、ドナー免疫グロブリン中のＣＤＲに直接隣接する１以上のアミノ酸または分子モデリングにより推定される約３Å以内の１以上のアミノ酸のような、ＣＤＲと相互作用して結合親和性をもたらし得るドナー免疫グロブリンフレームワークに由来するアミノ酸を含む。重鎖および軽鎖は、米国特許第５，６９３，７６２号；同第５，６９３，７６１号；同第５，５８５，０８９号；および同第５，５３０，１０１号（各々が本明細書中で参考として援用される）に記載される種々の位置基準の、いずれか１つ、任意の組合せ、または全てを使用することによって、各々設計され得る。インタクトな抗体に組み合わされる場合、ヒト化免疫グロブリンは、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして本来の抗原に対するドナー免疫グロブリンと実質的に同じ親和性を保持する。

【０３０７】

ヒト化抗体を産生するためのさらなる方法は、米国特許第５，５６５，３３２号および同第５，７３３，７４３号（各々が本明細書中で参考として援用される）に記載される。この方法は、抗体をヒト化する概念を、本明細書中にもまた詳細に記載されるファージミドライブラリーと組み合わせる。一般的な意味では、この方法は、目的の抗原に対する抗体または抗体の集団の抗原結合部位に由来する配列を利用する。従って、単一のげっ歯類抗体について、抗体の抗原結合部位の部分を含む配列は、組み合せて完全な抗原結合部位を作製し得るヒト抗体の配列の多様なレパートリーと組み合せられ得る。

【０３０８】

このプロセスにより作製される抗原結合部位は、本来のげっ歯類抗体の配列の部分のみが同様の様式にて抗原と接触するようであるという点で、ＣＤＲグラフティング（ｇｒａｆｔｉｎｇ）により作製される抗原結合部位とは異なる。選択されたヒト配列は、配列において異なるようであり、そして本来の結合部位のそれらからの抗原と代替的に接触する。しかし、抗原に対する本来の配列の部分の結合ならびに抗原およびその抗原結合部位の形状により課される制約は、抗原の同じ領域またはエピトープに対するヒト配列の新たな接触を駆動するようである。従って、このプロセスは、「エピトープインプリント選択」（ＥＩＳ）と呼ばれている。

【０３０９】

動物の抗体で開始して、１つのプロセスは、部分的にヒト抗体である抗体の選択を生じる。このような抗体は、治療において直接的にまたは少数の重要な残基の変更の後に使用されるべきヒト抗体と配列において十分に類似し得る。ヒト配列を有する選択された抗体

のげっ歯類成分の間の配列の差異は、例えば、個々の残基の部位特異的変異誘発によってか、またはループ全体のＣＤＲグラフティングによって、ヒト配列の残基で異なる残基を置換することによって最小化され得る。しかし、完全なヒト配列を有する抗体もまた、作製され得る。従って、ＥＩＳは、それぞれ、動物または部分的なヒト抗体と同じエピトープに結合する部分的なヒト抗体またはそれぞれ、動物または部分的なヒト抗体と同じエピトープに結合する完全なヒト抗体を作成するための方法を提供する。ＥＩＳにおいて、抗体フラグメントのレパートリーは、糸状ファージの表面上に提示され得、そして抗原結合活性を有するフラグメントをコードする遺伝子は、抗原へのファージの結合によって選択され得る。

【０３１０】

本発明の使用に意図される抗体をヒト化するためのさらなる方法は、米国特許第５，７５０，０７８号；同第５，５０２，１６７号；同第５，７０５，１５４号；同第５，７７０，４０３号；同第５，６９８，４１７号；同第５，６９３，４９３号；同第５，５５８，８６４号；同第４，９３５，４９６号；および同第４，８１６，５６７号（各々は、本明細書中で参考として援用される）に記載される。

【０３１１】

（Ｅ５．ＰＣＲ^{TM}による変異誘発）

部位特異的変異誘発は、基礎となるＤＮＡの特異的な変異誘発を通して、個々の抗体の調製において有用な技術である。この技術はさらに、ヒト化しようとしなかろうと、ＤＮＡ内に１以上のヌクレオチド配列の変化を導入することによって、１以上の前述の考慮を援用して、配列改変体を調製および試験するすばやい能力を提供する。

【０３１２】

多くの方法が、変異誘発における使用について適切であるが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ^{TM}）の使用は、一般的に現在好ましい。この技術は、所定のＤＮＡ配列中に所望の変異を導入するための迅速かつ効率的な方法を提供する。以下のテキストは、所定の配列によってコードされるアミノ酸を変えるために使用され得るような、配列中に点変異を導入するＰＣＲ^{TM}の使用を特に記載する。この方法の適応もまた、ＤＮＡ分子中に制限酵素部位を導入するために適切である。

【０３１３】

この方法において、合成オリゴヌクレオチドは、増幅したセグメントの一方の端に点変異を組み込むために設計される。ＰＣＲ^{TM}の後に、増幅したフラグメントは、クレノーフラグメントで処理することによって、平滑末端にされ、次いで、この平滑末端フラグメントは、配列分析を容易にするためにベクター中に連結され、そしてサブクローニングされる。

【０３１４】

変異誘発することを所望するテンプレートのＤＮＡを調製するために、このＤＮＡは、高コピー数のベクター（例えば、ｐＵＣ１９）中に、変異される領域に隣接する制限部位を使用して、サブクローニングされる。次いで、テンプレートのＤＮＡは、プラスミドのミニプレップを使用して調製される。親配列に基づくが、所望の点変異を含みかつ制限酵素部位によってその５’末端に隣接される、適切なオリゴヌクレオチドプライマーが、自動化合成機を使用して合成される。約１５塩基程度のテンプレートＤＮＡに相同なプライマーが、一般に必要とされる。プライマーは、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって精製され得るが、これは、ＰＣＲ^{TM}の使用について絶対に必要ではない。次いで、このオリゴヌクレオチドの５’末端は、リン酸化されるべきである。

【０３１５】

このテンプレートＤＮＡは、所望の点変異を含むオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、ＰＣＲ^{TM}によって増幅されるべきである。増幅緩衝液中の$MgCl_2$の濃度は、一般に約１５ｍＭである。一般に、約２０～２５サイクルのＰＣＲ^{TM}が、以下の通りに実行されるべきである：９５℃にて３５秒の変性；５０℃にて２分のハイブリダイゼーション；および７２℃にて２分の伸長。ＰＣＲ^{TM}は、一般に、７２℃での約１０分間の最

後のサイクルの伸長を含む。最後の伸長工程の後に、約５ユニットのクレノーフラグメントが、反応混合物に添加され、約３０℃にてさらに１５分間インキュベートされるべきである。クレノーフラグメントのエキソヌクレアーゼ活性は、末端を平らにし、そして平滑末端クローニングに適切にするために必要とされる。

【０３１６】

得られた反応混合物は、一般に、この増幅が推定される産物を生じたことを確認するために、非変性アガロースまたはアクリルアミドゲル電気泳動によって分析されるべきである。次いで、大部分のミネラルオイルを除去し、クロロホルムで抽出して残っているオイルを除去し、緩衝化フェノールで抽出し、次いで１００％エタノールを用いる沈澱により濃縮することによって、反応混合物を処理する。次に、このオリゴヌクレオチドに使用された隣接配列で切断する制限酵素を用いて増幅したフラグメントのおよそ半分を消化するべきである。この消化したフラグメントは、低ゲル化／融点アガロースゲル上にて精製される。

【０３１７】

このフラグメントをサブクローニングするため、そして点変異を調べるために、平滑末端のライゲーションによって、適切に消化されたベクター中に２つの増幅したフラグメントをサブクローニングする。これは、ミニプレップを使用して、プラスミドＤＮＡが引き続き調製され得るＥ．ｃｏｌｉを形質転換するために使用される。次いで、プラスミドＤＮＡの増幅した部分は、正確な点変異が作製されたことを確認するためにＤＮＡ配列決定によって分析される。Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼは、ＤＮＡフラグメント中にさらなる点変異を導入するので、これは、重要である。

【０３１８】

点変異の導入はまた、一連のＰＣＲ^{TM}工程を使用してもたらされ得る。この手順において、この変異を含む２つのフラグメントは、互いにアニールされ、そして相互に開始する合成によって伸長される。次いで、このフラグメントは、第２のＰＣＲ^{TM}工程によって増幅され、それによって上記のプロトコルに必要とされる平滑末端のライゲーションを回避する。この方法において、テンプレートＤＮＡの調製、オリゴヌクレオチドプライマーの作製および第１のＰＣＲ^{TM}増幅は、上記のように実行される。しかし、このプロセスにおいて、選択されたオリゴヌクレオチドは、約１５～約２０個の間の塩基のストレッチについてテンプレートＤＮＡと相同なはずであり、そしてまた約１０塩基以上だけで互いに重複しなければならない。

【０３１９】

第２のＰＣＲ^{TM}増幅において、上記の条件を使用して、各々の増幅したフラグメントおよび各々の隣接する配列プライマーを使用して、そして約２０～約２５の間のサイクルについてＰＣＲ^{TM}を実行する。再度、このフラグメントをサブクローニングし、そして上記に概説した工程を使用して点変異が正確であったことを調べる。

【０３２０】

前述の方法のいずれかを使用して、可能な限り小さなフラグメントを増幅することによって、変異を導入することが、一般に好ましい。もちろん、パラメータ（例えば、ＧＣ含量およびこのオリゴの長さによって一般に影響される、オリゴヌクレオチドの融解温度）はまた、注意深く考慮されるべきである。これらの方法の実行、および必要な場合、それらの最適化は、当業者に公知であり、そして本明細書中に参考として援用される、種々の刊行物（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、１９９５）にさらに記載される。

【０３２１】

部位特異的変異誘発を実行する場合に、表Ａは、参考として用いられ得る。

【０３２２】

【化１】

表 A

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
トレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

（Ｅ６．抗体フラグメントおよび誘導体）

元々の陰イオン性リン脂質またはアミノリン脂質に対する抗体の供給源とは無関係に、インタクトな抗体、抗体マルチマー、または抗体の種々の機能的な抗原結合領域のいずれか１つは、本発明において使用され得る。例示的な機能領域は、抗体のｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを含む。このような構築物を調製するための技術は、当業者に周知であり、そして本明細書中にてさらに例示される。

【０３２３】

抗体構築物の選択は、種々の因子によって影響され得る。例えば、延長した半減期は、腎臓内のインタクトな抗体の能動的な再吸収（免疫グロブリンのＦｃ片の特性）から生じ得る。従って、ＩｇＧベースの抗体は、それらのＦａｂ’対応物よりも遅い血中クリアランスを示すことが予測される。しかし、Ｆａｂ’フラグメントベースの組成物は、一般に、より良好な組織浸透能力を示す。

【０３２４】

抗体フラグメントは、非特異的チオールプロテアーゼであるパパインによる免疫グロブリン全体のタンパク質分解によって得られ得る。パパイン消化により、２つの同一の抗原

結合フラグメント（「Ｆａｂフラグメント」および残りの「Ｆｃフラグメント」と呼ばれ、Ｆａｂフラグメントは、各々が単一の抗原結合部位を有する）が得られる。

【０３２５】

パパインはまず、活性部位中のスルフヒドリル基を、システイン、２－メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールで還元することによって活性化されなければならない。ストック酵素中の重金属は、最大の酵素活性を補償するために、ＥＤＴＡ（２ｍＭ）でのキレート化によって除去されるべきである。酵素および基質は、通常、１：１００の重量比で一緒に混合される。インキュベーションの後に、この反応は、ヨードアセトアミドを用いるチオール基の不可逆的なアルキル化によってか、または単純に透析によって停止され得る。この消化の終了は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによってモニターされ、そして種々の画分は、プロテインＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅまたはイオン交換クロマトグラフィーによって分離されるべきである。

【０３２６】

ウサギおよびヒト起源のＩｇＧからのＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントの調製のための通常の手順は、酵素のペプシンによる限定されたタンパク質分解である。この条件（１００×抗体過剰ｗ／ｗ酢酸緩衝液中ｐＨ４．５、３７℃）は、抗体が重鎖内のジスルフィド結合のＣ末端側にて切断されることを示唆する。マウスＩｇＧの消化の速度は、サブクラスで変動し得、いくらかの未消化または完全に消化したＩｇＧなしで、活性Ｆ（ａｂ’）$_2$の高収率を得ることは、困難であり得る。特に、ＩｇＧ$_{2b}$は、完全な分解を受けやすい。他のサブクラスは、最適な結果を生じるために異なるインキュベーション条件（これらの全ては、当該分野で公知である）を必要とする。

【０３２７】

インタクトな抗体のペプシン処理により、２つの抗原結合部位を有するＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントが得られ、そしてなお抗原を架橋し得る。ペプシンによるラットＩｇＧの消化は、０．１Ｍ　酢酸緩衝液、ｐＨ４．５、中での透析、次いで１％　ｗ／ｗペプシンを用いる４時間のインキュベーションを含む条件を必要とする；ＩｇＧ$_1$およびＩｇＧ$_{2a}$消化は、初めに４℃で１６時間の０．１Ｍホルメート緩衝液、ｐＨ２．８、続いて酢酸緩衝液に対して透析される場合に、改善される。ＩｇＧ$_{2b}$は、０．１Ｍリン酸緩衝液、ｐＨ７．８中のｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　Ｖ８　プロテアーゼ（３％ｗ／ｗ）における３７℃で４時間のインキュベーションでより一貫した結果を生じる。

【０３２８】

Ｆａｂフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）を含む。Ｆａｂ’フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の１以上のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシル末端でのいくつかの残基の付加によって、Ｆａｂフラグメントと異なる。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体フラグメントは、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、本来生成された。抗体フラグメントの他の化学的カップリングは公知である。

【０３２９】

「Ｆｖ」フラグメントは、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む最小の抗体フラグメントである。この領域は、密接した共有結合（ｃｏｎ－ｃｏｖａｌｅｎｔ　ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ）した１つの重鎖可変ドメインと１つの軽鎖可変ドメインとのダイマーから構成される。各可変ドメインの３つの超可変領域が、V_H－V_Lダイマーの表面上の抗原結合部位を規定するように相互作用することは、この構成内にある。集合的に、６つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な３つの超可変領域のみを含むＦｖの半分）でさえ、全結合部位よりも低い親和力であるが、抗原を認識しかつ結合する能力を有する。

【０３３０】

「単鎖Ｆｖ」または「ｓＦｖ」抗体フラグメント（ここで、「単鎖」としても公知）は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、ここでこれらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、Ｆｖポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間のポ

リペプチドリンカーをさらに含み、これはｓＦｖが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。

【０３３１】

以下の特許は、抗体の機能的な抗原結合領域（抗体のｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ’、ＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを含む）の調製および使用に関する本教示をなおさらに補足する目的のために、本明細書中に参考として具体的に援用される：米国特許第５，８５５，８６６号；同第５，８７７，２８９号；同第５，９６５，１３２号；同第６，０９３，３９９号；同第６，２６１，５３５号；および同第６，００４，５５５号。ＷＯ９８／４５３３１もまた、抗体の可変領域、超可変領域、および相補性決定（ＣＤＲ）領域の調製をなおさらに記載および教示することを含む目的のために、本明細書中に参考として援用される。さらに、本発明の範囲内のｓｃＦｖ構築物の首尾良い産生は、実施例ＸＩＶに詳細に記載される。

【０３３２】

「ｄｉａｂｏｄｙ」は、２つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントであり、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖（V_H－V_L）において軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上で２つのドメインの間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることによって、これらのドメインは、別の鎖の相補ドメインと対を形成することを強いられ、そして２つの抗原結合部位を作製する。ｄｉａｂｏｄｙは、ＥＰ４０４，０９７およびＷＯ９３／１１１６１（各々、本明細書中に参考として具体的に援用される）に記載される。「線形抗体（ｌｉｎｅａｒ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」（これは、二特異的または一特異的であり得る）は、Ｚａｐａｔａら（１９９５）（本明細書中に参考として具体的に援用される）に記載されるように、一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデム型Ｆｄセグメント（V_H－C_H1－V_H－C_H1）を含む。

【０３３３】

抗体のＦａｂ’フラグメントまたは抗原結合フラグメントの使用において、組織貫通に対する付帯利益と共に、その半減期を増加するようにフラグメントを改変することにより、さらなる利点を引き出し得る。種々の技術（例えば、抗体分子自身の操作または改変、およびまた不活性なキャリアへの結合）が使用され得る。薬剤を標的に送達するのではなく、半減期を増加させるただ一つの目的のために、任意の結合が注意深くアプローチされるべきであり、その際にＦａｂ’および他のフラグメントは、組織を貫通するように選択される。それでもなお、非タンパク質ポリマー（例えば、ＰＥＧなど）への結合が意図される。

【０３３４】

従って、結合ではなく改変は、抗体フラグメントをより安定にし、そして／または身体における異化作用の速度を減少させるように、抗体フラグメントの構造を改変することに基づく。このような改変の１つのメカニズムは、Ｌ－アミノ酸の代わりのＤ－アミノ酸の使用である。このような改変の導入は、得られた分子がなお所望の生物学的特性を保持していることを確実にするために、得られた分子の厳密な試験を次に必要とすることを当業者は理解する。さらなる安定化改変は、Ｎ末端もしくはＣ末端のいずれか、またはその両方への、安定化部分の付加の使用を含み、これは、一般的には生物学的分子の半減期を延ばすために使用される。例示のみの目的で、アシル化またはアミノ化によって末端を改変することを所望し得る。

【０３３５】

本発明と共に使用するための適度な結合型改変は、サルベージレセプター結合エピトープを抗体フラグメントに組み込む工程を包含する。これを達成するための技術としては、抗体フラグメントの適切な領域の変異、または抗体フラグメントに付着するペプチドタグとしてのエピトープの組み込みが挙げられる。ＷＯ９６／３２４７８は、このような技術をさらに説明する目的のために、本明細書中に参考として具体的に援用される。サルベージレセプター結合エピトープは、代表的には、抗体フラグメントの類似の位置に移される

Ｆｃドメインの１つまたは２つのラップ（ｌｏｐ）由来の３つ以上のアミノ酸の領域である。ＷＯ９８／４５３３１のサルベージレセプター結合エピトープは、本発明と共に使用するために、本明細書中に参考として援用される。

【０３３６】

（Ｆ．陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合する免疫複合体）

本発明者らは、以前に、腫瘍脈管構造を標的化する際に使用するためのアミノリン脂質に結合するある範囲の免疫複合体を開発した（米国特許第６，３１２，６９４号、本明細書中において具体的に援用される）。これらの因子は、腫瘍および腫瘍内脈管構造に結合した治療剤を送達するために、アミノリン脂質結合タンパク質（例えば、アネキシンおよびキニノゲン）、およびアミノリン脂質に対する抗体（例えば、ＰＳおよびＰＥ）を使用する。本発明は、ここで、改善された特性を有する選択された抗ＰＳ抗体（例えば、３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）および９Ｄ２）を提供し、これらおよび競合する抗体は、ここでまた、免疫結合体の抗体部分として使用され得る。

【０３３７】

アミノリン脂質に結合する脈管標的因子の使用（米国特許第６，３１２，６９４号）に加えて、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質が安定でありそして標的化可能な実体であるという本発明の発見は、ある範囲の新たな腫瘍脈管標的化因子の使用を提供する。新規化合物（アミノリン脂質に関する先の研究において提案されていない）は、腫瘍および腫瘍内脈管構造においてアップレギュレートされる陰イオン性リン脂質に、毒素、サイトカイン、凝固剤および他の治療剤を送達するための陰イオン性リン脂質に対する抗体を使用する。裸の抗体に関して上に詳述されるように、本発明のこれらの局面の開発は、異なるリン脂質、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する優れた特異性を有する生物学的ツール（特に抗体）の作製を必要とした。

【０３３８】

本発明が陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質（例えば、ＰＳ、ＰＥ、ＰＩ、ＰＡおよびＰＧ、最も具体的には、ＰＳおよびＰＥ）が、安全で、抗ウイルス治療に有効な標的であることを示しているので、これらの成分（特にＰＳおよびＰＤ）に結合するペプチドは、ここで、ある範囲の公知の抗ウイルス剤に有利に結合し得る。これらの抗ウイルス結合体は、ペプチドベースの結合体および抗体ベースの結合体の両方を含み、これらの後者は、抗ウイルス免疫結合体または「イムノビロシド（ｉｍｍｕｎｏｖｉｒｏｃｉｄｅ）」と呼ばれ得る。

【０３３９】

本発明のこれらの局面において、陰イオン性リン脂質に対する任意の抗体が、第２世代の抗体（特に、９Ｄ２様抗体および３Ｇ４様抗体）を用いて、免疫結合体、免疫毒素またはコアグリガンド（ｃｏａｇｕｌｉｇａｎｄ）を調製するために使用され得、それらの有利な陰イオン性リン脂質結合プロフィールが好ましい。このような免疫結合体において使用するための因子としては、好ましくは、抗細胞因子または細胞毒性因子、凝固剤（凝固因子）、サイトカイン、放射線治療剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘導剤、抗チューブリン薬物および抗ウイルス剤（およびＰＥ結合ペプチド（例えば、本明細書中に詳細に開示されるような、デュラマイシン（ｄｕｒａｍｙｃｉｎ）誘導体）が挙げられる。抗ウイルス免疫結合体において、本明細書中に開示されるような第２世代の抗体を使用するための要件はないが、これらが特に使用され得る。アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対する任意の抗体が、このように、抗ウイルス剤に連結されて、本発明に従って、抗ウイルス免疫結合体またはイムノビロシドを形成し得る。

【０３４０】

（Ｆ１．毒素および抗細胞性薬剤）

特定の適用のために、治療剤は、内皮細胞の増殖または細胞分裂を消失または抑制する能力を有する、細胞傷害性薬剤または薬理学的薬剤、特に細胞傷害性薬剤、細胞分裂抑制剤か、そうでなければ抗細胞性薬剤（特に、腫瘍内皮細胞または腫瘍細胞に対する）である。一般に、本発明のこれらの局面は、陰イオン性リン脂質（好ましくは、９Ｄ２ベース

の抗体または３Ｇ４ベースの抗体）に結合されて、そして標的化される内皮に活性な形態で送達され得る任意の薬理学的薬剤の使用を企図する。

【０３４１】

例示的な抗細胞性薬剤には、化学療法剤および細胞毒が挙げられる。使用され得る化学療法剤には以下が挙げられる：ホルモン（例えば、ステロイド）；代謝拮抗薬（例えば、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキセートまたはアミノプテリン）；アントラサイクリン；マイトマイシンＣ；ビンカアルカロイド類；デメコルチン；エトポシド：ミトラマイシン：抗腫瘍アルキル化剤（例えば、クロラムブシルまたはメルファラン）。他の実施形態は、サイトカインのような薬剤を含み得る。基本的には、標的化された内皮細胞の部位での血液成分への標的化、インターナリゼーション、放出および／または提示を可能にする様式で、抗体に首尾良く結合され得るか、またはそれと会合され得る限り、任意の抗細胞性薬剤が使用され得る。

【０３４２】

例えば、標的抗原が、毒性化合物による効率的な中毒と一致する経路によってインターナライズしない場合、化学療法剤（例えば、抗腫瘍薬物、サイトカイン、代謝拮抗薬、アルキル化剤、ホルモンなど）を標的化することが望まれる場合のような状況が存在し得る。種々の化学療法剤および他の薬理学的薬剤（ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキセート、ビンブラスチン、ネオカルチノスタチン、マクロマイシン、トレニモン（ｔｒｅｎｉｍｏｎ）およびα－アマニチンを含む）は、現在では、抗体に首尾良く結合され、そして薬理学的に機能することが示されている。

【０３４３】

他の状況において、細胞毒に基づく治療由来の任意の潜在的な副作用が、ＤＮＡ合成インヒビター（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、アドリアマイシンなど）の使用によって除去され得る。従って、これらの薬剤は、本発明における使用のための抗細胞性薬剤の好ましい例である。細胞分裂抑制剤に関して、そのような化合物は、一般に、標的細胞の天然の細胞周期を、好ましくはその細胞が細胞周期からはずされるように妨害する。例示的な細胞分裂抑制剤は含む。

【０３４４】

陰イオン性リン脂質に対する抗体（好ましくは、９Ｄ２ベースの抗体または３Ｇ４ベースの抗体）に結合体化され得る、広範な種々の細胞傷害剤が公知である。例には、いくつか例を挙げると、例として以下が挙げられる多くの有用な植物由来毒素、真菌由来毒素または細菌由来毒素が挙げられる：種々のＡ鎖毒素、特にリシンＡ鎖；リボソーム不活化タンパク質（例えば、サポリンまたはゲロニン）；α－サルシン；アスペルギリン；レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）；リボヌクレアーゼ（例えば、胎盤リボヌクレアーゼ）；ジフテリア毒素；およびｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ外毒素。

【０３４５】

毒素のうちゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）およびリシンＡ鎖の使用が好ましい。脈管形成された腫瘍の腫瘍内血管において発現するマーカーに結合するか、結合へと利用可能であるか、吸着されるかまたは局在化される免疫結合体のエフェクターまたは毒素部分としてのゲロニンの使用は、米国特許第６，０５１，２３０号（これは、本明細書中において具体的に援用される）および米国特許第６，４５１，３１２号（特に、標的化剤としてＶＥＧＦに結合したゲロニンに関する）に記載される。

【０３４６】

リシンＡ鎖に関して、さらに好ましい毒素部分は、炭水化物残基を改変または除去するように処理された毒素Ａ鎖、いわゆる脱グリコシル化Ａ鎖（ｄｇＡ）である。脱グリコシル化リシンＡ鎖は、その極度の有効性、より長い寿命のため、そして臨床等級および規模での製造に経済的に適切であるために好ましい。

【０３４７】

最も小さな分子であるが、にもかかわらず適切な生物学的応答を提供することが可能な分子を使用することは、薬理学的見地から望ましくあり得る。例えば、十分な抗細胞応答

を提供するより小さなＡ鎖ペプチドを使用することが望まれ得る。この目的のために、リシンＡ鎖は、Ｎａｇａｒａｓｅ（Ｓｉｇｍａ）による３０のＮ末端アミノ酸の除去によって「切り詰め」され得、そしてなお十分な毒素活性を保持し得ることが発見されている。所望される場合、この切り詰めされたＡ鎖は、本発明に従って結合体において使用され得ることが提案される。

【０３４８】

あるいは、毒素Ａ鎖部分への組換えＤＮＡ技術の適用は、本発明によるさらなる利益を提供することが理解され得る。生物学的に活性なリシンＡ鎖のクローニングおよび発現が達成されているという点で、現在では、より小さいまたは他の様式の改変体ペプチドであるが、にもかかわらず適切な毒素活性を示す改変体ペプチドを同定および調製することが可能である。さらに、現在では、リシンＡ鎖がクローニングされているという事実によって、部位特異的変異誘発の適用が可能であり、それを通じて、Ａ鎖由来ペプチドが容易に調製およびスクリーニングされ得、そして本発明と組み合わせての使用のためのさらなる有用な部分が得られる。

【０３４９】

（Ｆ２．サイトカイン）

サイトカインおよびケモカインは、本発明の抗体に連結するための因子の特定の例である。ある範囲のサイトカインが使用され得、これには、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３、ＴＧＦ－β、Ｍ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＴＮＦβ、ＬＡＦ、ＴＣＧＦ、ＢＣＧＦ、ＴＲＦ、ＢＡＦ、ＢＤＧ、ＭＰ、ＬＩＦ、ＯＳＭ、ＴＭＦ、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－βが挙げられる。より好ましいサイトカインとしては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮγ、単球化学誘引物質タンパク質－１（ＭＣＰ－１）、血小板由来増殖因子－ＢＢ（ＰＤＧＦ－ＢＢ）、およびＣ－反応性タンパク質（ＣＲＰ）などが挙げられる。特に好ましい例は、ＴＮＦα、ＴＮＦα誘導因子およびＩＬ－１２である。

【０３５０】

ＴＮＦαは、脈管浸透性を増加する。この因子は、本発明の抗体への結合を企図し、特に、得られる免疫結合体は、癌の処置のための併用療法において使用される。この抗体は、結合したＴＮＦαを腫瘍環境に送達し、そして腫瘍における向上した脈管浸透性により、第２の抗癌剤の腫瘍内への侵入を容易にし、従って、全体的な抗主要行かを増幅する。ｓｃＦｖ構築物は、このような実施形態における使用に特に企図される。これは、部分的に、３量体としてのＴＮＦαおよびｓｃＦＶ構築物が、容易に３量体化し得ることが理由である。

【０３５１】

例えば、ＩＬ－１２は、抗体に結合され得、そして腫瘍血管を攻撃するように、宿主の防御を変えるために使用され得る。ＩＬ－１２を使用する際、抗原結合領域のｓｃＦｖ形態は、好ましくあり得る。サイトカインＬＥＣ（肝臓発現ケモカイン、ＮＣＣ－４、ＨＣＣ－４、またはＬＭＣとしても公知）は、別の好ましい成分である（Ｇｉｏｖａｒｅｌｌｉら、２０００）。ＬＥＣは、樹状細胞、単球、Ｔ細胞、ＮＫ細胞および好中球に対した走化性であり、従って、宿主媒介抗腫瘍応答を改善し得る。

【０３５２】

（Ｆ３．凝固因子）

陰イオン性リン脂質に対する抗体、またはアミノリン脂質、または本発明の好ましい９Ｄ２抗体および３Ｇ４抗体（ＡＴＣＣ－４５４５）に基づく第２世代の抗体は、コアグリガンドを形成するために、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分に連結され得る。米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号、および同第６，０３６，９５５号が、コアグリガンドを形成するために、抗体と凝固剤の作動可能な会合をさらに記載する目的で、本明細書中において具体的に援用される。

【０３５３】

本発明の抗体は、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分に連結され、コアグリガ

ンドを形成し得る。ここで、この抗体は、凝血薬または凝固因子に直接的に連結され得るか、または凝血薬もしくは凝固因子を結合し、次いでそれらを放出する第２の結合領域に連結され得る。本明細書中で使用される用語「凝血薬」および「凝固因子」を各々使用して、適切な条件下、好ましくは特定のインビボ環境（例えば、腫瘍血管構造）に提供される場合に、凝固を直接的または間接的に刺激し得る成分をいう。

【０３５４】

好ましい凝固因子は、組織因子組成物（例えば、切り詰めされたＴＦ（ｔＴＦ）、ダイマーＴＦ分子、マルチマーＴＦ分子および変異体ＴＦ分子）である。「切り詰めされたＴＦ（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ　ＴＦ）」（ｔＴＦ）は、膜結合欠損に、この特性における変化をもたらすために十分なアミノ酸配列を除去することによってされているＴＦ構造をいう。この状況において「十分な量」とは、ＴＦ分子を膜中に進入させるか、またはＴＦタンパク質の機能的な膜結合を他の様式で媒介するに元々十分な、膜貫通アミノ酸配列の量である。従って、このような「十分な量の膜貫通配列」の除去は、リン脂質膜結合能を欠損した切り詰めされた組織因子タンパク質またはポリペプチドを生じ、その結果、このタンパク質は、実質的に、リン脂質膜に有意に結合しない可溶性タンパク質である。従って、切り詰めされたＴＦは、実質的に、標準的なＴＦアッセイにおいて第ＶＩＩ因子を第ＶＩＩａ因子に変換し得ず、そしてなお第ＶＩＩａ因子の存在下で第Ｘ因子を活性化することを含む、いわゆる触媒活性を保持する。

【０３５５】

米国特許第５，５０４，０６７号、同第６，１５６，３２１号、同第６，１３２，７２９号および同第６，１３２，７３０号は、そのような短縮された組織因子タンパク質をさらに記載する目的のために、特に本明細書中において参考として援用される。好ましくは、本発明のこれらの局面における使用のための組織因子は、一般に、タンパク質の膜貫通領域および細胞質領域（アミノ酸２２０～２６３）を欠く。しかし、切り詰めされたＴＦ分子が、２１９アミノ酸という正確な長さの分子に限定される必要はない。

【０３５６】

組織因子組成物はまた、ダイマーとして有用であり得る。任意の切り詰めされた組織因子構築物、変異された組織因子構築物、または他の組織因子構築物は、本発明における使用のためにダイマー形態で調製され得る。当業者に公知のように、このようなＴＦダイマーは、分子生物学および組換え発現の標準的な技術を使用することによって調製され得る。ここで２つのコード領域は、インフレームに調製され、そして発現ベクターから発現される。同様に、種々の化学結合技術が、ＴＦダイマーの調製と組み合わせて使用され得る。個々のＴＦモノマーは、結合の前に誘導体化され得る。すべてのこのような技術は、当業者に容易に公知である。

【０３５７】

所望される場合、組織因子ダイマーまたはマルチマーは、生物学的に放出可能な（ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ－ｒｅｌｅａｓａｂｌｅ）結合（例えば、選択的に切断可能なリンカーまたはアミノ酸配列）を介して結合され得る。例えば、腫瘍環境内で優先的に配置されるか、または活性である酵素についての切断部位を含むペプチドリンカーが意図される。そのようなペプチドリンカーの例示的な形態は、ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第ＩＸａ因子、第Ｘａ因子またはメタロプロテイナーゼ（例えば、コラーゲナーゼ、ゲラチナーゼまたはストロメライシン）によって切断されるペプチドリンカーである。

【０３５８】

特定の実施形態において、組織因子ダイマーはさらに、後にリン脂質膜と組織因子の機能的会合を（特定の所定の条件下のみであるが）強化するために、妨げられた疎水性膜挿入部分を含み得る。切り詰めされた組織因子の状況において記載される場合、疎水性膜会合配列は、一般に、それらの疎水性の性質に起因して、リン脂質環境との会合を促進するアミノ酸のストレッチである。同様に、脂肪酸は、潜在的な膜挿入部分を提供するために使用され得る。

【０３５９】

このような膜挿入配列は、それらの付着がＴＦ構築物の機能的特性を妨げない限り、ＴＦ分子のＮ末端もしくはＣ末端のいずれかに位置され得るか、または一般に膜の任意の他の点に付加され得る。妨げられた挿入部分の意義は、ＴＦ構築物が腫瘍環境に位置するまで、それは非機能性を保持し、そして疎水性付加が、接近可能になり、そしてなおさらに膜との物理的会合を促進するのを可能にすることである。再度、生物学的に放出可能な結合および選択的に切断可能な配列が、この点において特に有用であり、結合または配列のみが、腫瘍環境内の局在化および特定の酵素または他の生物活性分子への曝露の際に切断または他の様式で改変されることが意図される。

【０３６０】

他の実施形態において、ｔＴＦ構築物は、マルチマーまたはポリマーであり得る。この状況において、「ポリマー構築物」は、３以上の組織因子構築物を含む。「マルチマーＴＦ構築物またはポリマーＴＦ構築物」は、少なくとも第２および第３のＴＦ分子または誘導体に作動可能に結合された第１のＴＦ分子または誘導体を含む構築物である。マルチマーは、約３～約２０のこのようなＴＦ分子を含み得る。マルチマーまたはポリマー内の個々のＴＦ単位はまた、所望される場合、選択的に切断可能なペプチドリンカーまたは他の生物学的に放出可能な結合によって連結され得る。再度、上記に議論されたＴＦダイマーに関して、構築物は、組換え操作および発現を用いるか、または標準的な合成化学を用いるかのいずれかで容易に作製され得る。

【０３６１】

本発明の状況において有用ななおさらなるＴＦ構築物は、第ＶＩＩ因子を活性化する能力が欠損している変異体である。そのような「第ＶＩＩ因子活性化変異体」は、一般に、機能的な第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子を結合し、第Ｘ因子をタンパク質分解性に活性化するが、第ＶＩＩ因子をタンパク質分解性に活性化する能力が実質的に存在しないＴＦ変異体として本明細書中において定義されている。従って、そのような構築物は、第ＶＩＩ因子活性化活性を欠くＴＦ変異体である。

【０３６２】

そのような第ＶＩＩ因子活性化変異体が、腫瘍特異的凝固を促進する際に機能する能力は、腫瘍血管構造へのそれらの特異的送達、および血漿中における低いレベルでの第ＶＩＩａ因子の存在に基づく。そのような第ＶＩＩ因子活性化変異体標的化剤結合体の投与の際に、変異体は、血管新生化腫瘍の血管構造内に局在化される。局在化の前に、ＴＦ変異体は、一般に、第ＶＩＩ因子を第ＶＩＩａ因子に変換し得ないことに基づいて、任意の他の身体部位における凝固を促進し得ない。しかし、次いで、腫瘍領域内の局在化および蓄積の際に、変異体は、外因性の凝固経路を開始するために血漿から十分な第ＶＩＩａ因子と出会い、腫瘍特異的血栓症を導く。外因性の第ＶＩＩａ因子もまた患者に投与され得る。

【０３６３】

種々の第ＶＩＩ因子活性化変異体のうちの任意の１つ以上が調製され、本発明と組み合わせて使用され得る。第ＶＩＩ／ＶＩＩａ因子についてのＴＦ分子上の認識部位に関して、有意な量の科学知識が存在する。従って、第ＶＩＩ活性化領域が、一般にＴＦ分子のおよそアミノ酸１５７～およそアミノ酸１６７の間に位置することが理解される。しかし、この領域の外側の残基もまた、第ＶＩＩ活性化活性に関連することが判明し得、従ってＴＦ配列のおよそアミノ酸１０６～およそアミノ酸２０９に一般に位置する残基の任意の１つ以上に変異を導入することが考慮され得る（ＷＯ９４／０７５１５；ＷＯ９４／２８０１７；各々、本明細書中において参考として援用される）。

【０３６４】

米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号および同第６，０３６，９５５号に詳細に記載されるように、種々の他の凝固因子は、以下に示される薬剤によって詳述されるように、本発明と組み合わせて使用され得る。トロンビン、第Ｖ／Ｖａ因子および誘導体、第ＶＩＩＩ／ＶＩＩＩａ因子および誘導体、第ＩＸ／ＩＸａ因子および誘導体、第Ｘ／Ｘａ因子および誘導体、第ＸＩ／ＸＩａ因子お

よび誘導体、第ＸＩＩ／ＸＩＩａ因子および誘導体、第ＸＩＩＩ／ＸＩＩＩａ因子および誘導体、第Ｘ因子アクチベーターおよび第Ｖ因子アクチベーターが、本発明において使用され得る。

【０３６５】

ラッセルクサリヘビ蛇毒第Ｘ因子アクチベーターは、本発明における使用について意図される。ラッセルクサリヘビ蛇毒中に存在する第Ｘ因子アクチベーターについて特異的なモノクローナル抗体もまた産生されており、そして二重特異性結合リガンドの部分として因子を特異的に送達するために使用され得る。

【０３６６】

トロンボキサン$Ａ_2$は、血小板ミクロソーム中の酵素シクロオキシゲナーゼおよび酵素トロンボキサンシンテターゼの連続的作用によって、エンドペルオキシドから形成される。トロンボキサン$Ａ_2$は血小板によって容易に産生され、そして血小板凝集を生成するその能力が理由で強力な血管収縮薬である。トロンボキサン$Ａ_2$およびその活性なアナログは、本発明の用途のために意図される。

【０３６７】

トロンボキサンシンターゼ、および血小板活性化プロスタグランジンを合成する他の酵素もまた、本発明の状況において「凝固薬」として使用され得る。トロンボキサンシンターゼに対するモノクローナル抗体、およびトロンボキサンシンターゼのイムノアフィニティ精製は公知であり；ヒトトロンボキサンシンターゼについてのｃＤＮＡも同様である。

【０３６８】

α２－抗プラスミン、すなわち、α２－プラスミンインヒビターは、プラスミノゲンアクチベーターによって誘導されるフィブリン血餅の溶解を効率的に阻害するように機能する、ヒト血漿において天然に存在するプロテイナーゼインヒビターである。α２－抗プラスミンは、特に強力なインヒビターであり、そして本発明の用途のために意図される。

【０３６９】

α２－抗プラスミンについてのｃＤＮＡ配列が利用可能である場合、組換え発現および／または融合タンパク質が好ましい。α２－抗プラスミンに対するモノクローナル抗体もまた利用可能であり、これは本発明の二重特異性結合リガンドの実施形態において使用され得る。これらの抗体は、標的部位に外因性α２－抗プラスミンを送達するために使用されるか、または内因性α２－抗プラスミンを収集し、そして標的領域内でそれを濃縮するために使用され得る。

【０３７０】

（Ｆ４．抗チューブリン薬）

一連の薬物は、チューブリン活性との干渉を介してその効果を行使する。チューブリンの機能は、有糸分裂および細胞の生存能力に不可欠であるので、特定の「抗チューブリン薬」は、強力な化学療法剤である。いくつかの周知であってかつ本発明とともに使用するための現在好ましい抗チューブリン薬は、コルヒチン；タキサン（例えば、タキソール）；ビンカアルカロイド類（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビンデスチン）；およびコンブレタスタチン（ｃｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎ）である。他の適切な抗チューブリン薬は、サイトカラシン類（Ｂ、Ｊ、Ｅを含む）、ドラスタチン（ｄｏｌａｓｔａｔｉｎ）、オーリスタチン（ａｕｒｉｓｔａｔｉｎ）ＰＥ、パクリタキセル、ウスチロキシン（ｕｓｔｉｌｏｘｉｎ）Ｄ、リゾキシン（ｒｈｉｚｏｘｉｎ）、１０６９Ｃ８５、コルセミド（ｃｏｌｃｅｍｉｄ）、アルベンダゾール、アザトキシン（ａｚａｔｏｘｉｎ）およびノコダゾールである。

【０３７１】

米国特許第５，８９２，０６９号、同第５，５０４，０７４号、および同第５，６６１，１４３号（各々本明細書中に詳細に参考として援用される）に記載されるように、コンブレタスタチン類は、一般に細胞有糸分裂を阻害するエストラジオール誘導体である。本発明と組合せて使用され得る例示的なコンブレタスタチンとしては、コンブレタスタチンＡ、Ｂおよび／またはＤを基本とするコンブレタスタチンならびに米国特許第５，８９２

，０６９号、同第５，５０４，０７４号、および同第５，６６１，１４３号に記載されるコンブレタスタチンが挙げられる。コンブレタスタチンＡ－１、Ａ－２、Ａ－３、Ａ－４、Ａ－５、Ａ－６、Ｂ－１、Ｂ－２、Ｂ－３およびＢ－４は、上記の型の例である。

【０３７２】

米国特許第５，５６９，７８６号および同第５，４０９，９５３号は、コンブレタスタチンＡ－１、Ａ２、Ａ－３、Ｂ－１、Ｂ－２、Ｂ－３およびＢ－４の各々の単離、構造的特徴付けおよび合成、ならびにこのようなコンブレタスタチンを使用して新生物性増殖を処置するための処方物および方法を記載する目的のために、本明細書中に参考として援用される。任意の１つ以上のこのようなコンブレタスタチンは、本発明と組合せて使用され得る。

【０３７３】

米国特許第５，８９２，０６９号、同第５，５０４，０７４号、同第５，６６１，１４３号および同第４，９９６，２３７号（各々詳細に本明細書中で参考として援用される）に記載されるように、コンブレタスタチンＡ－４はまた、本発明と共に使用され得る。米国特許第５，５６１，１１２号は、適切なコンブレタスタチンＡ－４プロドラッグ（これらは、本発明とともに組合せて使用することが意図される）を適切に記載するために、本明細書中に参考として援用される。

【０３７４】

米国特許第４，９４０，７２６号（本明細書中に参考として詳細に援用される）は、コンブレタスタチンＤ－１および「コンブレタスタチンＤ－２」と称される大環状ラクトンを詳細に記載し、これらは、本発明の組成物および方法と組み合わせて使用され得る。米国特許第５，４３０，０６２号（本明細書中に参考として詳細に援用される）は、抗癌活性を有するスチルベン誘導体およびコンブレタスタチンアナログに関し、これらは本発明と組合せて使用され得る。

【０３７５】

（Ｆ５．抗脈管形成剤）

抗脈管形成剤は、本発明の抗体およびペプチドへの結合に有用である。多くの抗癌剤が、それらの作用の機構の一部として、抗脈管形成効果を有する。併用療法で使用するために記載されるこのような任意の１つ以上の薬剤（表Ｅに含まれる）がまた、本明細書中に記載されるように、本発明の抗体に結合体化され得る。特定の他の薬剤が、作用の一次的な機構として、抗脈管形成効果を有することが発見されるか、設計されるか、または選択された。このような薬剤の例は、以下に記載され、これらのうちの任意がまた、免疫結合体を調製するために使用され得るか、または本発明の併用療法において別々に使用され得る。

【０３７６】

種々の疾患状態で顕著であるように、新脈管形成の処置に有用である多数のチロシンキナーゼインヒビターが、現在公知である。これらとしては、例えば、米国特許第５，６３９，７５７号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）の４－アミノピロール［２，３－ｄ］ピリミジンが挙げられる。これはまた、本発明と組み合わせて使用され得る。ＶＥＧＤＲ２レセプターを介するチロシンキナーゼシグナル伝達を媒介し得る有機分子のさらなる例は、キナゾリン化合物および米国特許第５，７９２，７７１号（具体的に、脈管形成疾患の処置における本発明と共に使用するためのさらなる組み合わせを記載する目的で、参考として本明細書中で援用される）の組成物である。

【０３７７】

他の化学クラスの化合物はまた、新脈管形成を阻害することが示されており、そして本発明と組み合わせて使用され得る。例えば、米国特許第５，９７２，９２２号（具体的に、参考として本明細書中で援用される）に記載されるステロイド（例えば、新脈管形成の４，９（１１）－ステロイドおよびＣ２１－酸化ステロイド）じは、併用治療において使用され得る。米国特許第５，７１２，２９１号および同第５，５９３，９９０号（各々、参考として本明細書中で援用される）は、サリドマイドならびに関連する化合物、前駆体

、アナログ、代謝物および加水分解産物を記載する。これらもまた、新脈管形成を阻害するために本発明と組み合わせて使用され得る。米国特許第５，７１２，２９１号および同第５，５９３，９９０号における化合物は、経口的に投与され得る。組合せ治療に関して有用である、さらなる例示的な抗新脈管形成剤は、表Ｂに列挙される。ここで列挙される各薬剤は、例示であって、限定することを意味しない。

【０３７８】

【化２－１】

表B

脈管形成のインヒビターおよびネガティブ調節剤

物質	参考文献
アンギオスタチン	O'Reilly *et al.*, 1994
エンドスタチン	O'Reilly *et al.*, 1997
16kDaプロラクチンフラグメント	Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993; D'Angelo *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998
ラミニンペプチド	Kleinman *et al.*, 1993; Yamamura *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1996; Tryggvason, 1993
フィブロネクチンペプチド	Grant *et al.*, 1998; Sheu *et al.*, 1997
組織メタロプロテイナーゼインヒビター (TIMP 1, 2, 3, 4)	Sang, 1998
プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1, -2)	Soff *et al.*, 1995
腫瘍壊死因子（高用量，インビトロ）	Frater-Schroder *et al.*, 1987
TGF-β1	RayChadhury and D'Amore, 1991; Tada *et al.*, 1994
インターフェロン(IFN-α, -β, γ)	Moore *et al.*, 1998; Lingen *et al.*, 1998
ELR- CXC ケモカイン ： IL-12; SDF-1; MIG; 血小板因子4 (PF-4); IP-10	Moore *et al.*, 1998; Hiscox and Jiang, 1997; Coughlin *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1997
トロンボスポンジン(TSP)	Good *et al.*, 1990; Frazier, 1991; Bornstein, 1992; Tolsma *et al.*, 1993; Sheibani and Frazier, 1995; Volpert *et al.*, 1998
SPARC	Hasselaar and Sage, 1992; Lane *et al.*, 1992; Jendraschak and Sage, 1996
2-メトキシエストラジオール	Fotsis *et al.*, 1994
プロリフェリン(proliferin)関連タンパク質	Jackson *et al.*, 1994
スラミン	Gagliardi *et al.*, 1992; Takano *et al.*, 1994; Waltenberger *et al.*, 1996; Gagliardi *et al.*, 1998; Manetti *et al.*, 1998
サリドマイド	D'Amato *et al.*, 1994; Kenyon *et al.*, 1997 Wells, 1998

【０３７９】

【化２－２】

（表Bの続き）

コルヒチン	Thorpe *et al.*, 1993 Folkman *et al.*, 1983 Sakamoto *et al.*, 1986
リノマイド	Vukanovic *et al.*, 1993; Ziche *et al.*, 1998; Nagler *et al.*, 1998
フマギリン (AGM-1470; TNP-470)	Sipos *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1998
タモキシフェン	Gagliardi and Collins, 1993; Linder and Borden, 1997; Haran *et al.*, 1994
朝鮮ヤドリギ抽出物 (*Viscum album coloratum*)	Yoon *et al.*, 1995
レチノイド	Oikawa *et al.*, 1989; Lingen *et al.*, 1996; Majewski *et al.* 1996
CM101	Hellerqvist *et al.*, 1993; Quinn *et al.*, 1995; Wamil *et al.*, 1997; DeVore *et al.*, 1997
デキサメタゾン	Hori *et al.*, 1996; Wolff *et al.*, 1997
白血病阻害因子 (LIF)	Pepper *et al.*, 1995

本発明と共に使用するための他の抗脈管形成剤としては、アンギオスタチンおよびエンドスタチンが挙げられる。「アンギオスタチン」と呼ばれるタンパク質は、米国特許第５，７７６，７０４号；同第５，６３９，７２５号および同第５，７３３，８７６号において開示されている。これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。アンギオスタチンは、還元ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定されるように、約３８ｋＤａ～約４５ｋＤａの分子量を有するタンパク質であり、これは、プラスミノゲン分子のほぼクリングル領域１～４を含む。アンギオスタチンは、一般に、インタクトなマウスプラスミノゲン分子のアミノ酸番号９８から開始するマウスプラスミノゲンのフラグメントと実質的に類似のアミノ酸配列を有する。

【０３８０】

アンギオスタチンのアミノ酸配列は、種の間でわずかに変化する。例えば、ヒトアンギオスタチンにおいて、このアミノ酸配列は、上記のマウスプラスミノゲンフラグメントの配列と実質的に類似であるが、活性なヒトアンギオスタチン配列は、インタクトなヒトプラスミノゲンアミノ酸配列のアミノ酸番号９７または９９のいずれかで開始し得る。さらに、ヒトプラスミノゲンは、類似の抗脈管形成活性を有するので、マウス腫瘍モデルにおいて示されるように使用され得る。

【０３８１】

特定の抗脈管形成治療剤は、腫瘍後退を引き起こすことが既に示されており、アンギオスタチンがこのような薬剤の１つである。エンドスタチン（ｅｎｄｏｓｔａｔｉｎ）、コラーゲンＸＶＩＩＩの２０ｋＤａのＣＯＯＨ末端フラグメント、細菌性多糖類ＣＭ１０１、および抗体ＬＭ６０９もまた、血管静止（ａｎｇｉｏｓｔａｔｉｃ）活性を有する。しかし、それらの他の特性を考慮して、これらは、脈管形成を阻害するだけではなく、大部分規定されていない機構によって腫瘍脈管の破壊を開始するので、抗脈管治療剤または腫瘍脈管毒素と呼ばれる。

【０３８２】

アンギオスタチンおよびエンドスタチンは、マウスにおいて、腫瘍増殖を阻害するだけでなく腫瘍後退もまたもたらす能力が実証された最初の新脈管形成インヒビターであるので、これらは熱心な研究の焦点となる。エラスターゼ、マクロファージメタロエラスター

ゼ（ＭＭＥ）、マトリリシン（ｍａｔｒｉｌｙｓｉｎ）（ＭＭＰ－７）、および９２ｋＤａゼラチナーゼＢ／ＩＶ型コラゲナーゼ（ＭＭＰ－９）を含む、プラスミノゲンからアンギオスタチンを生成することが示される複数のプロテアーゼが存在する。

【０３８３】

ＭＭＥは、腫瘍においてプラスミノゲンからアンギオスタチンを生成し得、そして顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭＣＳＦ）は、アンギオスタチンの生成を誘導するマクロファージによってＭＭＥの発現をアップレギュレートする。アンギオスタチン生成におけるＭＭＥの役割は、ＭＭＥが患者由来の肝細胞癌の臨床サンプルにおいて実際に発現されるという知見によって支持される。アンギオスタチンを生成し得ると考えられる別のプロテアーゼは、ストロメライシン－１（ＭＭＰ－３）である。ＭＭＰ－３は、インビトロにおいてプラスミノゲンからアンギオスタチン様フラグメントを生成することが示されている。アンギオスタチンについての作用機構は現在のところ明らかではなく、これが、プログラム化された細胞死または有糸分裂の阻止を受けるように内皮細胞を誘導する内皮細胞上の同定されていない細胞表面レセプターに結合すると推定されている。

【０３８４】

エンドスタチンは、その生物学はあまり明白ではないものの、さらにより強力な抗新脈管形成および抗腫瘍剤であるようである。エンドスタチンは、マウスにおける多くの腫瘍モデルにおいて後退を生じることにおいて有効である。腫瘍は、エンドスタチンに対する耐性を発生させず、そして複数のサイクルの処置後に、腫瘍は、休眠状態に進入し、この間、これらは容量において増加しない。この休眠状態において、アポトーシスを受ける腫瘍細胞の割合は増加し、そして本質的に同じサイズをとどめる集団を生じた。エンドスタチンは、その効果を媒介する未同定の内皮細胞表面レセプターに結合すると考えられる。

【０３８５】

ＦｏｌｋｍａｎおよびＯ’Ｒｅｉｌｅｙらへの米国特許第５，８５４，２０５号（本明細書中で参考として詳細に援用される）は、内皮細胞増殖および脈管形成のインヒビターとしてのエンドスタチンおよびその使用に関する。エンドスタチンタンパク質は、コラーゲンＸＶＩＩＩ型のＣ末端フラグメントに対応し、そしてこのタンパク質は、種々の供給源から単離され得る。米国特許第５，８５４，２０５号はまた、エンドスタチンが、コラーゲンＸＶＩＩＩ型、コラーゲンＸＶ型、またはＢＯＶＭＰＥ１プロガストリン（ｐｒｅｇａｓｔｒｉｃ）エステラーゼのフラグメントのアミノ酸配列を有し得るということを教示する。エンドスタチンの他の抗脈管形成タンパク質、特にアンギオスタチンとの組み合わせはまた、米国特許第５，８５４，２０５号に記載され、その結果、組合された組成物は、脈管形成依存性腫瘍塊を効果的に後退させ得る。

【０３８６】

ＣＭ１０１は、細菌性ポリサッカリドであり、これは、腫瘍において新血管炎症を誘導する能力において十分に特徴付けられている。ＣＭ１０１は、補体系の活性化を刺激する脱分化した内皮上で発現されるレセプターに結合し、そして架橋する。それはまた、腫瘍を選択的に標的するサイトカイン駆動化炎症応答を開始する。これは、発現ＶＥＧＦおよびそのレセプターをダウンレギュレートする固有の抗病理新脈管形成剤である。ＣＭ１０１は、現在、抗癌剤として臨床試験中であり、そしてこれと組み合わせて使用され得る。

【０３８７】

トロンボスポンジン（ｔｈｒｏｍｂｏｓｐｏｎｄｉｎ）（ＴＳＰ－１）および血小板因子４（ＰＦ４）もまた、本発明において使用され得る。これらはともに、ヘパリンと会合する新脈管形成インヒビターであり、そしてまた血小板α－顆粒において見出される。ＴＳＰ－１は、細胞外マトリクスの構成成分である、大きな４５０ｋＤａのマルチドメイン糖タンパク質である。ＴＳＰ－１は、ＨＳＰＧ、フィブロネクチン、ラミニン、および種々の型のコラーゲンを含む、細胞外マトリクスにおいて見出される多くのプロテオグリカン分子に結合する。ＴＳＰ－１は、インビトロにおいて内皮細胞遊走および増殖、ならびにインビボにおいて新脈管形成を阻害する。ＴＳＰ－１はまた、形質転換された内皮細胞の悪性表現型および腫瘍形成を抑制し得る。腫瘍抑制遺伝子ｐ５３は、ＴＳＰ－１の発現

を直接的に調節することが示されており、その結果、ｐ５３活性の損失は、ＴＳＰ－１生成における劇的な減少、および腫瘍が開始する新脈管形成を付随する増大を生じる。

【０３８８】

ＰＦ４は、ケモカインのＣＸＣ　ＥＬＲファミリーのメンバーである７０ａａタンパク質あり、これは、インビトロにおける内皮細胞の増殖およびインビボにおける新脈管形成を強力に阻害し得る。腫瘍内に投与された、またはアデノウイルスベクターによって送達されたＰＦ４は、腫瘍増殖の阻害を生じ得る。

【０３８９】

インターフェロンおよびメタロプロテイナーゼインヒビターは、本発明に従って送達され得る、２つの他のクラスの天然に存在する脈管形成インヒビターである。インターフェロンの抗内皮活性は、１９８０年代初期から公知であるが、阻害の機構は、未だ明確でない。これらが内皮細胞の移動を阻害し得ること、およびこれらが、腫瘍細胞による新脈管形成プロモーターの産生を阻害する能力によっておそれく媒介される、インビボでのいくつかの抗新脈管形成活性を有することは公知である。血管腫瘍は具体的に、インターフェロンに感受性であり、例えば、増殖中の血管腫はＩＦＮαで首尾よく処置され得る。

【０３９０】

メタロプロテイナーゼの組織インヒビター（ＴＩＭＰ）は、天然に存在するマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）のインヒビターのファミリーであり、これもまた、新脈管形成を阻害し得、そして本発明の処置プロトコルにおいて使用され得る。ＭＭＰは、新脈管形成プロセスにおいて重要な役割を果たす。なぜなら、これらは、血管網を拡大または再構築する場合、内皮細胞および線維芽細胞が移動するマトリックスを分解するからである。実際、ＭＭＰの１つのメンバーであるＭＭＰ－２は、おそらくこの目的のためにインテグリンαｖβ３を介して活性化された内皮と会合することが示されている。この相互作用がＭＭＰ－２のフラグメントによって崩壊されられる場合、次いで新脈管形成はダウンレギュレートされ、そして腫瘍増殖において阻害される。

【０３９１】

新脈管形成を阻害する多くの薬理学的物質が存在し、これらの任意の１以上が本発明の一部として使用され得る。これらの物質としては、ＡＧＭ－１４７０／ＴＮＰ－４７０、サリドマイド、およびカルボキシアミドトリアゾール（ＣＡＩ）が挙げられる。フマギリンは、１９９０年に新脈管形成の強力なインヒビターであることが見出されており、そしてそれ以来、フマギリンの合成アナログである、ＡＧＭ－１４７０およびＴＮＰ－４７０が開発されてきた。これら両方の薬物は、インビトロでの内皮細胞増殖およびインビボでの新脈管形成を阻害する。ＴＮＰ－４７０は、ヒトの臨床試験で広範に研究され、そのデータは長期の投与が最適であることを示唆する。

【０３９２】

サリドマイドは、元来鎮静薬として使用されていたが、強力な催奇形物質であることが見出され、そして中止された。１９９４年に、サリドマイドは新脈管形成インヒビターであることが見出された。サリドマイドは現在、抗癌剤および血管性の眼疾患の処置として臨床試験されている。

【０３９３】

ＣＡＩは新脈管形成の低分子量の合成インヒビターであり、これは、アクチンの再組織化、内皮細胞の移動およびコラーゲンＩＶ上での延展を妨げる、カルシウムチャネルブロッカーとして作用する。ＣＡＩは生理学的に達成可能な濃度で新生血管形成を阻害し、そして癌患者によって経口的に十分許容される。ＣＡＩを用いた臨床試験によって、処置前に進行性の疾患を有する癌患者の４９％において疾患の安定化を生じた。

【０３９４】

ヘパリンまたはヘパリンフラグメントの存在下のコルチゾンは、内皮細胞増殖をブロックすることによってマウスにおいて腫瘍増殖を阻害することが示された。ステロイドおよびヘパリンの相加的な阻害効果に関与する機構は明らかでないが、ヘパリンが内皮細胞によるステロイドの取り込みを増加させ得ると考えられる。この混合物は、新しく形成され

た毛細血管の下の基底膜の溶解を増加させることが示されており、そしてこれはまた、相加的な血管抑制（ａｎｇｉｏｓｔａｔｉｃ）効果についての可能性のある説明である。ヘパリン－コルチゾール結合体はまた、インビボでの強力な血管抑制効果活性および抗腫瘍効果活性を有する。

【０３９５】

さらに特定の新脈管形成インヒビターが、本発明の腫瘍標的化方法を使用して腫瘍に送達され得る。これには、抗侵襲性因子（Ａｎｔｉ－Ｉｎｖａｓｉｖｅ　Ｆａｃｔｏｒ）、レチノイン酸およびパクリタキセル（米国特許第５，７１６，９８１号；参考として本明細書中に援用される）；ＡＧＭ－１４７０（Ｉｎｇｂｅｒら、１９９０；参考として本明細書中に援用される）；サメ軟骨抽出物（米国特許第５，６１８，９２５号；参考として本明細書中に援用される）；陰イオン性ポリアミドオリゴマーまたは陰イオン性ポリ尿素オリゴマー（米国特許第５，５９３，６６４号；参考として本明細書中に援用される）；オキシンドール（ｏｘｉｎｄｏｌｅ）誘導体（米国特許第５，５７６，３３０号；参考として本明細書中に援用される））；エストラジオール誘導体（米国特許第５，５０４，０７４号；参考として本明細書中に援用される）；およびチアゾールピリミジン誘導体（米国特許第５，５９９，８１３号；参考として本明細書中に援用される）が挙げられるが、これらに限定されない。これらはまた、本発明の併用使用のための、抗新脈管形成組成物としての使用が意図される。

【０３９６】

$\alpha_v\beta_3$インテグリンのアンタゴニストを含む組成物はまた、本発明と組合せて新脈管形成を阻害するために使用され得る。米国特許第５，７６６，５９１号（参考として本明細書中に援用される）に開示されるように、ＲＧＤ含有ポリペプチドおよびその塩（環状ポリペプチドを含む）は、$\alpha_v\beta_3$インテグリンアンタゴニストの適切な例である。

【０３９７】

アンギオポイエチン（ａｎｇｉｏｐｏｉｅｔｉｎ）がＴｉｅ２に対するリガントであるので、Ｔｉｅ２レセプターを介するシグナル伝達を変えることに基づく治療的介入の他の方法がまた、本明細書と組み合わせて使用され得る。例えば、Ｔｉｅ２を活性化をブロックし得る可溶性Ｔｉｅ２レセプター（Ｌｉｎら、１９９８ａ）が使用され得る。組換えアデノウイルス遺伝子治療を使用するこのような構築物の送達は、癌の処置および転移の減少において有効であることが示されている（Ｌｉｎら、１９９８ａ）。

【０３９８】

アンギオポエチンは、ＶＥＧＦファミリーのメンバーと同様に、血管内皮に特異的な増殖因子である（ＤａｖｉｓおよびＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ、１９９９：Ｈｏｌａｓｈら、１９９９；本明細書中で参考として援用される）。最初に記載されたアンギオポエチンは、天然に存在するレセプター賦活体またはアゴニストであるアンギオポエチン－１（Ａｎｇ－１；配列番号１および配列番号２）、および天然に存在するレセプターアンタゴニストであるアンギオポエチン－２（Ａｎｇ－２；配列番号３および配列番号４）であった。この両方は、内皮細胞チロシンキナーゼレセプターＴｉｅ２によって作用する。

【０３９９】

２つの新しいアンギオポエチンである、アンギオポエチン－３（マウス）およびアンギオポエチン－４（ヒト）もまた同定された（Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａら、１９９９）。アンギオポエチン－３は、（Ａｎｇ－２のような）アンタゴニストとして作用するようであるが、アンギオポエチン－４は、（Ａｎｇ－１のような）アゴニストとして機能するようである（Ｖａｌｅｎｚｕｅｌａら、１９９９）。アンギオポエチン－３と呼ばれるタンパク質はまた、ヒト心臓からクローニングされ、そして内皮細胞に対してマイトジェン効果を有さないと報告された（Ｋｉｍら、１９９９）。

【０４００】

ＶＥＧＦは、血管発達の早期の段階のために必要であるが、アンギオポエチン－１は、一般に、血管新生のより後期の段階に必要とされる。従って、ＶＥＧＦは、内皮細胞分化、増殖および初期の血管形成を促進するように作用する。アンギオポエチン－１は、Ｔｉ

ｅ２レセプターを介して、成熟管の維持および安定化を促進するように作用する。従って、アンギオポエチン－１は、成熟因子または安定化因子であり、これは、内皮細胞と周囲の支持細胞との間の相互作用を促進することにより未成熟の血管を成熟した血管に変換する（Ｈｏｌａｓｈら、１９９９）。

【０４０１】

（Ｆ６．アポトーシス誘発剤）

本発明はまた、腫瘍内の任意の細胞（腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞を含む）においてアポトーシスを誘発する因子を送達するために使用され得る。多くの抗癌剤は、その作用機構の一部として、アポトーシス誘発効果を有する。併用療法において使用するために記載された任意の１つ以上のこのような薬剤（表Ｆに含まれる）はまた、本明細書中に記載されるように、本発明の抗体に結合体化され得る。特定の他の薬剤が、一次的な機構として、アポトーシス効果を有することが発見されるか、設計されるか、または選択された。このような因子の例は、以下に記載され、これらのうちの任意がまた、免疫結合体を調製するために使用され得るか、または本発明の併用療法において別々に使用され得る。

【０４０２】

多くの形態の癌において、腫瘍抑制遺伝子（例えば、ｐ５３）における変異が報告されている。ｐ５３の不活性化は、アポトーシスの促進の不全を生じる。この不全によって、癌細胞は、細胞死へと運命付けられるよりむしろ、腫瘍形成を進行させる。従って、腫瘍抑制因子の送達もまた、細胞死を刺激するために本発明での使用が意図される。例示的な腫瘍抑制因子としては、ｐ５３、網膜芽細胞腫遺伝子（Ｒｂ）、ウィルムス腫瘍（ＷＴ１）、ｂａｘα、インターロイキン－１ｂ－変換酵素およびファミリー、ＭＥＮ－１遺伝子、神経芽細胞腫Ｉ型（ＮＦ１）、ｃｄｋインヒビターｐ１６、結腸直腸癌遺伝子（ＤＣＣ）、家族性腺腫症ポリポーシス遺伝子（ＦＡＰ）、多発性腫瘍抑制遺伝子（ＭＴＳ－１）、ＢＲＣＡ１ならびにＢＲＣＡ２が挙げられるがこれらに限定されない。

【０４０３】

使用のために好ましいのは、ｐ５３（米国特許第５，７４７，４６９号；同第５，６７７，１７８号；および同第５，７５６，４５５号；各々は、参考として本明細書中に援用される）、網膜芽細胞腫、ＢＲＣＡ１（米国特許第５，７５０，４００号；同第５，６５４，１５５号；および同第５，７１０，００１号；同第５，７５６，２９４号；同第５，７０９，９９９号；同第５，６９３，４７３号；同第５，７５３，４４１号；同第５，６２２，８２９号；および同第５，７４７，２８２号；各々は、参考として本明細書中に援用される）、ＭＥＮ－１（ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ９３２３６号）およびアデノウイルスＥ１Ａ（米国特許第５，７７６，７４３号；参考として本明細書中に援用される）の遺伝子である。

【０４０４】

アポトーシスまたはプログラムされた細胞死を阻害する他の発癌遺伝子としては、ｂｃｒ－ａｂｌ、ｂｃｌ－２（ｂｃｌ－１とは異なる、サイクリンＤ１；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｍ１４７４５、Ｘ０６４８７；米国特許第５，６５０，４９１号；および同第５，５３９，０９４号；各々が本明細書中において参考として援用される）；およびファミリーメンバー（Ｂｃｌ－ｘｌ、Ｍｃｌ－１、Ｂａｋ、Ａ１、Ａ２０を含む）が挙げられる。ｂｃｌ－２の過剰発現は、最初に、Ｔ細胞リンパ腫において発見された。ｂｃｌ－２は、Ｂａｘ、アポトーシス経路におけるタンパク質に結合し、不活化することによって発癌遺伝子として機能する。ｂｃｌ－２機能の阻害は、Ｂａｘの不活化を妨げ、アポトーシス経路が進行し得る。このように、このクラスの発癌遺伝子の阻害（例えば、アンチセンスヌクレオチドを使用する）は、アポトーシスの増強が所望される局面において本発明における使用に企図される（米国特許第５，６５０，４９１号；同第５，５３９，０９４号；および同第５，５８３，０３４号；各々が、本明細書中において参考として援用される）。

【０４０５】

本発明の抗体により送達され得る他の組成物としては、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド（ＴＲＡＩＬと称される）をコードする遺伝子、およびＴＲＡＩＬポリペプ

チド（米国特許第５，７６３，２２３号；参考として本明細書中に援用される）；米国特許第５，６０５，８２６号（参考として本明細書中に援用される）２４ｋＤアポトーシス関連プロテアーゼ；Ｆａｓ関連因子１、ＦＡＦ１（米国特許第５，７５０，６５３号；参考として本明細書中に援用される）が挙げられる。インターロイキン－１β－変換酵素およびファミリーのメンバー（これらもまた、アポトーシスを刺激することが報告されている）の提供もまた、本発明のこれらの局面における使用のために意図される。

【０４０６】

以下のような化合物もまた使用され得る；カルボスチリル（ｃａｒｂｏｓｔｙｒｉｌ）誘導体（米国特許第５，６７２，６０３号；および同第５，４６４，８３３号；各々は、参考として本明細書中に援用される）；分枝状アポトーシス原性（ａｐｏｇｅｎｉｃ）ペプチド（米国特許第５，５９１，７１７号；参考として本明細書中に援用される）；ホスホチロシンインヒビターおよび非加水分解性ホスホチロシンアナログ（米国特許第５，５６５，４９１号；および同第５，６９３，６２７号；各々は、参考として本明細書中に援用される）；ＲＸＲレチノイドレセプターのアゴニスト（米国特許第５，３９９，５８６号；参考として本明細書中に援用される）；さらには、抗酸化剤（米国特許第５，５７１，５２３号；参考として本明細書中に援用される）。チロシンキナーゼインヒビター（例えば、ゲニステイン）もまた、本発明の抗体に連結され得る（参考として本明細書中に援用される米国特許第５，５８７，４５９号により支持されるように）。

【０４０７】

（Ｆ７．抗ウイルス薬剤）

陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質（特に、ＰＳおよびＰＥ）は、ウイルス感染細胞において曝露され、本発明の抗体（例えば、９Ｄ２および３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５））抗体はまた、任意の１つ以上の抗ウイルス薬剤に連結され得る。本発明のこれらの局面の元にあるさらなる理由、およびその利点は、ＰＥ結合ペプチド、抗ウイルス結合体に関して、以下にさらに詳細に記載される。

【０４０８】

例示的な抗ウイルス剤は、抗体に連結するためであるか、またはペプチドはまた、ＰＥ－結合ペプチド、本発明の抗ウイルス結合体と関連してさらに詳細に記載される。任意の１つ以上の抗ウイルス剤（表Ｇに含まれる）が、本明細書中に記載されるように、本発明の抗体に結合体化され得る。このような抗ウイルス剤はまた、本発明の抗ウイルス治療と組み合わせて別々に使用され得る。

【０４０９】

（Ｇ．生物学的機能性等価物）

抗体およびエフェクターの等価物またはさらなる改良物が、今や、一般には上記に提供される物質を出発点として使用して作製され得る。改変および変化が、このような抗体の構造中になされ得、そしてさらに類似または他の様式の所望の特徴を有する分子を入手し得る。例えば、特定のアミノ酸が、相互作用性結合能（例えば、アミノリン脂質、ＰＳおよびＰＥへの結合）のかなり大きな損失なしに、タンパク質構造において他のアミノ酸の代わりに置換され得る。これらの考察もまた、毒素、抗脈管形成剤、アポトーシス誘発剤および凝血薬などにあてはまる。

【０４１０】

タンパク質の生物学的機能活性を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質であるので、特定のアミノ酸配列置換がタンパク質配列（または、当然のことながら基礎のＤＮＡ配列）中でなされ得、にもかかわらず類似（アゴニスト）の特性を有するタンパク質を入手し得る。従って、種々の変化が、それらの生物学的有用性または活性のかなり大きな損失なく、抗体または治療剤の配列（または、基礎のＤＮＡ配列）になされ得ることが意図される。基礎のＤＮＡ配列を変異することから作製される生物学的機能性等価物は、本明細書中の表Ａにおいて提供されるコドン情報、および部位特異的変異誘発に関する支持する技術的詳細を用いてなされ得る。

【０４１１】

分子の所定の部分内になされ得、なお受容可能なレベルの等価な生物学的活性を有する分子を生じ得る変化の数に対して限界が存在するという概念が、「生物学的機能性等価物」タンパク質またはペプチドの定義に固有であることもまた、当業者に十分に理解される。従って、生物学的機能性等価物タンパク質およびペプチドは、本明細書中において、ほとんどまたはすべてではないが特定のアミノ酸が置換され得るタンパク質およびペプチドとして規定される。当然のことながら、異なる置換を有する複数の異なるタンパク質／ペプチドは、本発明に従って容易に作製および使用され得る。

【０４１２】

アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖の置換の相対的類似性（例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなど）に基づく。アミノ酸側鎖置換のサイズ、形状および型の分析によって、アルギニン、リジンおよびヒスチジンはすべて正に荷電した残基であること；アラニン、グリシンおよびセリンはすべて類似のサイズであること；そして、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンはすべて一般的に類似の形状であることが示される。従って、これらの考察に基づいて、アルギニン、リジンおよびヒスチジン；アラニン、グリシンおよびセリン；ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、本明細書中において、生物学的機能性等価物として規定される。

【０４１３】

より定量的な変化を生じさせる際に、アミノ酸の疎水親水指数が考慮され得る。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷特徴に基づいて疎水親水指数を指定されており、これらは以下である：イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；トレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５）。

【０４１４】

タンパク質に相互作用性生物学的機能を付与する際の疎水親水アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野において理解される（ＫｙｔｅおよびＤｏｏｌｉｔｔｌｅ、１９８２、本明細書中で参考として援用される）。特定のアミノ酸が、類似の疎水親水指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに置換され得、そしてなお類似の生物学的活性を保持することは公知である。疎水親水指数に基づいた変化を生じさせる際に、疎水親水指数が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内である置換が特に好ましく、そして±０．５以内である置換がさらにより特に好ましい。

【０４１５】

従って、アミノ酸が、類似の親水性値を有する別のアミノ酸の代わりに置換され、そしてなお生物学的に等価なタンパク質を入手し得ることが理解される。米国特許第４，５５４，１０１号（本明細書中で参考として援用される）において詳述されるように、以下の親水性値が、アミノ酸残基に指定されている：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；トレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－０．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；トリプトファン（－３．４）。

【０４１６】

親水性値に基づいた変化を生じさせる際に、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内である置換が特に好ましく、そして±０．５以内である置換がさらにより特に好ましい。

【０４１７】

（Ｈ．結合体）

アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体（改善された特性を有する選択された抗ＰＳ抗体、例えば、９Ｄ２および３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）を含む）は、「免疫毒素」を調製するための抗細胞剤および細胞傷害剤；「コアグリガンド」を調製するための直接的または間接的のいずれかのコアグリガンド；または抗ウイルス性免疫結合体または「イムノビロシド」を調製するための抗ウイルス剤（例えば、ヌクレオシド）に結合体化され得るか、または結合され得るか、または作動可能に関連し得る。ＰＥ結合ペプチド（例えば、デュラマイシン）はまた、ある範囲のＰＥ結合ペプチド誘導体および抗ウイルス性ペプチド結合体を調製するために、不活性なキャリア、標的剤または抗ウイルス剤に結合体化され得るか、または結合され得るか、または作動可能に関連し得る。

【０４１８】

共有結合が好ましいものの、作動可能な結合のための他の手段がまた使用され得る。例えば、連結される構築物は、アビジン：ビオチン架橋を使用して作製され得る。当業者に利用可能な知識に加えて、同一出願人の米国特許第６，０９３，３９９号は、抗体および標的化剤の生物学的薬剤および治療剤に作動可能に結合する際のアビジン：ビオチンの使用をさらに記載し可能にするために、本明細書中において具体的に援用される。

【０４１９】

２つの薬剤がまた、第２の結合領域（好ましくは、抗体またはその抗原結合領域）によって結合され得る。これは、コアグリガンドによって例示され、この標的化剤は、第２の結合領域によって凝固剤に連結される（米国特許第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号、および同第６，０３６，９５５号、各々が、本明細書中において参考として援用される）。これは、癌の処置において作製され、首尾良く使用された。第１の標的化剤が抗体または抗原結合領域である場合、抗体、または抗原結合領域でもある第２の結合領域の使用は、二重特異的抗体構築物を生じる。一般に、二重特異的抗体の調製および使用は、当該分野で周知であり、本明細書中にさらに開示される。

【０４２０】

免疫結合体技術は、ここで、一般的に当該分野で公知である。しかし、特定の利点が、特定の好ましい技術（調製および引き続く臨床的投与のための精製の両方）の適用を介して達成され得る。例えば、ＩｇＧベースの構築物が、代表的に、それらのＦａｂ’対応物よりもより良い結合能力および血液クリアランスを示すものの、Ｆａｂ’フラグメントに基づく構築物は、一般的に、より良い組織浸透能力を示す。

【０４２１】

さらに、多くのタイプのジスルフィド結合含有リンカーが、公知であり、抗体およびペプチド結合体において首尾良く利用され得、特定のリンカーが、一般的に、異なる薬理学的特性および能力に基づいて、他のリンカーよりも好ましい。例えば、立体的に「妨害される」ジスルフィド結合を含むリンカーが、インビボでより大きな安定性を生じることに起因して好ましく、これによって作用物での結合の前での凝固剤の放出を妨げる。

【０４２２】

架橋リンカーの各タイプ、ならびに架橋がどのように実行されるかは、得られる結合体の薬物動力学を変化する傾向がある。作用の意図される部位（この部位で、結合体が良好な「放出」特性を有する）を除いて、体内のいたる場所で見出される条件下でインタクトなままである結合体を有することが望ましくあり得る。従って、特定の架橋スキーム（特に、使用される特定の架橋試薬および架橋される構造を含む）は、いくらかの有用性がある。

【０４２３】

結合体化される特定の薬剤に依存して、抗体またはＰＥ結合ペプチドおよび第二の薬剤または治療剤を作動可能に結合するペプチドスペーサーを提供することが必要であり得るかまたは所望され得る。特定のペプチドスペーサーは、ジスルフィド結合されたループ構造に折り畳まれ得る。次いで、ループ内のタンパク質分解切断は、ヘテロダイマーポリペ

プチドを生成し、ここでこの抗体および治療剤は、単一のジスルフィド結合のみによって連結される。このような毒素の例は、リシンＡ鎖毒素である。

【０４２４】

特定の他の毒素化合物が利用される場合、非切断可能ペプチドスペーサーが、融合タンパク質の抗体および毒素化合物を作動可能に結合するために提供され得る。非切断可能ペプチドスペーサーとともに使用され得る毒素は、それら自体が、タンパク質分解切断によって、細胞傷害性ジスルフィド結合形態に変換され得る毒素である。このような毒素化合物の例は、Ｐｓｅｕｄｏｎｏｍａｓ外毒素化合物である。

【０４２５】

種々の化学治療剤および他の薬理学的薬剤が、ここで、抗体に首尾良く結合体化され、そして薬理学的に機能することを示した。調査されている例示的な抗新生物剤としては、ドキソルビシン、ダウノマイシン、メトトレキサート、ビンブラスチン、および種々の他のものが挙げられる。さらに、他の薬剤（例えば、ネオカルジノスタチン（ｎｅｏｃａｒｊｉｎｏｓｔａｔｉｎ）、マクロマイシン、トレニモン（ｔｒｅｎｉｍｏｎ）およびα－アマニチンが記載されている。これらの結合方法が、本明細書中での使用のために適合され得る。

【０４２６】

抗体またはＰＥ結合ペプチドに対する任意の共有結合が、機能的部位とは異なる部位で理想的になされるべきである。従って、組成物は、特に、得られる構築物がなお意図される抗原またはＰＥに結合し、そして結合される薬剤が、実質的に生物学的活性を実質的に維持し、および／または構築物から放出される場合に、生物学的活性を回復するように、有意に損なうことなく、その異図とされる機能を各領域が実行する、任意の操作様式で「連結」される。

【０４２７】

（Ｈ１．生化学架橋剤）

上記に提供される一般の情報に加えて、抗体またはＰＥ結合ペプチドは、特定の好ましい生化学架橋剤を使用して、治療剤または他の薬剤に結合体化され得る。架橋試薬は、２つの異なる分子の官能基を共に結ぶ分子架橋を形成するために使用される。段階的な様式にて２つの異なるタンパク質を連結するために、所望されないホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性架橋剤が、使用され得る。例示的なヘテロ二官能性架橋剤は、表Ｃにおいて参照される。

【０４２８】

【化３】

表C：ヘテロ二官能性架橋剤

リンカー	以下に対して反応性	利点および適用	架橋後のｽﾍﾟｰｻｰｱｰﾑの長さ
SMPT	第１級アミン スルフヒドリル	・より大きな安定性	11.2Å
SPDP	第１級アミン スルフヒドリル	・チオール化 ・切断性架橋	6.8Å
LC-SPDP	第１級アミン スルフヒドリル	・伸長したｽﾍﾟｰｻｰｱｰﾑ	15.6Å
ｽﾙﾎ-LC-SPDP	第１級アミン スルフヒドリル	・伸長したｽﾍﾟｰｻｰｱｰﾑ ・水溶性	15.6Å
SMCC	第１級アミン スルフヒドリル	・安定なﾏﾚｲﾐﾄﾞ反応基 ・酵素-抗体結合体 ・ﾊﾌﾟﾃﾝｰｷｬﾘｱﾀﾝﾊﾟｸ質結合体	11.6Å
ｽﾙﾎ-SMCC	第１級アミン スルフヒドリル	・安定なﾏﾚｲﾐﾄﾞ反応基 ・水溶性 ・酵素-抗体結合体	11.6Å
MBS	第１級アミン スルフヒドリル	・酵素-抗体結合体 ・ﾊﾌﾟﾃﾝｰｷｬﾘｱﾀﾝﾊﾟｸ質結合体	9.9Å
ｽﾙﾎ-MBS	第１級アミン スルフヒドリル	・水溶性	9.9Å
SIAB	第１級アミン スルフヒドリル	・酵素-抗体結合体	10.6Å
ｽﾙﾎ-SIAB	第１級アミン スルフヒドリル	・水溶性	10.6Å
SMPB	第１級アミン スルフヒドリル	・伸長したｽﾍﾟｰｻｰｱｰﾑ ・酵素-抗体結合体	14.5Å
ｽﾙﾎ-SMPB	第１級アミン スルフヒドリル	・伸長したｽﾍﾟｰｻｰｱｰﾑ ・水溶性	14.5Å
EDC/ｽﾙﾎ-NHS	第１級アミン カルボキシル基	・ﾊﾌﾟﾃﾝｰｷｬﾘｱﾀﾝﾊﾟｸ質結合体	0
ABH	糖質 非選択的	糖基と反応	11.9Å

ヘテロ二官能性架橋剤は、２つの反応基（一方は、一般に、第１級アミン基（例えば、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）と反応し、そして他方は、一般にチオール基（例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応する）を含む。第１級アミン反応基を通じて、この架橋剤は、あるタンパク質（例えば、選択された抗体、フラグメント、またはＰＥ結合ペプチド）のリジン残基と反応し得、このチオール反応基を通じて、第１のタンパク質と既に結び付けられている架橋剤は、他のタンパク質（例えば、凝血薬）のシステイン残基（遊離のスルフヒドリル基）と反応する。

【０４２９】

従って、組成物は、一般に、架橋の目的に利用可能な官能基を有するか、または有するように誘導体化される。この要件は、広汎な種々の基がこの様式において使用され得るという点で限定的であるとは考えられない。例えば、第一級アミン基または第二級アミン基

、ヒドラジド基またはヒドラジン基、カルボキシル基、アルコール基、ホスフェート基、あるいはアルキル化基は、結合および架橋のために使用され得る。

【０４３０】

架橋剤の２つの反応基の間のスペーサーアームは、種々の長さおよび化学組成を有し得る。より長いスペーサーアームは、結合体成分のより良好な可撓性を可能にし、その一方、架橋におけるいくつかの特定の成分（例えば、ベンゼン基）は、反応基にさらに安定性を、または種々の局面の作用に化学結合の耐性の増大（例えば、還元剤への耐性のジスルフィド結合）を与え得る。ペプチドスペーサー（例えば、Ｌ－Ｌｅｕ－Ｌ－Ａｌａ－Ｌ－Ｌｅｕ－Ｌ－Ａｌａ）の使用もまた、意図される。

【０４３１】

血中にて合理的な安定性を有する架橋剤が用いられることが好ましい。標的化剤および毒素因子または凝固因子を結合体においてに首尾よく用いられ得る、多くの型のジスルフィド結合含有リンカーが、公知である。立体的に妨害されるジスルフィド結合を含むリンカーが、インビボでより大きな安定性を生じることを証明し得、このことは、作用部位での結合の前に因子の放出を妨げる。従って、これらのリンカーは、連結剤の１つの好ましい群である。

【０４３２】

イムノトキシンにおける使用に最も好ましい架橋試薬のうちの１つは、ＳＭＰＴである。ＳＭＰＴは、隣接するベンゼン環およびメチル基により「立体的に妨害」されているジスルフィド結合を含む、二官能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、チオレート陰イオン（組織および血中に存在し得るグルタチオンのような）による攻撃から結合を保護し、それによって腫瘍部位への結合した薬剤の送達の前に結合体の脱カップリングを防ぐため際に役立つ機能を提供すると考えられる。ＳＭＰＴ剤はまた、本発明の二重特異性リガンドと組み合せて使用され得ることが意図される。

【０４３３】

多くの他の公知の架橋試薬のように、ＳＭＰＴ架橋試薬は、官能基（例えば、システインのＳＨまたは第一級アミン（例えば、リジンのε－アミノ基））を架橋する能力を与える。別の可能な型の架橋剤は、切断性ジスルフィド結合（例えば、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート）を含有する、ヘテロ二官能性感光性フェニルアジドを含む。Ｎ－ヒドロキシ－スクシンイミジル基は、第一級アミノ基と反応し、そしてフェニルアジド（光分解の際）は、任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【０４３４】

妨害された（ｈｉｎｄｅｒｅｄ）架橋剤に加えて、妨害されていないリンカーもまた、本明細書に従って用いられ得る。保護されたジスルフィドを含まないかまたは生成しないと考えられる、他の有用な架橋剤には、ＳＡＴＡ、ＳＰＤＰおよび２－イミノチオレンが挙げられる。このような架橋剤の使用は、当該分野において十分に理解されている。

【０４３５】

一旦結合体化されると、この結合体は、非結合体化抗体またはペプチドおよび他の薬剤から、ならびに他の夾雑物から分離される。多数の精製技術が、結合体を臨床的に有用にするに十分な程度の純度の結合体を提供する使用に利用可能である。サイズ分離（例えば、ゲル濾過、ゲル浸透、または液体高速クロマトグラフィー）に基づく精製方法は、一般に、最も有用である。他のクロマトグラフィー技術（例えば、Ｂｌｕｅ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ分離）もまた、使用され得る。

【０４３６】

（Ｈ２．生物学的に放出可能なリンカー）

任意の結合部分は、血液において合理的な安定性を有し、疾患、例えば、腫瘍部位に標的化する前に、付着した薬剤の実質的な放出を予防することが、好ましいけれども、特定の局面において、生物学的に放出可能な結合および／または選択的に切断可能なスペーサーまたはリンカーの使用が、意図される。「生物学的に放出可能な結合」および「選択的

に切断可能なスペーサーまたはリンカー」は、循環において合理的な安定性をなお有する。

【０４３７】

従って、本発明に従う抗体またはＰＥ結合ペプチドは、生物学的に放出可能な結合を介して１以上の治療剤に結合され得る。ＳｃＦｖフラグメントは、特定の実施形態において好ましいけれども、標的化薬剤または抗体の任意の形態は、使用され得、これは、インタクトな抗体を含む。

【０４３８】

「生物学的に放出可能な結合」または「選択的に加水分解可能な結合」は、唯一または優先的に特定の条件下で、放出可能、切断可能、または加水分解であるすべての結合を含む。これは、米国特許第５，４７４，７６５号および同第５，７６２，９１８号（各々は、本明細書中で特異的に参考文献として援用される）に記載されるように、ジスルフィド結合およびトリスルフィド結合ならびに酸標識結合が挙げられる。

【０４３９】

治療剤の本発明の抗体またはＰＥ結合ペプチドへの付着のための酸感応性スペーサーの使用は、特に意図される。このような実施形態において、治療剤または治療薬物は、細胞内の酸区画内で放出される。酸感応性放出は、細胞外で起こり得るが、特定の標識の後、好ましくは腫瘍部位に対して起こることが意図される。特定の現状で好ましい例としては、酸感応性スペーサーを介してコルヒチンまたはドキソルビシンに結合された２Ｃ３様抗体が挙げられる。抗体の糖質部分を介する付着はまた、意図される。このような実施形態において、治療剤または治療薬物は、細胞内の酸性区画内で放出される。

【０４４０】

抗体またはＰＥ結合ペプチドはまた、生物学的に放出可能な結合を介して治療剤の付着を可能にする官能基を導入するように誘導され得る。従って、抗体またはＰＥ結合ペプチドは、ヒドラジド基、ヒドラジン基、１級アミン基または２級アミン基において側鎖ターミネートを導入するように誘導され得る。治療剤は、Ｓｃｈｉｆｆの塩基結合、ヒドラゾンもしくはアシルヒドラゾン結合またはヒドラジドリンカーを介して結合体化され得る（米国特許第５，４７４，７６５号および同第５，７６２，９１８号、各々は、本明細書中で参考として特異的に援用される）。

【０４４１】

米国特許第５，４７４，７６５号および同第５，７６２，９１８号（各々は、本明細書中で参考として特異的に援用される）に記載されるように、抗体またはＰＥ結合ペプチドは、酵素感応性の１以上の生物学的に放出可能な結合（ペプチド結合、エステル、アミド、リン酸ジエステルおよびグリコシドが挙げられる）を介して治療剤に操作可能に付着され得る。

【０４４２】

本発明の特定の好ましい局面は、優先的に疾患部位、特に、腫瘍環境内に位置する、ペプチターゼおよび／またはプロテイナーゼに対する少なくとも第１切断部位を含むペプチドリンカーの使用に関する。従って、付着された治療剤の抗体媒介送達は、疾患部位または腫瘍環境内で特異的に切断を生じ、活性薬剤の特異的放出を生じる。特定のペプチドリンカーは、再構築に関する１以上の酵素によって認識される切断部位を含む。

【０４４３】

ウロキナーゼ、プロ－ウロキナーゼ、プラスミン、プラスミノゲン、ＴＧＦβ、スタフィロキナーゼ、トロンビン、第ＩＸａ因子、第Ｘａ因子またはメタロプロテイナーゼ（例えば、間質性コラゲナーゼ、ゲラチナーゼ、またはストロメライシン）に対する切断部位を含むポリペプチドリンカーは、特に好ましい。米国特許第６、００４、５５５、米国特許第５，８７７，２８９および同第６，０９３，３９９号は、さらなる記載ならびに標的薬剤－治療剤構築（生物学的に放出可能な結合ならびに選択的に切断可能なリンカーおよびペプチドを含む）を作製かつ使用する方法を可能にする目的のために、本明細書中で参考として特異的に援用される。特に、１９９９年３月２日に発行された米国特許第５，８

７７，２８９号は、さらなる記載ならびに標的薬剤－治療剤構築（ウロキナーゼ、プラスミン、トロンビン、第ＩＸａ因子、第Ｘａ因子またはメタロプロテイナーゼ（例えば、間質性コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、またはストロメライシン）によって腫瘍環境内で切断される選択的に切断可能なペプチドリンカーを含む）を作製かつ使用する方法を可能にする目的のために、本明細書中で特異的に参考として援用される。

【０４４４】

現状で好ましい選択的に切断可能なペプチドリンカーは、プラスミンまたはメタロプロテイナーゼ（「マトリックスメタロプロテアーゼ」または「ＭＭＰ」としても公知である）（例えば、間質性コラゲナーゼ、ゼラチナーゼまたはストロメリシン）に対する切断部位を含むリンカーである。本発明に関して有意に使用され得るさらなるペプチドリンカーとしては、例えば、プラスミン切断可能配列（例えば、プロウロキナーゼによって切断可能なもの）、ＴＧＦβ、プラスミノゲンおよびスタフィロキナーゼ；第Ｘａ因子切断可能配列；ＭＭＰ切断可能配列（例えば、ゼラチナーゼＡによって切断可能なもの）；コラゲナーゼ切断可能配列（例えば、ウシ皮膚コラーゲン（α１（Ｉ）鎖）、ウシ皮膚コラーゲン（α２（Ｉ）鎖）、ウシ軟骨コラーゲン（α１（ＩＩ）鎖）、ヒト肝臓コラーゲン（α_1（ＩＩＩ）鎖）、ヒトα_2Ｍ、ヒトＰＺＰ、ラットα_1Ｍ、ラットα_2Ｍ、ラット$\alpha_1$$Ｉ_3$（２Ｊ）、ラット$\alpha_1$$Ｉ_3$（２７Ｊ）、およびヒト線維芽細胞コラゲナーゼ自己分解切断部位が挙げられる。当業者に利用可能な知識に加えて、同一出願人の米国特許第６，３４２，２１９号、同第６，５２４，５８３号、同第６，３４２，２２１号および同第６，４１６，７５８号における表Ｂ２からの文書および配列が、このような切断可能な配列の使用を記載しそして可能にする目的で、本明細書中において具体的に援用される。

【０４４５】

（Ｈ３．二重特異性抗体）

二重特異性抗体は、一般的に、１つのアームが、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合し、そして二重特異的抗体が、抗原結合部位とは異なる部位において治療剤に結合する限り、使用され得る。

【０４４６】

一般に、二重特異性抗体の調製はまた、当該分野において周知である。１つの方法は、一方で、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に対して特異性を有する抗体を、他方で、治療剤を、別々に調製することを含む。ペプシンのＦ（ａｂ’γ）$_2$フラグメントを、２つの選択した抗体から調製し、続いて各々を還元し、別々のＦａｂ’$γ_{SH}$フラグメントを提供する。次に、カップリングする２つのパートナーの１つにあるＳＨ基を、ｏ－フェニレンジマレイミドのような架橋剤を用いてアルキル化し、遊離のマレイミド基を１つのパートナー上に提供する。次にこのパートナーを、チオエーテル結合の手段によって他方と結合させ、所望のＦ（ａｂ’γ）$_2$ヘテロ結合体を生成し得る。ＳＰＤＰまたはプロテインＡを用いて架橋を行うか、または三重特異性構築物を調製する他の技術が、公知である。

【０４４７】

二重特異性抗体を生成する他の方法は、２つのハイブリドーマを融合して、クアドローマ（ｑｕａｄｒｏｍａ）を形成することである。本明細書において使用する場合、用語「クアドローマ」は、２つのＢ細胞ハイブリドーマの融合産物を記載するために使用される。ここで、標準的な技術を用いて、２つの抗体産生ハイブリドーマを融合して、娘細胞を産生し、そして免疫グロブリン遺伝子のクローン型の両方のセットの発現を維持する細胞が、次いで選択される。

【０４４８】

クアドローマを産生する好ましい方法は、親ハイブリドーマの少なくとも１つの酵素を欠失する変異体の選択を包含する。次に、この第１の変異型ハイブリドーマ細胞株は、その連続する生存を妨げる、例えば、ヨードアセトアミドに致死的に曝露された第２のハイブリドーマの細胞に融合される。細胞融合は、致死的に処理されたハイブリドーマから、その酵素欠失についての遺伝子を獲得することにより、第１のハイブリドーマの救済、お

よび第１のハイブリドーマとの融合を介する第２のハイブリドーマの救済を可能とする。同一のアイソタイプであるが、異なるサブクラスの免疫グロブリンの融合が好ましいが、しかし必要ではない。好ましいクアドローマの単離のための代替的なアッセイが存在すれば、混合されたサブクラスの抗体は、使用可能である。

【０４４９】

より詳細には、クアドローマの開発およびスクリーニングの１つの方法は、第１の選択されたＭＡｂを分泌するハイブリドーマ株を得る工程、およびこのハイブリドーマを、必須の代謝酵素（ヒポキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴ））について欠失させる工程を包含する。ハイブリドーマの欠失変異体を得るために、細胞を、８－アザグアニンの漸増濃度（１×１０$^{-7}$Ｍ～１×１０$^{-5}$Ｍ）の存在下で増殖させる。変異体を、限界希釈によってサブクローニングし、そしてそのヒポキサンチン／アミノプテリン／チミジン（ＨＡＴ）感受性について試験する。この培養培地は、例えば、１０％　ＦＣＳ、２ｍＭ　Ｌ－グルタミンおよび１ｍＭ　ペニシリン－ストレプトマイシンを補充したＤＭＥＭからなり得る。

【０４５０】

第２の所望のＭＡｂを産生する相補的なハイブリドーマ細胞株を使用して、標準的な細胞融合技術によって、クアドローマを生成する。手短には、４．５×１０^{7}のＨＡＴ感受性の第１の細胞を、２．８×１０^{7}ＨＡＴ耐性の第２の細胞（不可逆的生化学的インヒビターであるヨードアセトアミドの致死用量（リン酸緩衝化生理食塩水中に５ｍＭ）で、融合前に３０分間氷上で前処理した）と混合する。細胞融合は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を使用して誘導し、そしてこの細胞を９６ウェルのマイクロ培養プレート中にプレートする。クアドローマを、ＨＡＴ含有培地を使用して選択する。二重特異性抗体含有培養物を、例えば、固相アイソタイプ特異的ＥＬＩＳＡおよびアイソタイプ特異的免疫蛍光染色を使用して、同定する。

【０４５１】

二重特異性抗体を同定するための、１つの同定実施形態において、マイクロタイタープレートのウェル（Ｆａｌｃｏｎ、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｌａｂｗａｒｅ）を、親ハイブリドーマ抗体の１つと特異的に相互作用し、そして両方の抗体との交差反応性を有さない試薬で、コートする。プレートを洗浄し、ブロックし、そして試験する上清（ＳＮ）を各ウェルに添加する。プレートを室温で２時間インキュベートし、上清を棄て、プレートを洗浄し、そして希釈したアルカリホスファターゼ－抗－抗体結合体を、室温で２時間添加する。プレートを洗浄し、そしてホスファターゼ基質（例えば、ｐ－ニトロフェニルホスフェート（Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ））を各ウェルに添加する。プレートをインキュベートし、３Ｎ　ＮａＯＨを各ウェルに添加して反応を停止し、そしてＥＬＩＳＡリーダーを使用して、OD_{410}値を測定する。

【０４５２】

別の同定実施形態において、ポリＬ－リジンを用いて前処理したマイクロタイタープレートを使用して、各ウェルに標的細胞の１つを結合し、次にその細胞を固定化し（例えば、１％　グルタルアルデヒドを使用する）、そして二重特異性抗体を、インタクトな細胞に結合するその能力について試験する。さらに、ＦＡＣＳ、免疫蛍光染色、イデオタイプ特異的抗体、抗原結合競合アッセイ、および抗体の特徴付けの分野において一般的な他の方法を、本発明の方法と組み合わせて使用し、好ましいクアドローマを同定し得る。

【０４５３】

クアドローマの単離に続いて、二重特異性抗体を他の細胞性産物から精製する。この精製は、免疫グロブリン精製の分野において当業者に公知の、種々のタンパク質単離手順によって達成され得る。抗体を調製する手段、および特徴付ける手段は、当該分野において周知である（例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、１９８８を参照のこと）。

【０４５４】

例えば、選択されたクアドローマの上清をプロテインＡセファロースカラムまたはプロ

テインＧセファロースカラムを通過させて、ＩｇＧを結合させる（アイソタイプに依存する）。次に結合した抗体を、例えば、ｐＨ５．０クエン酸緩衝液を使用して溶出する。ＢｓＡｂを含む溶出画分を、等張緩衝液に対して透析する。あるいは、溶出液をまた、抗－免疫グロブリンセファロースカラムを通過させる。次に、ＢｓＡｂを、３．５Ｍ　塩化マグネシウムを用いて溶出する。次に、この方法において精製されたＢｓＡｂを、例えば、上記の標的細胞のアイソタイプ特異的ＥＬＩＳＡおよび免疫蛍光染色アッセイによって、結合活性について試験する。

【０４５５】

精製されたＢｓＡｂおよび親抗体はまた、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動と、その後の銀染色またはクマシー染色によって、特徴付け、および単離され得る。この手順は、親抗体の一方が、他方の抗体よりも大きな分子量を有し、ＢｓＡｂのバンドが２つの親抗体の中間に移動する場合に、可能である。サンプルの還元は、２つの見掛け上異なる分子量を有する重鎖の存在を確認する。

【０４５６】

（Ｈ４．融合タンパク質および組換え発現）

アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体（９Ｄ２および３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）抗体を含む）および改善された特性を有する他の競合抗体、ならびにＰＥ結合ペプチドはまた、分子生物学技術を使用して融合タンパク質を作製するために使用され得る。任意の融合タンパク質が、任意の抗体、ＰＥ結合ペプチドおよび第二の薬剤または治療剤（本明細書中に開示される）ならびに当該分野で公知のものを使用して設計および作製され得る。融合タンパク質技術は、他の改変（例えば、ＣＤＲ配列の最適化、選択的に切断可能なペプチド配列を介する連結など）を有する融合タンパク質を調製するために容易に適合可能である。

【０４５７】

このような目的を達成するための組換えＤＮＡ技術の使用は、現在、当業者に標準的操作である。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、およびインビボ組換え／遺伝的組換えが挙げられる。さらに、ＤＮＡ合成およびＲＮＡ合成は、自動合成装置を使用して実施され得る（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９（本明細書中に参考として援用される）に記載される技術を参照のこと）。

【０４５８】

このような融合タンパク質の調製は、一般的に、所望の融合タンパク質をコードする単一のコード領域を調製するために、第１および第２のＤＮＡコード領域の調製、およびそのような領域をインフレームで機能的に連結または結合することを伴う。本発明の状況において、抗体配列は、治療剤をコードするＤＮＡ配列とインフレームで連結される。構築物のどの部分がＮ末端領域またはＣ末端領域として調製されるかが、特に関連するとは一般に考えられない。

【０４５９】

一旦、所望のコード領域が生成されると、発現ベクターが作製される。発現ベクターは、挿入されたＤＮＡ領域の上流に、そのＤＮＡの転写を促進するように作用し、そして従ってコードされる組換えタンパク質の発現を促進するように作用する１つ以上のプロモーターを含む。これが、「組換え発現」の趣意である。

【０４６０】

免疫結合体のいわゆる「組換え」バージョンを獲得するために、ベクターが、組換え細胞内で発現される。原核生物系または真核生物系における発現のためのＤＮＡセグメントの操作は、組換え発現における当業者に一般的公知の技術によって実施され得る。実質的に任意の発現系が、この発現において使用され得ると考えられる。

【０４６１】

本発明の免疫結合体は、真核生物発現系（例えば、ＣＨＯ細胞）において首尾良く発現され得る。しかし、Ｅ．ｃｏｌｉ　ｐＱＥ－６０のような細菌発現系が、構築物の大規模調製および引き続く精製のために特に有用であると考えられる。ｃＤＮＡはまた細菌系に

おいて発現され、発現されるそのコードタンパク質はβ－ガラクトシダーゼ、ユビキチン、Ｓｃｈｉｓｔｏｓｏｍａ ｊａｐｏｎｉｃｕｍグルタチオンＳ－トランスフェラーゼなどを伴う融合物として発現され得る。細菌発現は、使用の容易さ、およびそれによって得られる物質の品質に関して、真核生物発現を超える利点を有すると考えられる。

【０４６２】

微生物発現に関して、組換え宿主細胞における遺伝子の発現と関連して本発明の開示をなおさらに補充する目的のために、米国特許第５，５８３，０１３号；同第５，２２１，６１９号；同第４，７８５，４２０号；同第４，７０４，３６２号；および同第４，３６６，２４６号が、本明細書中で参考として援用される。

【０４６３】

組換え的に生成される免疫結合体は、ヒト投与のために精製および処方され得る。あるいは、免疫結合体コードする核酸は、遺伝子治療を通して送達され得る。裸の組換えＤＮＡまたはプラスミドが使用され得るが、リポソームまたはベクターの使用が好ましい。特定ウイルスが、レセプター媒介性エンドサイトーシスを介して細胞に進入する能力、および宿主細胞ゲノムに組込みそして安定的および効率的にウイルス遺伝子を発現する能力は、それらを、哺乳動物細胞内に外来遺伝子を移入させるための魅力的な候補にさせている。本発明における使用のために好ましい遺伝子治療ベクターは、一般的にウイルスベクターである。

【０４６４】

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノム中に組込むそれらの能力、大量の外来性遺伝物質を移入させるそれらの能力、広範なスペクトルの種および細胞型に感染するそれらの能力、および特定の細胞株にパッケージングされるそれらの能力に起因して、遺伝子送達ベクターとして見こまれている。他のウイルス（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、およびアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）（例えば、米国特許第５，１３９，９４１号（本明細書中で参考として援用される）に記載されるウイルス）もまた、遺伝子移入のためのベクターとして作用されるように操作され得る。

【０４６５】

外来性遺伝物質を受容し得るいくつかのウイルスは、それらが適応し得るヌクレオチドの数、およびそれらが感染する細胞の範囲において限定されるが、これらのウイルスは、遺伝子発現を首尾良くもたらすことが実証されている。しかし、アデノウイルスは、それらの遺伝産物を宿主ゲノム中に組込まず、従って遺伝子発現のために宿主の複製を必要としない。これは、迅速な遺伝子発現、効率的な遺伝子発現、異種遺伝子発現についてそれらを理想的に適合させる。複製欠損した感染性ウイルスを調製する技術は、当該分野において周知である。

【０４６６】

特定のさらなる実施形態において、遺伝子治療ベクターはＨＳＶである。ＨＳＶを魅力的なベクターにする因子は、ゲノムの大きさおよび組織化である。ＨＳＶは大きいので、複数の遺伝子または発現カセットを組込むことは、より小さな他のウイルス系よりもあまり問題ではない。さらに、変動する性能（例えば、時間的、強度）を有する種々のウイルスコントロール配列の利用能は、他の系におけるよりも高い程度で発現を制御することを可能にする。ウイルスが比較的少数でスプライシングされるメッセージを有し、遺伝子操作をさらに容易にすることもまた有用である。ＨＳＶはまた、操作が比較的容易であり、そして高い力価まで増殖され得る。

【０４６７】

もちろん、ウイルス送達系を使用する際には、所望されない夾雑物（例えば、不完全干渉ウイルス粒子または発熱物質）を本質的に含まないようにするために十分にビリオンを精製し、その結果、ベクター構築物を受容する細胞、動物、または個体において不都合な反応を全く引き起こさないことが所望される。ベクターを精製する好ましい手段としては、浮遊密度勾配の使用（例えば、塩化セシウム勾配遠心分離）が挙げられる。

【０４６８】
（Ｉ．結合および機能アッセイ）
本発明が動物およびヒトの処置レジメンにおいて有意な有用性を有するものの、多くの他の特異的および信頼できる使用（多くのインビトロ実施形態における特定の使用を含む）も有する。これらの使用の特定のものは、抗体、ペプチドおよび免疫結合体の特異的結合特性に関連する。本発明の構築物の各々が、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質に結合する少なくとも１つの抗体またはペプチド成分を含む点で、これらは、種々の結合実施形態（有用な結合アッセイを含む）において使用され得る。
【０４６９】
結合される薬剤の存在（関連する場合）は、有利な特性を提供するが、任意の結合アッセイにおける第１の抗体の有用性を否定しない。従って、適切な有用な結合アッセイは、本明細書中にさらに記載されるように、当該分野で一般的に使用されるもの（イムノブロット、ウェスタンブロット、ドットブロット、ＲＩＡ、ＥＬＩＳＡ、免疫組織化学、蛍光活性化細胞選別（ＦＣＳ）、免疫沈降、アフィニティークロマトグラフィーなどを含む。
【０４７０】
特定の標準的な結合アッセイは、イムノブロット、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡおよび関連アッセイのような、固体支持体マトリクス（例えば、ニトロセルロース、ナイロンまたはそれらの組合せ）上に固定される。他の重要なアッセイは、細胞を使用し、本発明の成分が、細胞表面において、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質を用いてアッセイに使用され得る。このようなアッセイは、前臨床試験（例えば、薬物の設計、作用の機構の試験および／または組み合わせた使用のための治療剤の選択に関する）において適用され得る。
【０４７１】
さらなるインビトロアッセイは、異常な細胞活性化および／またはアポトーシスに関連した疾患の診断に有用であり、細胞表面でのアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の存在の試験は、特に有用である。本発明の構築物は、このように、免疫組織化学において、新鮮凍結およびホルマリン固定の両方、パラフィン包埋組織ブロック；蛍光活性化細胞選別、フローサイトメトリーまたはフローマイクロフルオロメトリーと組み合わせて使用され得る。
【０４７２】
これらの本発明の構築物は、免疫沈降、抗原精製実施形態（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）（二重特異的抗体の場合さえ含む）、同時の一つ以上の抗原の一工程の迅速な精製；および本明細書中に提示される上表を与えられる当業者に公知の多くの他の結合アッセイにおいてさらなる実際的な使用を有する。
【０４７３】
本発明の構築物のなおさらなる実際的な使用は、機能的アッセイ（多くのインビトロおよびエキソビボのアッセイおよびシステムを含む）におけるコントロールとしてである。本発明の抗体、ペプチド、および結合体の結合特性および機能的特性が本明細書中に開示されるように特に特異的であるので、このような「コントロール」の使用は、実際に非常に価値がある。本発明のこのような実際的な適用からの利点があるアッセイとしては、例えば、細胞表面でのアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の検出に関するアッセイが挙げられる。これらのアッセイシステムはまた、インビトロまたはエキソビボで薬物スクリーニングアッセイへと開発され得、ここで、十分に規定された特性を有する生物学的材料の現在の提供（ｐｒｏｖｉｓｉｏｎ）が特に重要である。例えば、類似した、等価な、または改善された結合特性を有する低分子の選択におけるポジティブコントロールとして本発明の構築物を使用すること（例えば、薬物スクリーニングおよび開発において）。
【０４７４】
（Ｊ．薬学的組成物）
本発明の治療剤は、一般に、薬学的組成物として処方される。薬学的組成物は、少なく

とも本発明の第１の治療剤（薬学的に受容可能なキャリアまたは水性媒体中に、溶解または分散した）の生物学的または治療的有効量を含む。組み合わせ治療もまた意図され、そして同じ型の基礎をなす薬学的組成物を、単一医薬および組み合わせ医薬の両方について使用し得る。

【０４７５】

句「薬学的に受容可能、または薬理学的に受容可能」とは、必要に応じて、動物またはヒトに投与された場合、有害な、アレルギー性のまたは他の有害な反応を生じない分子全体または組成物をいう。獣医学的使用、本発明に等しく包含され、そして「薬学的に受容可能な」処方物は、臨床的および／または獣医学的使用の両方のための処方物を含む。

【０４７６】

本明細書において使用する場合、「薬学的に受容可能なキャリア」としては、任意のおよび全ての、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤および吸着遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質のための、そのような媒体および薬剤の使用は、当該分野において周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性成分と不適合である場合を除いて、治療的組成物中でのその使用が意図される。ヒトへの投与のために、調製物は、ＦＤＡ官庁の生物製剤の基準によって必要とされる、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度の基準を充たすべきである。補助的な活性成分もまた、組成物中に組込まれ得る。

【０４７７】

「単位用量」処方物は、特定の時機に合わせられた送達に適合される投与成分の用量または副用量を含む。例えば、例示的な「単位用量」処方物は、日用量もしくは日用量単位もしくは日副用量または週用量もしくは週用量単位もしくは週副用量などを含む処方物である。

【０４７８】

（Ｊ１．注射可能処方物）

本発明の治療剤は、しばしば、非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下、経皮を介する注射のための処方、またはぜん動投与および腫瘍もしくは疾患部位（腔内投与）中への直接滴下を含む他の経路のための処方）のために処方される。抗体、免疫結合体またはペプチド結合体を活性成分として含有する水性組成物の調製は、本明細書の開示を参照すれば、当業者に公知である。代表的には、そのような組成物は、水溶液または懸濁液のいずれかにおいて、注射可能な薬剤として調製され得る；注射前の液体への添加において、溶液または懸濁液を調製するための使用に適切な固体形態もまた調製され得る；そしてその調製物はまた、乳化され得る。

【０４７９】

注射での使用に適切な薬学的形態としては、滅菌水溶液または滅菌懸濁液；ゴマ油、ピーナッツオイル、または水性プロピレングリコールを含む処方物；および滅菌注射可能溶液または滅菌注射可能懸濁液の即時調製のための滅菌粉末、が挙げられる。全ての場合において、その形態は、滅菌であるべきであり、そして注射可能性が存在する程度に流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件下において安定であるべきであり、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の混入作用に対して、保護されるべきである。

【０４８０】

治療剤は、中性または塩の形態において、滅菌水性組成物中に処方され得る。遊離の塩基、または薬理学的に受容可能な塩としての治療剤の溶液は、界面活性剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース）と適切に混合された水中で調製され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸添加塩（タンパク質の遊離のアミノ基を用いて形成される）、および無機酸（例えば、塩酸またはリン酸）または有機酸（例えば、酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸）などを用いて形成される塩などが挙げられる。遊離のカルボキシ基を用いて形成される塩はまた、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは水酸化鉄（ＩＩＩ））および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン）などから誘導され得る。

【０４８１】
適切なキャリアとしては、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、ならびに植物油を含む、溶媒および分散媒体が挙げられる。多くの場合において、等張剤（例えば、糖類または塩化ナトリウム）を含むのが好ましい。適切な流動性は、例えば、コーティング剤（例えば、レシチン）の使用によって、分散の場合において必要とされる粒子サイズの維持によって、および／または界面活性剤の使用によって、維持され得る。
【０４８２】
貯蔵および使用の通常の条件下において、全てのそのような調製物は、防腐剤を含有し、微生物の増殖を防ぐべきである。微生物の作用の防止は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなど）によってもたらされ得る。注射可能な組成物の長期の吸収は、遅延型吸収剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の組成物中での使用によってもたらされ得る。
【０４８３】
処方の際、または処方前に、治療剤は、広範に透析され、所望されない低分子物質を除去するか、および／または、適切な場合、所望のビヒクル中へのより容易な処方のために凍結乾燥されるべきである。滅菌の注射可能溶液は、必要とされる量の活性薬剤を、適切な溶媒中に、上記に列挙した他の種々の成分とともに取り込まれ、必要に応じて、その後に濾過滅菌されることにより調製される。一般に、分散剤は、種々の滅菌活性成分を、塩基性分散媒体および上記に列挙される必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に取り込まれることにより、調製される。
【０４８４】
滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分、および以前に滅菌濾過されたその溶液由来の任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥およびフリーズドライ技術である。
【０４８５】
本発明に従う適切な薬学的組成物は、一般に、受容可能な薬学的希釈剤または賦形剤（例えば、滅菌水溶液）と混合された治療剤のある量を含み、意図される使用に依存して、ある範囲の最終濃度を生じる。調製の技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、第１６版、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ、１９８０（本明細書において参考として援用される）によって例示されるように、一般に当該分野において周知である。エンドトキシンの混入は、安全なレベルに最小限に維持されるべきである（例えば、０．５ｎｇ／ｍｇタンパク質未満）ことを理解するべきである。さらに、ヒトへの投与について、調製物は、ＦＤＡ官庁の生物製剤基準によって必要とされる、滅菌性、発熱性、一般的安全性および純度の基準を充たすべきである。処方の際に、抗体または免疫結合体溶液は、投薬量処方と適合する様式において、およびそのような治療的有効量において、投与される。
【０４８６】
（Ｊ２．徐放性処方物）
処方物は、種々の投薬形態（例えば、上記の注射可能な溶液の型）において容易に投与されるが、他の薬学的に受容可能な形態（例えば、錠剤、ピル、カプセルまたは経口投与のための他の固体、座剤、膣坐薬、経鼻溶液またはスプレー、エアロゾル、吸入剤、リポソーム形態など）もまた意図される。投与形態の型は、処置される疾患または障害に適合される。
【０４８７】
薬学的「遅放性」カプセルまたは「徐放性」組成物または調製物が、使用され得、そして一般的に適用可能である。徐放性処方物は、一般に、長期間にわたって一定の薬物レベルを生じるように設計され、そして本発明に従う治療剤を送達するために使用され得る。

遅放性処方物は、代表的に、疾患部の近位（例えば、腫瘍またはウイルス感染の部位）に移植される。

【０４８８】

徐放性調製物の適切な例としては、抗体または免疫結合体を含む固形疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形された物品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリックスの例としては、以下が挙げられる：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）またはポリ（ビニルアルコール））；ポリラクチド（例えば、米国特許第３，７７３，９１９号）；Ｌ－グルタミン酸およびγエチルＬ－グルタメートのコポリマー；非分解性エチレン－酢酸ビニル；分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（例えば、Ｌｕｐｒｏｎ　ＤｅｐｏｔＴＭ（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびロイプロリドアセテートからなる注射可能なミクロスフェア））；およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸。

【０４８９】

エチレン－酢酸ビニルおよび乳酸－グリコール酸のようなポリマーは、分子を１００日間にわたって放出し得、特定のヒドロゲルは、タンパク質をより短期間で放出する。カプセル化抗体が身体内に長時間残留する場合、３７℃で湿気に曝露される結果としてこれらは変性または凝集し得、従って生物学的活性を減少し、かつ／または免疫原性を変化する。合理的なストラテジーは、関与する機構に依存した安定化に利用可能である。例えば、凝集機構がチオ－ジスルフィド相互変換を介した分子間Ｓ－Ｓ結合形成に関与する場合、安定化は、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加物の使用、特定のポリマーマトリクス組成物の開発などによって達成される。

【０４９０】

（Ｊ３．リポソームおよびナノカプセル）

特定の実施形態において、リポソームおよび／またはナノカプセルもまた、治療剤とともに使用され得る。リポソームの処方および使用は、以下に要約されるように、当業者に、一般に公知である。本発明は、抗体、リポソームおよび化学療法剤の特定の組合せ（以下に記載される）を提供する。さらに、リポソーム処方物は、本発明の治療剤のいずれかの慣用的な成分として使用され得る。

【０４９１】

リポソームは、水性媒体中に分散されるリン脂質から形成され、そして自発的に多層の同心の二重層ビヒクル（多層ビヒクル（ＭＬＶ）とも称する）を形成する。ＭＬＶは、一般に、２５ｎｍ～４μｍの直径を有する。ＭＬＶの超音波処理は、中心に水溶液を含有する、直径２００～５００Åの範囲の小さな単層のビヒクル（ＳＵＶ）を生じる。

【０４９２】

リン脂質は、水中に分散される場合、水に対する脂質のモル比に依存して、リポソーム以外の多様な構造を形成し得る。低い比において、リポソームは、好ましい構造である。リポソームの物理学的特徴は、ｐＨ、イオン強度、および二価カチオンの存在に依存する。リポソームは、イオンおよび極性物質に対する低い浸透性を示し得るが、高温において、その浸透性を顕著に変化させる相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として公知の密接に充填された、規則正しい構造から、流体状態として公知の疎に充填された、より規則正しくない構造への変化を含む。これは、特徴的な相転移温度において生じ、そしてイオン、糖および薬物の浸透性を増加する。

【０４９３】

リポソームは、４つの異なる機構を通じて、細胞と相互作用する：マクロファージおよび好中球のような細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス；非特異的な弱い疎水的な力、もしくは静電的な力のいずれかによるか、または細胞表面成分との特異的な相互作用による細胞表面への吸着；リポソーム含有物の細胞質への同時放出をともなう、リポソームの脂質二重層の形質膜への挿入による形質細胞膜との融合；および、リポソームの内容物の会合をいずれもともなわない、リポソーム脂質の、細胞膜または細胞内（オルガネ

ラ）膜への移入、あるいはその逆。１つより多い機構が同時に作動し得るが、リポソームの処方を変化させることは、作動する機構を変更し得る。

【０４９４】

ナノカプセルは、一般に、安定にかつ再現性のある方法において、化合物を捕獲し得る。細胞内へのポリマー性の過剰負荷に起因する副作用を避けるために、そのような超微細粒子（約０．１μｍのサイズ）が、インビボで分解され得るポリマーを使用して設計されるべきである。これらの要求を満たす生分解性ポリアルキルーシアノアクリレートナノ粒子は、本発明における使用において意図され、そしてそのような粒子は、容易に作製され得る。

【０４９５】

（Ｊ４．　眼性処方物）

眼の多くの疾患（特に、脈管形成成分を有するもの）は、本発明によって処置され得る。例えば、眼の脈管新生疾患、年齢関連黄斑変性症、糖尿病性網膜症、未熟成の網膜症、角膜移植拒絶、脈管新生緑内障、水晶体後線維増殖症、ならびに角膜脈管新生または網膜／脈絡膜脈管新生と関連する他の疾患（本明細書中で以下に記載される）。

【０４９６】

従って、本発明の治療剤は、眼性溶液として使用するために適切な薬学的組成物の調製において有利に使用され得、この薬学的組成物は、硝子体内および／または房内（ｉｎｔｒａｃａｍｅｒａｌ）投与のための組成物を含む。前述の障害または他の障害の処置のために、治療剤は、従来の薬学的慣行（例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」第１５編、１４８８～１５０１頁（Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ）を参照のこと）に従って調製された眼性調製物の形態で処置の必要な非験体の眼に投与される。

【０４９７】

眼性調製物は、薬学的に受容可能な溶液、懸濁液または軟膏中に約０．０１～１重量％、好ましくは約０．０５～約０．５重量％の濃度で治療剤を含む。濃度のいくらかの変更は、使用する特定の化合物、処置される被験体の状態などに依存して必要に生じ、そして処置の担当者は、個々の被験体について最も適切な濃度を決定する。眼性調製物は、好ましくは、滅菌水溶液の形態であり、所望の場合、さらなる成分、例えば、防腐剤、緩衝液、弾力剤、酸化防止剤および安定剤、非イオン性湿潤剤または浄水剤、粘性増加剤などを含む。

【０４９８】

このような溶液において使用するための適切な防腐剤としては、塩化ベンズアルコニウム、塩化ベンズエトニウム、クロロブタノール、チメロサールなどが挙げられる。適切な緩衝液としては、約ｐＨ６とｐＨ８との間、好ましくは、約ｐＨ７とｐＨ７．５との間のｐＨを維持するために十分な量の、ホウ酸、炭酸水素ナトリウムおよびカリウム、ホウ酸ナトリウムおよびカリウム、炭酸ナトリウムおよびカリウム、酢酸ナトリウム、ビリン酸（ｂｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ）ナトリウムなどが挙げられる。適切な弾力剤は、デキストラン４０、デキストラン７０、デキストロース、グリセリン、塩化カリウム、プロピレングリコール、塩化ナトリウム、などであり、眼性溶液の塩化ナトリウム当量は、０．９±０．２％の範囲である。

【０４９９】

適切な酸化防止剤おおび安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、二亜硫酸水素ナトリウム、チオ亜硫酸ナトリウム、チオ尿素などが挙げられる。適切な湿潤剤および浄水剤としては、ポリソルベート８０、ポリソルベート２０、ポロキサマー２８２およびチロキサポールが挙げられる。適切な粘性増加剤としては、デキストラン４０、デキストラン７０、ゼラチン、グリセリン、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシメチルプロピルセルロース、ラノリン、メチルセルロース、ペトロラタム、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースなどが挙げられる。眼性調製物は、例えばドロップの形態で従来の方法によってか、または眼性溶液中に眼

を浸すことによって処置の必要な被験体の眼に局所的に投与される。

【０５００】

（Ｊ５．局所処方物）

広範な意味で、局所投与のための処方物は、口（頬側）を介してかつ皮膚を通して送達するための処方物を含む。「局所送達システム」はまた、投与される成分を含む経皮的パッチを含む。皮膚を通す送達は、所望の場合、イオン注入または電気的運搬によってさらに達成され得る。

【０５０１】

口において局所投与するための適切な処方物は、風味のある基礎原料の成分、通常は、ショ糖およびアカシアまたはトラガカントを含むロゼンジ；不活性基礎原料（例えば、ゼラチンおよびグリセリン）の活性成分またはショ糖およびアカシアを含む香錠；ならびに適切な液体キャリアで投与される成分を含むうがい薬が挙げられる。

【０５０２】

皮膚に局所投与するための適切な処方物としては、軟膏、クリーム、ゲルおよび泥膏（薬学的に受容可能なキャリアで投与される成分を含む）が挙げられる。局所使用（例えば、クリーム、軟膏およびゲルで）のための治療剤としては、当該分野で周知のような、脂肪性基剤または水溶性軟膏剤の調製物が挙げられる。例えば、これらの組成物は、野菜オイル、動物性脂肪、が挙げられ、そしてより好ましくは、石油から得た半個体炭化水素が挙げられ得る。使用される特定の成分は、白色軟膏、黄色軟膏、セチルエステルワックス、オレイン酸、オリーブオイル、パラフィン、ペトロラタム、白色ペトロラタム、鯨蝋、グリセリンデンプン、白色ワックス、黄色ワックス、ラノリン、無水ラノリンおよびモノステアリン酸グリセリルが挙げられ得る。種々の水溶性軟膏剤が、使用され得、グリコールエーテルおよび誘導体、ポリエチレングリコール、ポリオキシル４０ステアレート、ならびにポリソルベートが挙げられる。

【０５０３】

直腸投与のための処方物は、適切な塩基（例えば、ココアバターまたはサリチレートを含む）とともに坐剤として与えられ得る。窒投与のための適切な処方物は、さらなる活性成分（例えば、当該分野で適切であると知られるキャリア）を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、泥膏、包状物、またはスプレー処方物として与えられ得る。

【０５０４】

（Ｊ６．鼻性処方物）

鼻経路および呼吸器経路を介する局所送達は、種々の状態を処置するため（特に、本発明の抗ウイルス処置方法における使用のため）に意図される。これらの送達経路はまた、薬剤を全身性循環に送達するために適切である。従って、鼻性投与のための適切なキャリアにおける活性成分の処方物は、本発明内に含まれ、例えば、鼻性溶液、スプレー、エアロゾルおよび吸入抗原が挙げられる。キャリアが個体である場合、処方物は、例えば、２０～５００ミクロンの範囲の粒子サイズを有する粗散剤が挙げられ、例えば、鼻に近接して維持される散剤のコンテナから鼻経路を通る急速な吸入によって投与される。

【０５０５】

キャリアが液体である適切な処方物は、鼻投与において有用である。鼻溶液は、通常は、ドロップまたはスプレーで鼻経路に投与されるように設計される水溶液であり、そしてそれらが、多くの局面において鼻分泌と類似であり、通常の線毛作用が維持されるように調製される。従って、鼻水溶液は、通常、等張性であり、そして５．５～６．５のｐＨを維持するようにわずかに緩衝化される。さらに、必要な場合、眼性調製物において使用される防腐剤と類似の抗菌防腐剤および適切な薬物安定剤は、処方物中に含まれ得る。種々の市販の鼻性調製物は、公知であり、そして例えば、抗生物質および抗ヒスタミン剤が挙げられ、ぜん息予防に使用される。

【０５０６】

吸入薬および吸入剤は、薬物または化合物の患者の呼吸樹への送達のために設計される薬学的調製物である。蒸気または霧が、投与され、そして有効領域に到達する。この経路

はまた、薬剤を全身性循環に送達するために使用され得る。吸入薬は、鼻または口呼吸性経路によって投与され得る。吸入薬溶液の投与は、この液滴が十分に良質でかつサイズが均一であり、その結果、この霧が、細気管支に到達する場合にのみ、有効である。

【０５０７】

製品の別のグループ（吸入薬としても公知であり、そして時には、吸入剤といわれる）は、特異的送達システムの使用によって呼吸経路に運ばれる良質の散剤薬物または液体薬物（例えば、薬学的エアロゾル）を含み、液体ガス噴霧剤中に薬物の溶液または懸濁液を維持する。適切なバルブおよび口アダプターを通して放出される場合、吸入薬の測定用量は、患者の呼吸路に進められる。粒子サイズは、この型の調製物の投与において主に重要である。肺腔への穿通のための最適粒子サイズは、０．５～７μｍのオーダーであると、報告されてきた。良質の霧は、加圧エアロゾルによって産生され、それによって、それらの使用の利点が、考慮される。

【０５０８】

（Ｋ．診断および治療キット）

本発明はまた、処置方法、組合せ処置方法ならびに／または画像化および処置実施形態において使用するための、本発明の少なくとも１つの第１の治療剤（すなわち、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質およびに結合する、抗体、免疫結合体またはペプチド結合体）を含む診断キットおよび治療キットを提供する。このようなキットは、一般的に、少なくとも第１の適切な容器（または容器手段）、少なくとも１つの治療剤、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体、免疫結合体またはペプチド結合体の薬学的に受容可能な処方物を含む。キットは、例えば、前臨床的、臨床的および／または獣医学的実施形態での使用のための記載された指示書または電子指示書を備え得る。

【０５０９】

キットはまた、他の組成物、薬学的に受容可能な処方物および第２の生物学的および治療的薬剤（併用療法ならびに／または診断および画像化のためを含む）を含み得る。例えば、このようなキットは、任意の１つ以上のある範囲の化学治療剤、放射線療法剤または抗脈管形成剤、抗腫瘍細胞、抗腫瘍脈管構造または抗腫瘍間質抗体、免疫毒素またはコアグリガンド、抗ウイルス剤および／または診断成分または診断薬剤を含み得る。併用療法において使用するためならびに／または診断および画像化のための記載された指示書または電子指示書もまた含まれ得る。

【０５１０】

キットは、任意のさらなる成分を伴うかまたは伴わないで、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する第１抗体、免疫結合体またはペプチド結合体を含む単一容器を有し得るか、あるいは、これらは、各所望の薬剤のための異なる容器を有し得る。併用療法が提供される場合、単一の容器が、等しいモルの組合せで、または他方が過剰な一方の成分を有してのいずれかで予め混合され得る。あるいは、本発明の一次的な薬剤および第２の生物学的および治療的薬剤（例えば、第２の抗癌剤または抗ウイルス剤）、キットが、患者への投与の前に、キットの異なる容器内で別々に維持され得る。

【０５１１】

診断成分は、ほとんど大部分、少なくとも第２の容器（１つ以上の治療剤を含む他の容器または第１の容器とは異なる）で維持される。診断キットは、一次的治療剤と同じアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する標識された抗体またはペプチド、あるいは処置される疾患を診断するために適切な任意の他の薬剤を含み得る。キットは、インビトロでの使用、インビボでの使用のため診断剤、またはこのような薬剤の両方を含み得る。キットは、例えば、前臨床的、臨床的および／または獣医学的実施形態での使用のための記載された指示書または電子指示書を備え得る。

【０５１２】

インビトロでの免疫検出のために、抗体は、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートの壁）に結合し得るが、再構成のために抗体溶液または粉末が、好ましい。免疫検出キットは、好ましくは、少なくとも第１の免疫検出試薬を含む。キットの免疫検出試薬

は、種々の形態のいずれか１つ（例えば、インビボで使用される、抗体に結合するかまたは連結した検出可能な標識を含む）を取り得る。第２の結合リガンドに結合するかまたは連結した検出可能な標識もまた、企図される。例示的な二次リガンドは、第１の抗体に対する結合親和性を有する第２抗体である。

【０５１３】

本発明のキットでの使用のためのさらに適切な免疫検出試薬は、第２の抗体に対する結合親和性を有する第３の抗体とともに、第１の抗体に対する結合親和性を有する第２抗体を含む二成分試薬を含み、第三の抗体は、検出可能な標識に連結されている。多くの例示的な標識が当該分野において公知であり、全てのこのような標識が、本発明とともに使用され得る。これらのキットは、完全に結合体化された形態で、中間の形態で、またはキットの使用者によって結合体化されるように別々の部分として、のいずれかで抗体標識結合体を含み得る。画像化キットは、好ましくは、インビボ検出可能な標識に既に結合された標的薬剤または抗体を含む。しかし、標識および結合手段は、別々に供給され得る。

【０５１４】

診断キットのいずれの形態も、さらに、コントロール薬剤（例えば、適切なアリコートの生物学的組成物（標識されているかまたは標識されていない）を含み得、これは、検出アッセイのための検量線を調製するために使用され得る。

【０５１５】

このキットの成分が、１つ以上の液体中で提供される場合、液体は、好ましくは、水溶液であり、特に滅菌水溶液が好ましい。しかし、このキットの成分は、乾燥粉末において提供され得る。試薬または成分が乾燥粉末として提供される場合、この粉末は、適切な溶媒の添加によって再構成され得る。この溶媒もまたキット内の別の容器中で提供され得る。

【０５１６】

治療用キットおよび診断用キットの容器は、一般に、少なくとも１つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または他の容器手段を含み、これらの中で治療剤および任意の他の所望の薬剤が、好ましくは適切なアリコートで、配置され得る。少なくとも２つの別々の成分が好ましいので、キットは、好ましくは、少なくとも２つのこのような容器を含む。このキットは、滅菌の、薬学的に受容可能な緩衝液または他の希釈剤を含むための第３／第４の容器もまた、含み得る。

【０５１７】

このキットはまた、治療剤を動物または患者に投与するための手段（例えば、１つ以上の針またはシリンジ、あるいは点眼剤、ピペット、または他のそのような装置）を含み、その手段によって、この処方物が、動物に注入され得るか、または身体の疾患領域に適用され得る。本発明のキットはまた、代表的に、バイアルなど、および他の成分を、市販のために密接な拘束において含む手段（例えば、射出成形またはブロー成形したプラスチック容器）を含み、これらの手段の中で、所望のバイアルおよび他の装置が配置され、そして保持される。

【０５１８】

（Ｌ．免疫検出および画像化）

本発明はさらに、インビトロおよびインビボでの診断法および画像化法を提供する。このような方法は、診断情報、予後情報および／または画像情報（例えば、脈管形成疾患およびウイルス感染、好ましくは、腫瘍処置および画像化方法に関連する）を生成する際の使用に適用可能である。本発明の方法は、インビトロでの診断試験（例えば、サンプルが非侵襲的に得られ、好ましくは、高スループットアッセイにて試験され得るか、そして／または曖昧および確認における臨床診断が望まれる）を含む。インビボ診断および画像化の分野において、本発明の抗体およびペプチドは、１つ以上の検出可能な薬剤に連結され、そして必要に応じて、処置の前に第１工程として、脈管形成部位または腫瘍の画像を形成するために使用される。

【０５１９】

（Ｌ１．免疫検出法およびキット）

従って、本発明は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を結合、精製、除去、定量またはさもなければ一般には検出するため（例えば、活性化細胞およびアポトーシス細胞および関連する疾患の診断において使用するため）の、免疫検出法に関する。本発明の抗体（例えば、９Ｄ２および３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５））が、インビボ（下記）にて、単離された組織サンプル、生検またはスワブにおいて、そして／またはホモジナイズされた組織サンプルにおいて、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を検出するために使用され得る。このような免疫検出法は、明らかな診断的有用性を有するが、また、非臨床サンプルに（例えば、抗原サンプルの力価測定などにおいて）も適用を有する。

【０５２０】

種々の有用な免疫検出法の工程は、科学文献（例えば、Ｎａｋａｍｕｒａら、（１９８７、本明細書中に具体的に参考として援用される））に記載されている。一般には、免疫結合法は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を含むと疑われるサンプル（好ましくは、細胞表面にアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質を有することが疑われる細胞）を得る工程、およびそのサンプルを本発明の抗体（例えば、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５））と、免疫複合体の形成を可能にするに有効な条件下で接触させる工程を包含する。次いで、結合プロセスの間に形成される任意の免疫複合体が検出され、好ましくは、定量される。

【０５２１】

分析されるサンプルは、細胞サンプル（例えば、実験室において特定の試験条件下に曝露された細胞）であり得る。サンプルはまた、動物または患者（１つ以上の細胞型の活性化またはアポトーシスと関連する疾患を有することが疑われるもの）由来の生物学的サンプルであり得る。このようなサンプルは、組織切片または試料、生検、スワブ、またはスメア試験サンプル、ホモジナイズされた組織抽出物または分離もしくは精製されたこれらの形態であり得る。

【０５２２】

免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするに有効な条件下でかつそれを可能にするに十分な時間の間、選択した生物学的サンプルをその抗体と接触させることは、一般には、そのサンプルに抗体を単に添加し、そして存在する任意のアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質と免疫複合体を形成する（すなわち、結合する）に十分に長い時間その混合物をインキュベートすることである。この時点の後、そのサンプル－抗体組成物（例えば、組織切片、またはＥＬＩＳＡプレート）が、一般には洗浄されて、非特異的結合したすべての抗体種が除去されて、一次免疫複合体中の特異的に結合した抗体のみ検出することが可能になる。

【０５２３】

免疫複合体の検出は、当該分野で周知であり、そして多数のアプローチの適用を介して達成され得る。これらの方法は、一般的には、標識またはマーカー（例えば、当該分野で公知の任意の放射性、蛍光性、生物学的または酵素的な、タグもしくは標識）の検出に基づく。このような標識の使用に関する米国特許としては、第３，８１７，８３７号；同第３，８５０，７５２号；同第３，９３９，３５０号；３，９９６，３４５号；同第４，２７７，４３７号；同第４，２７５，１４９号および同第４，３６６，２４１号（各々が、本明細書中で参考として援用される）が挙げられる。色素形成基質との接触に際して有色生成物を生成する酵素の使用が、一般的に好ましい。二次結合リガンド（例えば、第２の抗体またはビオチン／アビジンリガンド結合配置）もまた、当該分野で公知であるように、使用され得る。

【０５２４】

検出において使用される本発明の抗体（例えば、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５））自体は、検出可能な標識に連結され得、次いでこの標識が簡単に検出され、それにより組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能になる。

【０５２５】

好ましくは、この一次免疫複合体は、本発明の抗体について結合親和性を有する第２の結合リガンドによって検出される。この場合において、その第２の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。この第２の結合リガンド自体は、しばしば抗体であり、従って、「二次」抗体と呼ばれ得る。この一次免疫複合体は、この標識された二次結合リガンドまたは抗体と、二次免疫複合体の形成を可能にするに有効な条件下かつそれを可能にするに十分な時間の間、接触される。次いで、この二次免疫複合体は、一般的には、非特異的に結合したすべての標識二次抗体またはリガンドを除去するために洗浄され、次いでその二次免疫複合体中の残りの標識が検出される。

【０５２６】

さらなる方法は、２工程アプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。第１の抗体に結合親和性を有する第２の結合リガンド（例えば、抗体）が、上記のように二次免疫複合体を形成するために使用される。洗浄の後、その二次免疫複合体は、その第２の抗体に結合親和性を有する第３の結合リガンドまたは抗体と、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするに有効な条件下かつそれを可能にするに十分な時間、接触させられる。この第３のリガンドまたは抗体は、そのようにして形成された三次免疫複合体の検出を可能にする、検出可能な標識に連結される。この系は、所望ならば、シグナル増幅を提供し得る。

【０５２７】

臨床的診断またはモニタリングは、種々の疾患（特に、細胞表面での増加したアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の曝露と関連するもの）を有する患者に適用され得る。アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の検出、あるいは正常な被験体由来の対応する生物学的サンプルのレベルと比較した、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質のレベルの上昇は、このような疾患を有する患者を示す。

【０５２８】

しかし、当業者に公知であるように、このような臨床診断は、この方法に基礎基づいて孤立しては行われないだろう。当業者は、バイオマーカーの有意な発現（ポジティブな同定を示す）とバイオマーカーの低レベル発現またはバックグラウンド発現との間を識別することに非常に精通している。実際、バックグラウンド発現レベルは、しばしば、「カットオフ」を形成するために使用され、このカットオフを超える染色の増加が、有意またはポジティブと記録される。

【０５２９】

（Ｌ２．インビボ画像化）

本発明は、種々のインビボ診断および画像化の実施形態を提供する。本発明の特定の局面は、インビボ診断および画像化について、新規な驚くべき有効な組成物に関する。例えば、本発明の新規な抗ＰＳ抗体の任意の１つ以上のパネル（好ましくは、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）抗体または類似の性質を有する競合する抗体）が、インビトロで検出可能な薬剤に連結されて、本発明の免疫診断結合体を形成する。抗体がこの分野において重要な発展を示しているものの、得られる免疫診断は、現在、アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の検出と連結されて、任意の以前に記載された診断実施形態または画像化実施形態において使用され得る。

【０５３０】

これに関して、本発明の抗体を含む免疫診断（９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）抗体または類似の性質を有する競合する抗体を含む）は、脈管血栓症（特に、心臓または心臓近く（例えば、深静脈血栓症、肺塞栓症、心筋梗塞、心房性細動、補綴心臓血管材料に伴う問題、発作など））を画像化する際に使用され得る。本発明のこのような組成物はまた、例えば、膿瘍、再狭窄、関節の炎症および止血性障害（例えば、動脈、冠状、静脈および大脳の塞栓など）のような状態において、活性化血小板を画像化する際に使用され得る。本発明の免疫診断組成物（好ましくは、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）抗体または類似の性質を有する競合する抗体を含むもの）がまた、アポトーシス細胞を検出する際に使用され得、これは、増加したまたは不適切なアポトーシスが生じる種々の

疾患の診断および画像化において使用され得る。

【０５３１】

本発明は、さらに、インビボ診断および画像化におけるある範囲の新規な方法を提供し、これには、本明細書中に提供される抗体のパネルの使用が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、ＰＩ、ＰＡおよびＰＧのような陰イオン性リン脂質が腫瘍の脈管構造に接近可能であり、安定な標的化可能マーカーであるという予期しない発見に基づいて、本発明は、ＰＩ、ＰＡおよびＰＧに結合する免疫診断剤の投与を含む腫瘍の診断および画像化のための方法を提供し、これは、固形腫瘍の脈管構造に特異的に局在化する。さらに、ウイルス感染細胞は、ＰＳ、ＰＥ、ＰＩ、ＰＡおよびＰＧ、好ましくはＰＳおよびＰＥのようなアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質に結合する免疫診断結合体を使用して、ここで検出され得、そしてウイル感染が診断され得る。

【０５３２】

本発明のインビボ画像化組成物および方法は、画像化それ自体で、または処置の前に信頼のある画像を形成するために身体の部位を予め画像化する際に使用され得る。好ましくは、画像化は、腫瘍の画像化である。これらの組成物および方法はまた、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質と関連する他の疾患または状態（例えば、細胞活性化および／またはアポトーシスを含むもの（脈管形成疾患、アテローム性硬化症、ウイルス感染、および診断目的もしくは予後目的または処置を設計するために内部画像が望ましい他のこのような状態を含む））の画像化および診断に適用され得る。

【０５３３】

これらの実施形態において、抗体およびペプチド（好ましくは、本発明の抗体（例えば、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）および類似の抗体））が、検出可能な標識に作動可能に結合、連結または結合体化される。「検出可能な標識」は、それらの特異的な機能特性、または化学的特徴に起因して検出され得る化合物あるいはエレメントであり、その使用により、それらが付着する成分が検出可能になり、そして所望であれば、さらに定量可能になる。インビボでの診断プロトコルまたは「画像化方法」のための抗体およびペプチド結合体において、非侵襲的方法を用いて検出され得る標識が必要である。

【０５３４】

抗体および結合リガンドにそれらを付着させる方法のような多くの適切な画像化剤が、当該分野において公知である（例えば、米国特許第５，０２１，２３６号および同第４，４７２，５０９号を参照のこと。両方とも本明細書中に参考として援用される）。特定の付着方法は、例えば、抗体に付着されたＤＴＰＡのような有機キレート剤を使用する金属キレート複合体の使用を含む（米国特許第４，４７２，５０９号）。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩のような結合剤の存在下で酵素と反応され得る。フルオレセインマーカーとの結合体は、これらの結合剤の存在下で、またはイソチオシアネートとの反応により、調製される。

【０５３５】

検出可能な標識の例は、常磁性イオンである。この場合、適切なイオンとしては、以下が挙げられる：クロム（ＩＩＩ）、マンガン（ＩＩ）、鉄（ＩＩＩ）、鉄（ＩＩ）、コバルト（ＩＩ）、ニッケル（ＩＩ）、銅（ＩＩ）、ネオジム（ＩＩＩ）、サマリウム（ＩＩＩ）、イッテルビウム（ＩＩＩ）、ガドリニウム（ＩＩＩ）、バナジウム（ＩＩ）、テルビウム（ＩＩＩ）、ジスプロシウム（ＩＩＩ）、ホルミウム（ＩＩＩ）、およびエルビウム（ＩＩＩ）（ガドリニウムが特に好ましい）。

【０５３６】

他の状況（例えば、Ｘ線画像化）において有用なイオンは、以下を含むがそれらに限定されない：ランタン（ＩＩＩ）、金（ＩＩＩ）、鉛（ＩＩ）および特にビスマス（ＩＩＩ）。蛍光標識には、ローダミン、フルオレセイン、およびレノグラフィンが挙げられる。ローダミンおよびフルオレセインは、しばしば、イソチオシアネート中間体を介して結合される。

【０５３７】

診断的適用のための放射性同位体の場合、適切な例としては、以下が挙げられる：^{14}炭素、^{51}クロム、^{36}塩素、^{57}コバルト、^{58}コバルト、銅^{67}、^{152}Ｅｕ、ガリウム^{67}、^{3}水素、ヨウ素^{123}、ヨウ素^{125}、ヨウ素^{131}、インジウム^{111}、^{59}鉄、^{32}リン、レニウム^{186}、レニウム^{188}、^{75}セレニウム、^{35}硫黄、テクネチウム^{99m}、およびイットリウム^{90}。^{125}Ｉは、しばしば、特定の実施形態において使用するために好ましく、そしてテクネチウム^{99m}およびインジウム^{111}はまた、しばしば、それらが低エネルギーでありかつ広範囲での検出に適しているために好ましい。

【０５３８】

本発明における使用のための放射性標識された抗体およびペプチドが、当該分野で周知の方法により生成され得る。例えば、放射性同位体金属イオンを抗体に結合するために、しばしば使用される中間体官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（ＤＴＰＡ）およびエチレンジアミンテトラ酢酸（ＥＤＴＡ）である。

【０５３９】

モノクローナル抗体はまた、ヨウ化ナトリウムまたはヨウ化カリウム、および次亜塩素酸ナトリウムのような化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼのような酵素酸化剤と接触することによりヨウ素化され得る。本発明による抗腫瘍抗体は、リガンド交換プロセスにより、例えば、二価のスズの溶液で過テクネチウム酸（ｐｅｒｔｅｃｈｎａｔｅ）を還元し、Ｓｅｐｈａｄｅｘカラム上でその還元されたテクネチウムをキレート化し、そしてこのカラムに抗体を適用することにより、テクネチウム^{99m}で標識され得る；または直接的標識技術により、例えば、過テクネチウム酸、$SNCl_2$のような還元剤、ナトリウム－カリウムフタレート溶液のような緩衝溶液、およびその抗体をインキュベートすることにより、標識され得る。

【０５４０】

上記の型の検出可能に標識された抗体および結合リガンドのいずれかが、画像化単独または処置の前に疾患部位または腫瘍の画像を形成するためのいずれかで、本発明の画像化の局面において使用され得る。いずれに方法においても、この方法は、一般的に、動物または患者に、非侵襲的な方法によって検出可能なマーカーに結合された抗体または結合リガンドの診断的有効量を投与する工程を包含する。抗体または結合リガンド－マーカー結合体は、疾患部位（例えば、腫瘍または腫瘍脈管構造）においてアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質の曝露を発現する細胞に局在化および結合するのに十分な時間を可能にする。次いで、患者は、検出可能なマーカーを同定するために、検出デバイスに曝露され、このようにして、疾患部位または腫瘍の画像を形成する。

【０５４１】

核磁気スピン－共鳴同位体（例えば、ガドリニウム）は、核磁気画像化装置を使用して検出され；そして放射性物質（例えば、テクネチウム^{99m}またはインジウム^{111}）は、ガンマシンチレーションカメラまたは検出器を使用して検出される。米国特許第５，６２７，０３６号はまた、検出可能に標識された構築物の個々の血液内への安全かつ効果的な導入に関するさらなるガイダンス、および例えば、ガンマシンチレーションカメラを使用するかまたは磁気共鳴測定によって体外的に検出可能な標識薬剤の分布を決定するための方法を提供する目的で、本明細書中において具体的に参考として援用される。

【０５４２】

画像化実施形態のための投薬量は、一般的に、治療用よりも少ないが、患者の年齢および体重に依存する。患者１人当たり、０．１ｍｇ、０．５ｍｇまたは約１ｍｇと約９ｍｇまたは１０ｍｇとの間、より好ましくは、約１ｍｇと約５～１０ｍｇの間の抗体または結合体リガンド－結合体の１回の用量が有用であると企図される。

【０５４３】

（Ｌ３．癌治療のための代理マーカー）

インビボ診断および画像化に関して、本発明は、さらに、癌治療のための代理マーカーとして使用するための組成物および方法を提供する。このような実施形態は、アミノリン

脂質および／または陰イオン性リン脂質に結合する抗体、好ましくは、インビボ検出可能な薬剤に連結された、ＰＳ、および最も好ましくは、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）抗体または競合抗体の使用に関する。

【０５４４】

現在の使用において多くの抗癌治療は、アポトーシスおよび壊死を誘導する。アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質（特に、ＰＳ）は、アポトーシス前およびアポトーシス細胞のマーカーである。従って、適切な抗体、好ましくは、９Ｄ２、３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）または競合抗体での画像化は、アポトーシス前細胞およびアポトーシス細胞を同定するために使用され得、従って、治療の進行に関する情報を提供し得る。これは、本明細書中において使用されるように、「癌治療のための代理マーカー」によって意味されることである。

【０５４５】

本発明の抗体（好ましくは、９Ｄ２または３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）抗体または類似の特性を有する競合抗体）の使用は、癌治療のための代理マーカーとしての特定の利点を提供する。例えば、アポトーシス前細胞を同定する能力は、特に有利である。抗体の特異性はまた、医師により意味のある画像化を提供する。また、これらの抗体の安全性プロフィールは、印象的であり、例えば、アネキシンが凝固と関連する欠点を受けるので、アネキシン対して利点を提供する。

【０５４６】

従って、上記の任意のインビボ診断および画像化方法が、単純に、癌治療を受ける患者における使用によって、癌の治療のための代理マーカーとして診断的使用のために適合され得る。

【０５４７】

（Ｍ．腫瘍処置）

本発明の重要な局面は、悪性疾患、腫瘍および脈管新生化腫瘍の処置に関する。これは、脈管新生が多かれ少なかれ重要である腫瘍、およびプロトロンビン血管を有する腫瘍を含む。良性腫瘍の処置が本発明に含まれ、例えば、聴覚神経腫、神経線維腫、トラコーマ、化膿性肉芽腫およびＢＰＨが挙げられる。血液の腫瘍（例えば、白血病）および骨髄の種々の急性または慢性の新生物形成疾患の処置もまた包含される。

【０５４８】

本発明は、任意の悪性腫瘍（脈管成分を有するかまたは有さないか関わらず）の処置に幅広く適用可能である。処置される腫瘍としては、固形腫瘍、特に癌腫（酸素および栄養の提供のための脈管成分を必要とする）が挙げられる。本発明を使用して処置され得る例示的な固形腫瘍としては、限定しないが、以下が挙げられる：肺、乳房、卵巣、胃、膵臓、咽頭、食道、精巣、肝臓、耳下腺、胆管、結腸、直腸、頚部、子宮、子宮内膜、腎臓、膀胱、前立腺、甲状腺、扁平細胞の癌、腺癌、小細胞癌、メラノーマ、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、神経芽細胞腫。

【０５４９】

本発明は、固形腫瘍を呈する任意の患者の処置における使用を企図される。一般的に、本発明は、全てのサイズの腫瘍（約０．３～０．５ｃｍ以上を含むもの、０．５ｃｍより大きいサイズの腫瘍、および約１．０と約２．０との間のサイズの腫瘍を呈する患者）を処置するために使用され得るが、ヒトにおいて見出される最も大きな腫瘍までを含む腫瘍がまた処置され得る。

【０５５０】

本発明が、一般的に、予防的（ｐｒｅｖｅｎｔｉｖｅ）または予防的（ｐｒｏｐｈｙｌａｃｔｉｃ）処置として意図されないが、本発明の使用は、中程度または大きなサイズのみの腫瘍を有する患者の処置に特に制限されない。本発明のこれらの局面の元にある多くの理由が存在する。例えば、中程度以上の原発性腫瘍を呈する患者はまた、転移腫瘍の種の初期段階で小さなサイズであることが考えられる種々の他の転移性腫瘍を有し得る。本発明の抗アミノリン脂質抗体または抗陰イオン性リン脂質抗体、あるいはＰＥ結合ペプチ

ド誘導体、あるいは組合せは、一般的に、患者の全身循環内に投与されることを考慮すると、これらは、自然に、二次のより小さな転移性腫瘍に対する効果を有するものの、これは、処置の最初の意図ではないかもしれない。さらに、全体としての腫瘍質量が単一の小さな腫瘍である状況においてさえ、特定の有利な抗腫瘍効果が、本書値の使用から生じる。

【０５５１】

本発明と関係する使用についてより適切な患者に関して本明細書中に提供されるガイダンスは、特定の患者のプロフィールが、本発明による処置についての患者の選択を補助し得るという教示として意図される。特定の患者の予備選択、または患者のカテゴリーは、癌を有する全ての患者の処置に関係する本発明の有用性を、いかなる方法でも否定しない。さらなる考慮は、本発明の抗体治療によって提供される腫瘍に対する攻撃が、腫瘍をさらなる治療処置を受けやすくさせ、その結果、引き続く処置は全体的な相乗効果を生じるか、完全な寛解または治癒を導きさえする。

【０５５２】

任意の特定の型の腫瘍が本発明を使用する処置から除外されることは考えられない。しかし、腫瘍細胞の型は、他の治療剤、特に化学療法剤および抗腫瘍細胞イムノトキシンを組合せた本発明の使用に関連し得る。本発明が、腫瘍脈管構造の標的化および破壊をその作用の様式内で含み、その脈管系は実質的または全体的に全ての固形腫瘍で同じであるために、本発明の方法論は、腫瘍細胞自体の特定の表現型または遺伝子型に無関係に、全ての固形腫瘍の処置に広範に、または全体的に適用可能であることが理解される。本明細書中に提示されるデータは、幅広い範囲の異なる腫瘍モデルにおいて印象的な結果を示すように思われる。

【０５５３】

治療的有効用量は、例えば、本明細書中に詳述される研究に示されるように、動物モデルからのデータを使用して、そしてある範囲の治療剤を使用する臨床的なデータから、容易に決定可能である。固形腫瘍を保持する実験動物は、臨床環境に移行する前に適切な治療用量を最適化するために、しばしば使用される。このようなモデルは、効果的な抗癌ストラテジーを予測する際に非常に信頼性があることが公知である。例えば、固形腫瘍を保持するマウス（例えば、本実施例で使用される）は、前臨床試験において広範に使用される。本発明者らは、このような分野で受容されるマウスモデルを使用して、最小の毒性で有益な抗腫瘍効果を与える治療剤の作用範囲を決定した。

【０５５４】

本発明に関連して付随する安全性の利益を考慮して腫瘍治療の点で、他の脈管治療を使用する成功に関する化学文献および特許文献を参照し得る。例として、米国特許第５，８５５，８６６号；同第５，８７７，２８９号；同第５，９６５，１３２号；同第６，０５１，２３０号；同第６，００４，５５５号；同第５，７７６，４２７号；同第６，００４，５５４号；および同第６，０３６，９５５号；ならびに同第６，０９３，３９９号の各々が挙げられ、これらは、本発明に適用され得る、このような薬剤の使用をさらに記載する目的で、本明細書中に参考として援用される。米国特許第６，３１２，６９４号および同第６，４０６，６９３号は、ＰＳおよびＰＥならびに関連する免疫結合体に対する非結合体化抗体を使用する投薬および処置についてのガイダンスについて、本明細書中に参考としてさらに具体的に援用される。

【０５５５】

当該分野で公知のように、臨床処置に進める前に、前臨床試験と関係するガイドラインとして使用され得る、現実的目的が存在する。しかし、受容されるモデルにおいてすでに実証された安全性に起因して、本発明の前臨床試験は、有効性を確認するというよりも、最適化である。従って、前臨床試験は、最も有利な薬剤、用量または組み合わせを選択するために利用され得る。

【０５５６】

任意の一定して検出可能な抗腫瘍効果（検出可能な腫瘍脈管構造後退、血栓および／ま

たは破壊、ならびに腫瘍壊死を含む）を生じる任意の抗体用量、組合せ方法または医薬が有用な発明をなお規定する。退行、血栓、破壊および壊死効果は、好ましくは、約１０％と約４０～５０％との間の腫瘍血管および腫瘍組織において観察され、約５０％と約９９％との間までのこのような効果が観察される。本発明はまた、腫瘍の下流の脈管に効果的であり得る（すなわち、特に腫瘍から放出されるサイトカインがこれらの脈管に作用し、それらの抗原性プロフィールを変化させるので、少なくとも排出脈管のサブセットを標的化する）。

【０５５７】

治療の抗腫瘍効果が、この範囲の下端に向かうような状況下でさえ、この治療が、特定の腫瘍の状況における他の全ての公知の治療となお等価であるか、またはより効果的でさえあることがあり得ることもまた理解される。特定の腫瘍が中期間または長期間効果的に処置され得ないことは臨床医に不幸にも明らかであるが、特に一般的に提案されている他のストラテジーと少なくともほぼ同様に効果的である場合、それは、本発明の治療の有用性を否定しない。

【０５５８】

血管新生化腫瘍の処置のための、抗アミノリン脂質抗体または陰イオン性リン脂質抗体、ＰＥ結合ペプチド誘導体または組み合わせの治療薬の適切な用量を設計する際に、臨床投与のための適切な用量に到達するために、本明細書中に記載される動物研究および文献における技術的常識から容易に推定し得る。このコンバージョンを達成するために、当業者は、実験動物の単位質量あたり投与される薬剤の質量を計算し、そして好ましくは、実験動物とヒト患者との間の体表面積の差異を計算する。全てのこのような計算は、当業者に周知でありそして慣用的である。

【０５５９】

例えば、マウス研究において使用される治療剤の首尾良い用量を採用し、そして質量および表面積に基づいて標準計算を適用する場合、ヒト患者における使用のため薬剤の有効用量は、患者当たり約１ｍｇと約５００ｍｇとの間の抗体、好ましくは、患者当たり約１０ｍｇと約１００ｍｇとの間の抗体である。

【０５６０】

従って、この情報を使用して、本発明者らは、ヒト投与のための有用な低用量は、患者当たり、約１ｍｇ、２ｍｇ、３ｍｇ、４ｍｇ、５ｍｇ、６ｍｇ、７ｍｇ、８ｍｇ、９ｍｇ、１０ｍｇ、１５ｍｇ、２０ｍｇ、２５ｍｇ、または約３０ｍｇなどであり；そしてヒト投与のための有用な高用量は、患者当たり約２５０ｍｇ、２７５ｍｇ、３００ｍｇ、３２５ｍｇ、３５０ｍｇ、３７５ｍｇ、４００ｍｇ、４２５ｍｇ、４５０ｍｇ、４７５ｍｇまたは約５００ｍｇなどである。ヒト投与のための有用な中程度の用量は、患者当たり、約３５ｍｇ、４０ｍｇ、５０ｍｇ、６０ｍｇ、７０ｍｇ、８０ｍｇ、９０ｍｇ、１００ｍｇ、１２５ｍｇ、１５０ｍｇ、１７５ｍｇ、２００ｍｇ、または約２２５ｍｇなどであることが企図される。一般的に、患者当たり、約５～１００ｍｇ、約１０～８０ｍｇ、約２０～７０ｍｇ、約２５～６０ｍｇ、または約３０～５０ｍｇの間の用量範囲が好ましい。しかし、上記に引用されたいずれかの例示的用量を用いる任意の特定の範囲または特定の記載された範囲の間の任意の中間の値が意図される。

【０５６１】

記載された範囲にかかわらず、本明細書中に提示されるパラメータおよび詳細なガイダンスを考慮して、活性な範囲または最適な範囲にさらなる変更が、本発明内において包含される。従って、特定の薬剤と組合わせにおいて、低用量がより適切であり得、そして特に、本発明の構築物の増強された安全性を考慮すると、高用量がなお許容され得ることは理解されるべきである。ヒトまたはヒト化抗体およびヒトエフェクターの使用は、健常組織における有意な毒性または副作用の機会をさらに減少して、本発明を臨床使用のためにさらに安全にする。

【０５６２】

本発明の治療レジメの意図は、一般的に、受け入れられない毒性に関連するレベル未満

の用量をなお維持しながら、有意な抗腫瘍効果を生成することである。用量自体の変化に加えて、投与レジメはまた、処置ストラテジーを最適化するために採用され得る。現在の好ましい処置ストラテジーは、約１ｍｇ～５００ｍｇ、好ましくは、約１０ｍｇ～１００ｍｇの抗体、あるいはこれらを含む治療カクテル（ｔｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ｃｏｃｋｔａｉｌ）を、約７日間に約３回で投与することである。例えば、用量は、およそ１日目、およそ３日目または４日目、および６日目または７日目に与えられる。

【０５６３】

特定の用量自体の投与において、好ましくは薬学的受容可能な組成物（無菌性、発熱性、純度および一般的な安定性のＦＤＡ基準に従う）を患者に全身的に提供する。静脈内注射が、一般的に好ましく、最も好ましい方法は、約１時間または２時間などの期間にわたって連続注入を使用することである。本発明を使用する処置の前にこのようなパラメータを決定することは必要ではないが、本明細書中に詳述される研究が、注射の約１２～２４時間以内に固形腫瘍の血管において特異的に観察される少なくともいくらかの血栓を生じること、および腫瘍細胞自体が、約２４～７２時間以内に死滅し始めることに留意すべきである。広範な腫瘍壊死は、一般的に、次の約４８～９６時間で観察され、６０％までおよび６０％を超える壊死が、観察される。

【０５６４】

当然、広範な使用の前に、臨床試験が実施される。臨床試験の実行の種々のエレメント（患者の処置およびモニタリングを含む）は、本発明の開示に照らして当業者に公知である。以下の情報は、このような治験を確立する際の使用のための一般的なガイドラインとして提示されている。

【０５６５】

第１の処置研究について選択される患者は、従来の治療の少なくとも１つの過程に応答せず、そして身体検査、実験技術、および／またはＸ線撮影手段によって決定されるような客観的に測定可能な疾患を有する。いずれの化学療法も、本研究に入る少なくとも２週間前に停止する。マウスモノクローナル抗体または抗体部分を使用する場合、患者はマウス免疫グロブリンに対するアレルギーの病歴を有さない。

【０５６６】

特定の利点は、三管腔ポート（ｔｒｉｐｌｅ　ｌｕｍｅｎ　ｐｏｒｔ）を有する中心静脈カテーテルの留置を使用する際に見出される。この治療は、例えば、０．２２μフィルターを使用して濾過され、そして適切に（例えば、生理食塩水で）１００ｍｌの最終用量に希釈される。使用の前に、この試験サンプルはまた、同様の様式で濾過され、そしてA_{280}を測定することによって濾過の前後でその濃度を評価される。予想される回収率は、８７％～９９％の範囲内であり、次いで、タンパク質の損失についての調整が補正される。

【０５６７】

この構築物は、約４～２４時間の期間にわたって投与され、各患者は、２～７日間の間隔で２～４回の注入を受ける。投与はまた、７日間にわたって一定速度の注入によって実施され得る。任意の用量レベルで与えられる注入は、観察される任意の毒性に依存する。従って、グレードＩＩの毒性が、任意の単回注入後または一定速度注入の間の特定の期間で達した場合、毒性が改善されない限り、さらなる用量を中止するか、またはその一定速度注入を停止する。漸増用量は、約６０％の患者が、任意のカテゴリーにおいて、受け入れられないグレードＩＩＩまたはＩＶの毒性を示すまで、患者群に投与される。この値の２／３である用量が、安全用量として定義される。

【０５６８】

身体検査、腫瘍測定、および実験室試験は、もちろん、処置前および１ヶ月後までの間隔で実施される。実験室試験としては、全血球計数、血清クレアチニン、クレアチニンキナーゼ、電解質、尿素、ＳＧＯＴ、窒素、ビリルビン、アルブミン、および全血清タンパク質が挙げられる。処置後６０日までに採取された血清サンプルは、投与された構築物、およびそのいずれかの部分に対する抗体の存在について放射免疫アッセイによって評価さ

れる。任意の標準的アッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡまたはＲＩＡのような）を使用する、血清の免疫学的分析は、治療剤の薬物動態およびクリアランスの評価を可能にする。

【０５６９】

抗腫瘍応答を評価するために、患者を、最後の注入の、４８時間後～１週間後に、そして再び３０日後に試験するべきである。触知可能な疾患が存在した場合、全ての塊の二つの垂直直径（ｐｅｒｐｅｎｄｉｃｕｌａｒ　ｄｉａｍｅｔｅｒ）を、処置の間毎日、治療完了後１週間以内、および３０日で測定すべきである。触知可能でない疾患を測定するために、連続ＣＴスキャンが、胸部、腹部、および骨盤の全体を通して、１ｃｍ間隔で、４８時間～１週間で、そして３０日で再び実施され得る。組織サンプルはまた、組織学的におよび／あるいはフローサイトメトリーにより、疾患部位から、または適切であれば血液もしくは体液サンプルからの生検を用いて評価されるべきである。

【０５７０】

臨床応答は、受容可能な基準により規定され得る。例えば、完全な応答は、処置の１カ月後、全ての測定可能な腫瘍がみられないことにより規定され得る。これに対し、部分的な応答は、処置の１カ月後に、増大を示す腫瘍部位なしでの、全ての評価可能な腫瘍小節の垂直直径の積の和の５０％またはそれ以上の減少により規定され得る。同様に、混合応答は、処置の１カ月後に、一つ以上の部位での進行を伴った、全ての測定可能な病巣の垂直直径の積の５０％以上の減少により規定され得る。

【０５７１】

上記のような臨床試験の結果を鑑みて、さらにより正確な処置レジメが処方され得る。そうであったとしても、投与量におけるいくらかのバリエーションは、処置される被験体の状態に依存して、後で必要であり得る。投与に責任をもつ医者は、本開示に鑑みて、個々の被験体に適切な用量を決定し得る。このような最適化および調節は、当該分野において慣用的に実施され、そして過剰な実験量をけっして反映しない。

【０５７２】

Ｎ．併用腫瘍療法

本発明の処置方法は、患者が示す特定の腫瘍、疾患または障害の処置において一般に使用される任意の他の方法と組み合わされてもよい。詳細な治療アプローチがそれ自体で患者の状態に対して有害であることが知られておらず、そして本発明の抗アミノリン脂質または抗陰イオン性リン脂質に基づく処置に有意に反作用しない限り、本発明とのその組み合わせが考えられる。

【０５７３】

非悪性疾患の併用療法も意図される。このような特定の例は、良性の前立腺過形成（ＢＰＨ）であり、これは当該分野で現在行なわれる他の処置との組み合わせで処置されてもよい。例えば、ＰＳＡのようなＢＰＨ内に局在するマーカーに対する免疫毒素の標的化。

【０５７４】

固体腫瘍処置に関して、本発明は、古典的なアプローチ、例えば外科手術、化学療法、放射線療法、サイトカイン療法、血管新生抑制などと組み合わせて用いられ得る。従って、抗体、免疫複合体またはペプチド複合体を、外科手術または放射線治療と同時に、または前後に用いる；あるいは従来の化学療法剤または放射線治療剤、サイトカイン、血管新生阻害因子、アポトーシス誘導性因子、標的化免疫毒素またはコアグリガンドなどとともに、またはその前後に患者に投与する、併用療法を本発明は提供する。適切な治療因子の多くの例は、本発明の免疫複合体の局面と関連して上記されている。治療複合体の一部としての使用のために最初に記載された任意の因子はまた、本発明の併用療法において別々に用いられてもよい。

【０５７５】

外科手術に関しては、任意の外科的介入を本発明と組み合わせて実施してもよい。放射線療法と組み合わせて、ＤＮＡ損傷を腫瘍細胞内に局所的に誘導するための任意の機構、例えば、γ放射線、Ｘ線、ＵＶ照射、マイクロ波およびさらには電子発光などが考えられる。腫瘍細胞への放射性同位体の指向性の送達もまた考えられ、これは、標的化抗体また

は他の標的化方法と組み合わせて用いられ得る。

【０５７６】

ガン処置における物質の組み合わせの一般的使用が周知である。例えば、米国特許第５，７１０，１３４号（参考として本明細書に援用される）は、非毒性物質または「プロドラッグ（ｐｒｏｄｒｕｇｓ）」と組み合わせて腫瘍における壊死を誘導する成分を開示する。壊死的プロセスによって自由になる酵素は、非毒性の「プロドラッグ（ｐｒｏｄｒｕｇ）」を毒性の「薬物（ｄｒｕｇ）」へ切断し、これが腫瘍細胞死をもたらす。また、米国特許第５，７４７，４６９号（参考として本明細書において援用される）は、ｐ５３およびＤＮＡ損傷因子をコードするウイルスベクターの併用使用を開示する。任意のこのような類似のアプローチを本発明とともに用いることができる。

【０５７７】

１つ以上の因子を、本発明の抗体、免疫複合体およびペプチドに基づく治療剤と組み合わせて用いる場合、併用結果が、各々の処置を別々に行なう場合に観察される効果の相加的なものである必要はない。少なくとも相加作用が一般に所望されるが、単一での治療の１つを上回る抗腫瘍効果の任意の増大が有益である。また、併用処置が相乗作用を示すための特定の要件はないが、これは特に見込みがあって有利である。

【０５７８】

Ｎ１．第二の抗ガン剤の選択

本明細書において用いる場合、本発明の「一次治療因子（ｐｒｉｍａｒｙ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ａｇｅｎｔｓ）」は、抗アミノリン脂質もしくは抗陰イオン性リン脂質の抗体、免疫複合体またはＰＥ結合ペプチド誘導体および結合体である。本明細書において用いる場合、「二次治療因子（ｓｅｃｏｎｄａｒｙ　ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　ａｇｅｎｔｓ）」は、第二の、別個の治療因子または抗ガン剤、すなわち、一次治療因子「以外の（ｏｔｈｅｒ　ｔｈａｎ）」治療剤または抗ガン剤である。任意の二次治療因子は、本発明の併用療法において用いられ得る。また、二次治療因子または「二次抗ガン剤」は、以下の手引きに従って、相加作用、相加作用より大きい作用および潜在的に相乗的な作用を達成するという観点で選択され得る。

【０５７９】

併用された抗腫瘍治療を行なうために、動物または患者に、本発明の抗アミノリン脂質もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、免疫複合体またはＰＥ結合ペプチドに基づく治療剤を、別の、すなわち、第二の別個の抗ガン剤と組み合わせて、その動物または患者において、その併用された抗腫瘍作用を得るのに有効な様式で、単に投与する。従って、この因子は、腫瘍または腫瘍脈管構造内に組み合わされて存在し、その腫瘍環境において組み合わせた作用をするのに有効な量で、かつ有効な時間で提供される。この目的を達成するために、本発明の一次治療剤および第二の別個の抗ガン因子を動物に実質的に同時に、単一の組成物として投与してもよく、または異なる投与経路を用いて２つの別個の組成物として投与してもよい。

【０５８０】

あるいは、本発明の抗アミノリン脂質もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、免疫複合体、またはＰＥ結合ペプチドに基づく治療剤は、例えば、数分から数週間の間隔で、第二の別個の抗ガン剤と前後してもよい。本発明の一次治療剤および第二の別個の抗ガン剤が動物に別々に適用される特定の実施形態では、各々の因子は腫瘍に対して有利に組み合わされた効果をさらに発揮することができるように、各々の送達の間に長時間経過して失効しないことを確実にする。このような場合、腫瘍を両方の因子と、互いの約５分～約１週内に、より好ましくは互いの約１２～７２時間内に、最も好ましくはわずか約１２～４８時間の遅延時間で、接触させることを考慮する。

【０５８１】

離れたタイミングの併用療法のための二次治療因子は、以下に考察される規準を含む、特定の規準に基づいて選択され得る。しかし、１つ以上の第二の別個の抗ガン剤の事前の投与または引き続く投与の選択の優先は、所望の場合に実質的に同時投与でそれを使用す

ることを妨げない。

【０５８２】

第二に、本発明の一次治療因子の「前の（先立った）（ｐｒｉｏｒ　ｔｏ）」投与のために選択され、そして増大されかつ潜在的に相乗的である作用を達成するように設計された別個の抗ガン剤は、腫瘍脈管構造内にアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質の発現を誘導する因子を含む。例えば、局所的なカルシウム産生を刺激して、原形質膜の外面へＰＳおよび他のリン脂質を移動する膜輸送因子を活性化し、腫瘍内皮細胞を傷害し、前アポトーシス性変化を生じ、そして／または腫瘍内皮細胞においてアポトーシスを誘導する因子は一般に、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現を増大させる。このような因子の例は、ドセタキセルおよびパクリタキソールである。次いで、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質は、本発明の抗体を用いて標的され得、これによって全体的な治療効果を増幅して、また宿主エフェクターを介した攻撃の増大が得られる（補体、ＡＤＣＣ、抗体媒介性食作用、ＣＤＣ）。

【０５８３】

血管形成、再構築または活性化内皮細胞についての選択性を有する薬物、例えば、腫瘍血管には存在するが、正常な休止期の血管には存在しない薬物がまた、腫瘍内皮細胞の表面上でＰＳおよび他のリン脂質の露出を選択的に生じるために用いられ得る。このような因子の例は、コンブレタスタチンおよびドセタキセルである。これもやはり、抗体結合の増大および宿主エフェクター機構の開始の増強をもたらす。

【０５８４】

第二に、本発明の一次治療因子に「引き続く（ｓｕｂｓｅｑｕｅｎｔ　ｔｏ）」投与のために選択された、そして増大されかつ潜在的に相乗的な作用を達成するために設計された別個の抗ガン剤としては、この一次治療因子の効果から利益がある因子が挙げられる。本発明の抗アミノリン脂質もしくは抗陰イオン性リン脂質抗体、免疫複合体、またはペプチドに基づく治療剤は、腫瘍破壊を生じる。従って、引く続く投与のための有効な第二の、別個の抗ガン剤としては、転移を阻害する血管新生阻害因子；細胞内抗原に特異的な抗体がインビボにおいて悪性細胞から接近可能になるように壊死性腫瘍細胞を標的する因子（各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第５，０１９，３６８号、同第４，８６１，５８１号および同第５，８８２，６２６号）；および末梢で生存し得る任意の腫瘍細胞を攻撃する、化学療法剤および抗腫瘍細胞免疫複合体が挙げられる。

【０５８５】

いくつかの状況では、処置の期間を有意に延ばすことが所望され得、各々の投与の間に、数日間（２、３、４、５、６または７）、数週間（１、２、３、４、５、６、７または８）またはさらに数ヶ月間（１、２、３、４、５、６、７または８）経過する。これは、本発明の一次治療因子のような１つの処置が、腫瘍を実質的に破壊し、そして血管新生阻害因子の投与のような別の処置が、微小転移または腫瘍再増殖を妨げることが、意図される状況の場合に、有利である。しかし、効率的な創傷治癒を可能にするため、外科手術後、血管新生阻害因子は、注意深く投与されなければならない。次いで、血管新生阻害因子は、患者の一生涯投与されてもよい。

【０５８６】

一次治療因子または第二の別個の抗ガン因子のいずれかの２つ以上の投与が利用されることもまた想定される。一次治療因子および第二の別個の抗ガン剤は、別々の日または週に、互換可能に投与されてもよい；または１つの因子の処置の手順の後に他の処置の手順が行なわれてもよい。いずれの場合においても、併用療法を用いて腫瘍回帰を達成するために必要なことは、投与の回数にかかわらず、抗腫瘍効果を発揮するのに有効な併用量で両方の因子を送達することが全てである。

【０５８７】

実質的に、同時にまたは続けてのいずれで投与されようと、本発明の抗アミノリン脂質および抗陰イオン性リン脂質抗体、ならびに治療剤は、１つ以上の化学療法剤または薬物と組み合わせて投与され得る。化学療法薬物は、増殖する腫瘍細胞を殺傷し得、これによ

って処置全体によって生み出される壊死領域を増強する。これによって薬物は、本発明の一次治療因子の血栓性作用を増強し得る。

【０５８８】

ほとんどのガン化学療法薬物は、分裂している酸素化された細胞に選択性である。これらは、併用療法において有利である。なぜなら、化学療法薬物は、本発明の一次治療因子とは異なる標的に対して作用し、これがさらに完全な抗血管または抗腫瘍効果をもたらすからである。例えば、化学療法薬物は、腫瘍末梢の、急速に分裂している酸素化された腫瘍細胞に対して選択的に活性であるが、本発明の因子は、活性化反応性酸素種が豊富である、「抑制された（ｓｔｒｅｓｓｅｄ）」腫瘍コアにおける血管または腫瘍細胞に対して主に作用する。腫瘍末梢において十分に酸素化された脈管形成性血管に選択性である血管新生阻害薬物はまた、併用で有効である。なぜなら、本発明の因子は、腫瘍コアにおける比較的低酸素で静止状態の血管に対して作用するからである。

【０５８９】

腫瘍血管において血栓の形成を誘導することによって、本発明の一次治療因子はまた、腫瘍内に薬物を保持または捕獲することによって化学療法薬物の作用を増強し得る。従って、化学療法剤は、腫瘍内に保持されるが、残りの薬物は身体から排出される。従って腫瘍細胞は、より高濃度の薬物により長時間曝される。腫瘍内の薬物のこの捕獲によって、薬物の用量を減らすことが可能になり、処置はさらに安全かつさらに有効になる。

【０５９０】

本発明における併用使用のためのさらなる薬物は、一次治療因子の作用によって薬物に対して「感作（ｓｅｎｓｉｔｉｚｅｄ）」されている細胞に作用して、その結果、その抗腫瘍効果を達成するために必要とされる第二の薬物の用量が低下される薬物である。例えば、これは、第二の薬物の作用の主な成分が腫瘍血管で発揮されて本発明の抗体または因子が薬物に対して細胞を感作する場合に生じ得る。本発明の一次治療因子が、直接またはサイトカイン放出の刺激によるかのいずれかによって、第二の薬物に対して腫瘍細胞を感作する場合も同じことがあてはまる。

【０５９１】

併用療法のための他の適切な二次抗ガン剤は、例えば、免疫系の免疫抑制成分の活性を選択的に阻害することによって、宿主エフェクター細胞の活性を増強するものである。このような因子は、その機構の一部としてエフェクター細胞による攻撃を刺激する本発明の一次治療因子がさらに積極的に働くことを可能にする。このような因子の例はドセタキセルである。

【０５９２】

一次治療因子の作用の正確な機構（単数または複数）の理解は本発明の処置を行なうために必要ではないが、このような機構に関連するデータおよび理論的な推察を用いて、本発明における組み合わせた使用のための特定の第二の抗ガン剤を選択することができる。選択された併用療法の有効性によって、次に作用のもとのデータおよび提唱される機構が支持され、これによってまた、併用療法を行なうための第二の抗ガン剤の好ましいカテゴリーがもたらされる。

【０５９３】

アポトーシスを誘導する薬物は、併用療法における使用のために好ましい。例えば、ドセタキセルは、アポトーシスを誘導し、従ってＰＳは、微小管に対する結合および細胞有糸分裂の破壊によって露出する（Ｈｏｔｃｈｋｉｓｓら、２００２）。臨床濃度未満のドセタキセルを用いた、腫瘍血管をライニングする内皮細胞および腫瘍細胞の処置は本明細書においてインビトロにおける３Ｇ４抗体の強力な結合によって実証されるとおり、細胞表面でＰＳ発現を誘導することが示されている。

【０５９４】

本発明の抗体の抗腫瘍効果が、抗体媒介性食作用の増大によって示されるように免疫エフェクター機能のＦｃドメイン媒介性増強を誘導するということを本発明者らはまた決定した。従って、この抗体はまた、他のＦｃドメイン媒介性機能、例えば、ＡＤＣＣ、ＣＤ

Ｃ、サイトカイン産生の刺激、およびこのような機構の組み合わせを発揮するはずである。これはまた、ドセタキセルに関連する。なぜなら、他の研究は、ドセタキセルを用いた乳ガン患者の処置が、血清ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＩＬ－６およびＧＭ－ＣＳＦサイトカインレベルにおける増大をもたらし、これがナチュラルキラー（ＮＫ）細胞およびリンホカイン活性化キラー（ＬＡＫ）細胞の活性を増強することによって、これらの患者における抗腫瘍免疫応答を増強するということを示しているからである（Ｔｓａｖａｒｉｓら、２００２）。

【０５９５】

従って、本発明者らは、ドセタキセルがＰＳ発現および投与された抗体の結合の両方を誘導し、また免疫エフェクターの活性を増強し、これが抗腫瘍効果を媒介すると判断した。前述の考慮に基づいて、本発明者らは、３Ｇ４抗体によって例示されるような本発明の抗体の、ドセタキセルとの組み合わせが、同所性ＭＤＡ－ＭＢ－４３５ヒト乳ガン異種移植片を保有するマウスにおいて、ドセタキセルまたは３Ｇ４のいずれか単独よりも有意に優れていたことを示した（実施例ＸＸ）。

【０５９６】

従って、アポトーシスを誘導するドセタキセルおよび他の化学療法剤は、本発明の併用療法における使用のための好ましい因子である。アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質に対する抗体と、アポトーシスを誘導する化学療法薬物、例えばドセタキセルとの組み合わせは、腫瘍脈管内皮細胞および腫瘍細胞成分を相乗作用的に攻撃するはずであり、これは処置有効性の有意な増強だけでなく、毒性の低下ももたらす。これらの組み合わせは、乳ガン処置における使用、詳細には、ドセタキセルと本発明の抗体とを用いるメトロノームのような化学療法の併用が意図される。

【０５９７】

Ｎ２．内毒素

内毒素および解毒された内毒素誘導体は、併用処置において、好ましくは低用量で用いられ得る（本明細書において参考として詳細に援用される、ＰＣＴ公開第ＷＯ０３／０２８８４０号）。動物での使用のために、詳細にはヒトにおける使用のために好ましい、種々の解毒された内毒素が利用可能である。解毒および精練された内毒素、ならびにそれらの組み合わせは、各々が参考として本明細書において詳細に援用される、米国特許第４，８６６，０３４号；同第４，４３５，３８６号；同第４，５０５，８９９号；同第４，４３６，７２７号；同第４，４３６，７２８号；同第４，５０５，９００号に記載される。

【０５９８】

非毒性の誘導体モノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）は、本発明において用いられ得る解毒された内毒素の１例である。ＭＰＬは、ヒトについて安全であることが公知である；アジュバントとしてＭＰＬを用いる臨床試験によって、外来患者でさえ、ヒトでの使用については１００μｇ／ｍ^{2}が安全であることが示されている。

【０５９９】

Ｎ３．サイトカイン

サイトカイン療法は、組み合わせの治療レジメンのための有効なパートナーであることが証明されている。本発明の組み合わせアプローチにおいて、種々のサイトカインが使用され得る。サイトカインの例としては、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＴＧＦ－β、ＧＭ－ＣＳＦ、Ｍ－ＣＳＦ、Ｇ－ＣＳＦ、ＴＮＦα、ＴＮＦβ、ＬＡＦ、ＴＣＧＦ、ＢＣＧＦ、ＴＲＦ、ＢＡＦ、ＢＤＧ、ＭＰ、ＬＩＦ、ＯＳＭ、ＴＭＦ、ＰＤＧＦ、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－γが挙げられる。サイトカインは、患者の状態およびサイトカインの相対的な毒性のような、臨床的指標と整合する標準的レジメンに従って投与される。ウテログロビンはまた、転移を防止または阻害するために用いられ得る（米国特許第５，６９６，０９２号；参考として本明細書に援用される）。

【０６００】

Ｎ４．ＴＮＦαおよびＴＮＦαの誘導因子

ＴＮＦαおよびＴＮＦαの誘導因子はまた、本発明と組み合わせて用いられ得る。ＴＮＦαは、脈管透過性を増大し、従って、腫瘍への抗ガン剤の浸透を促進することにおいて有用である。抗体局在化は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を標的化する場合には決して問題ではない。なぜなら本発明においては、ＴＮＦαの併用使用は、腫瘍への他の化学療法剤および免疫複合体の接近を容易にし得、そして遠くの腫瘍細胞への本発明の抗体の結合を増大さえするからである。

【０６０１】

低レベルの内毒素であるＲａｃ１アンタゴニスト、例えば、弱毒化されるかまたは操作されたアデノウイルス、ＤＭＸＡＡ（およびＦＡＡ）、ＣＭ１０１およびサリドマイドがまた使用されてもよい。Ｒａｃ１アンタゴニストは、本発明の併用処置において用いられてもよい。なぜなら１細胞あたり約５０００個のＤＮＡ粒子でＣＤ１４と独立してＴＮＦ上方制御が生じるからである（Ｓａｎｌｉｏｇｌｕら、２００１）。ＣＭ１０１、サリドマイドおよびＤＭＸＡＡがまた、標準的用量または低下した用量で、これと組み合わされて用いられてもよい。

【０６０２】

Ｎ５．化学療法剤

背景にある機構（単数または複数）にかかわらず、種々の化学療法剤が、本明細書に開示される併用処置方法において用いられ得る。併用療法について考えられる化学療法剤としては、例えば、タモキシフェン、タキソール、ビンブラスチン、エトポシド（ＶＰ－１６）、アドリアマイシン、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、カンプトテシン、アクチノマイシン－Ｄ、マイトマイシンＣ、コンブレタスタチン（類）、さらに詳細には、ドセタキセル（タキソテール）、シスプラチン（ＣＤＤＰ）、シクロホスファミド、ドキソルビシン、メトトレキセート、パクリタキセル、およびビンクリスチン、ならびにその誘導体およびプロドラッグが挙げられる。

【０６０３】

当業者に理解されるように、適切な用量の化学療法剤は、一般に、臨床治療においてすでに利用されてきており、ここで、この化学療法剤は、単独で、または他の化学療法剤と組み合わせて投与される。しかし、ここで、本発明によって提供される利点に起因して、低用量が、可能である。例示のみのために、シスプラチンのような薬剤、および他のＤＮＡアルキル化剤が使用され得る。シスプラチンは、ガンを処置するために広範に使用され得、臨床適用において使用される有効な用量は、総計３つの経路について３週間毎に５日間２０ｍｇ／ｍ^{2}である。シスプラチンは、経口で吸収されず、従って、注射を介して、静脈内で、皮下で、腫瘍内で、または腹腔内で送達されねばならない。

【０６０４】

さらに有用な薬剤は、ＤＮＡ複製、有糸分裂、染色体分離および／またはチューブリン活性に干渉する化合物を含む。このような化学療法剤化合物には、アドリアマイシン（ドキソルビシンとしてもまた公知である）、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどが挙げられる。新形成の処置のための臨床設定において広範に使用されるので、これらの化合物は、静脈内では、アドリアマイシンについて２１日間隔で２５～７５ｍｇ／ｍ^{2}からエトポシドについては３５～５０ｍｇ／ｍ^{2}までの範囲の用量で、静脈内にボーラス注射を通じて、または経口的に静脈内用量の２倍で、投与される。

【０６０５】

ポリヌクレオチド前駆体の合成および忠実度を崩壊させる薬剤もまた使用され得る。特に有用なものは、広範な試験を受け、そして容易に利用可能な薬剤である。そのようなものとして、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）のような薬剤は，新形成組織によって優先的に使用され、新形成細胞に対する標的化のためにこの薬剤を特に有用にさせる。非常に毒性の５－ＦＵは、広範囲のキャリア（局所を含む）において適用可能であるが、３～１５ｍｇ／ｋｇ／日の範囲の用量を有する静脈内投与が一般に使用される。

【０６０６】

併用療法に関して有用な例示的な化学療法剤は、表Ｄにおいて列挙される。そこで列挙される各薬剤は、例示的であり、そしていかなるようにも限定することを意味しない。当業者は、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」第１５版、第３３章（特に６２４頁～６５２頁）に指向される。投薬量におけるいくらかの改変は、おそらく、処置されるべき被験体の状態に依存して生じる。処置を施す医師は、個々の被験体について適切な用量を決定し得る。

【０６０７】

【表１－１】

表D

新形成疾患において有用な化学療法剤

クラス	薬剤の型	非商品名（他の名称）	疾患
アルキル化剤	ナイトロジェンマスタード	メクロレタミン(HN_2)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
		シクロホスファミド イフォスファミド(Ifosfamide)	急性および慢性リンパ球性白血病、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、乳房、卵巣、肺、ウィルムス腫、頸、精巣、軟組織肉腫
		メルファラン（L-サルコリシン）	多発性骨髄腫、乳房、卵巣
		クロラムブシル	慢性リンパ球性白血病、原発性マクログロブリン血症、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
	エチレンイミンおよびメチルメラミン	ヘキサメチルメラミン	卵巣
		チオテパ	膀胱、乳房、卵巣
	アルキルスルホネート	ブスルファン	慢性顆粒球性白血病
	ニトロソ尿素類	カルムスチン(BCNU)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、多発性骨髄腫、悪性骨髄腫
		ロムスチン(CCNU)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、原発性脳腫瘍、小細胞肺
		セムスチン（メチル-CCNU）	原発性脳腫瘍、胃、結腸
		ストレプトゾシン（ストレプトゾトシン(Streptozotocin)）	悪性膵臓インスリノーマ、悪性カルチノイド
	トリアジン	ダカルバジン（DTIC;ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド）	悪性黒色腫、ホジキン病、軟組織肉腫
代謝拮抗物質	葉酸アナログ	メトトレキサート（アメトプテリン）	急性リンパ球性白血病、絨毛癌、菌状息肉腫、乳房、頭および頸、肺、骨原性肉腫
	ピリミジンアナログ	フルオウラシル（5-フルオロウラシル；5-FU） フロクスウリジン（フルオリドーオキシウリジン；FUdR）	乳房、結腸、胃、膵臓、卵巣、頭頸部、膀胱、前悪性皮膚病変（局所的）
		シタラビン（シトシンアラビノシド）	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
	プリンアナログおよび関連するインヒビター	メルカプトプリン（6-メルカプトプリン；6-MP）	急性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病および慢性顆粒球性白血病
		チオグアニン（6-チオグアニン；TG）	急性顆粒球性白血病、急性リンパ球性白血病および慢性顆粒球性白血病
		ペントスタチン（2-デオキシコホルマイシン）	毛細胞白血病、菌状息肉腫、慢性リンパ球性白血病

【０６０８】
【表１－２】

（表Dの続き）

天然産物	ビンカアルカロイド類	ビンブラスチン(VLB)	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、乳房、精巣
		ビンクリスチン	急性リンパ球性白血病、神経芽細胞腫、ウィルムス腫、横紋筋肉腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、小細胞肺
	エピポドフィロトキシン(Epipodophyllotoxin)	エトポシド ターチポシド(Tertiposide)	精巣、小細胞肺および他の肺、乳房、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性顆粒球性白血病、カポージ肉腫
	抗生物質	ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）	絨毛癌、ウィルムス腫、横紋筋肉腫、精巣、カポージ肉腫
		ダウノルビシン（ダウノマイシン；ルビドマイシン）	急性顆粒球性白血病および急性リンパ球性白血病
		ドキソルビシン	軟組織、骨原性肉腫および他の肉腫；ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、急性白血病、乳房、尿生殖器、甲状線、肺、胃、神経芽細胞腫
		ブレオマイシン	精巣、頭頸部、皮膚、食道、肺および尿生殖器管；ホジキン病、非ホジキンリンパ腫
		プリカマイシン(Plicamycin)（ミトラマイシン）	精巣、悪性高カルシウム血症
		マイトマイシン（マイトマイシンC）	胃、頸、結腸、乳房、膵臓、膀胱、頭頸部
	酵素	Ｌ－アスパラギナーゼ	急性リンパ球性白血病
	生物学的応答改質剤	インターフェロンα	毛細胞白血病、カポージ肉腫、黒色腫、カルチノイド、腎細胞、卵巣、膀胱、非ホジキンリンパ腫、菌状息肉腫、多発性骨髄腫、慢性顆粒球性白血病
種々の薬剤	白金配位錯体	シスプラチン(cis-DDP) カルボプラチン	精巣、卵巣、膀胱、頭頸部、肺、甲状腺、頸、子宮内膜、神経芽細胞腫、骨原性肉腫
	アントラセンジオン	ミトザントロン	急性顆粒球性白血病、乳房
	置換型尿素	ヒドロキシ尿素	慢性顆粒球性白血病、真性赤血球増加症、本能性(essential)血小板増加症、悪性黒色腫
	メチルヒドラジン誘導体	プロカルバジン（Ｎ－メチルヒドラジン，ＭＩＨ）	ホジキン病
	副腎皮質抑制	ミトタン　(o,p'-DDD)	副腎皮質
		アミノグルテチミド	乳房

【０６０９】

【表１－３】

（表Dの続き）

ホルモンおよびアンタゴニスト	アドレノコルチコステロイド	プレドニゾン（利用可能ないくつかの他の等価調製物）	急性および慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、乳房
	プロゲスチン	カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン 酢酸メドロキシプロゲステロン 酢酸メゲストロール	子宮内膜、乳房
	エストロゲン	ジエチルスチルベストロール エチニルエストラジオール（利用可能な他の調製物）	乳房、前立腺
	抗エストロゲン	タモキシフェン	乳房
	アンドロゲン	プロピオン酸テストステロン フルオキシメステロン（利用可能な他の調製物）	乳房
	抗アンドロゲン	フルタミド	前立腺
	性腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログ	ロイプロリド	前立腺

（Ｎ６．抗脈管形成）

用語「脈管形成」とは、一般的に組織または器官への新規な脈管の生成をいう。通常の生理学的条件下で、ヒトまたは動物は、特定の制限された状況においてのみ脈管形成を受ける。例えば、脈管形成は、通常、組織治癒、胎児および胚の発生、および黄体、子宮内膜および胎盤の形成において観察される。しかし、新たな証拠として、脈管形成が、例えば、副腎組織、前立腺および卵巣における特定の正常な状態において重要であることが示される。本発明の治療剤（抗脈管形成が、作用の様式だけでない）は、従って、所望のまたは「生理学的」脈管形が、本発明を使用する場合、阻害されない点で、顕著な抗脈管形成治療に対する利点を、有する（例えば、抗体Ａ４．６．１（Ｂｒｅｍ、１９９８；Ｂａｃａら、１９９７；Ｐｒｅｓｔａら、１９９７）。

【０６１０】

非制御（持続および／または非調節）脈管形成は、種々の疾患状態に関連し、腫瘍の発生および転移の間に生じる。制御脈管形成および非制御脈管形成は、類似の様式で進行すると考えられる。内皮細胞および周皮細胞（基底膜によって囲まれる）は、毛細血管を形成する。脈管形成は、内皮細胞および白血球によって放出される酵素による、基底膜の侵食から始まる。内皮細胞（血管の管腔を裏打ちする）は、基底膜を通って突出する。脈管形成刺激物によって、内皮細胞が、侵食される基底膜を通って移動するように誘導する。移動する細胞は、親の血管から「出芽（ｓｐｒｏｕｔ）」を形成し、ここで内皮細胞が、有糸分裂および増殖を行う。内皮出芽は、互いに吸収して、毛細管ループを形成し、新たな血管を作製する。

【０６１１】

脈管形成がいくつかの正常組織において必要とされる新たな証拠にも関わらず、抗脈管形成治療は、腫瘍および他の疾患の処置においてなお重要である。従って、抗脈管形成治療は、本発明の併用処置における使用のために意図される。本発明の低い比較的頻繁な用量の治療剤と脈管形成を阻害する薬剤との組み合わせは、特に意図される。併用療法と関連して有用な例示的な抗脈管形成剤は、（免疫結合体とともに）上に記載される。任意の１つ以上のこのような薬剤（表Ｂに含まれる）は、本発明とともに併用療法において使用

され得る。アンギオスタチン、エンドスタチン、バスキュロスタチン、カンスタチンおよびマスピンが現在好ましい。

【０６１２】

多くの公知の抗ガン剤もまた、それらの作用機構の一部として抗脈管形成効果を有する。これらの薬剤（表Ｅの薬剤によって例示される）は、本発明の併用療法の局面における使用に特に企図される（これらは、上記のように、本発明の抗体に結合体化され得る）。

【０６１３】

【表２】

表E

抗脈管形成活性を有する抗癌剤

薬剤のクラスまたはタイプ	例
アルキル化剤	シクロホスファミド, エデルフォシン（edelfosine ）、エストラムスチン, メルファラン
代謝拮抗物質	フルオロウラシル、メトトレキセート、メルカプトプリン、UFT, テガフール、ウラシル、シタラビン
抗腫瘍抗体	ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン
トポイソメラーゼインヒビター	カンプトテシン、イリノテカン、エトポシド、トポテカン
タキサン	ドセタキセル、パクリタキセル
ビンカアルカロイド類	ビンブラスチン、ビンクリスチン
種々雑多	シスプラチン、オクトレオチド

さらに、$\alpha_v\beta_3$に対する抗体ＬＭ６０９はまた、腫瘍後退を誘導し、併用療法において使用され得る。インテグリン$\alpha_v\beta_3$アンタゴニスト（例えば、ＬＭ６０９）は、脈管形成内皮細胞のアポトーシスを誘導し、静止血管に影響を与えないで残す。ＬＭ６０９または他の$\alpha_v\beta_3$アンタゴニストはまた、$\alpha_v\beta_3$とＭＭＰ－２との相互作用を阻害することによって作用し得、タンパク質分解酵素が、内皮細胞および線維芽細胞の移動において重要な役割を果たすと考えられる。

【０６１４】

ＬＭ６０９による脈管形成内皮のアポトーシスは、脈管ネットワークの残りに対するカスケード効果を有し得る。実際に、腫瘍脈管ネットワークが、増殖するための腫瘍のシグナルに完全に応答することを妨げることは、ネットワークの部分的なまたは完全な崩壊を開始し得、腫瘍細胞の死および腫瘍容積の減少を生じる。エンドスタチンおよびアンギオスタチンが同様な様式で機能することが可能である。ＬＭ６０９が静止脈管に影響しないが、腫瘍後退を引き起こし得るという事実は、抗腫瘍効果を得るために、腫瘍内の全ての血管が処置のために標的される必要があるわけではないことを強く示唆する。

【０６１５】

アンギオスタチンに対する抗体はまた、米国特許第５，５２０，９１４号（具体的に本明細書中において参考として援用される）に記載されるように使用され得る。ＦＧＦが脈管形成と関連するので、ＦＧＦインヒビターがまた使用され得る。特定の例は、アルチャラン（ａｒｃｈａｒａｎ）スルフェートのようなグリコサミノグリカンを含む、それらの主要な反復単位として、２－Ｏ硫酸化ウロン酸で配列を交代するＮ－アセチルグルコサミンを有する化合物である。このような化合物は、米国特許第６，０２８，０６１号（本明細書中において具体的に参考として援用される）に記載され、そして併用して使用され得る。

【０６１６】
（Ｎ７．ＶＥＧＦインヒビター）
ＶＥＧＦは、低酸素および発ガン性変異によって誘導される多機能性サイトカインである。ＶＥＧＦは、胚形成における脈管ネットワークの発生および維持の最初の刺激物である。これは、強力な浸透性誘導剤、内皮細胞化学走化性剤、内皮生存因子、および内皮細胞増殖因子として機能する。その活性は、正常な胚発生に必要とされる。なぜなら、ＶＥＧＦの一方または両方の対立遺伝子の標的化された破壊が、胚の死を生じるからである。
【０６１７】
１つ以上のＶＥＧＦ阻害方法の使用は、本発明の併用療法の好ましい局面である。病理学的状態における脈管形成の第１の刺激としてのＶＥＧＦの認識は、ＶＥＧＦの活性を遮断する種々の方法を導いた。開発された任意のＶＥＧＦインヒビターは、ここで、有利にこれとともに使用され得る。従って、ＶＥＧＦシグナル伝達を妨害するために設計された、以下の中和抗ＶＥＧＦ抗体、可溶性レセプター構築物、アンチセンスストラテジー、ＲＮＡアプタマーおよびチロシンキナーゼインヒビターの任意の１つ以上が、使用され得る。
【０６１８】
適切な薬剤としては、中和抗体（Ｋｉｍら、１９９２；Ｐｒｅｓｔａら、１９９７；Ｓｉｏｕｓｓａｔら、１９９３；Ｋｏｎｄｏら、１９９３；Ａｓａｎｏら、１９９５）、可溶性レセプター構築物（ＫｅｎｄａｌｌおよびＴｏｍａｓ、１９９３；Ａｉｅｌｌｏら、１９９５；Ｌｉｎら、１９９８；Ｍｉｌｌａｕｅｒら、１９９６）、チロシンキナーゼインヒビター（Ｓｉｅｍｅｉｓｔｅｒら、１９９８）、アンチセンスストラテジー、ＲＮＡアプタマーおよびＶＥＧＦまたはＶＥＧＦレセプターに対するリボザイム（Ｓａｌｅｈら、１９９６；Ｃｈｅｎｇら、１９９６）が挙げられる。アンタゴニスト特性を有するＶＥＧＦの改変体もまた、ＷＯ９８／１６５５１に記載されるように使用され得る。上記参考文献の各々が、本明細書中において具体的に援用される。
【０６１９】
ＶＥＧＦに対するブロッキング抗体は、特に、単純さのために、特定の実施形態において好ましい。ＶＥＧＦに対するモノクローナル抗体は、ヒト腫瘍異種移植片増殖およびマウスにおける腹水形成を阻害することが示されている（Ｋｉｍら、１９９３；Ｍｅｉｓｉａｎｏら、１９９８；Ｌｕｏら、１９９８ａ；１９９８ｂ；Ｂｏｒｇｓｔｒｏｍら、１９９６；１９９８；各々が、本明細書中において参考として援用される）。抗体Ａ４，６．１は、ＶＥＧＦＲ１およびＶＥＧＦＲ２の両方に結合するＶＥＧＦを遮断し得る高親和性抗ＶＥＧＦ抗体である（Ｋｉｍら、１９９２；Ｗｉｅｓｍａｎｎら、１９９７；Ｍｕｌｌｅｒら、１９９８；Ｋｅｙｔら、１９９６；各々が、本明細書中において参考として援用される）。Ａ４．６．１は、最近、一価ファージディスプレイ技術によってヒト化され、現在、抗ガン剤として第Ｉ期の臨床試験にある（Ｂｒｅｍ、１９９８；Ｂａｃａら、１９９７；Ｐｒｅｓｔａら、１９９７；各々が、本明細書中において参考として援用される）。
【０６２０】
Ａ４．６．１のＦａｂフラグメントによって結合されたＶＥＧＦのアラニン走査変異誘発およびＸ線結晶は、Ａ４．６．１が結合するＶＥＧＦに対するエピトープが、アミノ酸８９～９４の辺りで中心であることを示した。この構造データは、Ａ４．６．１が、ＶＥＧＦをＶＥＧＦＲ２への結合から競合的に阻害するが、おそらく立体障害によって、ＶＥＧＦがＶＥＧＦＲ１へ結合することを阻害することを示す（Ｍｕｌｌｅｒら、１９９８；Ｋｅｙｔら、１９９８；各々が、本明細書中において参考として援用される）。
【０６２１】
Ａ４．６．１は、本発明とともに使用され得る。しかし、２Ｃ３（４５４５）と呼ばれる新規な抗体が現在好ましく、これは、ＶＥＧＦと２つのＶＥＧＦレセプターのうちの１つのみとの相互作用を選択的に遮断する。２Ｃ３は、内皮細胞のＶＥＧＦ媒介増殖を阻害し、強力な抗腫瘍活性を有し、そしてＶＥＧＦとＶＥＧＦＲ２（ＫＤＲ／Ｆｌｋ－１）と

の相互作用を選択的に遮断するが、ＶＥＧＦＲ１（ＦＬＴ－１）を遮断しない。Ａ４．６．１と対照的に、２Ｃ３は、マクロファージ化学走化性（ＶＥＧＦＲ１によって媒介される）の付随した阻害無しに、ＶＥＧＦＲ２によって誘導される脈管形成の特異的阻害を可能にし、従って、より安全な治療剤であると企図される。米国特許第６，３４２，２１９号、同第６，３４２，２２１号、同第６，４１６，７５８号、および同第６，４１６，７５８号は、２Ｃ３抗体ならびに抗脈管形成治療およびＶＥＧＦ阻害におけるその使用をさらに記載するために、本明細書中で具体的に参考として援用される。

【０６２２】

（Ｎ８．アポトーシス誘導剤）

本発明の治療剤はまた、好ましくは、腫瘍（腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞を含む）内で任意の細胞のアポトーシスを誘導する処置方法と組み合わされる。アポトーシスを誘導する例示的な薬剤は、（免疫結合体とともに）上に列挙される。任意の１つ以上のこのようなアポトーシス誘導剤が、本発明の抗体に連結されること無しに、本発明の併用療法において使用され得る。

【０６２３】

多くの公知の抗ガン剤がまた、それらの作用機構の一部として、アポトーシス誘導効果を有する。これらの薬剤（表Ｆにおける薬剤によって例示される）は、本発明の併用療法の局面における使用のために特に企図される（これらは、上記のように、本発明の抗体に結合体化され得る）。

【０６２４】

【表３】

表F

アポトーシスを誘導する抗癌剤

薬剤のクラスまたはタイプ	例
抗代謝物質	シタラビン、フルダラビン、5－フルオロ－29－デオキシウリジン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキセート
DNA 架橋剤	クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード
インターカレート剤	アドリアマイシン(ドキソルビシン)、ミトキサントロン
トポイソメラーゼII毒	エトポシド、テニポシド
微小管指向剤	コルセミド、コルヒチン、ドセタキセル、ビンクリスチン
キナーゼインヒビター	フラボピリドール、スタウロスポリン STI571 (CPG 57148B), UCN-01 (7- ヒドロキシスタウロスポリン)
ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター	L-739749, L-744832
ホルモン	グルココルチコイド、フェンレチニド
DNA 断片化剤	ブレオマイシン
ホルモンアンタゴニスト	タモキシフェン、フィナステリド, LHRH アンタゴニスト
生物学的薬剤	TNF-α, TRAIL, 抗 CD20
タンパク質合成インヒビター	L-アスパラギナーゼ、シクロヘキシイミド、ピューロマイシン ジフテリア毒素
トポイソメラーゼII毒	カンプトセシン、トポテカン(toptecan)

（Ｎ９．免疫毒素およびコアグリガンド）

本発明はまた、標的タンパク質が腫瘍細胞のマーカー、腫瘍脈管構造または腫瘍支質に向けられる、他の免疫毒素またはコアグリガンドとともに使用され得る。ＰＥ結合ペプチドを標的化する際に使用するための本明細書中に記載される標的化剤のいずれかが、これらの実施形態において使用され得る。免疫毒素において、結合される薬剤は、抗細胞剤または細胞傷害剤、サイトカイン、放射線治療剤、抗脈管形成剤、アポトーシス誘導剤および抗チューブリン薬物を含む。コアグリガンドにおいて、結合される薬剤は、コアグリガンドである。米国特許第５，８５５，８６６号、同第５，９６５，１３２号、同第６，２６１，５３５号、同第６，０５１，２３０号、同第６，４５１，３１２号（免疫毒素）、同第６，０９３，３９９号、同第６，００４，５５５号、同第５，８７７，２８９号、および同第６，０３６，９５５号（コアグリガンド）が、このような構築物を例示するために、本明細書中で具体的に参考として援用される。

【０６２５】

（Ｎ１０．ＡＤＥＰＴおよびプロドラッグ治療）

本発明の抗体（９Ｄ２、３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）および類似の抗体）は、プロドラッグと組み合わせて使用され得、ここでこの抗体は、プロドラッグ活性化成分（例えば、抗体に接触した際にのみ、プロドラッグをより活性な形態へ変換するプロドラッグ活性化酵素）と作動可能に付随される。この技術は、一般に「ＡＤＥＰＴ」と称され、そして例えば、ＷＯ９５／１３０９５；ＷＯ９７／２６９１８、ＷＯ９７／２４１４３および米国特許第４，９７５，２７８号および同第５，５６８，５６８号（これらは、各々具体的に本明細書中に参考として援用される）において記載される。

【０６２６】

本明細書中で使用される場合、用語「プロドラッグ」は、プロドラッグが基づく親の薬物と比較して（腫瘍血管内皮細胞を含む）標的細胞に対する減少した細胞傷害性または他の抗細胞性効果を及ぼす生物学的にかまたは薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態をいう。好ましくは、プロドラッグまたは前駆体形態は、有意な減少を及ぼすか、またはより好ましくは、「ネイティブ」または親の形態と比較して、無視できる細胞傷害性または抗細胞性効果を及ぼす。「プロドラッグ」は、活性化されているかまたは変換されて、その薬物のより活性な親の形態を生じ得る。

【０６２７】

プロドラッグを作製しそして使用する技術的能力は、当業者の範囲内である。Ｗｉｌｌｍａｎら（１９８６）およびＳｔｅｌｌａら（１９８５）は、種々のプロドラッグの作製方法および使用方法に関する記載および技術をさらに供給する目的のために参考として本明細書中に各々具体的に援用される。本発明の文脈で使用され得る例示的なプロドラッグ構築物としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：ホスフェート含有プロドラッグ（米国特許第４，９７５，２７８号）、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチドベースのプロドラッグ（米国特許第５，６６０，８２９号；同第５，５８７，１６１号；同第５，４０５，９９０号；ＷＯ９７／０７１１８）、Ｄ－アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ（米国特許第５，５６１，１１９号；同第５，６４６，２９８号；同第４，９０４，７６８号、同第５，０４１，４２４号）、βラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ（米国特許第４，９７５，２７８号）、必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグおよびさらには５－フルオロシトシン（米国特許第４，９７５，２７８号）および５－フルオロウリジンプロドラッグなど（これらの特許の各々は、本明細書中に参考として具体的に援用される）。

【０６２８】

プロドラッグの形態で使用され得る治療剤または細胞傷害性薬物の型は、実質的には限られる。より細胞傷害性薬剤は、このような送達の形態には好ましく、たとえば、コアグラント（プロドラッグとしての使用にあまり好ましくない）の送達より好ましい。プロドラッグが実質的に不活性であり、そして「放出された」かまたは活性化された薬物が、実質的にかまたは意図される目的のための活性を有するように構築物を設計することが、プ

ロドラッグの形成において必要とされる全てである。

【０６２９】

もとのプロドラッグに関する種々の改良もまた、ＷＯ　９５／０３８３８０；ＥＰ　７５１，１４４（アントラサイクリン）；ＷＯ　９７／０７０９７（シクロプロピルインドール）；およびＷＯ　９６／２０１６９に開示されるように、公知でありかつ本明細書との使用について意図される。例えば、Ｋｍが減少したプロドラッグは、米国特許第５，６２１，００２号（本明細書中に参考として特に援用される）に記載され、これは本発明の状況において使用され得る。細胞内にて実行されるプロドラッグ治療もまた、ＷＯ　９６／０３１５１（本明細書中に参考として特に援用される）に例示されるように公知であり、そして本明細書を用いて実施され得る。

【０６３０】

ＡＤＥＰＴにおける使用のために、そのプロドラッグをより活性な薬物へと活性化または変換する因子が、本発明の抗体に作動可能に結合される。従って、この抗体は、脈管形成部位内または腫瘍部位内で、プロドラッグ変換能力を局在化し、活性薬物がそのような領域のみで産生され、そして循環中または健常組織においては産生されないようにする。

【０６３１】

本発明の抗体に結合してプロドラッグ活性化にて機能し得る酵素としては、ホスフェート含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのアルカリホスファターゼ（米国特許第４，９７５，２７８号）；スルフェート含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのアリールスルファターゼ（米国特許第５，２７０，１９６号）；ペプチドに基づくプロドラッグと組み合わせた使用のためのペプチダーゼおよびプロテアーゼ（例えば、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ（米国特許第５，６６０，８２９号；同第５，５８７，１６１号；同第５，４０５，９９０号）およびカテプシン（カテプシンＢおよびＬを含む））；Ｄ－アミノ酸修飾プロドラッグと組み合わせた使用のためのＤ－アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグと組み合わせた使用のための炭水化物切断酵素（例えば、β－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ）（米国特許第５，５６１，１１９号；同第５，６４６，２９８号）；β－ラクタム含有プロドラッグと組み合わせた使用のためのβ－ラクタマーゼ；アミノ窒素にてフェノキシアセトアミド基またはフェニルアセトアミド基で誘導体化された薬物と組み合わせた使用のためのペニシリンアミダーゼ（例えば、ペニシリンＶアミダーゼ（米国特許第、９７５，２７８号）またはペニシリンＧアミダーゼ）；ならびに５－フルオロシトシンに基づくプロドラッグ（米国特許第４，９７５，２７８号）と組み合わせた使用のためのシトシンデアミナーゼ（米国特許第５，３３８，６７８号；同第５，５４５，５４８号）が、挙げられるがこれらに限定されず、これらの特許各々は、本明細書中に参考として特に援用される。

【０６３２】

酵素活性を有する抗体（触媒抗体または「アブザイム」として公知）もまた、プロドラッグを活性な薬物へと変換するために使用され得る。従って、本発明の抗体（好ましくは、９Ｄ２および３Ｇ４および類似の抗体）に基づくアブザイムは、本発明の別の局面を形成する。アブザイムを生成する技術的能力もまた、Ｍａｓｓｅｙら（１９８７）（このアブザイムの教示を補足する目的で、本明細書中に参考として特に援用される）に例示されるように、当業者の範囲内に存在する。カルバメート位置（例えば、窒素マスタードアリールカルバメート）でプロドラッグの分解を触媒し得る触媒抗体が、ＥＰ　７４５，６７３（本明細書中に参考として特に援用される）に記載されるように、さらに意図される。

【０６３３】

（Ｏ．抗体コーティングリポソームおよび治療剤）

リポソーム処方物は、しばしば、治療剤および薬剤において使用される。しかし、最初の研究においてリポソームの生体分布は、このような処方物が、ヒトにおいて幅広く適用可能でないことを意味する。「ステルス（ｓｔｅａｌｔｈ）またはステルス化」リポソームおよび処方の技術は、このように開発され、これは、リポソームがより長く循環するこ

とを可能にする。ステルス化リポソームにおける使用のための好ましい薬剤は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）であり、そして得られるリポソームはまた、ＰＥＧ化リポソームと呼ばれる。

【０６３４】

ステルスリポソームは、ガン患者において腫瘍に、細胞傷害剤を送達する際に使用するために提案されている。ある範囲の薬物は、ステルスリポソームに組み込まれている（シスプラチン（Ｒｏｓｅｎｔｈａｌら、２００２）、ＴＮＦα（Ｋｉｍら、２００２）、ドキソルビシン（Ｓｙｍｏｎら、１９９９）およびアドリアマイシン（Ｓｉｎｇｈら、１９９９）（各々が、本明細書中において具体的に参考として援用される）を含む）。しかし、最近の報告は、転移性乳ガンの処置においてステルスリポソームドキソルビシンおよびビノレルビンの予期しない低い効力を示した（Ｒｉｍａｓｓａら、２００３）。

【０６３５】

本発明は、改善されたステルス化リポソーム処方物を提供し、当該分野の種々の欠点を克服し、ここで、ステルス化リポソームは、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質、好ましくは、ＰＳまたはＰＥに結合する抗体と機能的に関連するかまたは「コーティング」される。９Ｄ２、３Ｇ４（ＡＴＣＣ４５４５）および本発明の類似の競合抗体が、このような使用に好ましいが、任意の抗体、またはその抗原結合領域（アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する）が使用され得る。二価抗体または抗体部分は、本発明のこれらの局面において必要とされない。

【０６３６】

任意のステルス化リポソームが、新規なリポソーム処方物の基礎を形成し得、そして好ましくは、ＰＥＧ化リポソームが使用される。ステルス化リポソームは、「コーティング」される。すなわち、アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合する抗体と作動可能にまたは機能的に関連する。作動可能にまたは機能的に関連は、抗体が、標的アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質（好ましくは、ＰＳまたはＰＥ）に特異的に結合する能力を保持し、それによってステルス化リポソームおよびその任意の内容物をＰＳおよび／またはＰＥポジティブ細胞（例えば、腫瘍細胞および腫瘍脈管内皮細胞）に送達または標的化するように、なされる。

【０６３７】

本発明の抗体コーティングステルス化リポソームは、単独で使用され得る。しかし、好ましくは、このようなリポソームはまた、１つ以上の第２の治療剤（例えば、抗ガン剤または化学療法剤（第１の治療剤が、抗体自体である））を含む。第２の治療剤は、一般的に、リポソームの「コア」内であるとして記載される。抗体への結合体のためにまたは併用療法のために、当該分野で公知であり、そして／または本明細書中に記載される任意の１つ以上の第２の抗ガン剤または化学療法剤が、本発明の抗体コーティングステルスリポソームにおいて使用され得る。例えば、任意の化学療法剤または放射線療法剤、サイトカイン、抗脈管形成剤またはアポトーシス誘導剤。化学療法剤において現在好ましいのは、抗チューブリン薬物、ドセタキセルおよびパクリタキセルである。

【０６３８】

さらに、本発明の抗体コーティングステルス化リポソームはまた、ウイルス感染および疾患を処置する際に使用するための１つ以上の抗ウイルス薬物を装填され得る。抗ガン剤とともに、抗体への結合体のためにまたは併用療法のために、当該分野で公知であり、そして／または本明細書中に記載される、第２の抗ウイルス薬物の任意の１つ以上が、本発明の抗体コーティングステルス化リポソームにおいて使用され得る。シドファビルおよびＡＺＴは、現在好ましい例である。

【０６３９】

（Ｐ．抗脈管、抗脈管形成および他の治療）

本発明はまた、異常な脈管形成が関与する他の疾患（プロトロンビン血管を有する疾患および障害を含む）の処置において使用され得る。治療機構のみではないが、本発明の抗体、免疫結合体およびペプチドベース治療剤はまた、異常な脈管形成（例えば、種々の疾

患および障害に寄与する）を有する動物および患者を処置するために使用され得る。

【０６４０】

抗脈管形成、プロトロンビン脈管構造または他の抗脈管機構に基づくか否かに関わらず、本発明は、流行したおよび／または臨床的に重要なガン処置の分野以外の疾患を処置するために使用され、これには、以下が挙げられる：関節変形、慢性関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、加齢性黄斑変性、グレーヴズ病、血管性再狭窄（以下の再狭窄を含む：血管形成術、動静脈機能不全（ＡＶＭ）、髄膜腫、血管腫および血管新生緑内障）。介入についての他の標的には、以下が挙げられる：血管線維腫、アテローム性動脈硬化症斑、角膜移植新生血管形成、血友病性関節、肥大性瘢痕、オースラーウェーバー症候群、化膿性肉芽腫水晶体後線維増殖症、強皮症、トラコーマ、脈管接着、滑膜炎、皮膚炎、種々の他の炎症性疾患および障害、ならびに子宮内膜症。本発明によって処置可能なさらなる疾患および障害、ならびにこのような脈管形成障害の統一的な基礎が、以下に記載される。

【０６４１】

異常な脈管構造および脈管形成が関連する１つの顕著な疾患は、慢性関節リウマチであり、ここで、関節の滑膜内壁における血管は、脈管形成を起こす。新しい脈管ネットワークの形成に加えて、内皮細胞は、パンヌス増殖および軟骨破壊に導く、因子および反応性酸素種を放出する。脈管形成に関連する因子は、慢性関節リウマチの慢性的な炎症状態に能動的に寄与し、そして維持するのを助け得る。脈管形成に関連する因子はまた、変形性関節症において役割を有し、関節の破壊に寄与する。種々の因子（ＶＥＧＦを含む）が、慢性関節リウマチおよび変形性関節炎の病態に関係することが示されている。

【０６４２】

異常な脈管構造および脈管形成を含む疾患の別の重要な例は、眼血管新生疾患である。この疾患は、眼の構造（例えば、網膜または角膜）への新しい血管の侵入によって特徴付けられる。それは、失明に最も一般的な原因であり、そして約２０の眼の疾患に関係する。加齢性黄斑変性において、関連した視覚問題は、網膜色素上皮の真下での維管束組織の増殖を有するブルーフ膜における欠陥を介する脈絡膜毛細管の内殖によって引き起こされる。脈管形成損傷はまた、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、角膜移植拒絶、血管新生緑内障および水晶体後線維増殖症と関連する。

【０６４３】

本発明に従って処置され得る角膜新生血管形成に関連する他の疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：流行性角結膜炎、ビタミンＡ欠損、コンタクトレンズ過剰装着（ｏｖｅｒｗｅａｒ）、萎縮性角膜炎、上輪部角膜炎、翼状角膜炎乾燥症、シェーグレン症（ｓｊｏｇｒｅｎｓ）、しゅさ性挫瘡、フリクテン症（ｐｈｙｌｅｃｔｅｎｕｌｏｓｉｓ）、梅毒、マイコバクテリア感染、脂質変性、化学的やけど、細菌性潰瘍、真菌性潰瘍、単純疱疹感染、帯状疱疹感染、原虫感染、カポージ肉腫、モーレン潰瘍、テリエン辺縁変性、辺縁角膜炎、慢性関節リウマチ、全身性狼瘡、多発性動脈炎、外傷、ヴェーゲナー類肉腫症、強膜炎、スティーヴンズ－ジョンソン疾患、脈絡放射状角膜切開、および角膜移植片（ｇｒａｐｈ）拒絶。

【０６４４】

本発明に従って処置され得る網膜／脈絡膜新生血管形成に関連する疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：糖尿病性網膜症、黄斑変性、鎌状赤血球貧血、サルコイド、梅毒、弾性線維性仮性黄色腫、パジェット病、静脈閉鎖、動脈閉鎖、頸動脈閉塞性疾患、慢性ブドウ膜炎／硝子体炎（ｖｉｔｒｉｔｉｓ）、マイコバクテリア感染、ライム病、全身性エリテマトーデス（ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｉｓ）、未熟児網膜症、イールズ病、ベチェット病（Ｂｅｃｈｅｔｓ ｄｉｓｅａｓｅ）、網膜症または脈絡膜炎を引き起こす感染、推定眼ヒストプラスマ症、ベスト病、近視、視神経乳頭の先天的な構造上の欠損、シュタルガルト病、扁平部炎、慢性網膜剥離、過粘稠度症候群、トキソプラスマ症、外傷およびレーザー処置後の合併症。

【０６４５】

本発明に従って処置され得る他の疾患には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ルベオーシス（角の新生血管形成）に関連する疾患、および増殖性硝子体網膜症の全ての形態を含む維管束組織または線維性組織の異常増殖によって引き起こされる疾患（糖尿病と関連するかしないか）。

【０６４６】

慢性炎症はまた、異常な脈管構造および病理学的新脈管形成に関連する。潰瘍性大腸炎およびクローン病のようなこのような疾患状態は、新しい血管の炎症性組織への内殖とともに、組織学的変化を示す。南アメリカに見出されるバルトネラ症（細菌性感染）は、脈管内皮細胞の増殖によって特徴付けられる慢性的な段階を生じ得る。

【０６４７】

異常な脈管構造および脈管形成に関連する別の病理学的役割は、アテローム性動脈硬化症に見出される。血管の管腔内に形成されるプラークは、脈管形成刺激活性を有することが示されている。ヒト冠状動脈硬化の進行において、および閉塞性冠疾患における再疎通プロセスにおけるＶＥＧＦのような脈管形成マーカーの病態生理学的重要性についての特定の証拠がある。本発明は、このような状態のための有効な処置を提供する。

【０６４８】

小児期の最も頻繁な脈管形成疾患の１つは、血管腫である。ほとんどの場合において、腫瘍は良性であり、そして介入なく退行する。より重篤な場合において、腫瘍は、大きな空洞性かつ浸潤性の組織に進行し、そして臨床的な合併症を作り出す。血管腫の全身的な形態である、血管腫症（ｈｅｍａｎｇｉｏｎｍａｔｏｓｅｓ）は、高い死亡率を有する。現在使用される治療法を用いて処置され得ない治療耐性血管腫が存在する。

【０６４９】

新脈管形成はまた、オースラー－ウェーバー－ランデュ病、つまり遺伝性出血性毛細管拡張症のような遺伝性疾患に見出される損傷についての原因である。これは、血管またはリンパ管の複数の小さな血管腫、腫瘍によって特徴付けられる遺伝疾患である。血管腫は、皮膚および粘膜に見出され、しばしば、鼻出血（鼻血）または胃腸出血によって、ならびにときどき肺および肝動静脈瘻を伴って生じる。

【０６５０】

新脈管形成はまた、生殖および創傷治癒のような通常の生理学的プロセスに関係する。新脈管形成は、排卵、およびまた、受精後の胞胚の着床において重要な工程である。新脈管形成の阻止により、排卵をブロックするために、または胞胚による着床を防止するために無月経を誘導し得る。創傷治癒において、過剰修復または線維増殖症は、外科手順の有害な副作用であり得、そして新脈管形成によって引き起こされ得るか、または悪化され得る。接着は、手術の頻繁な合併症であり、そして小腸閉塞症のような問題に導く。これは、本発明によって処置され得る。

【０６５１】

前述の疾患および障害の各々はまた、全てのタイプの腫瘍とともに、本発明に従う処置が考えられる。米国特許第５，７１２，２９１号は、本明細書において参考として詳細に援用されており、一旦脈管形成の阻害が特定の因子を用いて示されれば、その因子などを用いる異常な脈管形成に関連する広範な疾患の処置は合理的に実行できるという当該分野における知識をさらに実証する。米国特許第６，５２４，５８３号はまた、同様の目的のために、そしてこの原理が抗体に基づく治療剤を用いる脈管形成の阻害および血管形成性疾患の処置にあてはまるということを詳細に実証するために、本明細書において参考として詳細に援用される。従って、腫瘍保有マウスにおける３Ｇ４抗体（ＡＴＣＣ　４５４５）の血管新生阻害効果（図１７Ａ）は、３Ｇ４などの抗体が広範な血管形成性疾患を処置するために適切である重要な証拠である。

【０６５２】

本発明はさらに、他の疾患を処置するのにおける使用のための組成物および方法を提供するが、ここではアミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質、詳細にはＰＳおよびＰＥがある役割を果たす。例えば、ＰＳは細胞接着、炎症性応答および敗血性ショック

に関与するので、ＰＳに対する抗体が、炎症性および敗血症ショックの処置において用いられ得る。３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）または同様の抗体の使用は、このような実施形態、詳細にはこのような抗体のＦａｂ二量体に好ましい。デュラマイシンＦａｂ二量体はまた、敗血性ショックを処置するのにおける使用について特に考慮される。

【０６５３】

アミノリン脂質および／または陰イオン性リン脂質、詳細にはＰＳはまた、鎌状赤血球貧血に、詳細にはクリアランス機構の一部として関与する。従って、ＰＳに対する抗体は、鎌状赤血球貧血を処置または緩和するために用いられ得る。３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）または同様の抗体の使用が、詳細にはそのＦａｂ二量体の使用が好ましい。

【０６５４】

ほとんどの細菌が、陰イオン性リン脂質ＰＡを発現する。従って、必要に応じて他の陰イオン性リン脂質に対する結合をともなう、ＰＡに結合する抗体が、抗細菌因子として用いられ得る。本発明の抗体は、Ｅ．ｃｏｌｉにおいて調製され得、従って、どのような状況でも殺菌性であるというわけでないが、インビボにおける抗細菌性の役割は、補体結合能力から生じると考えられる。従って、抗体フラグメントでなくインタクトな抗体は、抗細菌因子として用いられるべきである。３Ｇ４（ＡＴＣＣ　４５４５）および同様の抗体は、このような実施形態における使用に好ましいが、補体を結合しかつＰＡに結合する任意の抗体、例えば表４の他のＰＡ結合抗体を使用してもよい。

【０６５５】

身体自体のリン脂質に対して抗体が生成される自己免疫障害である抗リン脂質症候群およびループス（狼瘡）は、流産および血小板減少症（低い血小板数）を含む凝固障害に関連する。従って、これらの患者における抗リン脂質抗体は、血栓を生じる病原性抗体である。しかし、本発明の抗体は、このような副作用を示すことなく、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に結合する。従って、本発明の抗体は、抗リン脂質症候群、その関連の疾患および合併症を処置するのにおける使用が考えられる。

【０６５６】

抗リン脂質症候群を有する患者において循環する病原性抗リン脂質抗体は、β_2－糖タンパク質Ｉ、プロトロンビン、キニノーゲン、プレカリクレインおよび第ＸＩ因子のようなタンパク質と組み合わせて、ＰＳ、ＰＥおよび他のリン脂質に対して結合すると考えられる（Ｒｏｔｅ，１９９６；ＳｕｇｉおよびＭｃＩｎｔｙｒｅ，１９９５；１９９６ａ；１９９６ｂ）。ＰＳに結合したβ_2－糖タンパク質Ｉおよびプロトロンビンは、それぞれ、抗カルジオリピン抗体およびループス抗体についての一次抗原であることが報告されている。本発明の抗体は、血清タンパク質の存在下でのみアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対して結合しないことに基づいて特に選択されている。従って、リン脂質成分への結合によって、本発明の抗体は、このような患者における病原性の抗体との拮抗および競合における使用を意図しており、従って、身体におけるそのリン脂質タンパク質標的からの病原性抗体と入れ代わる。

【０６５７】

Ｑ．ＰＥ結合ペプチド誘導体および結合体

抗体および免疫複合体に加えて、本発明はさらに、詳細には、腫瘍およびウイルス疾患の処置における、ＰＥ結合ペプチド誘導体および種々の用途を提供する。現在好ましいＰＥ結合ペプチド構築物および誘導体は、デュラマイシンと命名されたペプチドに基づくものである。ＰＥ結合ペプチドおよびデュラマイシン誘導体の３つの一般的カテゴリーが本発明によって提供されるが、そのうちの２つはこの構築物の標的化部分としてＰＥ結合ペプチドまたはデュラマイシンを使用し、他のもう一方は、主にこの構築物のエフェクター部分としてデュラマイシンなどの因子を用いる。

【０６５８】

標的化因子としてのＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンの使用は、それが得られた構築物に対して選択性の結合能力を付与する能力に基づく。従って、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンを含む構築物または結合体は、ＰＥ発現細胞、例えば、

腫瘍脈管内皮細胞、悪性腫瘍細胞、増殖細胞および／またはウイルスに感染した細胞に特異的に結合する。

【０６５９】

ＰＥ結合ペプチド、例えば、デュラマイシンは、ＰＥ標的化機能に加えて生物学的活性を有するので、治療結合体を達成するために、治療因子へデュラマイシンのようなＰＥ結合ペプチドを結合体化することは必要ない。しかし、デュラマイシンのようなＰＥ結合ペプチドは、その天然の形態で毒性を伴うので、このペプチドは毒性を減らすために改変されるべきである。毒性は、ペプチドがクラスターを形成する能力、細胞膜に細孔を形成する能力、および細胞へ一般的に浸透するかまたは透過する能力に関連する。従って、これらの機能は、ＰＥ結合ペプチドがクラスターを形成すること、細胞へ浸透すること、および非特異的に毒性であることを有意にまたは実質的に妨げるように、減弱されなければならない。好ましくは、ＰＥに対して結合する能力は実質的に維持されるが、ＰＥ結合ペプチドがクラスターを形成し細胞に浸透する能力は実質的に阻害され、従って、細胞毒性は、有意に低下されるかまたは無効になる。

【０６６０】

本発明によって提供される毒性の低下したＰＥ結合ペプチド誘導体の第一のカテゴリーは、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンが比較的または実質的に細胞不浸透性にされるカテゴリーである。これは好ましくは、細胞不浸透性基に対する結合によって達成され、これは正の電荷もしくは負の電荷を有する小型の基または極性の基であってもよいし、不活性キャリアの形態であってもよい。本明細書において用いる場合、「細胞不浸透性基（ｃｅｌｌ　ｉｍｐｅｒｍｅａｎｔ　ｇｒｏｕｐ）」および「細胞不浸透性ＰＥ結合ペプチド（ｃｅｌｌ　ｉｍｐｅｒｍｅａｎｔ　ＰＥ－ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｅｐｔｉｄｅ）」という用語は、絶対的というよりも相対的であって、改変されたＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンをいうが、ここでクラスターを形成して細胞に浸透する能力は有意に、そして好ましくは実質的に低下されているものをいう。得られた細胞不浸透性ＰＥ結合ペプチドは、細胞の外側にＰＥおよび会合した膜分子をトラップすることによって、および／またはペプチドコーティング細胞上に宿主防御をもたらすことによって機能し得る。

【０６６１】

ＰＥ結合ペプチド誘導体のこのカテゴリー内では、特定の構築物が宿主防御の補充を強化し、これによってその治療的活性を増強する。例えば、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンが免疫グロブリンに結合される場合、免疫グロブリンは、不活性なキャリアとして、および免疫エフェクターとしての両方で機能し得る。これは、いわゆる「無関係な特異性（ｉｒｒｅｌｅｖａｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）」の免疫グロブリンに、そして抗原結合能を有さない免疫グロブリン誘導体、例えばＦｃ領域にあてはまる。結合した免疫グロブリンまたは免疫グロブリン誘導体のおかげで、このような構築物は、例えば、免疫エフェクター細胞を誘引および／または活性化することによって、ＰＥ発現細胞に対して宿主防御を向け直すことができる。

【０６６２】

本発明のＰＥ結合ペプチド誘導体の第二の一般的なカテゴリーにおいて、このペプチドは、細胞浸透および得られる毒性を減らすように依然として改変されるが、小さい細胞不浸透性基も不活性キャリアも用いず、得られる構築物の血液および組織の分布を変化させる因子が用いられる。好ましい例は、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンが、腫瘍細胞、腫瘍または腫瘍内脈管構造または腫瘍間質の成分に結合する標的因子に結合するものである。ＰＥ結合ペプチド自体が標的化特性をなお有するが、本発明のこれらの局面では、標的因子は主に標的組織へ、例えば腫瘍環境へ、構築物を指向し、そして結合されたＰＥ結合ペプチド、例えばデュラマイシンは、送達の際に治療効果を発揮する。

【０６６３】

ＰＥ結合ペプチド誘導体の第三の一般的なカテゴリーは、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンの、ＰＥ発現細胞に対してこの誘導体を局在化させる標的因子としての

使用に戻る。ウイルスに感染した細胞は、正常な未感染の細胞とは対照的に、細胞表面でＰＥを発現するので、抗ウイルス剤に対してデュラマイシンのようなＰＥ結合ペプチドを連結することによって、有効な標的された抗ウイルス剤が得られる。ＰＥ結合ペプチド部分、好ましくはデュラマイシンは、さらなる治療効果を有し得るが、結合された抗ウイルス剤は、このような構築物内の一次治療因子であるように設計される。

【０６６４】

架橋リンカー、ペプチドスペーサー、ビオチン：アビジン構築物および組み換え発現を含む、上記の結合体化技術のいずれかが、本発明によるデュラマイシン誘導体を調製するために用いられ得る。例えば、デュラマイシン分子内の結合の有利な部位は、デュラマイシン配列（配列番号９；図１３Ｐ；Ｈａｙａｓｈｉら、１９９０）におけるアミノ酸位置２でのリジン残基に対する。しかし、この部位での連結は、本発明の要件ではない。

【０６６５】

従って、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンは、架橋目的のために利用可能な官能基を有するように誘導体化され得る。広範な種々の基、例えば、一級または二級のアミン基、ヒドラジド基またはヒドラジン基、カルボキシルアルコール、リン酸、カルバミン酸およびアルキル化の基がこの様式で用いられ得る。従って、結合のための因子（抗ウイルス剤を含む）が、シッフ塩基結合、ヒドラゾンまたはアシルヒドラゾン結合またはヒドラジドリンカーを通じて結合体化されてもよい（各々が本明細書において参考として詳細に援用される、米国特許第５，４７４，７６５号および５，７６２，９１８号）。

【０６６６】

Ｑ１．ＰＥ結合および抗細菌ペプチド

任意のＰＥ結合ペプチドを本発明のこれらの局面において用いてもよい。例えば、低分子および高分子のキニノーゲンはＰＥに結合することが公知である。ヒトタンパク質を含む、種々のこのような結合タンパク質についてのタンパク質およびＤＮＡの配列は当該分野で公知であり、そのことからＰＥ結合ペプチドの使用が容易になる。例えば、高分子量および低分子量のキニノーゲンについてのヒトの遺伝子およびタンパク質は、各々が本明細書において参考として詳細に援用される、Ｋｉｔａｍｕｒａら（１９８５）およびＫｅｌｌｅｒｍａｎｎら（１９８６）に記載される。

【０６６７】

米国特許第６，３１２，６９４号は、ＰＥ結合タンパク質、例えば、キニノーゲンおよびそのＰＥ結合フラグメントを用いる、特定のＰＥ結合結合体を記載する。米国特許第６，３１２，６９４号においては、ＰＥ結合タンパク質またはそのＰＥ結合フラグメントは、抗細胞（ａｎｔｉｃｅｌｌｕｌａｒ）因子、毒素および凝固因子に作動可能に連結される。本発明の場合、ＰＥ結合ペプチドは、不活性キャリア、腫瘍標的因子または抗ウイルス因子に結合される。結合のための本発明の因子およびそれらの使用方法は、驚くべき進歩であるが、米国特許第６，３１２，６９４号は、ＰＥ結合ペプチド、例えば、キニノーゲンのＰＥ結合ペプチドフラグメントをさらに記載しかつ使用可能にする目的で参考として本明細書に詳細に援用される。

【０６６８】

本発明における使用のための現在好ましいＰＥ結合ペプチドは、ＰＥ結合分子、デュラマイシンに基づくペプチドである。デュラマイシン（２６２２Ｕ９０，Ｍｏｌｉ１９０１）は、ランチバイオティック（ｌａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ）ファミリー由来の抗菌ペプチドであり（米国特許第４，４５２，７８２号；Ｓｈｏｔｗｅｌｌら、１９５８；ＮａｋａｍｕｒａおよびＲａｃｋｅｒ，１９８４）、そしてランチバイオティックファミリーの他のメンバーが本発明において用いられ得る。ＰＥ結合ペプチドが、構築物の標的因子として用いられる場合、例えば、不活性なキャリアまたは抗ウイルス剤に連結される場合、ランチバイオティックＰＥ結合ペプチドは、ＰＥ結合活性を実質的に保持するべきである。構築物において治療因子として用いられる場合、詳細には腫瘍標的化因子に対して結合される場合、ＰＥ結合活性のある程度の損失についてのさらなる許容が存在する。

【０６６９】

実質的にＰＥに結合する候補ペプチドを確認または同定するために候補ペプチドを試験することは、本開示に照らせば単刀直入な問題であって、例えば、本明細書に記載される任意の１つ以上のＥＬＩＳＡを用いて達成できる。本明細書におけるＰＥ結合ペプチドとしての使用のためのランチバイオティックは、好ましくは、デュラマイシンと実質的に同じＰＥ結合活性を示し、さらにより好ましくは、デュラマイシンのような他のリン脂質を上回るＰＥについて実質的に同じ特異性も示す。このような特性はまた、本開示に、詳細には実施例に照らして容易に決定できる。

【０６７０】

上記の規準に基づいて、以下のランチバイオティックは、本発明の構築物および結合体の一部として用いられ得る：デュラマイシン、シンナマイシン、アクタガルディン（ａｃｔａｇａｒｄｉｎｅ）、アンコベニン（ａｎｃｏｖｅｎｉｎ）、エピデルミン、ガリデルミン、ランチオペプチン、メルサシジン、ナイシン、Ｐｅｐ５およびサブチリン。デュラマイシンは本発明の全ての局面における使用のための最も好ましいＰＥ結合ペプチドである。デュラマイシンは、抗菌剤であり、これはまた、喘息、慢性気管支炎およびＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ感染（各々が参考として本明細書に援用される；米国特許第５，８４９，７０６号；同第５，７１６，９３１号；同第５，６８３，６７５号；同第５，６５１，９５７号；および同第５，５１２，２６９号）ならびに嚢胞性線維症（ＭｃＮｕｌｔｙら、２００３）を処置するのにおける使用について示唆されている。しかし、デュラマイシンは、細胞不浸透性基に対する結合体化についても、詳細にはウイルス感染の処置における使用についても、以前には記載も示唆もされていない。

【０６７１】

シンナマイシン（Ｒｏ０９－０１９８）は、ＰＥに結合する、関連する分子である（Ｗａｋａｍａｔｓｕら、１９８６；Ｃｈｏｕｎｇら、１９８８ａ；１９８８ｂ）。標識されたシンナマイシンは、ＰＥの二重層を貫通する移動（Ａｏｋｉら、１９９４；Ｅｍｏｔｏら、１９９６）およびインビトロにおけるＴ細胞のアポトーシスの間のＰＥ露出（Ｅｍｏｔｏら、１９９７；ＵｍｅｄａおよびＥｍｏｔｏ、１９９９）を研究するためのプローブとして用いられている。しかし、本発明によるシンナマイシン誘導体の治療的な使用は、以前には記載も示唆もされていない。従って、ジンナマイシンに基づく本発明のＰＥ結合ペプチド誘導体を含む薬学的組成物、およびその種々の医学的用途は、このような組成物がウイルス感染を処置するのにおける使用を意図される場合に特に、当該分野における進歩である。

【０６７２】

以下の抗菌性ペプチドはまた、本発明の結合体において、詳細には腫瘍標的化因子に結合された治療因子として用いられ得る；シスチバイオティック（ｃｙｓｔｉｂｉｏｔｉｃｓ）、例えば、ペディオシンＡｃＨ／ＰＡ１、ロイコシンＡ／Ｕａｌ　１８７、メセンテリシンＹ　１０５、サカシンＡ、サカシンＰ、ラクタシンＦ、セレイン　７／８およびカルノバクテリオシン、例えば、カルノバクテリオシンＡ、ＢＭ１およびＢ２；ならびにチオールバイオティック（ｔｈｉｏｌｂｉｏｔｉｃｓ）、詳細にはラクトコッキン（ｌａｃｔｏｃｏｃｃｉｎ）、例えば、ラクトコッキンＢ、Ａ、Ｍ^{a}、Ｎ^{a}、Ｇ^{a}およびＧ。

【０６７３】

Ｑ２．細胞不浸透性基

細胞不浸透性基に、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンを結合させることは、ペプチドがクラスターを形成する能力を低下させ、実質的にＰＥ結合ペプチドが正常細胞へ浸透することを妨げ、従って毒性を低下させる。しかし、ＰＥ結合特性は、維持されており、その結果、このペプチドは、表面上に露出されたＰＥを有する異常な細胞または感染した細胞に対して局在化し得る。

【０６７４】

例示的な細胞不浸透性基としては、生理学的なｐＨで正の電荷または負の電荷を保有する基、例えば、硫酸イオン、スルホン酸イオン、リン酸イオン、カルボキシルイオン、フェノールイオン、四級アンモニウムイオンおよびアミン基が挙げられる。さらなる例は、

極性の基、例えば、単純な糖および多糖、アミノ酸およびポリアルコールである。デュラマイシンは詳細には、ビオチンに連結されて、ビオチン化ＰＥ結合ペプチドを形成してもよく、これが、薬学的組成物または医薬、詳細にはウイルス感染を処置することを意図するものに分散されてもよい。細胞不浸透性基はまた、ポリペプチド、タンパク質または免疫グロブリンであってもよく、そのいずれも不活性キャリアとして、または標的化因子として機能し得る。

【０６７５】

Ｑ３．不活性キャリア

ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンは、不活性な細胞不浸透性キャリアに対する結合によって細胞不浸透性にされ得る。ＰＥ結合活性が実質的に破壊されない限り、広範な不活性な細胞不浸透性キャリアを、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンに結合体化して、細胞不浸透性ＰＥ結合ペプチドを調製し得る。不活性キャリアは好ましくは、それが動物または患者への投与の際に、なんら重大な望ましくない効果を生じないように、生物学的に適合性であるべきである。

【０６７６】

キャリアタンパク質が用いられてもよく、そして例示的なタンパク質はアルブミンおよびグロブリンである。ニュートラビジンおよびストレプトアビジンがしばしば好ましい。ポリサッカライドおよびＰＥＧを含む、天然または合成のポリマーのような非タンパク質キャリアもまた用いられ得る。

【０６７７】

特定の実施形態において、キャリアは免疫グロブリンまたはその部分である。ヒト免疫グロブリン（ＨＩｇＧ）は、ヒトの投与に好ましい。免疫グロブリンはまた、以下に考察されるように標的化機能を付与し得る。不活性キャリアとして、免疫グロブリンは、結合体に対して標的化機能を付与しない点で、「無関係の特異性（ｉｒｒｅｌｅｖａｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ）」のものである。しかし、特定のタイプの免疫グロブリンの選択を通じて、依然として特定の利点を得ることができる。例えば、免疫グロブリンのＦｃ部分は、宿主免疫細胞を補充して、これによって宿主防御をさらに刺激するために用いられ得る。

【０６７８】

Ｑ４．標的化因子

不活性キャリアへの結合ではなく、ＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンは、標的因子、詳細には腫瘍細胞、腫瘍または腫瘍内脈管構造または腫瘍間質の成分へ結合する因子への結合によって細胞不浸透にされ得る。標的化因子は、標的組織、好ましくは腫瘍環境へこの構築物を指向し、そして結合されたＰＥ結合ペプチド、好ましくはデュラマイシンは、送達の際に治療効果を発揮する。

【０６７９】

適切な標的化因子は、腫瘍細胞に結合する、抗体および他の因子のような成分である。「腫瘍細胞に結合する（ｂｉｎｄ　ｔｏ　ａ　ｔｕｍｏｒ　ｃｅｌｌ）」因子とは本明細書においては、本明細書においてさらに記載されるとおり、腫瘍細胞の任意の接近可能な構成要素（単数または複数）に結合するか、または腫瘍細胞にそれ自体が結合するかそうでなければ会合する、ある構成要素に結合する、標的化因子として定義される。

【０６８０】

このような腫瘍細胞標的化因子および結合リガンドのほとんどが、細胞表面腫瘍抗原またはマーカーに結合する因子、詳細には抗体であることが考えられる。多くのこのような抗原は、抗原結合および腫瘍標的化における使用のための種々の抗体と同様に公知である。従って、本発明は、同定された腫瘍細胞表面抗原に結合する、そして／またはインタクトな腫瘍細胞に結合する標的因子を包含する。米国特許第５，８７７，２８９号；同第６，００４，５５５号；同第６，０３６，９５５号；同第６，０９３，３９９号の表Ｉおよび表ＩＩの、同定される腫瘍細胞表面抗原およびインタクトな腫瘍細胞は、適切な腫瘍細胞表面抗原を例証する目的で参考として本明細書に詳細に援用される。

【０６８１】
腫瘍細胞結合領域の例は、細胞表面腫瘍抗原ｐ１８５^{ＨＥＲ２}、ミルクのムチンコアタンパク質、ＴＡＧ－７２、ルイス（Ｌｅｗｉｓ）ａまたはガン胎児性抗原（ＣＥＡ）に結合する抗体の抗原結合領域を含むものである。腫瘍細胞結合領域の別の群は、抗体９．２．２７、ＯＶ－ＴＬ３、ＭＯｖ１８、Ｂ３（ＡＴＣＣ　ＨＢ１０５７３）、ＫＳ１／４（ベクターｐＧＫＣ２３１０（ＮＲＲＬ　Ｂ－１８３５６）またはベクターｐＧ２Ａ５２（ＮＲＲＬ　Ｂ－１８３５７）、２６０Ｆ９（ＡＴＣＣ　ＨＢ　８４８８）またはＤ６１２（ＡＴＣＣ　ＨＢ　９７９６）を含む細胞から得られる）に結合する腫瘍関連抗原に結合する抗体の抗原結合領域を含むものである。Ｄ６１２は、米国特許第５，１８３，７５６号に記載されており、そしてＡＴＣＣアクセッション番号ＨＢ　９７９６を有し；Ｂ３は米国特許第５，２４２，８１３号に記載されて、ＡＴＣＣアクセッション番号ＨＢ１０５７３を有し；そして組み換えおよびキメラのＫＳ１／４抗体は、米国特許第４，９７５，３６９号に記載される；各々が参考として本明細書に援用される。

【０６８２】
腫瘍細胞の標的可能な成分としてはさらに、壊死性かさもなければ損傷された腫瘍細胞から遊離された成分が挙げられ、これにはサイトゾルおよび／または核の腫瘍細胞抗原が挙げられる。これらは好ましくは、浸透性であるように誘導され得る細胞に、または哺乳動物の正常な、生きている細胞の外側には存在せず接近可能でもない実質的に全ての新形成のおよび正常な細胞の細胞ゴーストに存在する、不溶性の細胞内抗原（単数または複数）である。

【０６８３】
Ａｌａｎ　Ｅｐｓｔｅｉｎおよび同僚に対して発行された米国特許第５，０１９，３６８号、同第４，８６１，５８１号および同第５，８８２，６２６号は各々が、インビボにおいて悪性細胞から接近可能になる細胞内抗原に特異的な抗体を作製して使用する方法をさらに記載して教示する目的のために参考として本明細書に詳細に援用される。記載される抗体は、哺乳動物の悪性細胞の細胞内成分に十分特異的であるが、細胞外成分には特異的ではない。例示的な標的としてはヒストンが挙げられるが、壊死性腫瘍細胞から特異的に放出された全ての細胞内成分が包含される。

【０６８４】
血管新生した腫瘍を有する動物または患者に対する投与の際、このような抗体は、インビボに存在して悪性細胞の少なくとも一部を壊死性にさせる腫瘍再構築のプロセス（単数または複数）に起因して、血管新生した腫瘍が自然に壊死性の腫瘍細胞を含むという事実のおかげで悪性細胞に局在する。さらに、腫瘍壊死を増強する他の治療剤と組み合わせたこのような抗体の使用は、標的化および引き続く治療の有効性を増強するように機能する。従って、これらのタイプの抗体は、本明細書に開示されるような標的因子として用いられ得る。

【０６８５】
腫瘍内皮細胞および間質に存在するマーカーに結合するが、正常な細胞、内皮細胞および間質からはほとんど欠失されている、ある範囲の適切な標的因子が利用可能である。腫瘍脈管構造標的化のために、標的化抗体またはリガンドはしばしば、血管新生された腫瘍の腫瘍内血管によって発現されるか、そこに吸着されるか、その上で誘導されるか、さもなければそこに局在するマーカーに結合する。従って、「腫瘍脈管構造の構成要素（ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ　ｏｆ　ｔｕｍｏｒ　ｖａｓｃｕｌａｔｕｒｅ）」とは、これらの細胞表面レセプターまたは分子に結合され得る、腫瘍脈管内皮細胞表面分子および任意の構成要素、例えば増殖因子の両方を含む。以下の特許は、腫瘍脈管構造の、発現されるか、吸着されるか、誘導されるか、または局在されるマーカーに対して指向される標的化因子の調製および使用に関する本発明の教示をさらに補充する目的のために、本明細書に参考として詳細に援用される：米国特許第５，８５５，８６６号；同第５，７７６，４２７号；同第５，８６３，５３８号；同第５，６６０，８２７号；同第５，８５５，８６６号；同第５，８７７，２８９号；同第６，００４，５５４号；同第５，９６５，１３２号；同第

６，０３６，９５５号；同第６，０９３，３９９号；同第６，００４，５５５号。

【０６８６】

腫瘍および腫瘍内血管の表面発現標的の例としては、脈管細胞表面レセプターおよび細胞接着分子が挙げられる（参考として本明細書に詳細に援用される、ＴｈｏｒｐｅおよびＲａｎ，２０００、表１を参照のこと）。適切な例としては、例えば、ＴＥＣ－４、ＴＥＣ－１１、Ｅ－９およびＳｎｅｆ抗体によって標的されるエンドグリン（ｅｎｄｏｇｌｉｎ）；例えば、Ｈ４／１８抗体によって標的される、Ｅ－セレクチン；例えばＥ１／６および１．４ｃ３抗体によって標的されるＶＣＡＭ－１；例えば、ＦＢ５抗体によって標的されるエンドシアリン；例えば、ＬＭ６０９およびペプチド標的化因子によって標的されるα$_v$β$_3$インテグリン；多数の抗体によって、詳細にはＶＥＧＦによって標的されるＶＥＧＦレセプターであるＶＥＧＦＲ１；同様に多数の抗体、例えば、３Ｅ７およびＧＶ３９によって標的されるＶＥＧＦレセプター複合体；ならびにＪ５９１のような抗体によって標的されるＰＳＭＡ。エンドグリン、ＴＧＦβレセプター、Ｅセレクチン、Ｐセレクチン、ＶＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－１、ＬＡＭ－１と反応性のリガンド、ＶＥＧＦ／ＶＰＦレセプター、ＦＧＦレセプター、α$_v$β$_3$インテグリン、プレイオトロピン、エンドシアリンのような例はさらに、各々が参考として本明細書に援用される、米国特許第５，８５５，８６６号；同第５，８７７，２８９号；同第６，００４，５５５号；同第；６，０９３，３９９号に記載され使用可能にされる。

【０６８７】

さらなる適切な例としては、特定のペプチド標的化因子によって各々標的される、プロテオグリカン、例えば、ＮＧ２、およびマトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）、例えば、ＭＭＰ２およびＭＭＰ９が挙げられる（ＴｈｏｒｐｅおよびＲａｎ，２０００）。これらは、血管再構築の部位である、腫瘍における標的可能部分として発現される再構築酵素の例である。さらなる適切な標的はトロンボモジュリン、Ｔｈｙ－１およびシスタチンである。腫瘍内皮細胞において増加した配列を同定する研究によってまた、標的可能な腫瘍血管マーカーとして、トロンボモジュリン、ＭＭＰ１１（ストロメリシン）、ＭＭＰ２（ゲラチナーゼ）および種々のコラーゲンが同定され、これはまた本明細書において参考として詳細に援用される米国特許第６，００４，５５５号および同第６，０９３，３９９号にも一致している。

【０６８８】

別の適切な標的はＰＳＭＡ（前立腺特異的膜抗原）である。モノクローナル抗体７Ｅ１１によって最初に規定されたＰＳＭＡは、前立腺ガンのマーカーとしてもともと同定されており、２型組み込み型膜糖タンパク質として公知である。７Ｅ１１抗体は、生きた細胞においては結合について利用できない、ＰＳＭＡの細胞内エピトープに結合する。従って、本発明の状況では、ＰＳＭＡは細胞外ドメインに対する抗体を用いて標的される。このような抗体は、肺、結腸および乳房を含む種々のガン腫における腫瘍脈管内皮構造と反応するが、正常な脈管内皮細胞とは反応しない。

【０６８９】

ＰＳＭＡの外部ドメインに結合する多くの抗体は容易に利用可能であって、本発明において用いられ得る。モノクローナル抗体３Ｅ１１、３Ｃ２、４Ｅ１０－１．１４、３Ｃ９および１Ｇ３は、ＰＳＭＡタンパク質の細胞外ドメインの異なる領域について特異性を示し、そして本明細書における使用に適切である。ＰＳＭＡの細胞外ドメインの３つのさらなる抗体は、Ｊ５９１、Ｊ４１５およびＰＥＱ２２６．５であって、これは腫瘍関連脈管構造におけるＰＳＭＡ発現を確認し、本発明において用いられ得る。ＰＳＭＡおよびその改変体をコードする核酸はまた容易に利用可能であるので、米国特許第５，９３５，８１８号および同第５，５３８，８６６号、必要に応じて、さらなる抗体を生成してもよい。

【０６９０】

参考として本明細書に詳細に援用される米国特許第６，１５０，５０８号は、本発明において用いられ得る、ＰＳＭＡの細胞外ドメインに結合する種々の他のモノクローナル抗体を記載する。細胞表面で発現されたＰＳＭＡと反応性の３５個の例示的なモノクローナ

ル抗体のうちの任意の１つ以上を用いてもよい。これらとしては、３Ｆ５．４Ｇ６（ＡＴＣＣ ＨＢ１２０６０）；３Ｄ７－１．Ｉ．（ＡＴＣＣ ＨＢ１２３０９）；４Ｅ１０－１．１４（ＡＴＣＣ ＨＢ１２３１０）；３Ｅ１１（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４８８）；４Ｄ８（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４８７）；３Ｅ６（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４８６）；３Ｃ９（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４８４）；２Ｃ７（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４９０）；１Ｇ３（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４８９）；３Ｃ４（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４９４）；３Ｃ６（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４９１）；４Ｄ４（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４９３）；１Ｇ９（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４９５）；５Ｃ８Ｂ９（ＡＴＣＣ ＨＢ１２９４２）；３Ｇ６（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４８５）；および４Ｃ８Ｂ９（ＡＴＣＣ ＨＢ１２４９２）が挙げられる。

【０６９１】

ＰＳＭＡの細胞外ドメインを認識するさらなる抗体またはその結合部位は、各々が参考として本明細書に詳細に援用される、米国特許第６，１０７，０９０号および同第６，１３６，３１１号に記載される。詳細には４つのハイブリドーマ細胞株が記載されており、これはＥ９９、Ｊ４１５、Ｊ５３３およびＪ５９１（ＡＴＣＣ ＨＢ－１２１０１、ＨＢ－１２１０９、ＨＢ－１２１２７、およびＨＢ－１２１２６）であって、従ってその任意の１つ以上が、請求された発明に従って、標的化因子として用いられ得る。

【０６９２】

「吸着された（ａｄｓｏｒｂｅｄ）」標的に結合する標的化因子は、別の適切な基、例えば、腫瘍または腫瘍内脈管構造細胞表面レセプターに結合するリガンドまたは増殖因子に結合するものである。このような抗体としては、ＶＥＧＦ、ＦＧＦ、ＴＧＦβ、ＨＧＦ、ＰＦ４、ＰＤＧＦ、ＴＩＭＰまたは腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォームに結合する抗体が挙げられる（米国特許第５，８７７，２８９号；同第５，９６５，１３２号；同第６，０９３，３９９号および同第６，００４，５５５号；各々が本明細書において参考として援用される）。

【０６９３】

他の適切な標的抗体、またはそのフラグメントは、リガンド－レセプター複合体または増殖因子－レセプター複合体に存在するが、個々のリガンドまたは増殖因子およびレセプターの両方に存在しないエピトープに結合するものである。このような抗体は、細胞表面に提示された場合、リガンド－レセプター複合体または増殖因子－レセプター複合体を認識して結合するが、遊離のリガンドまたは増殖因子または複合体化していないレセプターには結合しない。従って、「結合したレセプター複合体（ｂｏｕｎｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｃｏｍｐｌｅｘ）」とは本明細書において用いる場合、増殖因子レセプターのようなそのレセプターにリガンドまたは増殖因子が特異的に結合する場合に生成される得られる複合体をいう。

【０６９４】

これらの局面は、ＶＥＧＦ／ＶＥＧＦレセプター複合体によって例示される。このようなリガンド－レセプター複合体は、非腫瘍関連内皮細胞上よりも腫瘍関連内皮細胞上に有意に多数存在し、従って、抗複合体抗体によって標的され得る。抗複合体抗体は、モノクローナル抗体２Ｅ５、３Ｅ５および４Ｅ５ならびにそのフラグメントを含む。

【０６９５】

サイトカインおよび凝固剤によって天然におよび人工的に誘導可能な抗原も標識され得る。例示的なサイトカイン誘導性抗原は、Ｅセレクチン、ＶＣＡＭ－１、ＩＣＡＭ－１、エンドグリン、ＬＡＭ－１と反応性のリガンド、およびさらにはＭＨＣクラスＩＩ抗原であって、これは、単球、マクロファージ、肥満細胞、ヘルパーＴ細胞、ＣＤ８陽性Ｔ細胞、ＮＫ細胞またはさらには腫瘍細胞によって遊離され得るように、例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－４、ＴＮＦ－α、ＴＮＦ－βまたはＩＦＮ－γによって誘導される。

【０６９６】

さらなる誘導性抗原としては、凝固因子によって、例えば、トロンビン、第ＩＸ／ＩＸａ因子、第Ｘ／Ｘａ因子、プラスミンまたはメタロプロテイナーゼ（マトリックスメタロプロテイナーゼ、ＭＭＰ）によって誘導可能な抗原が挙げられる。概して、トロンビンに

よって誘導される抗原が用いられる。この群の抗原としては、Ｐセレクチン、Ｅセレクチン、ＰＤＧＦおよびＩＣＡＭ－１が挙げられ、Ｐセレクチンおよび／またはＥセレクチンの誘導および標的が一般に好ましい。

【０６９７】

他の実施形態では、本発明の脈管構造および間質標的化因子（以下を参照）は、標的化因子であって、それ自体は抗体ではなくその生物学的リガンド、または一部である。「生物学的リガンド（ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｌｉｇａｎｄｓ）」とはこの意味で、サイトカイン、ホルモン、増殖因子などによって例示されるように、間質中または血管細胞に接近可能な、細胞表面分子、例えばレセプターに結合するかまたは会合する分子である。任意のこのような増殖因子またはリガンドが、疾患関連間質または脈管構造に、例えば、腫瘍脈管構造内皮細胞の表面に存在する特定の生物学的レセプターに結合する限り、これが用いられてもよい。

【０６９８】

本発明のこれらの局面における使用のための適切な増殖因子としては、例えば、ＶＥＧＦ／ＶＰＦ（血管内皮増殖因子／血管透過性因子）、ＦＧＦ（線維芽増殖因子ファミリーのタンパク質）、ＴＧＦβ（トランスフォーミング成長因子Ｂ）、腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォーム、散乱係数／肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、血小板因子４（ＰＦ４）、ＰＤＧＦ（血小板由来増殖因子）、ＴＩＭＰ、またはさらにはＩＬ－８、ＩＬ－６もしくは第ＸＩＩＩａ因子が挙げられる。ＶＥＧＦ／ＶＰＦおよびＦＧＦがしばしば好ましい。

【０６９９】

さらなる適切な標的化因子は、腫瘍関連間質に結合する因子である。腫瘍進行の間に、周囲の組織の細胞外マトリックスは、２つの主なプロセスを通じて再構築される：正常な組織の細胞外マトリックス成分のタンパク質分解性分解；ならびに腫瘍誘導性サイトカインによって活性化された腫瘍細胞および間質性細胞による細胞外マトリックス成分の新規な合成。これらの２つのプロセスは、「腫瘍細胞外マトリックス（ｔｕｍｏｒ　ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　ｍａｔｒｉｘ）」または「腫瘍間質（ｔｕｍｏｒ　ｓｔｒｏｍａ）」を生成するが、これは腫瘍進行に対して寛容であり、正常組織の細胞外マトリックスまたは間質とは定性的かつ定量的に別個である。

【０７００】

従って「腫瘍間質（ｔｕｍｏｒ　ｓｔｒｏｍａ）」は、正規の組織に存在しない標的可能な成分を有する。本発明における使用のための特定の好ましい腫瘍間質標的因子は、基底膜マーカー、ＩＶ型コラーゲン、ラミニン、硫酸ヘパラン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、活性化血小板、ＬＩＢＳ、ＲＩＢＳおよびテネイシンに結合する因子である。以下の特許は、腫瘍間質標的化因子の調製および使用に関する本発明の教示をさらに補強する目的で参考として本明細書に詳細に援用される：米国特許第５，８７７，２８９号；同第６，０９３，３９９号；同第６，００４，５５５号；および同第６，０３６，９５５号。

【０７０１】

腫瘍関連間質の成分としては、間質、細胞外マトリックスおよび結合組織の構造的および機能的成分が挙げられる。従って、腫瘍間質標的化因子としては、基底膜マーカー、ＩＶ型コラーゲン、ラミニン、フィブリン、硫酸ヘパラン、プロテオグリカン、糖タンパク質、陰イオン性多糖類（例えば、ヘパリンおよびヘパリン様成分）およびフィブロネクチンのような成分に結合する因子が挙げられる。

【０７０２】

例示的な有用な抗体は、種々の良性および悪性の腫瘍の間質において発現された高分子量の細胞外糖タンパク質であるテネイシンに結合する抗体である。従って、抗テネイシン抗体は、標的化因子として用いられ得る（参考として本明細書に詳細に援用される、米国特許第６，０９３，３９９号および同第６，００４，５５５号）。

【０７０３】

さらに適切な標的化因子としては、平滑筋細胞、周皮細胞、線維芽細胞、マクロファー

ジ、および浸潤性リンパ球または白血球に結合する抗体およびリガンドが挙げられる。「活性化された血小板（ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｐｌａｔｅｌｅｔ）」は、腫瘍間質のさらなる成分である。なぜなら血小板は、活性化された場合に間質に結合して、これによってこのような血小板が本発明によって標的され得るからである。

【０７０４】

さらに適切な間質性標的化因子、抗体およびその抗原結合領域は、「誘導性（ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ）」腫瘍間質成分、例えば、サイトカインによって誘導性の成分、および特に、凝固因子、例えばトロンビンによって誘導性の成分に結合する。好ましい抗間質性抗体の群は、フィブリノーゲン上のＲＩＢＳ（レセプター誘導性結合部位）に結合するものである。従って、「ＲＩＢＳ」は標的可能な抗原であり、間質でのその発現は、活性化された血小板によって指示される。活性化された血小板上のＬＩＢＳ（リガンド誘導性結合部位）に結合する抗体がまた有用である。

【０７０５】

腫瘍関連間質の特に好ましい標的可能な要素は、現在のところ、腫瘍関連フィブロネクチン（ＦＮ）アイソフォームである。フィブロネクチンは、細胞外マトリックスおよび体液の両方の多機能の高分子量糖タンパク質成分である。それらは、多くの異なる生物学的プロセス、例えば、正常な細胞形態学の確立および維持、細胞遊走、止血および血栓症、創傷治癒および発ガン性トランスフォーメーションに関与する。

【０７０６】

フィブロネクチンアイソフォームは、インテグリンファミリーのレセプターに結合するリガンドである。「腫瘍関連フィブロネクチンアイソフォーム（ｔｕｍｏｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ｆｉｂｒｏｎｅｃｔｉｎ　ｉｓｏｆｏｒｍ）」は、腫瘍脈管構造および／または腫瘍間質の一部であると考えることができる。フィブロネクチンアイソフォームは、転写、転写後および翻訳後のレベルでもたらされる、広範な構造的異質性を有する。

【０７０７】

フィブロネクチンにおける構造的多様性は最初に、少なくとも２０の異なるアイソフォームを生成するための一次フィブロネクチン転写物の３つの領域（ＥＤ－Ａ、Ｅｄ－ＢおよびＩＩＩＣＳ）の選択的スプライシングによってもたらされる。組織特異的および発生上特異的な様式で調節されるのと同様に、フィブロネクチン－プレ－ｍＲＮＡのスプライシングパターンは、形質転換された細胞においておよび悪性腫瘍において調節低下されることが公知である。実際に、ＥＤ－Ａ、ＥＤ－ＢおよびＩＩＩＣＳの配列を含むフィブロネクチンアイソフォームは、正常細胞におけるよりもトランスフォームされた細胞および悪性腫瘍細胞においてさらに大きい程度まで発現される。

【０７０８】

詳細には、ＥＤ－Ｂ配列を含むフィブロネクチンアイソフォーム（Ｂ＋アイソフォーム）は、胎児および腫瘍組織において、そして創傷治癒の間に高度に発現されるが、正常な成体の組織における発現に限定される。Ｂ＋フィブロネクチン分子は、成熟血管において検出不能であるが、正常な状況（例えば、子宮内膜の発達）、病理的な血管形成（例えば、糖尿病性網膜症）および腫瘍発達においては血管形成性血管において上方制御される。従って、フィブロネクチンのいわゆるＢ＋アイソフォーム（Ｂ－ＦＮ）は本発明での使用に特に適切である。

【０７０９】

ＥＤ－Ｂ配列は、単一のエキソンによってコードされる完全なＩＩＩ型相同性反復であって、９１アミノ酸を含む。Ｂ＋アイソフォーム自体の存在は、腫瘍誘導性新抗原（ｎｅｏａｎｔｉｇｅｎ）を構成するが、さらに、ＥＤ発現は、ＩＩＩ型リピート７（先行するＥＤ－Ｂ）内の通常潜在性の抗原を露出する；このエピトープは、ＥＤ－Ｂを欠くフィブロネクチン分子においては露出されないので、ＥＤ－Ｂ発現は直接および間接的に新抗原の発現を誘導する。この潜在性の抗原性部位は、モノクローナル抗体ＢＣ－１の標的を形成する（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎｉｍａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｃｕｌｔｕｒｅｓ，Ｐｏｒｔｏｎ　Ｄｏｗｎ，Ｓａｌｉｓｂｕｒｙ，ＵＫ，番号８８０４２

１０１）。ＢＣ１抗体は、本発明の脈管標的化成分として用いられ得る。
【０７１０】
ＥＤ－Ｂアイソフォームに特異性を有する改善された抗体は、参考として本明細書に援用されるＷＯ９７／４５５４４に記載される。このような抗体は、糸状バクテリオファージの表面上に提示されたヒト抗体可変性領域のライブラリーから単鎖Ｆｖｓ（ｓｃＦｖ）として得られている（ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９３／０６２１３、ＷＯ９３／１１２３６およびＷＯ９３／１９１７２も参照のこと）。
【０７１１】
抗体ファージライブラリーを用いて、特定のｓｃＦｖが、これらの抗原が固体表面上でコーティングされる場合（「パニング（ｐａｍｍｉｎｇ）」）、ＥＤ－Ｂドメインを含む組み換えフィブロネクチンフラグメント上で、そして組み換えＥＤ－Ｂ自体の上の両方での直接選択によって単離され得る。抗原のこれらの同じ供給源はまた、「親和性成熟（ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ）」のプロセスにおいて親のクローンに対して改善された特性を有する「第二世代（ｓｅｃｏｎｄ　ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ）」ｓｃＦｖを生成するために首尾よく用いられている。単離されたｓｃＦｖは、好ましくはＮグリカナーゼを用いた事前の処置なしに、ヒトフィブロネクチンのＢ＋アイソフォームと強力かつ特異的に反応する。
【０７１２】
従ってＷＯ９７／４５５４４の抗体は特にその使用が考慮される。抗腫瘍適用において、これらのヒト抗体抗原結合ドメインは有利である。なぜならそれらはヒト投与の際に有する副作用が少ないからである。参照抗体は、ＥＤ－Ｂドメインに直接結合する。好ましくは、抗体は、ヒトフィブロネクチンＥＤ－Ｂおよび非ヒトフィブロネクチンＥＤ－Ｂ、例えばマウスのフィブロネクチンＥＤ－Ｂの両方に結合して、動物モデルにおける試験および解析を可能にする。この抗体フラグメントは、単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂｃ、Ｆａｃｂおよび二重特異性抗体（ｄｉａｂｏｄｉｅｓ）に拡大する。
【０７１３】
フィブロネクチンのＥＤドメインに特異的なさらなる改善された抗体は、ＷＯ９９／５８５７０に記載のように、ナノモル未満の解離定数で生成されており、従ってその使用にさらに好ましい。これらの標的化因子は、この因子および関連の抗体を作製して使用する方法を教示する目的で参考として本明細書において詳細に援用されるＷＯ９９／５８５７０に記載されるＬ１９抗体によって例示される。これらの抗体は、フィブロネクチンのＥＤ－Ｂドメインの特徴的なエピトープに特異的な親和性を有し、かつＥＤ－Ｂエピトープに対して改善された親和性を有する。
【０７１４】
このような改善された組み換え抗体は、抗体ファージディスプレイライブラリーからｓｃＦｖ形式で利用可能である。Ｈ１０およびＬ１９のうちＬ１９は、ナノモル未満の濃度でフィブロネクチンのＥＤ－Ｂドメインについての解離定数を有するが、このＨ１０およびＬ１９に加えて、本明細書において参考として詳細に援用されるＷＯ９９／５８５７０の技術は、同様の抗体を調製するために用いられ得る。抗体ファージディスプレイライブラリーからのフィブロネクチンのＥＤ－Ｂドメインに特異的なヒトｓｃＦｖ抗体フラグメントの単離、およびナノモル未満の親和性でＥＤ－Ｂに結合するヒトｓｃＦｖ抗体フラグメントの単離は、ＷＯ９９／５８５７０の実施例１および２に詳細に記載される。
【０７１５】
従って、好ましい抗体としては、フィブロネクチンのＥＤ－Ｂドメインの特徴的エピトープに特異的な親和性を有する抗体が挙げられるが、この抗体は、ＥＤ－Ｂエピトープについて改善された親和性を有し、この親和性は、ナノモル未満の範囲であり、この抗体は、ＥＤ－Ｂ（＋）フィブロネクチンを認識する。他の好ましい形式では、抗体はｓｃＦｖであるかまたは組み換え抗体であり、そしてその親和性は、そのＣＤＲ残基に限定された数の変異を導入することによって改善される。変異されるべき例示的な残基としては、Ｖ

Ｈドメインの３１～３３、５０、５２および５４、ならびにＶＬドメインの残基３２および５０が挙げられる。このような抗体は２７～５４ｐＭのＫｄでフィブロネクチンのＥＤ－Ｂドメインに結合し得る；Ｌ１９抗体またはＬ１９の機能的に等価な改変体によって例示されるとおり。

【０７１６】

Ｑ５．抗ウイルス結合体

正常な条件下で、ＰＥは、細胞表面には露出されない。しかし、種々の疾患状態において、ＰＥは１つ以上の細胞タイプの細胞表面で露出される。例えば、腫瘍脈管構造内の内皮細胞は、ＰＥ陽性になり、ＨｕＩｇＧに結合体化されたデュラマイシンを用いる首尾よい腫瘍処置によって本明細書において示されるように、ＰＥ指向された治療剤によって標的され得る。ＰＥはまた、ウイルス感染した細胞の細胞表面で露出され、従ってこれは本発明のＰＥ結合ペプチド誘導体を用いる治療介入のさらなる標的である。実際、本出願は、ビオチンおよびＨｕＩｇＧに連結されたデュラマイシン誘導体によって例示されるとおり、デュラマイシン誘導体が、インビトロおよびインビボの両方で有効な抗ウイルス剤であることを示す。

【０７１７】

ＡＺＴ、アシクロビル、ガンシクロビル、シドフォビル（シトシン誘導体）および新規な抗ウイルス薬を含むいくつかの抗ウイルス薬物は、毒性／有効性によって制限される。ウイルス感染の間のＰＥにおける変化に関するその観察に基づいて、さらにもとのＰＥ結合ペプチド誘導体の有効性に照らして、本発明者らは、毒性の低下および有効性の増大を伴う新規な抗ウイルス治療剤を設計することによって抗ウイルス分野での問題に取り組んだ。本発明の新規な抗ウイルス治療剤において、抗ウイルス薬は、ＰＥ結合ペプチドに連結され、これがウイルス感染した細胞に対して結合した抗ウイルス薬を送達するように機能する。

【０７１８】

さらに、本発明者らは、本発明のＰＥ結合ペプチド、抗ウイルス誘導体の発達に関して以下の観察を有する。ＰＥ結合ペプチド誘導体、例えば、デュラマイシン－Ｌ－ビオチンが、全身投与の後でさえ、インビボにおいて、詳細には肺において、マクロファージによって取り込まれることを示すために本明細書においてデータが提示される。感染の際、多くのウイルスは、最初に細網内皮細胞系（ＲＥＳ）の細胞を通過して、マクロファージはウイルス取り込みのための主な細胞である。従って、デュラマイシンのようなＰＥ結合ペプチドに対する抗ウイルス薬の結合によって、薬物の抗ウイルス効果は、侵入するウイルスを排出することを担う主な細胞タイプ（マクロファージ）に指向される。

【０７１９】

従って、ＰＥ結合ペプチド誘導体は、全身投与後に肺においてマクロファージに局在し、当然有用である。エアロゾルを介することを含むさらに直接的な手段での肺への投与もまた想定される。従って、本発明は、広範に適用可能な実際的な抗ウイルス修復を提供することによってウイルス処理分野における重要な欠点を解決する。

【０７２０】

従って、本発明の新規な抗ウイルス治療剤は、好ましくは、２つの薬剤を連結するための生物学的に解放できるかまたは加水分解的に変化しやすい結合を用いて、抗ウイルス薬に結合するＰＥ結合ペプチド、例えばデュラマイシンを含む。将来の抗ウイルスとして開発される任意の因子を含む、任意のある範囲の抗ウイルス因子は、ＰＥ結合ペプチドに連結され、本発明による有利な抗ウイルス治療剤を形成し得る。いわゆる古典的な抗ウイルス剤に加えて、他のＤＮＡ／ＲＮＡインヒビターをＰＥ結合ペプチドに結合して、抗ウイルス治療剤を形成してもよい。例示的な抗ウイルス剤は、表Ｇに列挙されており、その任意の１つ以上を、ＰＥ結合ペプチドに結合して本発明の抗ウイルス結合体を調製してもよいし、または本発明の抗ウイルス併用療法において別々に用いてもよい。

【０７２１】

【表４】

表G

一般的な疾患を生じるウイルスおよび抗ウイルス薬

疾患を生じるウイルス	薬物カテゴリー	例示的な抗ウイルス薬
ヘルペスウイルス		シドフォビル、アシクロビル、ペンシクロビル（ファミシクロビル）、ガンシクロビル、デオキシグアノシン、フォスカーネット、イドクスウリジン、トリフルオロチミジン、ビダラビン、ソリブジン
レトロウイルス	ヌクレオシド逆転写酵素（RT）インヒビター	ジドブジン、ジダノシン、ザルシタビン、ラミブジン、スタブジン、アバカビル、マルチヌクレオシド抵抗性（resistance）A、マルチヌクレオシド抵抗性B
	非ヌクレオシドRTインヒビター	ネビラピン、デラビラジン、エファビレンツ、アデフォビルディピボキシル（Adefovir Dipivoxil）
	プロテアーゼインヒビター	インディナビル、リトナビル、サキナビル、ネルフィナビル、アンプレナビル
	細胞周期相特異的抗悪性腫瘍薬	ヒドロキシウレア（Hydrea™、Bristol Myers-Squibb）
B型肝炎		デオキシシトシンリン酸塩（iphosphate）、ラミブジン三リン酸、エムチシタビン三リン酸、アデフォビル二リン酸、ペンシクロビル三リン酸、ロブカビル三リン酸
C型肝炎		インターフェロンα、リバビリン
インフルエンザAおよびB		アマンタジン、リマンタジン、ザナミビル、オセルタミビル

抗ウイルス因子および薬物の範囲内で、ＰＥ結合ペプチドへの連結のためにはＡＺＴおよびシドフォビルが現在好ましい。選択された抗ウイルス薬、ＰＥ結合ペプチドにかかわらず、抗ウイルス結合体は肺においてマクロファージに、ウイルス感染した細胞に結合し、そしてまたウイルス粒子に結合してもよい。用いられるリンカーまたは結合体化技術に依存して、抗ウイルス薬は、標的細胞の表面で放出されて、次いで細胞に取り込まれてもよい。好ましくは、結合体自体が細胞、例えばマクロファージまたはウイルス感染した細胞に取り込まれる。取り込みは、天然に生じてもよいし、またはウイルス媒介されてもよい。一旦細胞内に入れば、抗体結合体と同様に、リンカーの加水分解によって活性な抗ウイルス剤が遊離される。

【０７２２】

デュラマイシン－シドフォビル抗ウイルス剤についての適切な結合選択肢の１例は、図１３Ｒに記載される。この例では、デュラマイシン－シドフォビル結合体は、肺においてマクロファージに結合するように、そして細胞に取り込まれるように設計される。リンカーの加水分解はホスホラミダイトの分解および、活性なシドフォビルまたは細胞浸透性誘導体（図１３ＲのＲ）の遊離をもたらして、これがシドフォビルを破壊する。

【０７２３】

生物学的に不安定な結合を含む他の結合、例えば、ジスルフィド、酸不安定性、酵素切

断可能または加水分解可能な結合などが用いられ得る。従って、治療剤に対して抗体を連結するのにおける使用のために記載される、生物学的に遊離可能であるかまたは選択的に加水分解可能な任意の結合を、本発明の抗ウイルス誘導体であるＰＥ結合ペプチドと組み合わせて用いてもよい。リンカーの選択は、特定のＰＥ結合ペプチド、例えばデュラマイシンによっては限定されない。なぜならこのペプチドは、上記のような選択された抗ウイルス剤の結合を可能にする官能基を導入することによって誘導体化され得るからである。

【０７２４】

Ｒ．抗ウイルス処置方法

本発明はさらに、ウイルス感染を処置するのにおける使用のために、必要に応じて抗ウイルス剤に結合体化された、ある範囲の抗体、免疫複合体およびＰＥ結合ペプチド誘導体を提供する。この処置レジメン、および詳細には用量は一般に、本発明のガン処置局面について上記されたとおりであって、この適応性は本発明全体の利点である。作用の特定の機構（単数または複数）の理解は、本発明の抗ウイルス処置を行なうのに必要ではないが、本明細書の実施例によって支持されるとおり、ウイルス処置の基礎にある特定の理由は以下のとおりである。

【０７２５】

最も重要な機構は、ウイルス複製および宿主細胞の活性化と関連していると考えられる。ウイルス感染の間、このウイルスは、細胞の内側での複製プロセスの間に細胞を活性化する。細胞活性化のこのプロセスは、ヘルペスウイルス、Ｃ型肝炎およびＨＩＶ－１について示されるとおり、ウイルス複製に必須である。ウイルスの発達は、ウイルスおよび宿主の両方の遺伝子発現を活性化する。例えば、ＰｉｃｈｉｎｄｅウイルスおよびＭａｃｈｕｐｏウイルスの複製は、複製周期後期でアクチノマイシンＤによって阻害され、このことは宿主細胞遺伝子転写がウイルス複製の完成に必要であることを示す。

【０７２６】

ウイルスによる宿主細胞の活性化は、細胞の陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、例えばＰＳおよびＰＥを外面化させる。詳細には、本発明者らは、ウイルス活性化が細胞内へCa^{2+}流入を生じ、これがスクランブラーゼを活性化して、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはＰＳおよびＰＥを外面化させると判断する。陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、好ましくはＰＳおよびＰＥに結合する抗体、ペプチド誘導体、および結合体は、次いで活性化プロセスに結合して、これを妨害し、これによってウイルスが適切に複製され得ることを妨げる。

【０７２７】

本実施例によって、本発明がウイルス感染の後期プロセスにおいて機能して、ウイルスの成熟または出現をブロックすることが示される。本発明者らの研究によって、本発明の因子の阻害性効果が広範に適用可能であることが示される。なぜなら、この因子は異なる発現機構を用いるウイルス上で作動することが示されているからである。例えば、本実施例は、ゴルジ由来開口分泌小胞から逃避するヘルペスウイルス（ＣＭＶ）のブロック、ならびに原形質膜から直接出芽する、アレナウイルス（Ｐｉｃｈｉｎｄｅウイルス）およびパラミクソウイルス（ＲＳＶ）のブロックを実証する。

【０７２８】

ウイルス感染した細胞は、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはＰＳおよびＰＥを外面化させ、これは正常には細胞内であり、すなわち、原形質膜の内面に限局される。ウイルスの逃避の間、リン脂質は、逃避の部位で再分布して、これは原形質膜からのウイルスの出芽または開口分泌の間の膜屈曲に適合し、そして陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質が、このプロセスの間に外面化される。従って、本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体は、外面化した陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、詳細にはＰＳおよびＰＥに結合して、感染した細胞からのウイルスの逃避をブロックする。ウイルス感染した細胞への本発明の構築物の結合も、本実施例に示される。

【０７２９】

本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体はさらに、外面化された陰イオン性リン脂

質およびアミノリン脂質、詳細にはＰＳおよびＰＥに結合し得、そしてウイルス遺伝子発現および／または複製のために必要な１つ以上のシグナル伝達経路を妨げる。

【０７３０】

さらに、エンベロープのあるビリオン自体は、それらの外面に、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質、例えばＰＳおよびＰＥを有する可能性が高い。ウイルスは転位酵素を欠いて、リン脂質を対称に維持するかまたは修復するので、ＰＳおよびＰＥのようなリン脂質の連続的な露出が期待される。従って、本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体は、マクロファージのような宿主細胞によるオプソニン作用、補体結合、食作用および遊離のウイルス粒子の排泄を生じ得る。

【０７３１】

本発明のさらなる局面において、ウイルスは、感染および／または合胞体（ｓｙｎｃｉｔｉａ）形成のために陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質を必要とするようである。本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体はさらに、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に対する結合によってウイルスのライフサイクルのこれらの局面をブロックし得る。

【０７３２】

前述の洞察に従って、そして本実施例に照らして、本発明についてのウイルス処置のスペクトルは、エンベロープの有無、ＤＮＡまたはＲＮＡにかかわらず、任意のウイルスに拡大する。本発明の陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合する抗体、ペプチド誘導体および結合体は少なくとも部分的には、細胞の内側のウイルス複製をブロックし、そして／または細胞からのウイルスの逃避を防止するので、本発明はエンベロープのあるウイルスのみの処置にも任意の特定のウイルスにも限定されず、これは重要な利点である。例えば、本発明に引き続いて公開された研究によって、アネキシンＶおよびＰＳのビヒクルがマクロファージのＨＩＶ－１感染を阻害し得るが、Ｔ細胞のＨＩＶ－１感染も他のウイルス、例えば、水疱性口内炎ウイルスＧおよびアンホトロピックマウス白血病ウイルスも阻害できないということが報告される（Ｃａｌｌａｈａｎら、２００３）。

【０７３３】

天然には、本発明の抗体、ペプチド誘導体および結合体は、エンベロープのあるウイルス上で、詳細には、ＰＳおよびＰＥの、陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質を有するウイルスにおいて、エンベロープの外面上で作用し、ここでこの抗体、ペプチド誘導体および結合体は、ウイルスのクリアランスおよび／または標的細胞のウイルス進入の阻害を生じる。

【０７３４】

従って、本発明の重要な局面は、これが普遍的に適用可能であり、例えばバイオテロの一部として作製された、組み換えの、操作された、および合成のウイルスの処置に適切であるということである。実際、本発明は、動物およびヒトの処置には限定されない。ウイルス分類群において見出される宿主のカテゴリーとしては、藻類、古細菌、細菌、真菌、無脊椎動物、マイコプラズマ、植物、原生動物、スピロプラズマおよび脊椎動物が挙げられるので、本発明を用いて、農業で重要なウイルスを含む、任意のこのような設定におけるウイルス感染および複製を阻害することができる。脊椎動物におけるウイルス感染および関連の疾患の処置は現在好ましく、そして脊椎動物に感染する、表Ｈのウイルスのうちの任意の１つ以上が、本発明を用いて阻害され得、そして生じた感染が処置され得る。

表Ｈ

脊椎動物のウイルス

【０７３５】

【表５－１】

科	属	種のタイプ
Adenoviridae	*Mastadenovirus* *Aviadenovirus* *African Swine Fever-like Viruses*	*Human adenovirus 2* *Fowl adenovirus 1* *African swine fever virus*
Arenaviridae	*Arenavirus* *Arterivirus*	*Lymphocytic choriomeningitis virus* *Equine arteritis virus*
Astroviridae	*Astrovirus*	*Human astrovirus 1*
Birnaviridae	*Aquabirnavirus* *Avibirnavirus*	*Infectious pancreatic necrosis virus* *Infectious bursal disease virus*
Bunyaviridae	*Bunyavirus* *Hantavirus* *Nairovirus* *Phlebovirus*	*Bunyamwera virus* *Hantaan virus* *Nabrobi sheep disease virus* *Sandfly fever Sicilian virus*
Caliciviridae	*Calicivirus*	*Vesicular exanthema of swine virus*
Circoviridae	*Circovirus*	*Chicken anemia virus*
Coronaviridae	*Coronavirus* *Torovirus* *Deltavirus*	*Avian infectious bronchitis virus* *Berne virus* *Hepatitis delta virus*
Filoviridae	*Filovirus*	*Marburg virus*
Flaviviridae	*Flavivirus* *Pestivirus* *Hepatitis C – like viruses*	*Yellow fever virus* *Bovine diarrhea virus* *Hepatitis C virus*
Hepadnaviridae	*Orthophepadnavirus* *Avihepadnavirus*	*Hepatitis B virus* *Duck hepatitis B virus*
Herpesviridae *Subfamily* *Alphaherpesvirinae* *Subfamily:* *Betaherpesvirinae* *Subfamily* *Gammaherpesvirinae*	 *Simplexvirus* *Varicellovirus* *Cytomegalovirus* *Muromegalovirus* *Roseolovirus* *Lymphocryptovirus* *Rhadinovirus*	 *Human herpesvirus 1* *Human herpesvirus 3* *Human herpesvirus 5* *Mouse cytomegalovirus 1* *Human herpesvirus 6* *Human herpesvirus 4* *Ateline herpesvirus 2*
Iridoviridae	*Ranavirus* *Lymphocystivirus* *Goldfish virus – like viruses*	*Frog virus 3* *Flounder virus* *Goldfish virus 1*
Orthomyxoviridae	*Influenzavirus A, B* *Influenzavirus C* *Thogoto-Like viruses*	*Influenza A virus* *Influenza C virus* *Thogoto virus*
Papovaviridae	*Polyomavirus* *Papillomavirus*	*Murine polyomavirus* *Cottontail rabbit papillomavirus (Shope)*

【０７３６】

【表５－２】

科	属	種のタイプ
Paramyxoviridae *Subfamily* *Paramyxovirinae* *Subfamily* *Pneumovirinae*	*Parayxovirus* *Morbillivirus* *Rubulavirus* *Pneumovirus*	*Human parainfluenza virus 1* *Measles virus* *Mumps virus* *Human respiratory syncytial virus*
Parvoviridae *Subfamily* *Parovirinae*	*Parvovirus* *Erythovirus* *Dependovirus*	*Mice minute virus* *B19 virus* *Adeno-associated virus 2*
Picornaviridae	*Enterovirus* *Rhinovirus* *Hepatovirus* *Cardiovirus* *Aphthovirus*	*Poliovirus 1* *Human rhinovirus 1A* *Hepatitis A virus* *Encephalomyocarditis virus* *Foot-and-mouth disease virus O*
Poxviridae *Subfamily* *Chordopoxvirinae*	*Orthopoxvirus* *Parapoxyvirus* *Avipoxvirus* *Capripoxvirus* *Leporipoxvirus* *Suipoxvirus* *Molluscipoxvirus* *Yatapoxvirus*	*Vaccinia virus* *Orf virus* *Fowlpox virus* *Sheeppox virus* *Myxoma virus* *Swinepox virus* *Molluscum contagiosum virus* *Yaba monkey tumor virus*
Reoviridae	*Orthoreovirus* *Orbivirus* *Rotavirus* *Coltivirus* *Aquareovirus*	*Reovirus 3* *Bluetongue virus 1* *Simian rotavirus SA11* *Colorado tick fever virus* *Golden shiner virus*
Retroviridae	*Mammalian type B retroviruses* *Mammalian type C retroviruses* *Avian type C retroviruses* *Type D retroviruses* *Blv-htlv retroviruses* *Lentivirus* *Spumavirus*	*Mouse mammary tumor virus* *Murine leukemia virus* *Avian leukosis virus* *Mason-Pfizer monkey virus* *Bovine leukemia virus* *Human immunodeficiency virus 1* *Human spumavirus*
Rhabdoviridae	*Vesiculovirus* *Lyssavirus* *Ephemerovirus*	*Vesicular stomatitis Indiana virus* *Rabies virus* *Bovine ephemeral fever*
Togaviridae	*Alphavirus* *Rubivirus*	*Sindbis virus* *Rubella virus*

哺乳動物におけるウイルス感染および関連に疾患を処置するのにおける本発明の使用が、詳細には貴重であるかまたは価値のある動物、例えば、競走馬および家庭用ペット、ならびにヒトの消費のための食品を直接生産するために（例えば、肉）または間接的に生産するために（例えば、乳および卵）用いられる動物および鳥類に関して、好ましい。ヒト処置に加えて、本発明の例示的な実施形態としては、ウマ、イヌ、ネコなどの処置；ウシ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ヤギ、バッファロー、バイソン、ラマ、シカ、オオジカ、および他の大型動物、ならびに仔ウシおよび仔ヒツジを含む、その若齢動物の処置が挙げられる。

【０７３７】

天然に存在するウイルスについてか、またはバイオテロによって作製されるウイルスに

ついてかにかかわらず、ヒトの処置は、特に好ましい。天然に存在するウイルスおよび生じた疾患に関して、本発明はここでもその適用において限定されない。従って、表Jにおけるウイルスの任意の１つ以上が本発明を用いて阻害され得、これによってその得られた感染および疾患が処置され得る。

表Ｊ

ヒトにおけるウイルス疾患

【０７３８】

【表６－１】

疾患	ウイルス	ウイルスのタイプ
AIDS	ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	*Retrovirus*
気管支炎およびウイルス肺炎	呼吸器合胞体ウイルス	*Paramyxovirus*
気管支炎	パラインフルエンザウイルス	*Paramyxovirus*
子宮頚癌	ヒトパピローマウイルス	*Papovavirus*
水疱瘡	水痘帯状疱疹ウイルス	*Herpesvirus*
デング	デングデング	*Flavivirus*
エボラ出血熱	エボラウイルス	*Filovirus*
生殖器ヘルペス	単純ヘルペスウイルス－２	*Herpesvirus*
ハンタウイルス出血熱	ハンタウイルス	*Bunyavirus*
肝炎	A型肝炎	*Picornavirus*
	B型肝炎	*Hepadavirus*
	C型肝炎	*Flavivirus*
	D型肝炎	*Deltavirus*
	E型肝炎	*Calcivirus*
インフルエンザ	インフルエンザA、BおよびC	*Orthomyxovirus*
フニン・アルゼンチン出血熱	フニンウイルス(Junin virus)	*Arenavirus*
ラッサ出血熱	ラッサウイルス	*Arenavirus*
マチュポ出血熱	マチュポウイルス	*Arenavirus*
麻疹(はしか)	麻疹ウイルス	*Paramyxovirus*
単核細胞症	エプスタインバーウイルス	*Herpesvirus*
CMV疾患(ウイルス肺炎、単核細胞症様症候群)	サイトメガロウイルス	*Herpesvirus*
重症急性呼吸器症候群(SARS)	ヒトコロナウイルス	*Coronavirus*
帯状疱疹	水痘帯状疱疹ウイルス	*Herpesvirus*
天然痘	天然痘ウイルス	*Poxvirus*
黄熱病	黄熱病ウイルス	*Flavivirus*
西ナイル病	西ナイルウイルス	
西部ウマ脳症	西部EEウイルス	*Togavirus*
肺炎、肝炎、急性呼吸器疾患	アデノウイルス	*Adenovirus*

【０７３９】
【表６－２】

疾患	ウイルス	ウイルスのタイプ
胃腸炎	ロタウイルス	*Rotavirus*
脳炎	セムリキ森林熱ウイルス	*Alphavirus*
牛痘	ワクシニアウイルス	*Poxvirus*
脳炎	ベネズエラEE	*Alphavirus*
髄膜炎、脳炎、髄膜脳炎	リンパ球性脈絡髄膜炎	*Arenavirus*
ベネズエラ出血熱	グアナリトウイルス	*Arenavirus*
リフトバレー熱（出血熱、脳炎）	リフトバレー熱ウイルス	*Bunyavirus*
マーブルグ出血熱	マーブルグウイルス	*Filovirus*
ダニ媒介性脳炎	ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）	*Flavivirus*
脳炎	ヘンドラウイルス	*Paramyxovirus*
脳炎	ニパウイルス	*Paramyxovirus*
クリミア・コンゴ出血熱	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	*Bunyavirus*
ブラジル出血熱	サビアウイルス	*Arenavirus*

本発明は詳細には、ＣＭＶ関連疾患、例えば、ウイルス性肺炎、単球細胞症関連の先天性奇形（難聴および精神遅延）；気管支炎およびウイルス性肺炎、インフルエンザ、感冒およびＳＡＲＳを含む、呼吸器疾患、例えばＲＳＶによって生じる疾患；ＡＩＤＳ；肝炎；ウイルス感染に関連するガン；単球細胞症；および天然痘の処置における使用が考慮される。

【０７４０】
他の実施形態では、本発明者らは詳細には、ヒトにおいて病原性である、アレナウイルスの阻害を意図する。アレナウイルスとしては、ラッサ熱（ラッサウイルス）およびリンパ球性脈絡髄膜炎（ＬＣＭＶ）の原因である旧世界ウイルスが挙げられる。ラッサ熱は、西アフリカにおいて風土性であって、１年に３００，０００人におよぶ人が罹患し、３０００例に及ぶ死亡が生じる。ラッサ熱での感染は、約１０日内で熱および倦怠感を生じる。腹部疼痛、悪心、嘔吐および下痢が一般的である。咽頭炎および咳も発症し得る。神経学的症状は一般に軽度である。さらに重篤な場合には、血管漏出症候群、例えば、浮腫および胸水が存在する。患者のほぼ四分の一で出血がみられる。この疾患は、心血管系の変化を生じ得、ついにはショックおよび死亡に至る。

【０７４１】
アレナウイルスはまた、アルゼンチン出血熱（フニンウイルス）、ボリビア出血熱（マチュポウイルス）およびベネスエラ出血熱（グアナリトウイルス）の原因である、抗原的に異なる新世界ウイルスを含む、そのようなウイルスである。これらのウイルスの全てが、潜在的なバイオテロ兵器のＣＤＣカテゴリーＡのリストにある。

【０７４２】
アミノリン脂質または陰イオン性リン脂質とは関連しないが、ウイルスに結合する他の抗体が、承認薬へと直接開発された。これは、免疫抑制された患者においてＣＭＶ感染を抑制するために用いられるＣｙｔｏＧａｍについて、および呼吸器合胞体ウイルスから新生児を防御するために用いられるＳｙｎａｇｉｓにあてはまる。従って、組織中のウイル

スに接近して中和するモノクローナル抗体の使用には問題はない。

【０７４３】

抗腫瘍実施形態に適切な用量はまた、抗ウイルス処置に適切である。同様に、複数回の投与が慢性の感染に用いられ得、そして高用量が急性の感染に用いられ得る。ここでもガン処置局面に開示されるように、ＩＶ、ＩＭ、ＳＣ、肺または気道に対するエアロゾルとしてなど、を含む、任意の適切な経路の投与が使用され得る。

【０７４４】

本発明によって提供される治療剤は、広範なスペクトルの抗ウイルス活性を有する有用な因子である。多数の致命的なウイルスに対して有効であることに加えて、この因子はまた、ウイルスの正確な性質が未知である設定でさえ、ウイルスに対する曝露後に投与され得る。従って、本発明の抗ウイルス治療剤は、特定のワクチンの開発、生成または送達に伴う時間および費用とは著しく対照的に、病原体の同定と治療の送達との間に長時間を要さない。

【０７４５】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。この実施例に開示された技術は、本発明の実施において十分機能することが本発明者らによって発見された本発明の技術に従い、従ってその実施のために好ましい様式で構成されることが考慮され得るということが当業者に理解されるはずである。しかし、当業者は、本開示に照らして、多くの変化が、開示されている特定の実施例においてなされ得、さらには類似または同様の結果が本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく獲得可能であるということを理解すべきである。

【実施例】

【０７４６】

実施例Ｉ

（抗ＶＣＡＭ－１－ｔＴＦコアグリガンドを用いた腫瘍処置）

本実施例は、腫瘍保有動物に対する腫瘍脈管標的化凝固因子（「コアグリガンド（ｃｏａｇｕｌｉｇａｎｄ）」）の投与後に生じるインビボにおける腫瘍脈管構造の特異的な凝固、および得られた抗腫瘍効果を示す。このコアグリガンドでは、ＶＣＡＭ－１（血管内皮接着分子－１、ＶＣＡＭ－１）に対する抗体を、腫瘍脈管構造に対して改変型のヒト凝固因子である短縮型組織因子（ｔｒｕｎｃａｔｅｄ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｆａｃｔｏｒ）（ｔＴＦ）を送達するための標的因子として用いる。

【０７４７】

マウスＶＣＡＭ－１に対するラットＩｇＧ$_1$抗体を分泌するＭＫ２．７ハイブリドーマを、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ；ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１９０９）から入手した。マウスウイルスタンパク質ｐ３０　ｇａｇに対するラットＩｇＧ$_1$抗体を分泌するＲ１８７ハイブリドーマをまた、ＡＴＣＣから入手して、抗ＶＣＡＭ－１抗体についてのアイソタイプマッチングしたコントロールとして用いた。

【０７４８】

皮下のＬ５４０ヒトホジキン腫瘍を保有するマウス由来の主な器官および腫瘍の血管を、抗ＶＣＡＭ－１抗体を用いてＶＣＡＭ－１発現について免疫組織化学的に検査した。陽性コントロールとして用いた抗エンドグリン抗体ＭＪ７／１８によって染色した総腫瘍血管のうち２０～３０％で、全体的に、ＶＣＡＭ－１発現が観察された。腫瘍保有動物および正常動物の両方において、心臓および肺において、ＶＣＡＭ－１の構成的な血管発現が見出された。ＶＣＡＭ－１発現が厳密に血管外である精巣では、強力な間質染色が観察された。

【０７４９】

皮下のＬ５４０腫瘍を保有するマウスに、抗ＶＣＡＭ－１抗体を静脈内注射して、２時間後にこのマウスを放血させた。この腫瘍および正常な器官を取り出して、凍結切片を調製して、免疫組織化学的に検査して抗体の位置を決定した。抗ＶＣＡＭ－１抗体は、腫瘍

、心臓および肺の内皮細胞で検出された。染色は特異的であった。なぜなら、内皮の染色は、無関係の特異性の種アイソタイプマッチングした抗体であるＲ１８７を注射したマウスの腫瘍および器官において観察されたからである。抗ＶＣＡＭ－１抗体の局在化は、精巣でも心臓および肺以外のどの正常な器官でも見出されなかった。

【０７５０】

抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦ結合体または「コアグリガンド」を、短縮された組織因子（ｔＴＦ）を用いて調製した。抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドの静脈内投与によって、腫瘍保有マウスにおいて、正常な組織における血管と対比して、腫瘍血管の選択的な血栓症が誘導される。

【０７５１】

０．４～０．６ｃｍの直径の皮下Ｌ５４０腫瘍を保有するマウスに抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドを投与した。コアグリガンド注射の前には、腫瘍は正常であって、均一な形態を有して壊死の領域はなかった。腫瘍は十分に血管新生されて、自発的な血栓症血管も出血も全くなかった。コアグリガンド注射の４時間内に、腫瘍血管のうち最初の染色はわずか２０～３０％にもかかわらず、４０～７０％の血管が血栓症になった。血栓症になった血管は、閉塞性の血小板凝集体、充填された赤血球およびフィブリンを含んだ。いくつかの領域では、血管は、腫瘍間質内に破裂した流出している赤血球を有した。

【０７５２】

コアグリガンド注射の２４時間後まで、血管は閉塞されたままであって、過度の出血が腫瘍全体にわたって広がった。腫瘍細胞は、お互いから分離され、濃縮された核を有し、そして細胞溶解を被った。７２時間まで、進行した壊死が、腫瘍全体にわたって明白であった。最初のコアグリガンド誘導性トロンビン沈着は、中枢の血管におけるＶＣＡＭ－１標的抗原の誘導の増大をもたらし、これによって標的化および腫瘍破壊の増幅が得られる可能性が高い。

【０７５３】

腫瘍血管上での抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦの血栓性作用は、抗原特異的である。等量で投与したコントロール試薬では（ｔＴＦ単独、抗ＶＣＡＭ－１抗体単独、ｔＴＦに加えて抗ＶＣＡＭ－１抗体または無関係な特異性のコントロールのコアグリガンド）血栓を生じなかった。

【０７５４】

腫瘍血管の血栓に加えて、本研究によってまた、抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドの静脈内投与が、正常な器官で血管の血栓を誘導しないことが示される。正常なマウスまたはＬ５４０腫瘍保有マウスの心臓および肺における血管でのＶＣＡＭ－１の発現にかかわらず、抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンド投与後に血栓は生じなかった。４時間前でも２４時間前でも、５～４５μｇのコアグリガンドを注射した２５匹のマウスでは、血栓、組織障害、形態の変化の兆候はどれも見られなかった。同じマウス由来の心臓および肺の正常な組織学的外見は、大きい腫瘍血栓を有した。全ての他の主な器官（脳、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、小腸、精巣）もまた、形態の変化を有さなかった。

【０７５５】

コアグリガンド処置マウス由来の器官および腫瘍の凍結切片は、抗ＴＦ抗体１０Ｈ１０、または抗ラットＩｇＧ抗体のいずれで発色した場合でも同時発生的な染色パターンを有し、これによってこのコアグリガンドが心臓、肺および腫瘍における血管に局在することが確認された。染色の強度は、コアグリガンドが高濃度で直接切片に適用され、続いて抗ＴＦまたは抗ラットＩｇＧのいずれかでの発色された場合に見られるものと同じであって、このことは結合の飽和がインビボで保持されていたことを示した。

【０７５６】

これらの研究によって、心臓および肺における正常な脈管構造でのＶＣＡＭ－１に対するコアグリガンドの結合は、血栓を誘導するほど有意ではないこと、そして腫瘍脈管構造は、コアグリガンドを支持するためのさらなる因子を提供することが示される。

【０７５７】

０．３～０．４ｃｍ^{3}のＬ５４０腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおいて、抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドの抗腫瘍活性を決定した。４日の間隔で静脈内に３回、この薬物を投与した。抗ＶＣＡＭ－１処置したマウスの平均腫瘍容積は、他の全ての群に比較して２１日の処置で有意に（Ｐ＜０．００１）低下した。特定のコアグリガンドで処置した全部で１５匹のマウスのうち９匹が、腫瘍容積の５０％より大きい低下を示した。この効果は特異的であった。なぜなら、未結合のｔＴＦ、コントロールＩｇＧコアグリガンド、ならびに遊離の抗ＶＣＡＭ－１抗体およびｔＴＦの混合物は腫瘍増殖に影響しなかったからである。

【０７５８】

実施例ＩＩ

腫瘍血管上のホスファチジルコリン発現

心臓および肺におけるＶＣＡＭ－１陽性脈管構造上の抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦの血栓性効果の欠失を説明するために、正常な血管と腫瘍血管との間の異なるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えば、ＰＳおよびＰＥの局在化という本発明者らの発展させた概念を確認した。詳細には、彼らは、正常な組織における内皮細胞が、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えばＰＳおよびＰＥを、原形質膜のリン脂質二重相の内面に分離して、ここでＰＳは血栓性反応に関与することができないが；一方、腫瘍の内皮細胞は、原形質膜の外面に対してアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を転位させ、ここでＰＳはコアグリガンドの凝固作用を支持し得るという仮説をたてた。細胞表面でのＰＳ発現によって、凝固が可能になる。なぜなら、ＰＳ発現によって、膜に対する凝固因子の結合が可能になり、凝固開始複合体のアセンブリが協調されるからである。

【０７５９】

腫瘍血管内皮細胞の表面に対するアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質転位の本発明者らのモデルは、本明細書において開発されたとおり、ＰＳ発現が細胞死の後に生じず、そして必然的に細胞死を誘発しないという点で驚くべきである。従って、腫瘍上皮細胞表面でのアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現は、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えばＰＳおよびＰＥが、治療介入のための標的可能な実体として機能することを可能にするのに十分安定である。

【０７６０】

腫瘍血管内皮細胞が、原形質膜の管腔表面上でＰＳを発現するという仮説を確認するために、本発明者らは、以下の免疫組織化学研究を用いて、Ｌ５４０腫瘍保有マウスへの静脈内注射後の抗ＰＳ抗体の分布を決定した。

【０７６１】

Ａ．方法

両方ともマウスのモノクローナルＩｇＭ抗体である、抗ＰＳ抗体および抗カルジオリピン抗体を、実施例ＩＶに記載のとおり、Ｒｏｔｅら（１９９３、本明細書において参考として援用される）によって生成して、特徴付けした。３ＳＢの主な反応性はＰＳとの反応であるが、３ＳＢはまた、正常な細胞における内部小葉部分に緊密にやはり分離される原形質膜の比較的少ない成分である、陰イオン性リン脂質、ホスファチジン酸との反応性も有する。

【０７６２】

Ｌ５４０腫瘍保有マウスに、抗ＰＳまたは抗カルジオリピンマウスＩｇＭ抗体のいずれか２０μｇをｉｖ注射した。１０分後、マウスを麻酔して、その血液循環をヘパリン処理した生理食塩水で灌流させた。腫瘍組織および正常組織を取り出して、急速凍結させた。器官および腫瘍の連続切片を、抗ＰＳ抗体の検出のためにＨＲＰ標識抗マウスＩｇＭを用いるか、または抗ＶＣＡＭ－１抗体、続いてＨＲＰ標識抗ラットＩｇを用いて染色した。

【０７６３】

凍結された切片上で膜リン脂質を保存するために、以下のプロトコールを開発した。２．５ｍＭ　Ｃａ$^{2+}$を含有するＤＰＢＳを用いて動物を灌流させた。組織を３－アミノプロピルトリエトキシシランでコーティングしたスライド上に装填して、２４時間染色した

。スライドの固定にも洗浄にも、有機溶媒、ホルムアルデヒド、界面活性剤は用いなかった。２．５ｍＭ　Ｃａ$^{2+}$および０．２％ゼラチンを含有するＤＰＢＳによってスライドを再水和した。同じ溶液をまた用いて、切片を洗浄して過剰の試薬を除去した。ＨＲＰ標識した抗マウスＩｇＭを用いて、室温で３．５時間切片をインキュベートして、抗ＰＳＩｇＭを検出した。

【０７６４】

Ｂ．結果

この免疫組織学研究によって、抗ＰＳ抗体は、ＶＣＡＭ－１を欠き得る腫瘍の中央領域の血管を含むほとんどの腫瘍血管に１０分以内で局在したことが示された。ＶＣＡＭ－１が陽性であった血管はまたＰＳについても陽性であった。従って、腫瘍におけるＶＣＡＭ－１発現血管上ではＰＳの同時発現が存在する。

【０７６５】

インビボの局在化研究において、心臓および肺のＶＣＡＭ－１陽性脈管構造を含む正常な器官では染色された血管はなく、このことは内皮細胞の外部表面からはＰＳが欠けていることを示す。対照的に、正常な組織および腫瘍の切片をインビトロで抗ＰＳ抗体を用いて直接染色した場合、正常な組織と腫瘍、内皮または他の細胞タイプとの間には相違はみられず、このことはＰＳがこれらの細胞内に存在するが、腫瘍の内皮細胞の表面でのみ発現されたことを示す。

【０７６６】

ＰＳ検出の特異性は、２つの独立した研究によって確認された。第一に、示差的に負に荷電された脂質、カルジオリピンに対するマウスＩｇＭモノクローナル抗体は、インビボで腫瘍にもどの器官にも存在しなかった。第二に、アセトンを用いた凍結切片の事前処置は、おそらく結合した抗ＰＳ抗体と一緒に脂質を抽出したという理由によって、抗ＰＳ抗体を用いた染色を無効にした。

【０７６７】

実施例ＩＩＩ

アネキシンＶはコアグリガンド活性をブロックする。

【０７６８】

本実施例によって、インビトロおよびインビボにおけるＰＳ機能をブロックする、高い親和性のＰＳ結合リガンド、アネキシンＶを用いる研究から、コアグリガンド活性における表面ＰＳ発現の役割のさらなる証拠が得られる。

【０７６９】

（Ａ．アネキシンＶは第Ｘ因子のインビトロでのコアグリガンド活性化をブロックする）

アネキシンＶがコアグリガンドによって誘導される第Ｘａ因子形成に影響を与える能力を、色素生産性アッセイによって決定した。ＩＬ－１α刺激したｂＥｎｄ．３細胞を、抗ＶＣＡＭ－・ｔＴＦとともにインキュベートし、そしてサポニンで透過化処理した。アネキシンＶを、０．１～１０μｇ／ｍｌの範囲の濃度で添加し、そして細胞を、希釈したＰｒｏｌｅｘＴの添加前に３０分間インキュベートした。アネキシンＶの存在下または非存在下で生成した第Ｘａ因子の量を、決定した。各処置を２連で行い、そして少なくとも２回繰り返した。

【０７７０】

コアグリガンド作用における表面ＰＳ発現の必要性はさらに、アネキシンＶ（これは、高親和性でＰＳに結合する）が、ｂＥｎｄ．３細胞に結合される抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦがインビトロで第Ｘａ因子を生成する能力をブロックするという本発明者らの発見によって示される。

【０７７１】

抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦとともにプレインキュベートされた、透過化処理された細胞に添加されたアネキシンＶは、用量依存性様式で第Ｘａ因子の形成を阻害した（図３）。アネキシンＶの非存在下で、細胞結合コアグリガンドは、６０分、１０，０００細胞あたり

９５ｎｇの第Ｘａ因子を産生した。漸増量のアネキシンＶ（１ｍｌあたり１μｇの範囲で）の添加は、第Ｘａ因子の産生を阻害した。１ｍｌあたり１０μｇでは、アネキシンＶは、第Ｘａ因子の産生を５８％阻害した。アッセイの間のアネキシンＶの濃度の増加によるさらなる阻害は観察されず、このことは、アネキシンＶが、１ｍｌあたり１０μｇで全ての利用可能な結合部位を飽和したことを示す。

【０７７２】

（Ｂ．：アネキシンＶはインビボでコアグリガンド活性をブロックする）

アネキシンＶのインビボでコアグリガンド誘導性血栓症を阻害する能力を、Ｌ５４０ホジキン腫保有ＳＣＩＤマウスにおいて試験した。腫瘍を、上記の実施例ＩＩに記載のようにマウスにおいて増殖させた。１群あたり２匹のマウス（直径０．５ｃｍの腫瘍サイズ）を、以下の試薬のいずれか１つで尾静脈を介して静脈内注射した：ａ）生理食塩水；ｂ）１００ｇのアネキシンＶ；ｃ）４０μｇの抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦ；ｄ）１００μｇのアネキシンＶ、続いて２時間後に４０μｇの抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦ。

【０７７３】

最後の注射の４時間後、マウスを麻酔し、そしてヘパリン化生理食塩水で灌流した。腫瘍を取り出し、４％ホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、そしてヘマトキシレン－エオシンで染色した。血栓が形成された血管および血栓が形成されていない血管の数を計数し、そして血栓の割合を算出した。

【０７７４】

アネキシンＶはまた、インビボでの抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドの活性をブロックする。腫瘍保有マウスの群を、方法に記載の通りに、コントロールまたは試験試薬の１つで処置した。マウスに以下を与えた：（ａ）生理食塩水；（ｂ）１００ｇのアネキシンＶ；（ｃ）４０μｇの抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンド；または（ｄ）１００のアネキシンＶ、続いて２時間後に４０μｇの抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンド。同一の結果が、１群あたり両方のマウスで得られた。

【０７７５】

自発的な血栓、出血または壊死は、生理食塩水を注射したマウス由来の腫瘍において観察されなかった。アネキシンＶ単独での処置は、腫瘍形態を変更しなかった。

【０７７６】

本明細書中で示される他のデータによれば、４０μｇの抗ＶＣＡＭ－１・ｔＴＦコアグリガンドは、全腫瘍血管の７０％において血栓を生じた。血管の大部分は固まった赤血球および血餅で閉塞し、そして腫瘍細胞は互いに分離した。コアグリガンド誘導性抗腫瘍効果（すなわち、静脈内血栓）および腫瘍細胞形態における変化の両方は、マウスをアネキシンＶで前処置することによって完全に消失した。

【０７７７】

これらの知見は、コアグリガンドの抗腫瘍効果が、腫瘍脈管構造の妨害によって媒介されることを確認する。これらのデータはまた、ＰＳが、インビボでのコアグリガンド誘導性血栓に必須であることを実証する。

【０７７８】

実施例ＩＶ

アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体の生成

本実施例は、腫瘍血管内皮細胞におけるアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の転位に対するその観察に照らして、本発明者らによって設計された、そしてアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の転位に対する抗体の生成において十分に機能するように開発された、免疫プロトコールを記載する。アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質、例えばＰＳおよびＰＥと反応性の多数の抗体が得られた。本実施例および以下の実施例において、簡便性のために、ＰＳと反応性の抗体を「抗ＰＳ抗体（ａｎｔｉ－ＰＳ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）」と命名してもよいが、特定のこれらの抗体の結合はＰＳには限定されず、本明細書に示されるような特定の他のアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に拡大される。

【０７７９】
Ａ．免疫プロトコール
さらに強力な免疫原として免疫系にアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を提示するために、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を、アミノリン脂質陽性細胞および陰イオン性リン脂質陽性細胞として処方した。他の膜成分によって囲まれる、膜に挿入されたアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質は、抗体を惹起するためのさらに良好な構成およびクリアランス速度を有する。
【０７８０】
この意図は、この例ではＰＳで例示されるようなアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質を発現する自家の細胞を用いて免疫コンピテントな動物を免疫することであって、ここでこの動物は、全ての自己表面抗原に対して抗体を生成しないが、膜露出リン脂質、例えばＰＳを外来の要素として認識する。この手順は、任意のアミノリン脂質陽性細胞および陰イオン性リン脂質陽性細胞を用いる、任意の標準的な実験動物、例えば免疫コンピテントなＢＡＬＢ／ｃマウスおよびルイス（Ｌｅｗｉｓ）ラットの使用に適用可能である。
【０７８１】
ＢＡＬＢ／ｃマウスおよびマウス内皮細胞ｂＥｎｄ．３（不死化マウス（ＢＡＬＢ／ｃ株）内皮細胞）を最初に選択した。１０％CO_2インキュベーター中で、９ｍｌ／５００ｍｌ　ＨＥＰＥＳ緩衝液を含有する１０％ＤＭＥＭ中でｂＥｎｄ．３を培養した。所望の細胞が得られるまで、ｂＥｎｄ．３細胞をＴ１７５　ＴＣフラスコ中で増殖させた。代表的には、各々のフラスコは、約７０～８０％コンフルエンスで、約3×10^6個の細胞を有し、そして各々のマウスには、1×10^6個～20×10^6個の細胞、1×10^7個におよぶ細胞をあたえなければならない。
【０７８２】
ｂＥｎｄ．３細胞を５０μＭ～２００μＭの過酸化水素を用いて１または２時間３７℃で処理して、免疫の前に陰イオン性リン脂質、例えばＰＳを曝す。H_2O_2のストックは、［９．８Ｍ］；３０％（ｖ／ｖ）である。これを１：１０００に希釈して、次いで０．４ｍｌを、４０ｍｌの培地を含むＴ１７５　ＴＣフラスコ中に１００μＭのH_2O_2の最終濃度まで添加する。細胞を３７℃で１時間維持した。回収のために、細胞を、暖かいＰＢＳ＋１０ｍＭ　ＥＤＴＡを用いて３×洗浄して、培地中の全てのＢＳＡまたは血清タンパク質を除いた。穏やかなトリプシン処理によって細胞を取り外して、洗浄し、１０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。この上清を吸引して、適切な容積まで添加することなく細胞をＤＭＥＭに再懸濁して（各々のマウスは約1×10^7個の細胞を含む２００μｌを投与される）、氷上で保持した。
【０７８３】
この方式で処理した細胞を、１ｍｌのシリンジおよび２３ゲージの針を用いて各々のマウスの腹腔内に注射した（２００μｌの細胞懸濁液）。３～４週間の間隔で３～７回マウスを免疫した。第二のブースト（追加免疫）から開始して、各々のブーストの１０日後、マウスを放血することによって免疫血清を収集した。抗ＰＳについての血清力価をＥＬＩＳＡによって試験した。
【０７８４】
自家のＰＳ陽性細胞を用いたこれらの免疫では、自己抗体の非制限的な産生は生じなかったが、ＰＳと反応性であるか、他のアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質と組み合わせてＰＳと反応性である抗体の産生に限定された。
【０７８５】
別の研究では、２００μＭの過酸化水素を用いて２時間処置したｂＥｎｄ．３内皮細胞を用いて雌性のルイス（Ｌｅｗｉｓ）ラットを免疫した。この処置によって、^{125}Ｉ標識されたアネキシンＶによって検出した場合、７０～９０％の細胞において外面に対する陰イオン性リン脂質の転位が生じた。処置した細胞を洗浄して脱離させて、カウントした。２百万個の細胞を滅菌ＰＢＳに再懸濁して、注射の間、３週間の間隔で５回腹腔内注射した。陰イオン性リン脂質に対するポリクローナル抗体の力価を、各々の免疫の２日後に

決定した。

【０７８６】

Ｂ．高力価の抗血清

陰イオン性リン脂質、例えばＰＳと反応性の抗体の極度に高い力価を有するマウスを得た（表１）。マウスは、なんら毒性の兆候を示さなかった。この免疫プロトコールは、ラット全体よりもマウスで有効であったが、ラットの免疫は、有効であって、９Ｄ２抗体が産生された（以下を参照のこと）。

【０７８７】

表１

抗ＰＳ　ＩｇＧ抗体生成

【０７８８】

【表７】

力価範囲	1群あたりのマウスの数（全体のうちの%）
1:100 - 1:1,000	2/30　(6.66 %)
1:1000 - 1:10,000	5/30　(16.6 %)
1:10,000 - 1:100,000	18/30　(60 %)
1:100,000 - 1,000,000	5/30　(16.6 %)

さらなる免疫において、種々のマウスを、過酸化水素処理ｂＥｎｄ．３細胞を用いて３回免疫して、その血清を最初の免疫の５４日後に試験した。血清内のＰＳと反応性のＩｇＧ抗体を、抗マウスＩｇＧ、Ｆｃ特異的二次抗体を用いて検出して、血清内のＩｇＭ抗体を抗マウスＩｇＧμ特異的二次抗体を用いて検出した。ＰＳと反応性のＩｇＧおよびＩｇＭ抗体を有する多数の有効な抗血清を、この免疫プロトコールを用いて得たが、そのうちＩｇＧ抗体を有する抗血清が一般に有効であった。

【０７８９】

これらの方法をここで用いて、例えば、以下に記載の３Ｇ４抗体との効率的な競合についてスクリーニングされた抗ＰＳ抗体を含む、さらなる特定の抗ＰＳ抗体を生成することができる。代表的には、ＰＳについての所望の抗血清のＩｇＧ力価が２００，０００を上回ったが、ＰＣ力価は５０，０００未満である場合、モノクローナル抗体を生成するために融合が実施され得る。

【０７９０】

また、これらの方法は、H_2O_2を用いた最初の細胞処置に限定されない。なぜなら、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現を誘導する他の方法が用いられてもよいからである。例えば、ＴＮＦおよびアクチノマイシンＤでの処置は、別の有用な方法である。１例では、サブコンフルエント（約８５％コンフルエンス）のｂＥｎｄ．３細胞を、１０ｎｇ／ｍｌのマウスＴＮＦおよび１μｇ／ｍｌのアクチノマイシンＤを用いて３７℃で１６時間、インキュベーター中で処置した。次いで、上記の概要のような免疫手順を通じて細胞を採取した。

【０７９１】

Ｃ．ＩｇＧおよびＩｇＭモノクローナル抗体

免疫した動物由来の脾細胞とミエローマパートナーＰ３Ｘ６３ＡＧ８．６５３細胞（ＡＴＣＣ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）とを融合することによってハイブリドーマを得た。

【０７９２】

腫瘍処置において有用なモノクローナル抗体を調製するための本発明者らの技術の重要な局面は、選択ストラテジーであり、これはアミノリン脂質または陰イオン性リン脂質に結合するが、中性のリン脂質には結合しない抗体を選択するためのスクリーニングの工程を包含する。別の重要な局面は、血清の非存在下で、血清の存在下と同様に強力に、ＰＳコーティングしたプレートに結合する抗体を選択することである。これは、抗リン脂質症

候群を生じるかまたはそれに寄与すると考えられる、ＰＳおよび血清タンパク質の複合体を認識する抗体を排除するために行なわれる。

【０７９３】

例えば、ＰＳと反応性のモノクローナル抗体を単離するためのストラテジーは、抗マウスＩｇＧ、Ｆｃγ特異的二次抗体を用いて、ＰＳコーティングプレート上のハイブリドーマ上清をスクリーニングする工程を包含した。スクリーニングを最初に、４つのリン脂質（ＰＳ，ホスファチジルセリン；ＰＥ、ホスファチジルエタノールアミン；ＣＬ、カルジオリピン；およびＰＣ、ホスファチジルコリン）ならびにｂＥｎｄ３細胞に対して行なった。中性のリン脂質、ＰＣと反応性のクローンを、ｂＥｎｄ３細胞と非反応性のクローンと同様に破棄した。高い結合の抗ＰＳクローンを選択した。ＰＳのみに反応性、またはＰＳについて強力な優先度を有するウェルを最初にサブクローニングして、他の陰イオン性リン脂質に対する結合と組み合わせたＰＳ反応性を示すウェルを二番目にサブクローニングした。

【０７９４】

以下の特定の研究においては、Ｒｏｔｅら（１９９３）によって記載されたように生成された３ＳＢ、Ｄ１１およびＢＡ３と命名されたマウスモノクローナルＩｇＭ抗体もまた含まれた。３ＳＢ抗体は、抗ＰＳ抗体としてその文献に記載されて、Ｄ１１抗体は、抗カルジオリピン（抗ＣＬ）抗体としてその文献に記載される。これらの抗体の生成および特徴づけの詳細は、Ｒｏｔｅらによって報告された（１９９３，参考として本明細書に援用される）。

【０７９５】

本発明者らによって生成される各々の選択されたハイブリドーマのアイソタイプを決定した。ＩｇＧクラスの抗体は、代表的には高い親和性、インビボでの低いクリアランス速度、ならびに精製、改変および取り扱いの簡便性を含む、ＩｇＭを上回る多くの利点を有するので、それらの生成が特に所望される。相同なＩｇＧアイソタイプを有するウェルに集中するため、ＩｇＭまたは異なるＩｇの混合物を含むウェルを破棄するかまたは再クローニングした。高度に陽性のクローンのサブクローニングを３～４回繰り返した。

【０７９６】

ＥＬＩＳＡによって決定される、代表的なＩｇＧおよびＩｇＭ抗体のアイソタイプを表２に示す。本発明者らは、３Ｇ４に対する称号を変更する前に３Ｇ４抗体「Ｆ３－Ｇ４」と最初に命名した。これは、生物学的材料におけるいかなる変化も反映しない。抗体の血清依存性または非依存性も、表２に記載される。

表２

抗ＰＳ抗体のアイソタイプおよび血清依存性

【０７９７】

【表８】

名称	起源	種／アイソタイプ	血清依存性
3SB	Rote *et al.*, 1993	マウス IgM κ	なし
D11	N. Rote	マウス IgM κ	
BA3	Rote *et al.*, 1993	マウス IgM κ	
9D2	本研究	ラット IgM κ	なし
1B12	本研究	マウス IgG_1 κ	
3G4	本研究	マウス IgG_3 κ	なし
1B9	本研究	マウス IgG_1 κ	絶対
3B10	本研究	マウス IgG_3 κ	なし
2G7	本研究	マウス IgG_1 κ	絶対
7C5	本研究	マウス IgG_1 κ	絶対

Ｄ．ＥＬＩＳＡプロトコールおよびモノクローナル抗体特徴づけ

抗体をＥＬＩＳＡによってさらに研究して、３ＳＢおよびＤ１１と比較した。本研究で用いた抗ＰＳ　ＥＬＩＳＡは以下のとおり行なう。特別な相違が特定されない限り、これが本出願の研究全体を通じて用いたＥＬＩＳＡの形式である。

【０７９８】

抗原ＰＳを用いるＥＬＩＳＡを例示する（２．５ｍｌのボトル中に、Ｐ－６６４１　２５ｍｇ　１０ｍｇ／ｍｌ（溶媒はクロロホルム：ＭｅＯＨ　９５：５））。同じプロトコールを用いて、他のリン脂質を用いてもよい。ＰＳ（または他のリン脂質）のストック溶液を、アリコートにして、気密容器に－３０℃で保管しなければならない。好ましい９６ウェルプレートは、Ｄｙｎａｔｅｃｈ　Ｕ底　Ｉｍｍｕｌｏｎ　１（Ｄｙｎａｔｅｃｈ　Ｌａｂｓ，カタログ番号０１１－０１０－３５５０）である。

【０７９９】

本明細書において用いられる標準的なブロッキング緩衝液は、ＰＢＳに溶解した１０％ウシ血清である。他のブロッキング溶液は適切であるが、界面活性剤はブロックおよび洗浄溶液から排除されなければならない。一次抗体は試験サンプルまたは混合物である。好ましい二次抗体はヤギ、抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰである。発色溶液は、１０ｍｌの０．２Ｍ　Na_2PO_4、１０ｍｌの０．１Ｍ　クエン酸、ＯＰＤの１０ｍｇの錠剤１つ、および１０μｌの過酸化水素である。停止溶液は０．１８Ｍ　H_2SO_4である。

【０８００】

このプロトコールは、以下のようにＰＳを用いて９６ウェルプレートをコーティングする工程を必要とする：ＰＳストック溶液をｎ－ヘキサン注で１０μｇ／ｍｌまで希釈してよく混合する。各々のウェルに５０μｌを添加して、これを１時間エバポレートさせる。２００μｌの１０％血清（または他のブロッキング緩衝液）を各々のウェルに加えて、カバーして、室温で２時間、または４℃で一晩維持する。ＰＢＳを用いてプレートを３回洗浄する。一次抗体（ブロッキング緩衝液中で希釈）を添加して、３７℃で２時間インキュベートする。ＰＢＳを用いて３回洗浄する。１００μｌ／ウェルの二次抗体（代表的には、ヤギ、抗マウスＩｇＧ－ＨＲＰまたは他の適切な二次抗体）を添加して、３７℃で１時間インキュベートする。ＰＢＳを用いてプレートを３回洗浄する。各々のウェルに１００μｌの発色溶液を添加することによってＥＬＩＳＡを発色させて、１０分間発色させ、次いで、各々のプレートに１００μｌの停止溶液を加えて、Ｏ．Ｄ．を４９０ｎｍで読みとる。

【０８０１】

以下の結果は、９Ｄ２、１Ｂ１２、３Ｇ４および１Ｂ９について示している。ＰＳについてのこれらの抗体の親和性を確認して、３ＳＢに対して比較した。新規な抗体の特定の

相対的な親和性は３ＳＢに比較してかなり改善されている（表３）。

【０８０２】

表３

抗ＰＳ抗体の相対的親和性

【０８０３】

【表９】

名称	EC_{50} (μg/ml)[1]	対3SBの結合（倍数）	EC_{50} (nM)[2]	対3SBの親和性（倍数）
3SB	0.468	1	0.518	1
D11	> 40.0	0.011	>44.4	0.011
9D2	0.104	4.50	0.115	4.50
1B12	0.312	1.50	2.07	0.25
3G4	0.040	11.7	0.266	1.94
1B9	0.019	24.6	0.126	4.11
アネキシン V[3]	0.100	4.68	2.77	0.18

[1] 組織培養上清の希釈に基づく；捕獲抗体として抗マウスまたはラットＩｇのいずれかを用いるサンドイッチＥＬＩＳＡによって、ＩｇＧおよびＩｇＭの濃度を決定した。全てのクローンが平均１０～１５μｇ／ｍｌのＩｇを分泌する。

[2] 変換のために用いたＭＷ：ＩｇＭ－９００ｋＤａ、ＩｇＧ－１５０ｋＤａ、アネキシンＶ－３６ｋＤａ

[3] ＰＳに対するアネキシンＶの親和性は、０．１ｎＭ～１ｎＭの範囲である。この表における値は、抗ＰＳ抗体についてと同じＥＬＩＳＡ条件を用いてストレプトアビジン－ＨＲＰによって検出された市販のビオチン化アネキシンＶの結合に相当する。

【０８０４】

抗体の特異性は、以下のリン脂質を用いてコーティングしたプレートを用いるＥＬＩＳＡによって決定された：ＰＳ、ホスファチジルセリン；ＰＥ、ホスファチジルエタノールアミン；ＰＩ、ホスファチジルイノシトール；ＰＡ、ホスファチジン酸；ＰＧ、ホスファチジルグリセロール；ＰＣ、ホスファチジルコリン；ＣＬ、カルジオリピン；およびＳＭ、スフィンゴミエリン。３ＳＢおよびＤ１１に比較した、９Ｄ２、１Ｂ１２、３Ｇ４および１Ｂ９の特異性プロフィールを表４に示す。

【０８０５】

表４

抗ＰＳ抗体のリン脂質特異性

【０８０６】

【表１０】

名称	ELISAに対する反応性の相対強度[1,2]
3SB	PS=PA>>CL, PI, PE, PG
D11	CL=PA>>PS, PI, PE, PG
9D2	PA>PS=CL>PG=PI>>PE
1B12	PS=PA>CL>PE=PI, PG
3G4	PS=PA=PI=PG=CL>>PE
3B10	PS=PA=PI>>PE
1B9	PS のみ
2G7	PS のみ
7C5	PS のみ
アネキシン V	PS=PE=PI=PA>CL>PG

[1]＞という記号は、同一の抗体濃度で試験した種々のリン脂質に対する結合における少なくとも２倍の相違を示す。
[2]＞＞という記号は、同一の抗体濃度で試験した種々のリン脂質に対する結合における少なくとも１０倍の相違を示す。

【０８０７】
１Ｂ９、２Ｇ７および７Ｃ５という抗体は、本質的に同じく挙動する。これらの抗体は、ＰＳのみを認識して、ＰＳに対する結合について血清または血清タンパク質を要する。種々のリン脂質に対する１Ｂ９、２Ｇ７および７Ｃ５の結合を、１０％ウシ血清の存在下でのみアッセイしたが、他の抗体の結合は、血清の有無のいずれかにおいて試験した。１Ｂ９、２Ｇ７および７Ｃ５以外の抗体については、血清の存在は、特定のリン脂質に対する結合における優先度を変化させない。３Ｇ４、３Ｂ１０および９Ｄ２を含む後者の群は、血清の非存在下でＰＳに対する結合の好ましい特性を有する。

【０８０８】
３ＳＢ抗体は、血清の有無においてインタクトな細胞上のＰＳを認識する。３ＳＢの主な反応性はＰＳとの反応であるが、これはまた、原形質膜の比較的わずかな成分であるホスファチジン酸との反応性を有する（Ｈｉｎｋｏｖｓｋａ－Ｇａｌｃｈｅｖａら、１９８９）。３ＳＢは本質的に、ホスファチジルエタノールアミンおよびホスファチジルイノシトール、ならびにホスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンとの反応性を欠く（表４）。

【０８０９】
ＰＳは、原形質膜の最も豊富な陰イオン性リン脂質であって、正常な条件下で正常な細胞において原形質膜の内部小葉に厳密に隔離される。ＰＳはアミノリン脂質である。ＰＥはまた、アミノリン脂質であるが、ＰＥは天然であって陰イオン性ではない。中性のアミノリン脂質であるよりも、ＰＥはＰＳと同様に挙動して、正常には原形質膜の内部小葉に厳密に隔離される。

【０８１０】
ＰＩは、原形質膜の別の主な陰イオン性リン脂質であって、これはさらに正常な条件下では正常な細胞における内部小葉構造に厳密に隔離される。ＰＡおよびＰＧは、原形質膜のわずかな陰イオン性リン脂質であって、これも通常は内部小葉構造に隔離される。ＣＬは、ミトコンドリア膜に存在する陰イオン性リン脂質であって、代表的には原形質膜には存在しない。

【０８１１】
ＰＣおよびＳＭは、原形質膜の、コリン含有の中性のリン脂質である。ＰＣおよびＳＭの各々は、正常な条件下では外部の小葉構造に主に局在する。

【０８１２】
正常な血管と腫瘍血管との間の示差的なアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発現についての本発明者らのモデルを踏まえて、選択されたプロトコールを用いて開発された抗体で、中性のリン脂質、ＰＣおよびＳＭと反応したものはなかった。１Ｂ９抗体は、ＰＳと特異的であったが、９Ｄ２、１Ｂ１２および３Ｇ４は、表４に示される優先度で陰イオン性リン脂質およびアミノリン脂質に結合した。９Ｄ２抗体も実施例ＶＩに記載される。
【０８１３】
実施例Ｖ
外面化したホスファチジルセリンは腫瘍血管の全体的なマーカーである。
【０８１４】
本実施例によって、ＰＳの露出がマウスにおいて増殖する１０個の異なる固体腫瘍の各々について内皮細胞上で生じ、実施例ＩＩに記載されるＬ５４０腫瘍モデルには限定されないことが示される。
【０８１５】
インビボにおける外面化したＰＳは、種々のタイプのヒトおよびマウスの腫瘍を保有するマウスへＰＳに対するモノクローナル抗体を静脈内注射することによって検出された。抗ＰＳ抗体は、全ての１０個の異なる腫瘍モデルにおいて血管内皮に特異的に結合することが示される。同じマウス由来の正常な器官における血管内皮は染色されなかった。アイソタイプマッチしたコントロールモノクローナル抗体は、腫瘍細胞または正常細胞のいずれにも局在しなかった。アポトーシス性細胞がまた免疫組織化学的に同定されたが、ここで腫瘍における極めて少数の内皮細胞がアポトーシスのマーカーを発現した。
【０８１６】
従って、本実施例によって、腫瘍における血管内皮細胞はＰＳを外面化するが、正常な血管はＰＳを外面化しないことが示される。露出したＰＳを有するほとんどの腫瘍内皮細胞はアポトーシスを起こさなかった。従って、ＰＳは、腫瘍脈管構造の豊富でかつ利用しやすいマーカーであって、腫瘍血管画像化および治療について用いることができる。
【０８１７】
Ａ．Ｌ５４０、Ｈ３５８およびＨＴ２９腫瘍
これらの研究で用いた抗ＰＳ抗体は、３ＳＢと命名されたマウスモノクローナルＩｇＭ抗体だった（実施例ＩＶ、Ｒｏｔｅら、１９９３）。３ＳＢは、主にＰＳに結合するがまた、ＰＳのような分布を有する比較的わずかな陰イオン性リン脂質であるＰＡとも反応する。用いた抗ＣＬ抗体は、Ｄ１１と命名されたマウスモノクローナルＩｇＭ抗体であった（実施例ＩＶ、Ｒｏｔｅら、１９９３）。
【０８１８】
腫瘍または正常な血管内皮でのＰＳ露出は最初に、３つの動物腫瘍モデルで試験された：Ｌ５４０ヒトホジキンリンパ腫、ＮＣＩ　Ｈ３５８ヒト非小細胞肺ガン（ＮＳＣＬＣ）およびＨＴ２９ヒト結腸直腸ガン。インビボで腫瘍を増殖させるため、2×10^{6}個の細胞を、ＳＣＩＤマウスの右脇腹に注射して、腫瘍を０．８～１．２ｃｍの直径にさせた。
【０８１９】
大きい腫瘍（約８００mm^{3}を超える容積）を保有するマウスに、２０μｇの抗ＰＳまたは抗ＣＬ抗体のいずれかを、尾静脈を介して静脈内注射した。注射の１時間後、マウスを麻酔して、その血液循環を、ヘパリン処理した生理食塩水で灌流させた。腫瘍および正常な器官を取り出して、凍結切片の調製のために急速凍結した。ヤギ抗マウスＩｇＭ（μ特異的）－ＨＲＰ結合体、続いてカルバゾールでの発色を用いてマウスＩｇＭを検出した。１切片あたり少なくとも１０個の無作為な領域を×４０の倍率で検査して、陽性血管の平均割合を算出した。
【０８２０】
抗ＰＳ抗体は、マウスＩｇＭの検出によって示されるとおり、インビボで３つの腫瘍全て（ＨＴ２９、Ｌ５４０およびＮＣＩ－Ｈ３５８）の脈管構造に特異的に存在した。この

最初の研究では、腫瘍における染色された血管の平均割合は、ＨＴ２９について８０％、Ｌ５４０について３０％、そしてＮＣＩ－Ｈ３５８について５０％であった。腫瘍の全ての領域における血管が染色され、小さい毛細管および大きい血管の両方が染色されていた。

【０８２１】

どの正常組織においても抗ＰＳ抗体での血管染色は観察されなかった。腎臓では、尿細管は抗ＰＳおよび抗ＣＬのレシピエントの両方で染色されて、これはこの器官を通じたＩｇＭの分泌に関連する。抗ＣＬ抗体は、腎臓以外のどのような腫瘍組織または正常組織においても検出されなかった。これらの知見によって、腫瘍内皮のみが原形質膜の外部にＰＳを露出させることが示される。

【０８２２】

Ｂ．小さいおよび大きいＬ５４０腫瘍

膜の内面に対してＰＳを隔離する能力を腫瘍脈管構造が失う時点を推定するため、１４０～１６００ｍｍ^{3}の容積におよぶＬ５４０腫瘍において、抗ＰＳ局在化を検査した。

【０８２３】

マウスをその腫瘍サイズに応じて３つの群に分けた：１４０～３００、３５０～８００および８００～１，６００ｍｍ^3。小さいＬ５４０腫瘍（３００ｍｍ^{3}まで）を保有する３匹のマウスでは抗ＰＳＡｂは検出されなかった。抗ＰＳ　Ａｂは、中間のサイズのＬ５４０腫瘍の群において５匹のうち３匹の動物に、そして大きいＬ５４０腫瘍を保有する全てのマウスにおいて（４匹中４匹）局在した（表５）。全てのＰＳ陽性血管の割合（汎内皮マーカーＭｅｃａ３２によって同定される）は、Ｌ５４０中間群において１０～２０％であって、大きいＬ５４０腫瘍の群において２０～４０％であった（表５）。

表５

中間および大きいサイズの腫瘍において検出されたＰＳ外面化

【０８２４】

【表１１】

腫瘍サイズ　(mm^3)	陽性腫瘍数／総数　*	PS陽性血管／総数†(%)
350-800	3/5	10-20
850-1,600	4/4	20-40

＊Ｌ５４０Ｃｙ腫瘍を保有するマウスを、腫瘍サイズに応じて３つの群に分割した。２０μｇの抗ＰＳ抗体を静脈内注射して、１時間循環させた。抗マウスＩｇＭペルオキシダーゼ結合体を用いて凍結切片でマウス抗体を検出した。

†汎内皮Ａｂ　Ｍｅｃａ　３２を用いて血管の総数を決定した。ＰＳ陽性およびＭｅｃａ陽性の血管を腫瘍の１断面あたり４領域でカウントした。同じ群内のＰＳ陽性血管の範囲（％）を示す。

【０８２５】

Ｃ．Ｌ５４０、Ｈ３５８、ＨＴ２９、Ｃｏｌｏ２６、Ｂ１６および３ＬＬ腫瘍

同じ抗ＰＳ（３ＳＢ）抗体および抗ＣＬ（Ｄ１１）抗体を用いて、腫瘍および正常血管内皮上のＰＳ露出を、さらなる３つの動物腫瘍モデル（全部で６つ）を用いるさらなる研究において試験した：Ｌ５４０ヒトホジキンリンパ腫、ＮＣＩ　Ｈ３５８ヒト非小細胞肺ガン（ＮＳＣＬＣ）、ＨＴ２９ヒト結腸直腸ガン、Ｃｏｌｏ２６マウス結腸ガン、Ｂ１６マウス黒色腫、および３ＬＬマウス肺腫瘍。

【０８２６】

これらの研究では、ＳＣＩＤマウスにおいて腫瘍を皮下で増殖させて、０．４～０．７ｃｍ^{3}の容積にさせた。１群あたり３匹以上のマウスを用いた。抗ＰＳまたは抗ＣＬマウスＩｇＭ抗体（３０μｇ／マウス）を含む２００μｌの生理食塩水を静脈内注射した。３０分後、このマウスを屠殺して、放血して、その血液循環をヘパリン処理した生理食塩水で灌流させた。ほとんどの器官および腫瘍を回収して、凍結切片の調製のために急速凍結

した。ヤギ抗マウスＩｇＭ（μ特異的）ＨＲＰ結合体を用い、続いてカルバゾールを用いた発色によって、マウスＩｇＭを検出した。

【０８２７】

腫瘍の連続切片を、マウス血管の汎内皮マーカーに対するモノクローナル抗体ＭＥＣＡ３２を用いて染色した。ＰＳ陽性血管を形態学的に、そして抗マウスＩｇＭおよびＭＥＣＡ３２での同時染色によって同定した。１切片あたり少なくとも１０の無作為な領域（１領域あたり０．３１７ｍｍ^2）を、２つの独立した観察によって盲検的に検査した。ＰＳについて陽性に染色したＭＥＣＡ３２陽性血管の割合を算出した。各々のタイプの３つの腫瘍を、各々２つの別の研究において検査した。平均値および標準誤差（ＳＥ）を算出した。各々の群における総血管数およびＰＳ陽性血管数の腫瘍間の変動は約１０％であった。

【０８２８】

この研究の６つの腫瘍全てがＰＳ陽性血管を有した（表６）。３ＳＢによるＰＳの検出は、特異的であった。なぜなら、抗ＣＬ抗体を用いては腫瘍内皮の染色は観察されなかったからである（表６；図１）。抗ＰＳまたは抗ＣＬ抗体の血管局在化は、腎臓以外の正常な器官では観察されなかった（抗ＰＳおよび抗ＣＬレシピエントの両方における尿細管染色は、この器官を通じたＩｇＭの分泌を反映する）。

表６

腫瘍血管に対する抗ＰＳ抗体の特異的局在化

【０８２９】

【表１２】

組織	抗-PS*	抗-CL
L540腫瘍	19.3±3.3	0
H358腫瘍	15.6±4.1	0
HT29腫瘍	4.2±1.6	0
B16腫瘍	40.6±5.4	0
3LL腫瘍	5.3±3.7	0
Colo 26腫瘍	12.4±2.4	0
副腎	0	0
脳	0	0
心臓	0	0
腎臓	0†	0†
小腸	0	0
肝臓	0	0
肺	0	0
膵臓	0	0
脾臓	0	0
精巣	0	0

＊この結果は、１領域の０．３１７ｍｍ^{2}あたりのＭＥＣＡ　３２染色された血管のうちのＰＳ陽性血管の平均（±ＳＥ）割合として示される。各々のタイプの６つの腫瘍を解析した。１領域の０．３１７ｍｍ^{2}あたりのＭＥＣＡ　３２陽性血管の平均数は、それぞれＬ５４０、Ｈ３５８、ＨＴ２９、Ｂ１６、３ＬＬおよびＣｏｌｏ２６腫瘍について２５、２１、１７、１８、２７および２２±１０％の血管であった。

†非抗原特異的尿細管染色は、抗ＰＳおよび抗ＣＬレシピエントの両方で可視であった。

【０８３０】

これらの研究では、ＰＳ陽性血管の割合は、Ｃｏｌｏ２６腫瘍での１０％からＢ１６腫瘍での４０％に及んだ。抗ＰＳ　ＩｇＭは、腫瘍の全ての領域において毛細血管および細静脈の内腔表面に存在した。ＰＳ陽性血管は、壊死および壊死の周囲の領域において特に一般的であるようである。陽性の血管は一般に形態学的異常を示さなかったが、これは光学顕微鏡によって明らかになった。壊死領域にたまたま局在した血管は、悪化の形態学的兆候を示した。抗ＰＳ抗体（ただし抗ＣＬ抗体ではない）はまた、壊死性およびアポトーシス性の腫瘍細胞に局在した。

【０８３１】
これらの制御された研究によって、ＰＳは種々の腫瘍において血管内皮の内腔表面に一貫して露出されるが、正常な組織には露出されず、そして腫瘍脈管構造発現はモデル特異的ではないことが実証される。
【０８３２】
Ｄ．ＰＳ陽性腫瘍血管のほとんどがアポトーシス性ではない。
【０８３３】
二重標識技術を用いて、腫瘍切片におけるアポトーシス性内皮細胞を同定した。内皮細胞を、汎内皮的な細胞マーカーであるＭＥＣＡ３２を用いて同定した。２つの独立したマーカー：瀕死の細胞における細胞質の変化を同定する、カスパーゼ３の活性フォーム（Ｋｒａｊｅｗｓｋａら、１９９７）、および核変化を有する細胞を同定する、断片化されたＤＮＡ（Ｇａｖｒｉｅｌｉら、１９９２）を用いてアポトーシス細胞を免疫組織化学的に同定した。
【０８３４】
ウサギ抗カスパーゼ３特異的抗体（Ｒ＆Ｄ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）、続いてアルカリホスファターゼに結合体化された抗ウサギＩｇＧ（ＡＰ，Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）とのインキュベーションによって、活性なカスパーゼ３を検出した。他の腫瘍切片を、検出試薬として抗ジゴキシゲニンアルカリホスファターゼ結合体を用いて、Ｔｕｎｅｌアッセイ（ＡｐｏｐＴａｇ^{TM}キット、Ｏｎｃｏｒ，ＭＤ）によって解析した。切片をアポトーシスマーカー（ピンク）および内皮細胞マーカー、ＭＥＣＡ　３２（褐色）について二重に染色した。内皮細胞およびアポトーシス細胞のマーカーが同時に存在する場合、両方の色が同じ細胞で明白に可視であった。
【０８３５】
６つのタイプの腫瘍のうち５つ（ＨＴ２９、Ｈ３５８、Ｂ１６、Ｃｏｌｏ２６、Ｌ５４０）において、内皮細胞は、いずれのアポトーシスマーカーも示さなかった（表７）。腫瘍のうち６番目のタイプである３ＬＬは、壊死の領域に局在した２～３のアポトーシス内皮細胞を示した。対照的に、アポトーシス悪性細胞は、全てのタイプの腫瘍において共通であった。アポトーシス腫瘍細胞の割合は、Ｌ５４０腫瘍における１～２％から３ＬＬ腫瘍における１２．６～１９．６％に及んだ。
【０８３６】
表７
腫瘍におけるアポトーシスマーカーの発現
【０８３７】
【表１３】

腫瘍タイプ	活性カスパーゼ3		Tunelアッセイ	
	腫瘍細胞（全体に対する%）*	腫瘍血管	腫瘍細胞（全体に対する%）*	腫瘍血管
3LL	19.8 ± 4.3	<1.0†	12.6 ± 3.6	0
HT29	13.7 ± 2.3	0	7.8 ± 2.5	0
H358	5.8 ± 2.0	0	4.3 ± 1.6	0
Colo 26	5.3 ± 1.5	0	4.1 ± 1.5	0
B16	4.2 ± 1.8	0	3.5 ± 1.6	0
L540	2.3 ± 1.0	0	1.6 ± 0.5	0

＊カスパーゼ－３またはＴｕｎｅｌのいずれかについて陽性であった腫瘍細胞または腫瘍血管の割合を、１切片あたり１０倍大きいパワーで決定した。この分野を、腫瘍の中央を通じて端部から２つの垂直方向にそって無作為に選択した。６匹のマウス由来の腫瘍における陽性の細胞または血管の割合の平均（±ＳＥ）を示す。

†３ＬＬ腫瘍の壊死領域に時折存在する血管（１００を超える内の１）は、アポトーシスの両方のマーカーを示した。

【０８３８】

Ｅ．ＭＤＡ－ＭＢ－２３１およびＭｅｔｈ　Ａ腫瘍

腫瘍血管内皮細胞上でのＰＳ露出をまた、マウスで増殖しているＭＤＡ－ＭＢ－２３１ヒト乳房腫瘍において、および皮下で増殖しているマウスＭｅｔｈ　Ａ線維肉腫において検査した。これらの研究において用いた抗体は、実施例ＩＶに記載のように生成された、９Ｄ２抗体であって、これは陰イオン性リン脂質と反応性である。

【０８３９】

実施例ＶＩに詳細に記載されるように、９Ｄ２は、Ｌ５４０、ＮＣＩ－Ｈ３５８およびＢ１６腫瘍における腫瘍血管に、そしてＳＣＩＤマウスの乳腺脂肪パッドにおいて同所性に増殖しているＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳房腫瘍のモデルおよび皮下で増殖しているマウスＭｅｔｈ　Ａ線維肉腫に局在した。９Ｄ２は、全ての５つの腫瘍において腫瘍血管に局在した。腫瘍における血管内皮細胞は、別個の膜染色を示した。９Ｄ２抗体はまた、壊死およびアポトーシス性腫瘍細胞の膜および細胞質に局在した。９Ｄ２抗体の血管局在は、試験された１０個の正常な器官のうち９個で観察されなかったが、ここでは腎臓における尿細管の非特異的染色が観察された。

【０８４０】

二重染色研究も実施したが、ここでは同所性ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳房腫瘍を保有するマウスにビオチン化した９Ｄ２抗体を静脈内注射して、その後に凍結した切片を後にＦＩＴＣ結合体化ＭＥＣＡ３２を用いて染色した（実施例ＶＩ）。ＭＥＣＡ　３２陽性血管のうち約４０％が９Ｄ２に結合した。

【０８４１】

Ｆ．ＭＤ－ＭＢＡ－４３５腫瘍

さらなる乳ガンモデルにおいては、腫瘍血管内皮上のＰＳ露出を、マウスで増殖しているＭＤＡ－ＭＢ－４３５ヒト乳ガン細胞中で検査した。これらの研究で用いた抗体は、３Ｇ４抗体のキメラバージョン（ｃｈ３Ｇ４）である。３Ｇ４抗体生成は実施例ＩＶに記載され、そしてキメラ３Ｇ４抗体の生成は、実施例ＸＩＸに詳細に記載される。ＭＤＡ－ＭＢ－４３５モデルにおける腫瘍血管内皮に対するｃｈ３Ｇ４の局在化は、実施例ＸＩＸにさらに詳細に記載されており、図２２に示される。

【０８４２】

要するに、腫瘍をＭＤ－ＭＢＡ－４３５細胞を用いて樹立して、キメラ３Ｇ４抗体のビオチン化バージョンおよび無関係の特異性のコントロールＩｇＧを投与した。腫瘍切片をＣｙ３結合体化ストレプトアビジンで染色してビオチン化タンパク質を検出した。ＭＥＣＡ　３２抗体に続いてＦＩＴＣタグ化抗ラットＴｇＧ二次抗体を用いる二重染色を行なって、血管内皮を検出した。この検出方法は、赤および緑を用いてビオチン化タンパク質および血管内皮細胞を標識して、その結果、内皮細胞に結合したビオチン化タンパク質は、集束型（ｃｏｎｖｅｒｇｅｄ）画像で黄色にみえる（図２２）。この研究によって、腫瘍脈管内皮細胞に対するキメラ３Ｇ４抗体の特異的な局在化が示された。

【０８４３】

Ｇ．ＲＩＰ－タグ腫瘍

１０番目のモデルについて、腫瘍血管内皮に対するＰＳの露出を、多段階の発現の「ＲＩＰ－Ｔａｇ」トランスジェニックマウスモデル（ＲＩＰ１－Ｔａｇ　２）において検査した。このトランスジェニックマウスモデルでは、あらゆるマウスが、インスリン産生β細胞におけるＳＶ４０　Ｔ抗原（Ｔａｇ）ガン遺伝子の発現の結果として１２～１４週齢までに膵臓の島腫瘍を発症する。腫瘍は、過剰増殖性島から多段階で発症して、悪性に進行するには血管形成性の切り替えを要する。マトリックスメタロプロテイナーゼ９が血管形成切り替えを制御する（ＲＥＦ）。

【０８４４】

ＵＣＳＦの病理学の教授であるＤｏｎａｌｄ　ＭｃＤｏｎａｌｄ博士と共同してＲＩＰ

１－Ｔａｇ２モデルにおいて、９Ｄ２局在化研究を行なった。全てのマウスが小さい高度に血管新生された固体腫瘍を有する場合、９Ｄ２を、１０週齢で開始してＲＩＰ１－Ｔａｇ２マウスに静脈内注射した。厚い（８０μｍ）腫瘍切片の二重染色を実施して、腫瘍および正常な膵臓に局在した９Ｄ２およびＣＤ３１を同定した。膵臓腫瘍における血管の約５０％（ＣＤ３１陽性）が、局在化した９Ｄ２を有したが、正常な島における血管は染色されなかった。コントロールラットＩｇＭを注射されたマウスが有した腫瘍血管の染色は弱くかつまれであった。内皮細胞をこえる血管外組織への９Ｄ２およびコントロールラットＩｇＭのある程度の漏出がまた出現した。

【０８４５】

従って、本実施例によって、腫瘍中の血管内皮細胞がその管腔表面にＰＳおよび陰イオン性リン脂質を外面化して、ここでそれらはインビボにおいて抗ＰＳ抗体によって結合され得ることが確認される。ＰＳは、正常組織における血管内皮細胞の外面には欠けており、このことはＰＳ認識抗体、アネキシンＶおよび他のリガンドが、固体腫瘍における血管の選択的画像化または破壊のための細胞毒性薬物、凝固剤および放射性核種を送達するために用いられ得ることを示す。

【０８４６】

ＰＳ陽性腫瘍内皮細胞は、ほとんどの部分について、この研究で用いられる腫瘍において生存可能であると考えられた。これは、アポトーシスのマーカーを示さず、これは、ＶＣＡＭ－１、Ｅセレクチンおよび他の急速に代謝されたタンパク質の発現によって示されるとおり、形態学的にインタクトであってかつ代謝的に活性である。アポトーシスの指標としてしばしばみなされるが、ＰＳ露出は、悪性細胞（Ｒａｏら、１９９２）、（Ｕｔｓｕｇｉら、１９９１）活性化血小板（Ｒｏｔｅら、１９９３）、ならびに種々の段階の遊走、細胞間質浸潤および融合の胚性トロホブラスト（Ａｄｌｅｒら、１９９５）を含む、いくつかのタイプの生存細胞において、観察されている。

【０８４７】

細胞死に対するＰＳ露出とコミットメントとの間の関係がないことはまた、プロアポトーシス刺激の除去後にＰＳの非対称性および増殖を正常に修復するプレアポトーシス性Ｂリンパ球細胞上で示されている（Ｈａｍｍｉｌｌら、１９９９）。正常な生存細胞において、ＰＳ露出はおそらく、細胞へのＣａ$^{2+}$フラックスを誘導するリガンド－レセプター相互作用のような表面事象によって誘発される（Ｄｉｌｌｏｎら、２０００）。Ｃａ$^{2+}$フラックスは、スクランブラーゼを活性化して（Ｚｈａｏら、１９９８）、アミノリン脂質転位酵素を同時に阻害する（Ｃｏｍｆｕｒｉｕｓら、１９９０）。

【０８４８】

腫瘍血管上のＰＳは、いくつかの理由のためにガン画像化または治療についての標的として魅力的である：ＰＳは豊富である（１細胞あたり約３×１０^{6}個の分子）；ＰＳは腫瘍内皮細胞の管腔表面にあり、これは血液中の血管標的化因子による結合について直接利用可能である；ＰＳは、多様な固体腫瘍において腫瘍内皮細胞のうち高い割合で存在し、ＰＳは、今まで試験された全ての正常組織における内皮細胞には欠けている。従って、腫瘍脈管構造上の未結合の抗体、血管標的因子およびＰＳに対する画像化剤は、ヒトでのガンの検出および処置のために用いることができる。

【０８４９】

実施例ＶＩ

陰イオン性リン脂質を腫瘍血管の表面上に露出させる。

【０８５０】

陰イオン性リン脂質は、正常な条件下で、哺乳動物細胞の原形質膜の外部小葉からはほとんど欠けている。例えば、細胞表面上のホスファチジルセリンの露出が、アポトーシス、壊死、細胞損傷、細胞活性化および悪性転換の間に生じる。本実施例は、陰イオン性リン脂質に対して結合する特定の抗体および天然のリガンドの両方の局在化によって実証されるとおり、陰イオン性リン脂質がインビボにおいて腫瘍脈管構造上で上方制御されることを示す。

【０８５１】
陰イオン性リン脂質を特異的に認識するモノクローナル抗体９Ｄ２を、種々の同所性または異所性の腫瘍を保有するマウスに注射した。他のマウスには、陰イオン性リン脂質に結合する天然のリガンドであるアネキシンＶを投与した。９Ｄ２およびアネキシンＶの両方は、全ての腫瘍における血管内皮に、そしてまた壊死の領域中のおよびその周囲の腫瘍細胞に特異的に局在した。腫瘍血管において１５～４０％の内皮細胞が染色された。正常な内皮細胞では局在化は検出されなかった。
【０８５２】
腫瘍の微小環境に存在することが公知の種々の要因および腫瘍関連状態を、９Ｄ２およびアネキシンＶ結合によって判定されるように、培養された内皮細胞における陰イオン性リン脂質の露出を生じる能力について試験した。低酸素／再酸素化、酸性度、トロンビンおよび炎症性サイトカインは全てが陰イオン性リン脂質の露出を誘導した。過酸化水素もまた強力な誘導因子であった。炎症性サイトカインおよび低酸素／再酸素化との併用処置によって相加作用よりも大きい効果が得られた。従って、インビボにおける腫瘍内皮上の陰イオン性リン脂質の実証された露出は、サイトカインおよび反応性酸素種による傷害および活性化によって生じる可能性が高い。この機構にかかわらず、陰イオン性リン脂質は、腫瘍血管標的化、画像化および治療について現在用いることができる腫瘍血管のマーカーである。
【０８５３】
Ａ．材料および方法
１．材料
$Na^{125}I$は、Ａｍｅｒｓｈａｍ（Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＬ）から入手した。ダルベッコ改変イーグル組織培養培地、およびCa^{2+}およびMg^{2+}を含有するダルベッコＰＢＳをＧｉｂｃｏから入手した（Ｇｒａｎｄ Ｉｓｌａｎｄ，ＮＹ）。ウシ胎仔血清をＨｙｃｌｏｎｅ（Ｌｏｇａｎ，Ｕｔａｈ）から入手した。Ｌ－α－ホスファチジルセリン、Ｌ－α－ホスファチジルコリン、カルジオリピン、Ｌ－α－ホスファチジルエタノールアミン、Ｌ－α－ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、Ｏ－フェニレンジアミン、過酸化水素およびトロンビンをＳｉｇｍａ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）から入手した。２４ウェルの平底プレートをＦａｌｃｏｎ（Ｂｅｃｔｏｎ ＤｉｃｋｉｎｓｏｎおよびＣｏ．，Ｌｉｎｃｏｌｎ Ｐａｒｋ，ＮＪ）から入手した。
【０８５４】
組み換え肝細胞増殖因子（ＨＧＦまたは散乱因子）およびアクチノマイシンＤは、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）からであった。組み換えマウスインターロイキン－１α、βおよび腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）を、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）から購入した。ユニバーサルタイプＩ（Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ Ｔｙｐｅ Ｉ）のインターフェロン（全てのタイプのインターフェロンの代わりになるハイブリッドタンパク質）をＰＢＬ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｎｅｗ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ）から購入した。組み換えのヒト血管内皮増殖因子１２１（ＶＥＧＦ）、ヒト血小板由来増殖因子－ＢＢ、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－８（ＩＬ－８）、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）およびヒト線維芽細胞増殖因子－２（ＦＧＦ－２）をＰｅｐｒｏＴｅｃｈ（Ｒｏｃｋｙ Ｈｉｌｌ，ＮＪ）から購入した。
【０８５５】
２．抗体
ＭＥＣＡ３２、汎マウス内皮細胞抗体は、Ｄｒ．Ｅ．Ｂｕｔｃｈｅｒ（Ｓｔａｎｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，ＣＡ）から入手して、免疫組織学的研究のための陽性コントロールとして用いた。この抗体の詳細は公表されている（Ｌｅｐｐｉｎｋら、１９８９）。西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）に結合体化したウサギ抗ラット免疫グロブリン二次抗体、ラット抗マウス免疫グロブリン二次抗体、ならびにヤギ抗マウス二次抗体およ

び抗ラット二次抗体は、Ｄａｃｏ（Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ，ＣＡ）またはＪａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅｒａｒｃｈ Ｌａｂｓ（Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）のいずれかから購入した。

【０８５６】

これらの研究で用いた９Ｄ２抗体は、実施例ＩＶに記載されたように生成した。９Ｄ２は、陰イオン性リン脂質と反応性のラットモノクローナル抗体である。９Ｄ２のリン脂質特異性のさらなる特徴付けは、本実施例の結果の節に記載される。

【０８５７】

３．細胞

末期の疾患を有する患者由来のＬ５４０Ｃｙホジキンリンパ腫細胞は、Ｖ．Ｄｉｅｈｌ教授（Ｋｏｅｌｎ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から提供された。ＮＣＩ－Ｈ３５８ヒト非小細胞肺ガンは、Ａｄｉ Ｇａｚｄａｒ博士（Ｓｏｕｔｈｗｅｓｔｅｒｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｃｅｎｔｅｒ，Ｄａｌｌａｓ，ＴＸ）から提供された。Ｍｅｔｈ Ａマウス線維肉腫およびＭＤＡ－ＭＢ－２３１ヒト乳ガンは、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｅｌｌ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）から入手した。マウス脳内皮腫株ｂＥｎｄ．３は、Ｗｅｒｎｅｒ Ｒｉｓａｕ教授（Ｍａｘ Ｐｌａｎｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ，Ｍｕｎｉｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から提供されて、１０％ＦＢＳを有するＤＭＥＭ中で維持した。成体ウシ大動脈内皮（ＡＢＡＥ）細胞は、Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ；Ｗａｌｋｅｒｖｉｌｌｅ，ＭＤ）から購入した。ＡＢＡＥ細胞は、１０％血清および２ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦを含有するＤＭＥＭ中で維持した。

【０８５８】

４．組織培養

ｂＥｎｄ．３，ＡＢＡＥ細胞およびＬ５４０Ｃｙリンパ腫以外の全ての腫瘍細胞を、１０％ウシ胎仔血清、２ｍＭ Ｌ－グルタミン、２単位／ｍｌペニシリンＧおよび２μｇ／ｍｌストレプトマイシンを補充したＤＭＥＭ中で維持した。Ｌ５４０Ｃｙ細胞は、同じ添加物を含むＲＰＭＩ １６４０中で維持した。細胞を週に１回継代培養した。０．２％ＥＤＴＡを含有するＰＢＳにおいて０．１２５％トリプシンを用いてｂＥＮｄ．３細胞のトリプシン処理を行なった。インビトロ研究については、２４ウェルプレートにおいて１ｍｌの培養培地に１０×１０^{3}細胞／ｍｌの密度で内皮細胞を播種して、アッセイでの使用の前に４８～９６時間インキュベートした。各々の研究の２４時間前に培地を再生した。

【０８５９】

５．プラスチック固定リン脂質との反応性

リン脂質をｎ－ヘキサンに５０μｇ／ｍｌの濃度まで溶解した。この溶液の１００μｌを９６ウェルマイクロタイタープレートのウェルに加えた。空気中の溶媒のエバポレーション後に、このプレートを、２ｍＭ Ｃａ$^{2+}$を含有するＤＰＢＳに溶解した１０％ウシ胎仔血清（結合緩衝液）を用いて２時間ブロックした。

【０８６０】

初期濃度６．７ｎＭで、１０％血清の存在下において結合緩衝液中で、９Ｄ２抗体またはアネキシンＶを希釈した。連続２倍希釈物をプレート中で調製した（１ウェルあたり１００μｌ）。次いで、このプレートを室温で２時間インキュベートした。このプレートを洗浄して、それぞれＨＲＰに対して結合体化したヤギ抗ラットＩｇＭおよびウサギ抗ヒトアネキシンＶによって、続いてＨＲＰに結合体化されたヤギ抗ウサギＩｇＧによって（全て１：１０００希釈）、９Ｄ２およびアネキシンＶを検出した。色素生産性の基質ＯＰＤを用い、続いてマイクロプレートリーダー（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）を用いて４９０ｎｍでプレートを読み取ることによって、二次試薬を検出した。

【０８６１】

９Ｄ２抗体結合の特異性を、無関係の特異性のコントロールのラットＩｇＭ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いることによって確証した。Ｃａ$^{2+}$依

存性であるリン脂質に対するアネキシンＶ結合の特異性を、５ｍＭ　ＥＤＴＡを含有するＤＰＢＳ中に試薬を希釈することによって決定した。さらなる陰性コントロールは、０．２％の界面活性剤Ｔｗｅｅｎ　２０を含有する結合緩衝液を用いてプレートを洗浄する工程から構成された。この処置によって脂質を抽出して、これによってプラスチックに吸着されたリン脂質を除去する。９Ｄ２抗体もアネキシンＶも、界面活性剤で洗浄したプレートには結合しなかった。

【０８６２】

６．培養された内皮細胞の表面上の陰イオン性リン脂質の検出

内皮細胞が約７０％コンフルエンスに達するまで内皮細胞を増殖させた。ＰＳ露出を誘導するために、細胞をH_2O_2（２００μＭ）を用いて３７℃で１時間処置した。コントロールのスライドおよび処置したスライドをCa^{2+}およびMg^{2+}含有ＤＰＢＳを用いて洗浄して、同じ緩衝液に希釈した０．２５％グルタルアルデヒドで固定した。５０ｍＭのNH_4Clとの５分間のインキュベーションによって過剰なアルデヒド基をクエンチした。リン脂質の検出に対する界面活性剤および有機溶媒の効果を試験するために、いくつかのスライドをアセトンを用いるか（５分）、または１％（ｖ／ｖ）Ｔｒｉｔｏｎ^{TM}Ｘ－１００を含有するＰＢＳを用いてプレインキュベートした。

【０８６３】

細胞をＤＰＢＳ（Ca^{2+}、Mg^{2+}および０．２％（ｗ／ｖ）ゼラチン含有）を用いて洗浄して、１μｇ／ｍｌのビオチン化アネキシンＶ（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）とともに、または１μｇ／ｍｌの９Ｄ２抗体とともにインキュベートした。インキュベーションの２時間後、細胞を０．２％ゼラチン緩衝液とともに洗浄して、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（１：５００希釈）とともにインキュベートした。無関係の特異性のラットＩｇＭおよびストレプトアビジン単独を、これらの研究における陰性コントロールとして用いた。全ての工程を室温で行なった。Ｏ－フェニレンジアミン（０．５ｍｇ／ｍｌ）および過酸化水素（０．０３％ｗ／ｖ）を含有するクエン酸－リン酸緩衝液、ｐＨ５．５を添加することによってＨＲＰ活性を測定した。１５分後、１００μｌの上清を９６ウェルプレートに移して、１００μｌの０．１８Ｍ　H_2SO_4を添加して、その吸光度を４９０ｎｍで測定した。あるいは、ＰＳ陽性細胞をカルバゾール基質の添加によって検出して、不溶性の赤褐色の沈殿を得た。各々の研究を、二連でかつ少なくとも２回繰り返して行なった。

【０８６４】

７．リン脂質に対する９Ｄ２およびアネキシンＶ結合のリポソームによる阻害

リン脂質認識の特異性をさらに、種々のリポソームを用いた競合アッセイによって確認した。リポソームを、５ｍｇの単一のリン脂質を含有するクロロホルムの溶液から調製した。この溶液を窒素下で乾燥して、丸底ガラスフラスコ中に薄層を形成させた。次いで、１０ｍｌのＴｒｉｓ緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ７．４）を添加して、フラスコを２分間に５回超音波処理した。９Ｄ２またはアネキシンＶ（６．６６ｎＭ）を２００μｇ／ｍｌのリポソーム溶液とともに室温で１時間プレインキュベートした。この混合物をリン脂質コーティングしたプレートまたは内皮細胞単層に加えた。異なるリポソームの有無において固定されたリン脂質または細胞表面に対して９Ｄ２が結合する能力を上記のように決定した。

【０８６５】

８．固定されたＰＳに対する結合についての９Ｄ２およびアネキシンＶの競合

１０倍モル過剰のＮ－ヒドロキシスクシンイミドビオチン（Ｓｉｇｍａ，ＭＯ）を用いて精製されたタンパク質を室温で１時間インキュベートすることによって、ビオチン化９Ｄ２抗体およびアネキシンＶを調製した。遊離のビオチンをＰＢＳに対する透析によって除去した。ビオチン化手順は、いずれのタンパク質のＰＳ結合能力も損なうことはなかった。競合研究について、未改変のタンパク質およびビオチン化タンパク質を１０倍モル過剰の未改変のタンパク質と事前混合した。次いで、この混合物をＰＳコーティングプレートに加えた。結合した試薬を、１：１０００に希釈されたストレプトアビジン－ＨＲＰ結

合体によって検出した。競合物の非存在下での各々の試薬のＰＳへの結合を１００％値として採用した。

【０８６６】

９．皮下移植された腫瘍の増殖

局在化研究のために、２×１０^{7}個のＬ５４０ヒトホジキンリンパ腫細胞または他の腫瘍タイプの１×１０^{7}個の細胞をＳＣＩＤマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）の右脇腹に皮下注射した。腫瘍を０．４～０．７ｃｍ^{3}の容積まで到達させた。１群あたり最小３匹の動物のを用いた。研究を少なくとも３回繰り返した。

【０８６７】

１０．ヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガンの同所性モデル

雌性のｎｕ／ｎｕマウスまたはＳＣＩＤマウスをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒから購入した。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１ヒト乳腺ガン細胞を、公表されたプロトコール（Ｐｒｉｃｅ，１９９６）に従って乳腺脂肪パッドに移植した。要するに、マウスを麻酔して外胸部にわたって皮膚に５ｍｍの切開を作製した。乳腺パッドを露出させて、０．１ｍｌの生理食塩水に再懸濁した１×１０^{7}個のＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の注射のための正確な部位を確認した。

【０８６８】

１１．インビボにおける腫瘍保有マウスにおける陰イオン性リン脂質の検出

９Ｄ２またはアネキシンＶが凍結組織の切片に直接付与される免疫組織化学技術では、原形質膜の内部小葉構造と外部小葉構造との上の陰イオン性リン脂質の間が識別されない。外部に位置するリン脂質を検出するために、本質的に以前に記載されたような方法を行なった（実施例Ｖ；Ｒａｎら、１９９８）。腫瘍保有ＳＣＩＤマウスに、５０μｇの９Ｄ２もしくはビオチン化９Ｄ２抗体、または１００μｇのビオチン化アネキシンＶのいずれかを静脈内注射した。６０分後にマウスを屠殺して、その血液循環を放血して、以前に記載されたようにヘパリン処理生理食塩水を用いて灌流させた（Ｂｕｒｒｏｗｓら、１９９２）。全ての主な器官および腫瘍を回収して、凍結切片の調製のために急速凍結させた。

【０８６９】

切片を１０％血栓含有ＰＢＳでブロックした。スライド処理の間のリン脂質の損失を妨げるために、界面活性剤および有機溶媒をブロッキング緩衝液および洗浄緩衝液から除外した。ヤギ抗ラットＩｇＭ（μ特異的）－ＨＲＰ結合体を用い、続いてカルバゾールまたはＤＡＢを用いた発色によって、ラットＩｇＭを検出した（Ｆｒｉｅｓら、１９９３）。ＨＲＰに結合体化されたストレプトアビジンによってビオチン化試薬を検出した。

【０８７０】

生理食塩水または無関係の特異性のラットＩｇＭを注射したマウス由来の腫瘍切片を陰性コントロールとして使用した。さらなるコントロールは、１％Ｔｒｉｔｏｎ溶液またはアセトン中で１０分間、スライドをインキュベートする工程から構成された。これらの処置によってリン脂質が抽出される。これらの条件下でシグナルを検出した。１つの強拡大視野あたりの陽性血管の数を×１００の倍率で決定した。１切片あたり少なくとも１０の視野を試験して、陽性の血管の平均割合を算出した。９Ｄ２またはアネキシンＶの存在下におけるこの方法による切片の染色によって、インビボにおいて試薬による結合に利用可能な外面化した陰イオン性リン脂質を有する細胞を検出する。

【０８７１】

１２．ＰＳ陽性腫瘍血管の同定および定量

局在化した９Ｄ２抗体またはアネキシンＶを有する構造を、ＤＡＢ染色した切片上の形態学的外観によって、および凍結組織の連続切片上の汎内皮細胞マーカーＭＥＣＡ３２を用いた同時染色によって、血管として同定した。腫瘍の連続切片においてＭＥＣＡ　３２、９Ｄ２またはアネキシンＶによって染色した血管をカウントすることによって、ＤＡＢ染色した切片上の定量を行なった。９Ｄ２抗体、コントロールラットＩｇＭまたはアネキシンＶを注射した６匹のマウス由来の各々の腫瘍タイプの６つのスライドを試験した。１

切片あたり少なくとも１０個の無作為の視野（１視野あたり０．３１７ｍｍ^2）を、２人の独立した観察者によって、盲検的にスコア付けした。９Ｄ２、アネキシンＶまたはＭＥＣＡ３２によって染色された血管の平均数および標準誤差を算出した。各々の腫瘍タイプ群において決定した９Ｄ２またはアネキシンＶの陽性血管の平均数を、同じ腫瘍群におけるＭＥＣＡ３２陽性血管の平均数と比較した。９Ｄ２またはアネキシンＶ陽性血管の割合を算出した。

【０８７２】

さらなる研究において、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１腫瘍（０．３～０．７ｃｍ^{3}の容積）を保有するマウスに、５０μｇのビオチン化９Ｄ２、コントロールＩｇＭまたはアネキシンＶを静脈内注射した（１群あたりマウス６匹）。ビオチン化試薬を最初にストレプトアビジン－Ｃｙ３結合体とともにインキュベートして、ＰＢＳ中で洗浄し、次いでＭＥＣＡ３２抗体、その後にＦＩＴＣタグ化抗ラットＩｇＧ二次抗体とともにインキュベートした。それぞれ、Ｃｙ３（赤）およびＦＩＴＣ（緑）蛍光について適切なフィルターでとった単一の画像をデジタルカメラによって撮影して、コンピューターに送信した。黄色（融合された緑および赤の蛍光の結果）を示す１０個の無作為の視野（１視野あたり０．３１７ｍｍ^2）の画像を、Ｍｅｔａｖｉｅｗソフトウェアの補助によって重ね合わせた。同じ方法を用いて、コントロールラットＩｇＭまたは生理食塩水を注射したマウス由来の腫瘍を解析した。９Ｄ２またはアネキシンＶが局在化した血管の割合を以下のように算出した：１視野あたりの黄色の血管の平均数を緑の血管の平均数（総数）で割って１００を掛ける。

【０８７３】

Ｂ．結果

１．９Ｄ２抗体およびアネキシンＶのリン脂質特異性

９Ｄ２抗体は、ＥＬＩＳＡにおいて、特異的に陰イオン性リン脂質（ＰＳ、ＰＡ、ＣＬ、ＰＩ、ＰＧ）を認識して、中性のリン脂質（ＰＥ、ＰＣおよびＳＭ）とは有意な反応性を有さなかった（図２Ａ；表８）。ＥＬＩＳＡにおけるリン脂質に対する９Ｄ２の結合の強度の順序は、ＰＡ＞ＰＳ＝ＣＬ＞ＰＧ＝ＰＩであった。結合は抗原特異的であった。なぜなら無関係の特異性であるいくつかのコントロールラットＩｇＭでは結合は観察されなかったからである。ＥＬＩＳＡプレートに吸着された任意の陰イオン性リン脂質に対する９Ｄ２の結合は、任意の陰イオン性リン脂質から調製されたリポソームによってブロックされたが、任意の中性のリン脂質から調製されたリポソームによってはブロックされなかった。

【０８７４】

【表１４】

表8
９Ｄ２およびアネキシンＶのリン脂質特異性

リン脂質		正常な条件下での原形質膜における量および位置[a]	結合のＥＣ$_{50}$（ｐＭ）	
名称	タイプ		９Ｄ２	アネキシンＶ
ＰＳ	陰イオン性アミノＰＬ	ほとんどのＰＬ（１５％）が内側に位置した	１２	１００
ＰＡ	陰イオン性ＰＬ	わずかなＰＬ（１％未満）	２	１００
ＰＧ	陰イオン性ＰＬ	わずかなＰＬ（１％未満）	１００	２５０
ＰＩ	陰イオン性ＰＬ	わずかなＰＬ（７％）が主に内側に位置した	１００	５０
ＣＬ	陰イオン性ＰＬ	原形質膜には欠ける	１５	１３０
ＰＥ	中性アミノＰＬ	ほとんどのＰＬ（２２％）が主に外側に位置した	＞８０００	１００
ＳＭ	中性コリンＰＬ	ほとんどのＰＬ（９％）が外側に位置した	＞８０００	＞８０００
ＰＣ	中性コリンＰＬ	ほとんどのＰＬ（４６％）が外側に位置した	＞８０００	＞８０００

[a]Ｆｒｉｄｒｉｋｋｓｏｎら、１９９９から採用した総リン脂質の割合。割合は異なる細胞タイプについて変化し得る。

【０８７５】

アネキシンＶはまた、陰イオン性リン脂質に結合したが、その結合はアネキシンＶが中性のリン脂質であるＰＥにも強力に結合するという点で９Ｄ２の結合よりも特異性が劣った。ＥＬＩＳＡにおけるリン脂質に対するアネキシンＶの結合の強度の順序は、ＰＩ＞ＰＳ＝ＰＥ＝ＰＡ＝ＣＬ＞ＰＧであった（表８）。アネキシンＶについてのこれらの知見は、初期のデータと一致する（Ａｎｄｒｅｅら、１９９０）。

【０８７６】

９Ｄ２の結合は、５ｍＭ　ＥＤＴＡの存在によっては影響されず、このことはこの結合には陰イオン性リン脂質に対する結合にCa^{2+}を要さないことを示した。対照的に、陰イオン性リン脂質に対するアネキシンの結合は、陰イオン性リン脂質またはＰＥに対する結合についてCa^{2+}に対するその公知の依存性から予想されるように、５ｍＭ　ＥＤＴＡの存在下で無効にされた（Ｓｃｈｌａｅｐｆｅｒら、１９８７；ＢｌａｃｋｗｏｏｄおよびＥｒｎｓｔ，１９９０）。

【０８７７】

９Ｄ２もアネキシンＶも、リン脂質でコーティングされているＥＬＩＳＡプレートに結合せず、そのため０．２％Ｔｗｅｅｎ含有生理食塩水で洗浄され、それらの結合が吸着されたリン脂質に対したものであったことが確認された。９Ｄ２およびアネキシンＶは、ヘパリンにも、硫酸ヘパランにも、または二本鎖もしくは一本鎖のＤＮＡにも検出可能には結合しなかった。

【０８７８】

２．９Ｄ２抗体およびアネキシンＶは、ＰＳに対するお互いの結合を交差ブロックしなかった

９Ｄ２抗体およびアネキシンＶがＰＳに対する結合について競合するか否かを試験するために、ＰＳコーティングしたプレート上でビオチン化タンパク質を用いて、交差ブロック研究を行なった。ビオチン化９Ｄ２抗体およびアネキシンＶの結合を、それぞれ１０倍モル過剰の未改変９Ｄ２およびアネキシンＶによってブロックした（表９）。しかし、未改変のアネキシンＶは、ビオチン化９Ｄ２がＰＳプレートに対して結合する能力に影響しなかった。同様に、未改変の９Ｄ２抗体の添加は、ビオチン化アネキシンＶがＰＳプレー

トに対して結合する能力に影響しなかった（表９）。

【０８７９】

【表１５】

表９

９Ｄ２およびアネキシンＶは、ＰＳに対する結合を交差ブロックしない

ＰＳ結合タンパク質	競合物[a]	結合（コントロール%）[b]
ビオチン化アネキシンＶ	アネキシンＶ	８%
ビオチン化９Ｄ２	アネキシンＶ	９３%
ビオチン化アネキシンＶ	９Ｄ２	９５%
ビオチン化９Ｄ２	９Ｄ２	５%

[a]アネキシンＶまたは９Ｄ２抗体は、ビオチン化試薬を１０倍モル過剰上回って事前混合された。マイクロタイタープレート上のＰＳに対するビオチン化試薬の結合を、ストレプトアビジン－ＨＲＰによって検出した。

[b]競合物の非存在下でのビオチン化試薬の反応性を１００％とした。三連の決定の平均値を示す。ＳＤは、平均値の１０％未満であった。

【０８８０】

これらの結果によって、９Ｄ２抗体およびアネキシンＶが、ＰＳコーティングプレートに対するお互いの結合を交差ブロックしないことが示される。なぜなら９Ｄ２抗体およびアネキシンＶはＰＳ分子上の異なるエピトープを認識するか、またはプラスチック上に吸着されたＰＳの異なる構成を認識するからである

３．細胞表面上に外面化された陰イオン性リン脂質に対する結合

細胞表面に対する９Ｄ２抗体およびアネキシンＶの結合を、マウスｂＥｎｄ．３内皮細胞またはウシＡＢＡＥ細胞を用いて試験した。９Ｄ２もアネキシンＶも、静止条件下でいずれの細胞タイプの非透過性単層にも結合しなかった。このことは、原形質膜の陰イオン性リン脂質のほとんどが細胞質ドメインに対して正常に隔離されることを示す。対照的に、内皮細胞の９０～１００％においてアポトーシスを生じる条件下で細胞をＴＮＦαおよびアクチノマイシンＤとともにプレインキュベートした場合、強力な染色が観察された。

【０８８１】

９Ｄ２およびアネキシンＶが細胞表面上のリン脂質に結合されたことを確認するために、H_2O_2処置したｂＥｎｄ．３細胞を、種々の競合するリポソームの有無において９Ｄ２抗体またはアネキシンＶとともにインキュベートした。陰イオン性リン脂質は、それらが毒性濃度未満（１００～２００μＭ）のH_2O_2を用いて事前処置された場合に、非アポトーシス性の生存可能なｂＥｎｄ．３細胞上に露出された（Ｒａｎら、２００２）。

【０８８２】

H_2O_2処理されたｂｅｎｄ．３細胞に対する９Ｄ２抗体の結合は、陰イオン性リン脂質を含むリポソームによって阻害されたが、中性のリン脂質を含むリポソームによっては阻害されなかった（図３）。細胞に対する９Ｄ２結合の阻害の大きさは、プラスチック固定されたリン脂質を用いて得られた結果に極めて一致して、ＰＡ＞ＰＳ＞ＣＬ＞ＰＧ＞ＰＩの順で変化した（図２Ａおよび図２Ｂ）。同様に、H_2O_2処置した細胞に対するアネキシンＶの結合は、ＰＳ、ＰＡ、ＰＥ、ＣＬならびに、それより低い程度ではＰＩおよびＰＧを含むリポソームによってブロックされた。ＳＭまたはＰＣを含むリポソームは、プラスチック固定されたリン脂質を用いて得られた結果と全く一致して、細胞に対するアネキシンＶ結合をブロックしなかった。

【０８８３】

これらの結果によって、H_2O_2処置された内皮細胞における陰イオン性リン脂質に９Ｄ２が結合するが、アネキシンＶは陰イオン性リン脂質に加えてＰＥに結合することが確認された。

【０８８４】

４．インビボにおける細胞上で外面化した陰イオン性リン脂質の検出

９Ｄ２またはアネキシンＶが凍結組織の切片に直接加えられる、直接免疫組織化学技術

では、原形質膜の内部小葉構造および外部小葉構造の上の陰イオン性リン脂質の間は識別されない。外側に位置するリン脂質を検出するために、９Ｄ２およびアネキシンＶを腫瘍保有マウスに静脈内注射して、腫瘍血管に対する局在化を直接免疫組織化学によって決定した。

【０８８５】

種々のタイプの固体腫瘍を保有するマウスに、９Ｄ２抗体またはビオチン化アネキシンＶを静脈内注射して、その１時間後に屠殺して、その腫瘍および正常な組織を取り出して、凍結切片を調製した。組織の凍結切片を切断して、ＨＲＰ標識抗ラットＩｇＭを用いるか、ＨＲＰ標識化ストレプトアビジンを用いて染色して、注射後にどの細胞に９Ｄ２およびアネキシンＶが結合したかを決定した。血管を形態学的に、そして連続切片上の汎内皮細胞抗体ＭＥＣＡ３２によるその陽性の染色から同定した。

【０８８６】

５．腫瘍保有マウスにおける９Ｄ２抗体およびアネキシンの体内分布

９Ｄ２抗体およびアネキシンＶは、この研究に含まれた５つ全ての腫瘍において腫瘍血管に局在した（図４；表１０）。腫瘍は以下であった：ＳＣＩＤマウスの乳腺脂肪パッドにおいて正所性に増殖しているヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガン；皮下で増殖しているヒトＬ５４０ホジキン腫瘍；皮下で増殖しているヒトＮＣＩ－Ｈ３５８　ＮＳＣＬＣ；皮下で増殖しているマウスＢ１６黒色腫、および皮下で増殖しているマウスＭｅｔｈ　Ａ線維肉腫。

【０８８７】

【表１６】

表１０

腫瘍血管に対する９Ｄ２およびアネキシンＶの特異的な局在化

組織	９Ｄ２抗体[a]	ラットＩｇＭコントロール	アネキシンＶ[b]
腫瘍			
ＭＤＡ－ＭＢ－２３１	４０．６±５．４	－	４５．３±５．６
Ｌ５４０ｃｙ	１９．３±３．３	－	１６．７±３．９
ＮＣＩ－Ｈ３５８	１５．６±４．１	－	ＮＤ
Ｂ１６	２３．４±４．５	－	２１．３±６．６
Ｍｅｔｈ　Ａ	２５．７±６．８	－	ＮＤ
正常			
副腎	－	－	－
脳	－	－	－
心臓	－	－	－
腎臓	－[c]	－[c]	－
小腸	－	－	－
肝臓	－	－	－
肺	－	－	－
膵臓	－	－	－
脾臓	－	－	－
精巣	－	－	－

[a] 腫瘍保有マウスにおける９Ｄ２抗体およびラットＩｇＭコントロールの局在を、抗体（５０μｇ）の注射、生理食塩水を用いてマウスの血液循環を灌流させること、および抗マウスＩｇＭペルオキシダーゼ結合体を用いることにより組織の切片上で抗体を検出することによって決定した。１領域０．３１７ｍｍ^{2}あたりのＭＥＣＡ３２染色血管のＰＳ陽性血管の平均（±ＳＥ）割合として結果を示す。各々のタイプの６つのサンプルを解析した。１領域０．３１７ｍｍ^{2}あたりのＭＥＣＡ３２陽性血管の平均数は、それぞれ、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、Ｌ５４０ｃｙ、Ｈ３５８、Ｂ１６およびＭｅｔｈＡ腫瘍について２３、２５、２１、１８および１９±１０の血管であった。

[b] アネキシンＶの局在化は、ビオチン化アネキシンＶ注射と、それに続くストレプトアビジン－ペルオキシダーゼ結合体を用いる凍結切片上での検出によって決定された。

[c] 非抗原特異的尿細管染色は、９Ｄ２およびコントロール抗体レシピエントの両方で可視

であった。
【０８８８】
９Ｄ２およびアネキシンＶは、本質的に同じパターンの染色を示した。腫瘍血管に対する９Ｄ２抗体の局在化は特異的であった。なぜなら腫瘍内皮の染色が無関係な特異性のラットＩｇＭで観察されなかったからである。おそらく、腫瘍血管外へのコントロールラットＩｇＭの漏出がある程度まで生じるが、血管外のＩｇＭの染色は、間接的な免疫組織化学によって識別するには拡散しすぎているかまたは弱すぎた。
【０８８９】
９Ｄ２抗体またはアネキシンＶの血管局在化は、試験した１０個の正常な器官のうち９つでは観察されなかった（表１０）。腎臓では、抗原特異的ではないと考えられる尿細管の染色が観察された。おそらくは尿細管を通したＩｇＭまたはその代謝物の分泌のおかげで、この器官は９Ｄ２およびコントロールラットＩｇＭレシピエントの両方で染色された。生理学的な血管形成の部位である卵巣は試験しなかった。
【０８９０】
９Ｄ２およびアネキシンＶ陽性血管の割合は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１腫瘍における４０％からＨ３５８腫瘍における１５％に及んだ。陰イオン性リン脂質陽性血管は、腫瘍の全ての領域における毛細管および血管の管腔表面に存在したが、特に壊死の領域およびその周辺では優勢であった。ほとんどの陰イオン性リン脂質陽性血管は、光学顕微鏡によって明らかである形態学的異常を示さなかった。まばらに存在する血管、詳細には壊死領域に位置する血管は、悪化の形態学的兆候を示した。９Ｄ２抗体およびアネキシンＶはまた、壊死細胞およびアポトーシス腫瘍細胞に局在したが、コントロールＩｇＭの局在化は検出不能であった（図４）。
【０８９１】
これらの知見によって、陰イオン性リン脂質は、種々の腫瘍における血管内皮細胞の管腔表面に存在するが、正常な組織には存在しないことが実証される。
【０８９２】
６．二重染色研究
正所性ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳房腫瘍を保有するマウスにビオチン化９Ｄ２抗体、ビオチン化コントロールＩｇＭまたはビオチン化アネキシンＶを静脈内注射した二重染色研究を行なった。１時間後、マウスを屠殺して、その腫瘍を取り出して、凍結切片を切断した。次いで腫瘍切片をＣｙ３結合体化ストレプトアビジンを用いて染色して、ビオチン化タンパク質を検出し、ＦＩＴＣ結合体化ＭＥＣＡ３２を用いて染色して血管内皮細胞を検出した。この検出方法では赤および緑によってビオチン化タンパク質および血管内皮細胞を標識した。ビオチン化タンパク質が内皮に結合した場合、集束型画像（ｃｏｎｖｅｒｇｅｄ　ｉｍａｇｅ）は黄色になる。
【０８９３】
これらの研究では、ビオチン化９Ｄ２およびアネキシンＶはほとんどが、血管内皮に結合するようであった。なぜならそれらの染色パターンは、ＭＥＣＡ３２の染色パターンに収斂したからである。間接的な免疫組織化学によって得られた結果と極めて一致して、約４０％のＭＥＣＡ　３２陽性血管が９Ｄ２およびアネキシンＶに結合した。腫瘍間質へのビオチン化タンパク質の漏出は、二重染色で検出されたが、それは間接的な免疫組織化学によっては明らかではなかった。
【０８９４】
ビオチン化タンパク質は、血管のうちわずか（約５％）の周囲の血管内皮の外側に見出された。無関係の特異性のビオチン化ラットＩｇＭを注射されたマウス由来の腫瘍において、ビオチン化ＩｇＭはまた、血管のうちほぼ同様の割合（約５％）の周囲の腫瘍間質に漏出したが、ほとんどは血管内皮によって結合されないようであった。おそらく、二重染色技術によって検出されるが、ただし間接的な免疫組織化学技術によっては検出されない、血管外遊出した９Ｄ２およびアネキシンＶの検出は、過去の技術のさらに大きい感度、および２つの染色パターンが比較され得るさらに大きい精度を反映する。注射されていな

いコントロール腫瘍は、ストレプトアビジン－Ｃｙ３によって完全に染色され、このことは赤い蛍光が局在化されたタンパク質に相当することを示す。

【０８９５】

実施例ＶＩＩ

腫瘍環境における陰イオン性リン脂質膜転位

腫瘍血管内皮細胞に固有のインビボ表面マーカーとしてのアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質の発見によって、このような分子の転位および外膜発現に対する腫瘍の微小環境の効果をさらに検討するように本発明者らは促された。本実施例は、腫瘍内の条件を模倣する特定の条件に対して細胞内皮をインビトロで暴露することによって、インタクトな生存可能な細胞において、初期に観察されたアミノリン脂質および陰イオン性リン脂質表面発現が再現されることを示す。

【０８９６】

Ａ．材料および方法

１．アネキシンＶのヨウ素化

組み換えヒトアネキシンＶは、ＥＴ１２ａ－Ｐａｎｉｏｎｉｃ リン脂質１プラスミド（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＳｅａｔｔｌｅのＪ．Ｔａｉｔ博士から入手）で形質転換したＥ．ｃｏｌｉから精製した。タンパク質の純度およびＰＳに対する結合を、それぞれＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびＰＳコーティングされたプラスチックで確認した。ウサギポリクローナル、アフィニティー精製抗アネキシンＶ抗体を用いてＰＳに結合したアネキシンＶを検出した。アネキシンＶは、Ｂｏｃｃｉ（１９６４）によって記載されたとおりクロラミンＴを用いて^{125}Ｉで放射性標識した。比活性は、Ｂｒａｎｄｆｏｒｄアッセイ（１９７６）で測定した場合、タンパク質１μｇあたり約１×１０^{6}ｃｐｍであった。

【０８９７】

２．内皮細胞処置

表１１に挙げた濃度のサイトカインまたは増殖因子を用いて内皮細胞を処置した。全ての試薬を１０％の血清を含む培地中で希釈して、細胞とともに３７℃で２４時間インキュベートした。

【０８９８】

低酸素の効果を研究するため、細胞を２４ウェルプレートに播種して、４８時間、加湿した正常酸素雰囲気（２１％O_2、５％CO_2）中でインキュベートさせ、その後に密閉したチャンバ（Ｂｉｌｌｕｐｓ Ｒｏｔｈｅｎｂｅｒｇ Ｉｎｃ．，Ｄｅｌ Ｍａｒ，Ｃａ）中で加湿した低酸素雰囲気（１％O_2、５％CO_2、９４％N_2）に移した。細胞を低酸素チャンバにおいて３７℃で２４時間インキュベートして、次いで３７℃で正常酸素環境に４時間戻した。この細胞を同一継代からの平行培養と比較して、同じ日に播種して、完全に正常酸素条件下で維持した。いくつかの研究において、低酸素チャンバに移す前に、ＩＬ－１α（１０ｎｇ／ｍｌ）およびＴＮＦα（２０ｎｇ／ｍｌ）を培地に加えた。

【０８９９】

酸性微小環境の効果を試験するために、必要量のＨＣｌを用いて種々のｐＨ（７．３から６．２の間におよぶ）に調節した、重炭酸塩を欠く増殖培地に細胞を曝露させた。CO_2の非存在下で３７℃で細胞をインキュベートした。培養の２４時間の間、培養培地が割り当てられたｐＨを保持することを確認した。これらの実験条件は、ウシまたはマウスの内皮細胞のいずれにも毒性ではなく、付着した単層の細胞形態学にも生存度にも影響を有さなかった。

【０９００】

３．^{125}Ｉ標識したアネキシンＶによる培養内皮細胞上でのＰＳの検出

上記の試薬を用いた処置後に、処置した細胞およびコントロール細胞を、７．１ピコモルの^{125}Ｉ標識アネキシンＶ（２００μｌ／ウェル）を含有する結合緩衝液とともにインキュベートした。室温での２時間のインキュベーション後、細胞を徹底的に洗浄して、０．５ＭのＮａＯＨに溶解した。０．５ｍｌの全体容積をプラスチックチューブに移して

、ガンマカウンターでカウントした。５ｍＭ　ＥＤＴＡの存在下で非特異的結合を決定して、実験値から差し引いた。その結果を、１×１０^{6}個の細胞について正規化した、細胞結合したアネキシンＶの正味のピコモルとして表現した。

【０９０１】

アクチノマイシンＤおよびＴＮＦα（各々の成分の５０ｎｇ／ｍｌ）で同時にい処置した細胞上で、アネキシンＶの最大結合を決定した。以前に報告されたとおり、これらの因子は、内皮細胞のうち９０～１００％でアポトーシスおよびＰＳ露出を生じる（Ｌｕｃａｓら、１９９８）。未処置の細胞に対する^{125}Ｉアネキシンの基礎的な結合を、１０％血清を含む培地の存在下で決定した。未処置の培養物に結合した^{125}Ｉアネキシンの量を、処置した培養物における量から差引きした。ＰＳの露出を以下の式に従って算出した：実験条件下の細胞結合アネキシンＶ（ピコモル）を最大アネキシンＶ結合（ピコモル）で割り、１００を掛けた。各々の研究を二連で行い、少なくとも３回行なった。平均値を算出した。これらの別の実験からのＳＥの平均値は５％未満であった。

【０９０２】

Ｂ．結果

１．H_2O_2による誘導

マウスｂＥｎｄ．３内皮細胞を、５０，０００細胞／ウェルの初期密度で播種した。２４時間後に細胞を、漸増濃度（１０μＭ～５００μＭ）のH_2O_2とともに３７℃で１時間インキュベートするか、または未処置のままにした。インキュベーションの終わりに細胞を０．２％ゼラチン含有ＰＢＳで３回洗浄して、０．２５％グルタルアルデヒドで固定した。同一のウェルを抗ＰＳ　ＩｇＭで染色するか、またはトリプシン処理してトリパンブルー排除試験によって生存度について評価した。抗ＰＳ染色のために、２％ゼラチンを用いた１０分間のブロッキング後に、細胞を２μｇ／ｍｌの抗ＰＳ抗体とともにインキュベートし、続いて抗マウスＩｇＭ－ＨＲＰ結合体を用いて検出した。

【０９０３】

高濃度のH_2O_2に対する内皮細胞の暴露によって約９０％の細胞においてＰＳ転位が生じる。しかし、これには、基板からの細胞の脱離および約５０～６０％までの細胞生存度の低下をともなう。細胞生存度の低下を伴う表面ＰＳ発現の関連は理解可能であるが、それでもなお約９０％の転位が観察され、これには細胞生存度のわずか５０～６０％の低下しか伴わないということは注目される。

【０９０４】

より低濃度のH_2O_2を用いることで、細胞生存度において感知できるほどの低下なしに有意なＰＳ発現が得られた。例えば、ＰＳは２０μＭ程度の低濃度でH_2O_2を用いて、全てのH_2O_2処置したウェルにおける約５０％の細胞の細胞表面で検出された。これらの低いH_2O_2濃度下で、プラスチックおよびお互いに対して強固に結合したままの細胞は、形態学的変化を示さず、そして細胞傷害性の兆候も有さなかったことに注目することが重要である。詳細な解析によって本質的に１００％の細胞間接触、適切な細胞形状の保持およびインタクトな細胞骨格が明らかになった。

【０９０５】

従って、低レベルのH_2O_2によって誘導された５０％のＰＳ表面発現が細胞集団で観察され、ここでは細胞生存度は、コントロールの未処置細胞に同一であった（すなわち、９５％）。高いH_2O_2濃度に関連したＰＳ発現には、細胞損傷と伴い、そして高いH_2O_2濃度に対して曝露されたＰＳ陽性細胞は、脱落されて、浮かび、そして細胞骨格が破壊されていた。

【０９０６】

低濃度H_2O_2の存在下での細胞生存度の維持は、他の実験からのデータと一致する。例えば、Ｓｃｈｏｒｅｒら（１９８５）は、１５μＭ　H_2O_2で処置したヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）が平均９０～９５％の生存度（５％～１０％の傷害として報告された）であったが、１５００μＭ　H_2O_2に暴露された細胞ではわずか０～５０％の生存度（５０％～１００％損傷された）であったことを示した。

【０９０７】
インビトロにおける腫瘍環境を模倣するためのH_2O_2の使用はまた、腫瘍環境が、H_2O_2および他の反応性酸素種を生成する炎症性細胞、例えば、マクロファージ、ＰＭＮおよび顆粒球において豊富であるという点でも適切である。安定な腫瘍血管マーカーと前には決して結び付けられていないが、炎症性細胞は、H_2O_2の存在を要する反応性酸素種に関する機構によって内皮細胞損傷を媒介することが公知である（Ｗｅｉｓｓら、１９８１；Ｙａｍａｄａら、１９８１；Ｓｃｈｏｒｅｒら、１９８５）。実際に、インビトロにおけるＰＭＮの刺激は、細胞死（クロム遊離アッセイによって測定される）も細胞剥落も生じることのない、致死に至らない内皮細胞損傷を生じるのに十分なH_2O_2の濃度を生じること；およびこれらのH_2O_2濃度がインビボで局所的に獲得可能であることが研究によって示されている（Ｓｃｈｏｒｅｒら、１９８５）。

【０９０８】
現在のインビトロ転位データは、抗ＰＳ抗体がインビボで腫瘍血管内皮細胞に特異的に局在して、正常な組織における細胞には結合しないことを示す、初期の結果と相関している。インビボのような濃度のH_2O_2が細胞完全性を破壊することなく内皮細胞表面に対するＰＳ転位を誘導するという知見は、もとのインビボデータおよび本発明者らの治療アプローチを確証することに加えて重要な意味を有する。

【０９０９】
ヒト、ウシおよびマウスの内皮細胞は全てが、正常な条件下ではＰＳ陰性であることが公知である。任意の以前に考証されたＰＳ発現は常に、細胞損傷および／または細胞死に関連している。これは正常な生存度が維持される本研究においては事情が異なる。これによって、腫瘍血管内皮におけるＰＳ転位が、細胞損傷とは関係のない生化学的機構によって媒介されることが示される。これは、形態学的にインタクトな内皮細胞におけるＰＳ表面発現の最初の実証であり、そしてＰＳ発現がアポトーシス経路（単数または複数）から切り離され得るという最初の開示であると考えられる。本発明の実現可能性に戻れば、これらの観察によってやはり、ＰＳが一過性ではなく持続できる腫瘍血管のマーカーであって、治療介入のための適切な候補物であることが確認される。

【０９１０】
２．トロンビンによる誘導
トロンビンはまた、ＰＳ発現を増大するが、H_2O_2と同じ程度まででではないことが観察された。このデータはまた、本発明者らによって開発されたＰＳ発現の腫瘍誘導モデルの欠くことのできない部分である：正常組織におけるトロンビン誘導性ＰＳ表面発現はまた、さらなる凝固物である。なぜなら、ＰＳ発現は凝固開始複合体のアセンブリを協調させるからである。

【０９１１】
腫瘍環境は、腫瘍血管が凝固する傾向があるように血栓促進性（プロトロンビン性）であることが公知である（米国特許第５，８７７，２８９号）。トロンビンは、凝固カスケードの産物であるので、これは腫瘍血管に存在する。実際、トロンビンの存在は、ＶＣＡＭ発現を誘導して、これは本発明者らが腫瘍血管の標的可能マーカーとしてＶＣＡＭを開発する能力に貢献する（米国特許第５，８５５，８６６号；同第５，８７７，２８９号）。従って、トロンビンがまたＰＳ発現を誘導するということを示す本発明のデータは、裸の抗体および治療結合体を用いてアミノリン脂質を標的化することに関係し、さらに組織因子を含む抗ＶＣＡＭコアグリガンドの有益な効果を説明する（実施例Ｉ）。

【０９１２】
３．酸化的ストレスの他の因子
インビトロにおけるマウスｂＥｎｄ．３またはウシＡＢＡＥ細胞を、多くの腫瘍の微小環境に存在する（Ｌｉｃｈｔｅｎｂｅｌｄら、１９９６；Ｈａｒｒｉｓら、１９９６）種々の濃度の因子および条件、例えば、低酸素／再酸素化、トロンビン、酸性度、炎症性サイトカインおよび過酸化水素を用いて２４時間処置した（表１１）。

【０９１３】

ＰＳおよび陰イオン性リン脂質の外面化を、^{125}Ｉアネキシン Ｖ結合を測定することによって定量した。アネキシンＶ結合の量を、アクチノマイシンＤおよびＴＮＦ－αを用いる併用処置によって、細胞のうち９０～１００％のアポトーシスが誘導された細胞での量と比較した。アクチノマイシンＤおよびＴＮＦαは、文献報告（Ｒａｏら、１９９２）とよく一致して、両方の細胞タイプにおいて10^6個の細胞あたり６．２ピコモルのアネキシンＶの結合（１細胞あたり３．８×10^6個のアネキシンＶの分子）を誘導した。この値を外面化された陰イオン性リン脂質の最大レベルとした。

【０９１４】

【表１７】

表１１

腫瘍環境を再生させることによるＰＳの誘導

処置	濃度	^{125}Ｉ－アネキシンＶ（最大結合％）	
		ＡＢＡＥ細胞	ｂＥｎｄ．３細胞
１０％血清を含む培地	Ｎ／Ａ	０	０
アクチノマイシンＤ＋ＴＮＦα	各50ｎｇ／ｍｌ	１００	１００
ＶＥＧＦ	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
ＦＧＦ－２	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
散乱因子	４０ｎｇ／ｍｌ	０	０
$TGF\beta_1$	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
ＰＤＧＦ－ＢＢ	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
ＩＬ－１０	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
ＩＬ－８	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
ＩＬ－６	２０ｎｇ／ｍｌ	０	０
ＩＬ－１α	１０ｎｇ／ｍｌ	６．４	７．５
ＩＬ－１β	１０ｎｇ／ｍｌ	５．８	５．５
インターフェロン	４０ｎｇ／ｍｌ	８．６	２．８
ＴＮＦα	２０ｎｇ／ｍｌ	７．４	１３．７
トロンビン	５０ｎＭ	８．８	１７．４
低酸素	１％ O_2	１５．０～１７．５	２２．５
低酸素＋ＩＬ－１α	上と同じ	２６．０	３１．０
低酸素＋ＴＮＦα	上と同じ	３３．０	３６．０
ｐＨ６．６	Ｎ／Ａ	２０．２	１８．９
過酸化水素	２００μＭ	９５．５	９８．４

表１１では、用いられるサイトカイン、増殖因子およびトロンビンの濃度を、培養された内皮細胞に対して最大の刺激効果を有する文献の値から選択した。これらの濃度は、形態学的外観、脱落のないこと、およびトリパンブルーの取り込みのないことによって判定されるとおり、試験の期間（２４時間）を通じて毒性を生じなかった。使用されるH_2O_2の濃度は、選択された条件下で細胞傷害性を生じない最大濃度であった。

【０９１５】

^{125}Ｉアネキシンの基礎的な結合を増殖培地単独の存在下で決定した。アクチノマイシンＤおよびＴＮＦαを用いた併用処置によるアポトーシスの導入後に最大のＰＳ露出を決定した。３つの別の研究からの繰り返しの平均を示す。標準誤差は５％未満であった。

【０９１６】

未処理の細胞を、アネキシンＶまたは抗ＰＳ（９Ｄ２）抗体結合によって判定されるように、外面化したＰＳをほとんど欠いた（表１１）。増殖媒体単独の存在下での基礎的結合は、それぞれＡＢＡＥおよびｂＥｎｄ．３細胞について、０．４４および０．６８ピコモルの^{125}Ｉアネキシンであった。これは、同じ条件下で約１０％の細胞がビオチン化アネキシンＶに結合するという知見とよく関連して、それぞれ、ＡＢＡＥおよびｂＥｎｄ．３細胞について約７．１％および１０．９％の最大の結合に相当した。

【０９１７】

ＶＥＧＦ、ＨＧＦ、ＦＧＦ、$TGF\beta_1$、ＰＤＧＦ、ＩＬ－６、ＩＬ－８およびＩＬ－

１０は、未処置の細胞について基礎的レベルを上回って^{125}ＩアネキシンＶの結合を増大しなかった。炎症伝達物質（ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＴＮＦαおよびインターフェロン）は、ＡＢＡＥ細胞について最大レベルの５～８％およびｂＥｎｄ３細胞について３～１４％に及ぶ、ＰＳおよび陰イオン性リン脂質の転位において少ないが再現性の増大を生じた。

【０９１８】

低酸素／再酸素化、トロンビンまたは酸性の外部条件（ｐＨ６．８～６．６）によって、ＡＢＡＥ細胞については最大レベルの８～２０％、およびｂｅｎｄ．３細胞については最大レベルの１７～２２％におよぶ、ＰＳおよび陰イオン性リン脂質の中程度の高い外面化が誘導された。１００～２００μＭの過酸化水素を用いた処置後にＰＳおよび陰イオン性リン脂質転位における最大の増加が観察された。この処置によって、^{125}ＩアネキシンＶ結合によって判定されるように、両方の細胞タイプにおけるＰＳのほぼ完全な（９５％）外面化が生じた（表１１）。免疫組織化学的に判定されたとおり、ＡＢＡＥおよびｂＥｎｄ．３細胞の７０％より多くがビオチン化アネキシンＶに結合した。

【０９１９】

ＰＳおよび陰イオン性リン脂質転位が低酸素／再酸素化、トロンビン、酸性度、ＴＮＦα、ＩＬ－１またはH_2O_2を用いた処置によって生成された内皮細胞は、アッセイの期間（２４時間）中、マトリックスに結合したままであり、細胞間接触を保持し、トリパンブルー色素を排除する能力を保持した。誘導性因子が除去されるか、または培養条件が正常に戻された後に、正常なＰＳおよび陰イオン性リン脂質の配向は、ほとんどの細胞において２４～４８時間後に回復された。H_2O_2の直接の適用によって、または低酸素／再酸素化、酸性度、トロンビンもしくは炎症性サイトカインによって間接的に、生み出された穏やかな酸化的ストレスが生存可能な内皮細胞上のＰＳおよび陰イオン性リン脂質の一過性の転位を誘発することがこれらの結果によって示される。

【０９２０】

４．炎症性サイトカインおよび低酸素／再酸素化の併用効果

ＡＢＡＥおよびｂＥｎｄ．３細胞をＩＬ－１αまたはＴＮＦαの存在下で低酸素／再酸素化に供した場合、強化されたＰＳおよび陰イオン性リン脂質露出が観察された。サイトカインの非存在下で、低酸素／再酸素化は、ＡＢＡＥ細胞によるＰＳ露出を、アポトーシス濃度のアクチノマイシンＤおよびＴＮＦαで処置した細胞について最大レベルの１５％～１７．５％まで増大した。毒性未満の濃度のＩＬ－１αまたはＴＮＦαの存在下で、低酸素／再酸素化は、陰イオン性リン脂質露出をそれぞれ最大の２６％および３３％まで増大した（図５；表１１）。低酸素／再酸素化の非存在下でのサイトカインの効果との比較によって、サイトカインおよび低酸素／再酸素化の組み合わせがＰＳ露出に対して相加作用よりも大きい作用であったことが示される。同様の効果がｂＥｎｄ．３細胞上で観察された。

【０９２１】

従って、腫瘍環境においては、低酸素／再酸素化によって誘導されたＰＳおよび陰イオン性リン脂質の露出は、炎症性サイトカインによって、そしておそらくは酸性度およびトロンビンのような他の刺激によって増幅され得る。

【０９２２】

これらのインビトロ研究は、インビボにおける腫瘍内皮細胞に対するＰＳ露出の機構の解明に役立った。それらによって、インビボにおいて腫瘍における刺激を模倣する細胞傷害性を生じずに、種々の要因が内皮細胞に対するＰＳ露出を誘導するということが示される。低酸素とその後の再酸素化、酸性度およびトロンビンが、生存可能な内皮細胞上のＰＳ露出を最も増大した。炎症性サイトカイン（ＴＮＦαおよびＩＬ－１α）はまた、ＰＳ露出の弱いが明確な誘導を生じた。

【０９２３】

これらの条件は、以下の理由によってインビボでの腫瘍における主な誘導性刺激である可能性が高い：ｉ）ＰＳ陽性内皮細胞は、低酸素、酸性度、血栓症になった血管、および

浸潤性宿主白血球が通常観察される、壊死および壊死の周囲の領域において優勢である；ｉｉ）低酸素／再酸素化がインビトロにおける内皮細胞に対するＴＮＦαおよびＩＬ－１の弱いＰＳ露出活性を増幅するという知見は、低酸素およびサイトカイン分泌腫瘍および宿主細胞が共存する腫瘍におけるインビボ状況と相関する；ｉｉｉ）低酸素／再酸素化およびトロンビンは、ＮＡＤＰＨオキシダーゼ様膜酵素の活性化を通じて内皮細胞において反応性酸素種（ＲＯＳ）を生成することが報告されている（Ｚｕｌｕｅｔａら、１９９５）。悪性細胞によって生成されたＲＯＳは、内皮細胞の損傷に寄与し得る（Ｓｈａｕｇｈｎｅｓｓｙら、１９８９）。過酸化水素は、本研究において見出された培養された内皮細胞上のＰＳ露出の最も強力な誘導因子であって、これによってＲＯＳの関与についての直接の支持が得られる。

【０９２４】

外面化したＰＳによって、凝固因子がその上に濃縮およびアセンブルする陰性のリン脂質表面が得られる。これは、長らく認識されている腫瘍内皮上の凝固促進性の状況に寄与し得る。ＰＳはまた、腫瘍への白血球浸潤を補助する、循環しているマクロファージ（ＭｃＥｖｏｙら、１９８６）、Ｔリンパ球（Ｑｕら、１９９６）および多形核球細胞についての付着部位を提供する。腫瘍内皮上のＰＳに対する活性化マクロファージ、多形核細胞および血小板の付着は、反応性酸素種のさらなる分泌およびＰＳ露出のさらなる増幅をもたらし得る。

【０９２５】

（実施例ＸＩＩＩ：アネキシン結合体の抗腫瘍効果）

アミノホスホリピドが腫瘍脈管構造の安定なマーカーであるという驚くべき知見はまた、抗体－治療剤構築物がガン治療に使用され得ることを意味する。標的剤としての抗体の使用に加えて、本発明者らは、アネキシン、および他のアミノホスホリピド結合タンパク質もまた、治療剤を腫瘍脈管構造に特異的に送達するのに使用され得ると結論付けた。以下のデータは、アネキシン－ＴＦ構築物のインビボ投与から生じる抗腫瘍効果を示す。

【０９２６】

（Ａ．方法）

アネキシンＶ－ｔＴＦ結合体を調製し、そして固形腫瘍を有するｎｕ／ｎｕマウスに投与した。この腫瘍は、少なくとも約１．２ｃｍ^{3}の腫瘍を形成したヒトＨＴ２９結腸直腸腺ガン細胞から形成された。アネキシンＶ－ｔＴＦコアグリガンド（１０μｇ）を静脈内投与し、そして２４時間循環させた。生理食塩水で処置したマウスを、コントロールマウスとして別々に維持した。１日の処置期間の後、このマウスを屠殺し、そして放血させ、そしてこの腫瘍および主な器官を分析のために採取した。

【０９２７】

（Ｂ．結果）

アネキシンＶ－ｔＴＦ結合体が、ＨＴ２９腫瘍保有マウスにおいて特定の腫瘍血管凝固を誘導することを見出した。アネキシンｖ－ｔＴＦ結合体処置した動物における腫瘍血管の約５５％が、１回の注射後に血栓形成した。対照的に、コントロール動物の腫瘍脈管構造において血栓、最小限に現れた。

【０９２８】

実施例ＩＸ

３ＳＢ抗ＰＳ抗体の抗腫瘍効果

本実施例は、同系および異種の腫瘍モデルを用いる抗ＰＳ抗体の抗腫瘍効果を示す。本研究で用いる３ＳＢ抗体は、ＰＳ（およびＰＡ）に結合するが、本質的にＰＥとの反応性は欠く。この抗ＰＳ抗体は、血栓および腫瘍壊死を伴った腫瘍血管傷害を生じた。

【０９２９】

抗ＰＳ抗体の効果を、３ＳＢ抗体を用いる同系および異種の腫瘍モデルにおいて最初に試験した。同系のモデルについて、マウス結腸直腸ガンＣｏｌｏ２６の１×１０^{7}個の細胞（Ｄｒ．ｌａｎ　Ｈａｒｔ，ＩＣＲＦ、Ｌｏｎｄｏｎから入手）をＢＡＬＢ／ｃマウスの右脇腹に皮下注射した。異種モデルにおいては、雄性ＣＢ１７　ＳＣＩＤマウスの右脇

腹に１×１０^{7}個の細胞を皮下注射することによってヒトホジキンリンパ腫Ｌ５４０異種移植片を樹立した。処置の前に約０．６～０．９ｃｍ^{3}のサイズまで腫瘍を増殖させた。

【０９３０】

腫瘍保有マウス（１群あたり４匹）に２０μｇの３ＳＢ抗ＰＳ抗体（ＩｇＭ）、コントロールのマウスＩｇＭまたは生理食塩水を腹腔内注射した。４８時間の間隔で処置を３回繰り返した。動物を腫瘍測定および体重について毎日モニターした。腫瘍容積を実施例Ｉに記載のとおり算出した。腫瘍が２ｃｍ^{3}に達するか、または腫瘍が壊死もしくは潰瘍形成の兆候を示す前にマウスを屠殺した。

【０９３１】

同系および異種の腫瘍の両方の増殖を３ＳＢ抗ＰＳ抗体を用いた処置によって効率的に阻害した（図６Ａおよび図６Ｂ）。抗ＰＳ抗体は、血栓および腫瘍壊死を伴った腫瘍血管傷害を生じた。ブロックされた血管の周囲の血餅の存在および腫瘍塊の分解が証明された。

【０９３２】

定量的に、３ＳＢ抗ＰＳ抗体処置は、大きいＣｏｌｏ２６腫瘍（図６Ａ）およびＬ５４０腫瘍（図６Ｂ）を保有するマウスにおけるコントロール腫瘍容積の６０％まで腫瘍増殖を阻害した。生理食塩水またはコントロールのＩｇＭで処置したマウスでは、腫瘍増殖の遅延は見出されなかった。抗ＰＳ抗体で処置したマウスでは毒性は観察されず、正常な器官では、未処置または生理食塩水で処置されたマウスと識別できない、未変化の形態が保存されていた。

【０９３３】

腫瘍の退行は最初の処置の２４時間後に開始して、腫瘍はその後６日間サイズが低下し続ける。これは同系および免疫無防備状態＋腫瘍モデルの両方で観察され、このことはこの効果が免疫状態依存性機構（単数または複数）によって媒介されることを示した。さらに、腫瘍負荷の減少は、１５００ｍｍ^{3}より大きい腫瘍を保有するコントロールのマウスに比べて、動物の意識の覚醒の向上および一般的に健常な外観を伴っていた。最初の処置の７～８日後に腫瘍の再増殖が生じた。

【０９３４】

Ｌ５４０腫瘍の抗ＰＳ処置で得られた結果は以下の利用のためにさらに納得される。とりわけ、Ｌ５４０腫瘍処置において観察された腫瘍壊死は、Ｌ５４０腫瘍においてＰＳに陽性に染色された血管の割合がＨＴ２９およびＮＣＩ－Ｈ３５８腫瘍におけるよりも少ないという事実にかかわらず生じた。このことは、他の腫瘍タイプを処置した場合、さらに急速な壊死が生じる可能性が高いということを意味する。さらに、Ｌ５４０腫瘍は、清澄な組織学的切片を提供して、実際に壊死に対して耐性であることが公知なので、一般に実験モデルとして選択される。

【０９３５】

実施例Ｘ

陰イオン性リン脂質に対する抗体（９Ｄ２）の抗腫瘍効果

本実施例は、インビボにおける抗腫瘍研究において、ＰＳおよび他の陰イオン性リン脂質に結合する、９Ｄ２抗体の効果を実証する。

【０９３６】

陰イオン性リン脂質９Ｄ２に結合する高用量（＞１５０μｇ）のラット抗体を、Ｈ３５８腫瘍を保有するヌードマウスに注射した。免疫局在化研究によって、これが腫瘍内皮に強力に局在した（４＋）が、正常な血管による９Ｄ２の非特異的な結合が、高用量に起因していくらか低いレベルで観察されたことが示された（無関係の特異性のコントロールのＩｇＭ抗体について観察されるように）。

【０９３７】

腹水産物にＬ５４０腫瘍を有するＳＣＩＤマウスに９Ｄ２を腹腔内注射した場合、腫瘍は壊死して崩壊した。Ｌ５４０腫瘍を有するＳＣＩＤマウスへのコントロール抗体（ＭＫ２．７、ラットＩｇＧ）の注射の際、同様の効果は観察されなかった。

【０９３８】
次いで、インビボでのＬ５４０腫瘍の増殖に対する９Ｄ２抗ＰＳ抗体の効果をさらに正確に決定した。腫瘍が２００～２５０μｌに達した場合、処置を開始した（０日）。０日から７日まで、マウスに約１５０μｇのＩｇＭ（２００μｌ上清）または２００μｌの１０％ＤＭＥＭを腹腔内注射した。７日から２２日まで、マウスに約３００μｇのＩｇＭ（４００μｌ上清）または４００μｌの１０％ＤＭＥＭを腹腔内注射した。２２日が処置の最終日であって、マウスを屠殺した。
【０９３９】
表１２に示すとおり、１０～２２日まで、腫瘍増殖は一般に約４０％～５０％まで阻害される。研究の終わりに、２０００μｌ容積を超える腫瘍を有するのはコントロール群での９匹中９匹に比べて、処置群ではわずか４匹のマウスであった。
【０９４０】
【表１８】

表１２
インビボでのＬ５４０腫瘍における抗ＰＳ抗体の効果

処置開始後日数	平均腫瘍容積（μｌ）		阻害（％）	２０００μｌを超える腫瘍容積を有するマウスの数	
	コントロール	処置		コントロール	処置
０	３４１	３２０	６．２	０	０
１	４６４	３２５	１０．８	０	０
３	４１２	４１５	０	０	０
７	６８７	４５５	３３．８	０	０
１０	９０４	５４４	３９．９	１／９	０
１３	９４５	５４５	４２．４	１／９	０
１５	１３７３	６８５	５０．１	４／９	１／１０
１７	１４２６	８４２	４１．０	４／９	４／１０
２０	１９９２	９８７	５０．５	６／９	４／１０
２２	２５６０	１３６５	５３．３	９／９	４／１０

別のインビボ研究では、ＣＢ１７　ＳＣＩＤマウスにおけるＬ５４０腫瘍の増殖に対するラット抗ＰＳ抗体の効果を、腫瘍細胞注射後４５日間追跡した。これらの腫瘍保有マウスを、毎日３００μｇの抗ＰＳ抗体を腹腔内に用いて処置するか、またはコントロールとして毎日３００μｌの１０％　ＤＭＥＭを腹腔内に用いて処置した。腫瘍処置の種々のパラメーターは、コントロールに比べて処置群において著しく良好であった（表１３）。
【０９４１】
【表１９】

表１３
インビトロでのＬ５４０腫瘍に対する抗ＰＳ抗体の効果

他のパラメーター	コントロール	処置
退行した腫瘍の％[1]（処置後６０日）	０	４０％
退行した腫瘍の％[1]（処置後９０日）	０	２０％
二次腫瘍の平均値（μｌ）[2]	５３７±３０	３６６±５６

[1] 処置後示した時点で（６０日対９０日）、処置したマウスにおいては測定するには腫瘍が小さすぎる
[2] リンパ節における転移
さらなる研究では、９Ｄ２抗体を、Ｌ５４０腫瘍を有するマウスに１週あたり３回１００μｇの用量で腹腔内注射した。週に２回ノギスで腫瘍サイズを測定した。コントロール群に比較した抗腫瘍効果を図７に示す。カッコの数は、１群あたりのマウスの総数あたりの退行した腫瘍を有するマウスの数を示す。
【０９４２】
実施例ＸＩ

抗ＰＳ抗体３Ｇ４の抗腫瘍効果

本実施例は、同系および異種の腫瘍モデルにおいて抗ＰＳ抗体３Ｇ４を用いて、さらなる抗腫瘍効果を実証する。本研究で用いる３Ｇ４抗体は、ＰＳおよび他の陰イオン性リン脂質に結合するＩｇＧ抗体である（実施例ＩＶ）。

【０９４３】

Ａ．動物腫瘍研究についてのプロトコール

同系および異種の腫瘍モデルにおいて３Ｇ４の効果を検討した。動物腫瘍処置研究のための一般的プロトコールは以下のとおり行なう。特に相違を示さない限り、これは本出願の研究全体にわたって用いたプロトコールである。

【０９４４】

動物は、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手した。マウスは４～５週齢の雌性Ｃ．Ｂ－１７ ＳＣＩＤまたはＦｏｘ Ｃｈａｓｅ ＳＣＩＤマウスである。マウスをオートクレーブしたケージで、無菌の食物および水で、無菌的な取り扱いで飼育した。ラミナーフローのフードにおいて全ての手順を行なった。マウスを１週間馴化させて、次いで耳にタグを付けて、血液サンプル（約７５～１００μｌ）を尾静脈から採取して、ＥＬＩＳＡによって漏出をチエックする。漏出ＥＬＩＳＡ試験をできないマウスは試験手順には用いるべきではない。耳にタグ付けして血液サンプルを取り出した２～３日後に、乳房の脂肪パッド（ＭＦＰ）に、または右の脇腹に皮下的に、腫瘍細胞をマウスに同所性に注射する。

【０９４５】

同所性モデルでは、1×10^{7}個の細胞を含む０．１ｍｌのＤＭＥＭを麻酔されたマウスのＭＦＰに局所注射する。マウスを０．０７５ｍｌのマウスカクテル腹腔内注射によって麻酔する。このマウスカクテルは５ｍｌ ケタミン（１００ｍｇ／ｍｌ）；２．５ｍｌ キシラジン（２０ｍｇ／ｍｌ）；１ｍｌ アセプロマジン（１０ｍｇ／ｍｌ）；１１ｍｌ滅菌水である。投与量は、３０分間にわたりＩＰ経路を介して体重２０～３０グラムあたり０．１ｍｌである。

【０９４６】

つまさき／足のピンチに応答しないことを測定した場合、一旦マウスを麻酔すれば、マウスを左を下にして横にさせて、頭部のすぐ後ろおよび右前脚／背中領域周囲を７０％エタノールで拭く。２～３ｍｍの切開を右前脚のすぐ後ろ（胸部側方）で行い、これによって、皮膚弁を持ち上げた場合、白っぽい脂肪パッドが明らかになる。１ｍｌのシリンジおよび２７ゲージの針を用いて０．１ｍｌの細胞を脂肪パッドに注射して、この脂肪パッドに小疱を生成する。９ｍｍ滅菌創傷クリップを用いて切開を閉鎖する。マウスをそのケージに戻して、麻酔から覚醒して動くまで観察する。術後の健康状態を確認し、もし窮迫の何らかの兆候が観察されれば、その動物にアセトアミノフェン（０．２４ｍｇ／ｍｌ）＋コデイン（０．０２４ｍｇ／ｍｌ）を含む飲料水を与える。創傷クリップは１週後に除去する。この方法を用いて、細胞を選択された部位に正確において、皮下領域にはいれない。腫瘍は１４～１５日では約２００μｌの容積（Ｌ×Ｗ×Ｗ）であって、摂取率は本質的に１００％である。

【０９４７】

皮下モデルにおいては、マウスに代表的には、1×10^{7}個の細胞を含む０．２ｍｌを注射する。マウスを麻酔せず、ただしマウス皮膚の確実なグリップを用いて拘束して、右脇腹を曝す。２３ゲージの針を備える１ｍｌのシリンジを用いて、マウスの皮膚の直下に1×10^{7}個の細胞を含む２００μｌを注射して、小疱が示される。注射部位からの少量の液体漏出が観察されるのは珍しいことではない。この漏出を減らすために皮下注射から針を抜く場合にねじれ運動を用いてもよい。腫瘍容積はＬ×Ｗ×Ｈによって測定する。

【０９４８】

灌流プロトコールでは、マウスに１０００Ｕのヘパリンを含有する０．２ｍｌの生理食塩水を静脈内注射する。次いで、０．１ｍｌのマウスカクテルを用いたマウス腹腔内注射によってマウスを鎮静する。つまさき／足にピンチングされる場合に反射がないというこ

とで測定されるように一旦マウスが十分に鎮静されれば、胸腔を開口して心臓および肺を露出させる。チューブおよび灌流ポンプに接続した３０ゲージ針を左心室に挿入する。右心室を切りとって、これによって血液を滴下させ得る。１分あたり１ｍｌの速度で１２分間、生理食塩水をポンピングする。灌流の終わりに、この針およびチューブを抜き取る。免疫組織化学または病理にいずれかのさらなる研究のために組織を取り出す。

【０９４９】

Ｂ．腫瘍処置結果

同系モデルについては、Ｍｅｔｈ　Ａマウス線維肉腫腫瘍細胞を用いた。異種モデルの１つにおいて、ヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガン細胞を、乳腺脂肪パッドに播種した。別の異種モデルでは、細胞を注射することおよび腫瘍を処置の前に５００ｍｍ^{3}を超えるサイズまで増殖させることによって、大きいヒトホジキンリンパ腫Ｌ５４０異種移植片を樹立した。腫瘍保有マウス（１群あたり１０匹）に、コントロールに対して、１００μｇの３Ｇ４抗ＰＳ抗体（ＩｇＧ）を腹腔内注射した。処置は週に３回繰り返した。動物を腫瘍測定のために週に２回モニターした。

【０９５０】

同系および異種の腫瘍の両方の増殖は、３Ｇ４抗ＰＳ抗体での処置によって効率的に阻害された。最初の２０～３０日間の処置を図８Ａ、図８Ｂおよび図８Ｃに示す。この抗体は、腫瘍血管損傷、局所的血栓および腫瘍壊死を生じた。

【０９５１】

同系のＭｅｔｈ　Ａ腫瘍細胞の処理は特に首尾よく、そして乳腺脂肪パッドにおいて増殖しているヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガン細胞の処置も腫瘍退行を生じた（図８Ａおよび図８Ｂ）。壊死に耐性であることが公知の大きいＬ５４０腫瘍を保有するマウスでさえ、３Ｇ４抗体処置は、コントロールに比べて腫瘍増殖を阻害した。腫瘍増殖の遅延はコントロールマウスでは見いだされなかった。抗ＰＳ抗体で処置したマウスでは毒性は観察されなかった。

【０９５２】

腫瘍をまたＭＤ－ＭＢＡ－４３５細胞を用いて樹立して上記のように処置した。これらの腫瘍の増殖はまた、３Ｇ４抗体での処置によって効率的に阻害された。６０日間の大きいＬ５４０腫瘍、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１およびＭＤ－ＭＢＡ－４３５腫瘍細胞の処置を図８Ｄ、図８Ｅおよび図８Ｆに示す。この抗体は、腫瘍血管損傷、血栓および壊死および腫瘍増殖の遅延を生じ、毒性の証拠はなかった。

【０９５３】

ＭＤ－ＭＢＡ－４３５ルシフェラーゼ細胞は、Ｂａｒｃｅｌｏｎａ、ＳｐａｉｎのＡｎｇｅｌｓ　Ｓｉｅｒｒａ　Ｊｉｍｅｎｅｚ博士から入手して、１０％ＤＭＥＭ中で増殖させた。マウスに上記のような腫瘍細胞を注射して、注射の２週後にこの腫瘍を測定して容積を記録した。同様の平均容積（２００ｍｍ^3）の腫瘍でのマウスの処置を、コントロールに対して、実施例ＸＩＸに記載のように生成した、３Ｇ４抗体およびキメラ３Ｇ４抗体を用いて行った。１５日の腹腔内注射（８００μｇ）によって処置を開始して、３５日の４００μｇの最終注射まで２～３日ごとに２００μｇの注射を続けた。腫瘍容積およびマウス体重を注射の日に測定した。マウスを屠殺して、生理食塩水を１２分間灌流させた。器官および腫瘍を取り出して、液体窒素中で急速凍結させて、免疫組織化学的解析のために腫瘍を切片化した。

【０９５４】

この研究によって、コントロールに対して、３Ｇ４抗体およびキメラ３Ｇ４抗体の両方とも腫瘍増殖を効率的に遅延させたことが示された（図８Ｇ）。

【０９５５】

実施例ＸＩＩ

ＣＭＶに対する抗ＰＳ抗体の抗ウイルス効果

驚くべきことに、腫瘍脈管構造からウイルス感染へ分野を切り替えて、本発明者らは次に、アミノリン脂質および陰イオン性リン脂質に対する抗体がまた抗ウイルス効果を発揮

する可能性が高いと判断した。本実施例は実際に、サイトメガロ（ＣＭＶ）感染の処置において３Ｇ４抗体を最初に用いて、これが真実であることを示す。

【０９５６】

Ａ．方法

１．インビトロにおけるＣＭＶ感染細胞の処置

６ウェルプレート中のヒト二倍体包皮線維芽細胞（ＨＨＦ－Ｒ２）のコンフルエントな単層を、前に記載されたように、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するヒトＣＭＶＡＤ１６９を用いて、ＭＯＩ＝０．０１で感染させた（Ｂｒｅｓｎａｈａｎら、１９９６）。要するに、この細胞を、１ウェルあたり１ｍｌの総容積でウイルスとともに、３７℃で９０分間インキュベートした。感染の間、プレートを３０分ごとに穏やかにロッキングさせた。感染後、細胞上清を取り出してＤＭＥＭ／１０％　ＦＢＳ／ｐｅｎ－ｓｔｒｅｐ（１ウェルあたり２ｍｌ）を各々のウェルに添加した。

【０９５７】

３Ｇ４またはアイソタイプマッチングしたコントロール抗体ＧＶ３９Ｇの希釈物（１００μｇ／ｍｌおよび５０μｇ／ｍｌ）をウェルに添加した。感染した細胞を３７℃で、全部で１９日間インキュベートさせた。各々のウェルにおいて培地および抗体を３日ごとに交換した。１９日目に各々のウェル由来の細胞および上清を回収して、プラークアッセイを行なうまで－８０℃で凍結させた。

【０９５８】

２．蛍光顕微鏡

組み換えＣＭＶは、ＳＶ４０プロモーターの制御下でＧＦＰを発現する。従って、感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑になる。これらの研究では、抗体で処置したＣＭＶ感染細胞は、２日目、３日目および９日目に蛍光顕微鏡下で観察された。

【０９５９】

３．プラークアッセイ

標準的プロトコールと用いてプラークアッセイを行なった。要するに、凍結細胞細胞懸濁液を３７℃で急速に融解して、１０００ｒｐｍで１分間、遠心分離によって砕片を除去した。細胞上清の種々の希釈物を、６ウェルプレート中のＨＨＦ－Ｒ２細胞のサブコンルフエントな単層に加えて、その細胞を３７℃で９０分間インキュベートさせた（このプレートを３０分ごとに穏やかにロッキングさせた）。感染後に、細胞上清を取り出して、２ｍｌのＤＭＥＭ／１０％　ＦＢＳと交換した。４日目に、各々のウェルの上清を取り出して、細胞に０．０１％の低融点のアガロース／ＤＭＥＭ／１０％　ＦＢＳを重層した。このプレートを感染後、３７℃で、全部で１４日間インキュベートさせた。１４日目に、感染した単層を１０％緩衝化ホルマリンで固定して、メチレンブルーで染色して、プラークを可視化した。

【０９６０】

Ｂ．結果

１．３Ｇ４がＣＭＶのウイルス伝播を阻害する

３Ｇ４がＣＭＶ感染および複製に対して阻害性効果を有するか否かを検討するために、コンフルエントなヒト線維芽細胞を、低いｍ．ｏ．ｉでＣＭＶを添加する前に、３Ｇ４で前処置した。これらの研究において用いられるＣＭＶは、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現する。従って、感染された細胞は、蛍光顕微鏡下で観察された場合に緑になる。

【０９６１】

処置の３日目に、抗体の５０μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌの両方を用いて、未処置のウェルにおいて、および３Ｇ４またはアイソタイプマッチングコントロール抗体ＧＶ３９Ｇで処置したウェルにおいて、両方とも単一の感染細胞が存在する。従って、３Ｇ４を用いた線維芽細胞の処置は、細胞へのウイルスの侵入を有意に阻害しないようである。

【０９６２】

しかし、９日目には、３Ｇ４処置対コントロールＧＶ３９Ｇ処置ウェルにおける感染細胞の数に劇的な相違が存在する（図９Ａおよび図９Ｂ；上側の右のパネルを中央および下

部の右側のパネルと比較する）。ウイルスは、コントロールウェルにおいては単層の約８０％に感染しているが、ウイルスは、３Ｇ４処置ウェルにおいては最初の単一感染した細胞に限定される。従って、３Ｇ４は、もとの感染細胞から周囲の細胞へのＣＭＶの伝播を制限する。ウイルス伝播の阻害は、細胞が１００μｇ／ｍｌ（図９Ａ）および５０μｇ／ｍｌ（図９Ｂ）で処置された場合に観察される。

【０９６３】

２．ウイルス阻害は、抗体濃度依存性である

低ｍ．ｏ．ｉでの抗ウイルス効果に必要な３Ｇ４の濃度を決定するために、感染した細胞を、異なる濃度の３Ｇ４およびコントロール抗体ＧＶ３９Ｇで処置した。図１０に示されるように、３Ｇ４を１００μｇ／ｍｌおよび５０μｇ／ｍｌで用いて細胞間の伝播の完全な阻害が観察される。細胞を２５、１２．５および６．２５μｇ／ｍｌの３Ｇ４で処置した場合、ＧＦＰ陽性ＣＭＶ感染細胞の数が増大される。３Ｇ４は、これらのさらに低濃度の一次感染細胞からのウイルス伝播を完全には妨げないが、依然として意味のある抗ウイルス効果を有する。なぜなら、ＧＶ３９Ｇ処置したコントロールウェルに比較して３Ｇ４処置したウェルでは、みられるＧＦＰ陽性ＣＭＶ感染細胞はわずかであるからである（図１０）。

【０９６４】

３．低Ｍ．Ｏ．Ｉでのウイルスロードの定量

抗体処置後のウイルスロードを決定するプラークアッセイを行なうことによって３Ｇ４の抗ウイルス効果を定量した。このコントロールは、未処置の細胞、ＧＶ３９Ｇ抗体、およびＣ４４抗体を用いるさらなる抗体コントロール、コルヒチンに対するマウスＩｇＧ２ａアイソタイプ抗体を含んだ。

【０９６５】

１００μｇ／ｍｌの３Ｇ４で感染させた感染細胞の処置（ｍ．ｏ．ｉ＝０．０１ｐｆｕ／細胞）によって、コントロールＧＶ３９Ｇ処置細胞に比較して、ウイルス力価において劇的である６$\log_{10}$の低下が得られた（図１１Ａ）。この阻害は、ウイルス複製のほぼ９９．９９９９％阻害に変換する。５０μｇ／ｍｌの濃度での３Ｇ４を用いた処置によって、３Ｇ４での処置によって、ＧＶ３９Ｇ処置に比較してウイルス力価の３．５の$\log_{10}$の低下が生じる。３Ｇ４を２５μｇ／ｍｌおよび１２．５μｇ／ｍｌで用いたところ、結果はさらに劇的であって、６．２５μｇ／ｍｌでさえ阻害効果がやはり観察される（図１１Ａ）。

【０９６６】

４．高Ｍ．Ｏ．Ｉ．でのウイルスロードの定量

３という高ｍ．ｏ．ｉ．で感染された線維芽細胞の３Ｇ４処置によってまた、ウイルス力価の劇的な低下が生じる。１００μｇ／ｍｌでは、３Ｇ４での処置は、コントロールのＧＶ３９Ｇ処置細胞に比較してウイルス力価の５$\log_{10}$の低下が生じた（図１１Ｂ）。５０μｇ／ｍｌでは、３Ｇ４が、ＧＶ３９Ｇに比較して３ｌｏｇまでウイルス複製を阻害した（図１１Ｂ）。

【０９６７】

５．後期段階での複製の阻害

ＣＭＶ複製サイクルのどの段階が３Ｇ４によってブロックされるかを決定するために、タイミング的な添加研究を行なった。このために、感染後種々の時点で高ｍ．ｏ．ｉ．で感染した線維芽細胞に３Ｇ４を加えた。ウイルスロード（細胞および上清の両方において）を標準的なプラークアッセイを用いて定量した。

【０９６８】

感染後２４時間までの３Ｇ４の添加によって、ウイルス力価における$\log_{10}$の５～６の低下が生じた（図１１Ｃ）。しかし、３Ｇ４の添加が４８時間まで遅れた場合、３Ｇ４の阻害性効果は、$\log_{10}$で２まで低下して、添加が７２時間～９６時間まで遅れた場合、阻害性効果がさらに低下された。これによって、感染後２４～４８時間の間に生じるＣＭＶ複製の後期段階を３Ｇ４が妨害することが示される。従って、３Ｇ４は、感染も

ごく早期もしくは早期の遺伝子発現も有意に妨害しない。これは、例えば、後期遺伝子発現、ウイルスＤＮＡ合成、ウイルスパッケージングまたは出現に対してよりも、ウイルス複製周期の後期に作用する。

【０９６９】

実施例ＸＩＩＩ

ＲＳＶに対する抗ＰＳ抗体の抗ウイルス効果

実施例ＸＩＩに示されるＣＭＶに対する劇的な抗ウイルス効果に加えて、本実施例は、呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）複製の阻害における３つの異なる抗ＰＳ抗体の使用を実証する。

【０９７０】

Ａ．方法

１．インビトロにおけるＲＳＶ感染細胞の処置

Ａ５４９細胞を、３つのＣｏａｓｔｅｒ　１２ウェル組織培養プレートにおいて１００％コンフルエンスまで増殖させた。２００μＬの最小基本イーグル培地を全てのウェルに添加した。抗リン脂質抗体（Ａｂ）を各々のプレートの９つのウェルに添加（１００μＬに１００μｇ）して、３０分後に最初の９ウェルのうちの６つにおける細胞をＲＳＶ長型株を含む１００μＬの容積を１のＭＯＩで用いて感染させた。３つの残りのウェルを感染されていない、抗体処置ウェルのまま残した。抗体を有さない３つの他のウェルを、ＲＳＶを上記と同じＭＯＩで用いて感染させた。

【０９７１】

各々のプレートを用いて３つの異なる抗体：３Ｇ４、３ＳＢおよび１Ｂ９を試験した（実施例ＩＶ）。細胞を５％CO_2において４０℃で２時間インキュベートして、次いで６００μＬの培地を、各々のウェルに添加して１ｍＬにした。Ａ５４９細胞プレートをコントロールとして同じ条件で維持した。上清を感染後に４時間、２４時間および７２時間で収集した。各々の時点で、各々のプレートから４つのウェルをサンプリングした：１つのウェルにはＡｂ処理細胞のみがあり、２つのウェルにはＡｂ処理した／ＲＳＶ感染細胞があり、そして１つのウェルにはＲＳＶ感染細胞のみがあった。このサンプルをプラークアッセイまで－８０℃で凍結させた。

【０９７２】

２．プラークアッセイ

プラークアッセイを前に記載の通り行なった（Ｋｉｓｃｈら、１９６３；Ｇｒａｈａｍら、１９８８）。要するに、凍結細胞の細胞上清を３７℃で急速融解させた。未希釈の細胞上清から３段の１０倍希釈を行なった：10^{-1}、10^{-2}および10^{-3}。各々の希釈の１００μＬに加えて未希釈のサンプルを、全て３連の８０％コンフルエントＨｅｐ－２細胞株プレートに接種した。プレートを５％CO_2，４０℃インキュベーターに５日間入れた。５日目に、このプレートを発色させて、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色して、各々のウェルにおけるプラークを明らかにした。このプラークを、解剖顕微鏡を用いてカウントして、ｐｆｕ（プラーク形成単位）／ｍＬにおけるＲＳＶウイルスロードを算出した。

【０９７３】

Ｂ．結果

図１２に示されるとおり、３ＳＢまたは１Ｂ９のいずれかを用いるＲＳＶ感染細胞の処置によって、ウイルス複製の対数低下が生じた。感染した細胞を３Ｇ４で処置した場合、抗ウイルス効果が、さらに証明された。３Ｇ４を用いた処置によって、ウイルス力価において$2\log_{10}$の低下が得られた（図１２）。阻害は、ＣＭＶで見られるよりも低く、これは３Ｇ４の濃度が低かった（２５～５０μｇ／ｍｌ）ためである可能性が最も高い。

【０９７４】

実施例ＸＩＶ

短鎖抗ＰＳ抗体

抗腫瘍因子単独として、腫瘍に対して結合した治療因子を送達するための標的化因子と

して、および抗ウイルス剤としての使用を含む、本明細書に記載される抗ＰＳ抗体の多くの使用を考慮すれば、本実施例は、短鎖（ｓｃＦｖ）抗ＰＳ抗体を生成するのに適切な技術を記載しており、すなわち、ここではＶ$_{H}$ドメインおよびＶ$_{L}$ドメインがペプチドリンカーによって一般に結合される短鎖ポリペプチド鎖に存在する。

【０９７５】

Ａ．ファージ抗体ライブラリーの調製

細菌ライブラリーの二次ストック（約１×１０^{10}クローン）を１００μｇ／ｍｌアンピシリンおよび１％グルコースを含む１００ｍｌ　２×ＴＹに接種した。これをＯＤが６００ｎｍで０．５になるまで、３７℃で振盪しながら増殖させた。

【０９７６】

Ｍ１３ＫＯ７ヘルパーファージを１０^{13}ｐｆｕで添加して、３７℃の水浴中で振盪せずに３０分間インキュベートさせた。感染した細胞を３，５００ｇで１０分間遠心分離した。このペレットを１００μｇ／ｍｌ　アンピリシンおよび７５μｇ／ｍｌ　カナマイシンを含む２００ｍｌの２×ＴＹに再懸濁して、振盪しながら３０℃で一晩インキュベートさせた。

【０９７７】

培養物を１０，８００ｇで１０分間遠心分離した。１／５容積のＰＥＧ／ＮａＣｌをこの上清に加え、十分に混合させて、４℃に１時間おいた。次いで、１０，８００ｇで３０分間遠心分離した。このペレットを４０ｍｌのＰＢＳに再懸濁して８ｍｌ　ＰＥＧ／ＮａＣｌを添加した。これを混合して４℃に２０分間おいた。次いで、これを１０，８００ｇで１０分間遠心分離して、上清を吸引した。このペレットを２ｍｌの１０％ヒト血清に再懸濁して、微小遠心分離機で１１，６００ｇで１０分間遠心分離して、残りの細菌の破片のほとんどを除去した。

【０９７８】

プレパン（ｐｒｅ－ｐａｎ）するために、１０％ヒト血清におけるファージ抗体ライブラリーをＰＣコーティングディッシュに添加して、室温で６０分間インキュベートした。

【０９７９】

Ｂ．ビオチン化リポソーム上の選択

２０μｍｏｌのホスファチジルイノシトールおよび２０μｍｏｌのビオチン化ホスファチジルセリンを１０ｍｌのヘキサンに溶解した。この溶液を、回転エバポレーターを用いてフラスコの表面上に薄層に乾燥させた。２ｍｌ　ＰＢＳを添加して、槽を４℃で３０分間超音波処理した。

【０９８０】

次いで、１００μｌのファージｓｃＦｖおよび１００μｌ　ビオチン化リポソームを１０％のヒト血清の存在下で混合して、室温で１時間穏やかに回転させた。室温で３０分間６００μｌ　２．５％カゼイン／０．５％　ＢＳＡを添加することによって１００μｌ　ストレプトアビジンＭ－２８０ダイナビーズを用いてブロッキングを行なった。４～５分間、ＭＰＣ－Ｅ（Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒ　ｆｒｏｍ　Ｄｙｎａｌ）を用いてブロッキング緩衝液からビーズを分離した。

【０９８１】

１００μｌのＰＢＳにビーズを再懸濁した。１００μｌのブロックされたストレプトアビジンダイナビーズ（Ｄｙｎａｂｅａｄｓ）をビオチン化抗原に結合したファージに添加して、室温で１５分間穏やかに回転させた。ＭＰＣ－Ｅを用いて５分間分離を達成して、上清を流し出した。これを１ｍｌ　ＰＢＳを用いて５分間洗浄した。各々の洗浄のために、ビーズを再懸濁してＭＰＣ－Ｅを用いて沈下させた。

【０９８２】

最終的に、ファージを３００μｌ　１００ｍＭ　トリエーテルアミンに３０分間再懸濁することによってビーズから溶出させた。１５０μｌ　１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ＝７．４を中和のために添加した。ＭＰＣ－Ｅを用いてビーズを再度分離した。

【０９８３】

１５０μｌのファージ上清を用いて、対数期の１０ｍｌ　ＴＧ１細菌に感染させた。１０ｍｌの培養物を２０μｇ／ｍｌ　アンピシリンの存在下で３７℃で１時間振盪させた。アンピシリンを最終濃度５０μｇ／ｍｌまで添加して、さらに１時間振盪させた。10^{13}ｐｆｕ　Ｍ１３ヘルパーファージをこの培養物に添加して、１００μｇ／ｍｌ　アンピシリンを含む１００ｍｌ　２ＴＹ培地に移して、３７℃で１時間振盪させた。カナマイシンを最終濃度１００μｇ／ｍｌまで添加して、３０℃で一晩振盪させた。

【０９８４】

ファージ調製手順を繰り返して、選択手順をさらに３～４回繰り返した。

【０９８５】

Ｃ．モノクローナル単鎖抗体ＥＬＩＳＡ

プレートからの個々のＨＢ２１５１コロニー（４回の選択後）を、９６ウェルプレート中に１００μｇ／ｍｌのアンピシリンおよび１％グルコースを含有する５００μｌ　２×ＴＹ中に接種して、３７℃で一晩振盪しながら（３００ｒｍ．）増殖させた。このプレートからの５μｌを、１ウェルあたり１００μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有する５００μｌ　２×ＴＹを含有する第二の９６ウェルプレートに移して、振盪しながら３７℃で３時間増殖させた（ＯＤ６００＝０．９）。

【０９８６】

１００μｇ／ｍｌアンピシリン、１０ｍＭ　ＩＰＴＧ（最終濃度は１ｍＭ）を含有する５０μｌ　２×ＴＹを各々のウェルに添加して、これを振盪しながら３０℃で一晩増殖させた。これを１，８００ｇで１０分間遠心分離して、以下のＥＬＩＳＡにおいて１００μｌの上清を用いた。

【０９８７】

１０μｇ／ｍｌの濃度で、エタノールに溶解したＰＳを用いて、９６ウェルプレート（ＤＹＮＥＸ　ＩＭＭＵＬＯＮ（登録商標）１Ｂ）をコーティングした（Ｐ６６４１　１０ｍｇ／ｍｌ溶媒は、クロロホルム：ＭｅＯＨ　９５：５であった）。１０μｇ／ｍｌのＰＣを同じ方法でコーティングした。これらのプレートを冷室で４℃でエバポレートした。２５０μｌ　２．５％カゼインを各々のウェルに添加して、そのプレートをカバーして、３７℃で１時間ブロックした。

【０９８８】

ＰＢＳを用いてウェルを３回リンスして、可溶性のｓｃＦｖを含有する１００μｌ／ウェル　１０％ヒト血清および１００μｌ／ウェルの上清を添加して、３７℃で６０分間インキュベートした。溶液を廃棄して、ＰＢＳを用いて６回洗浄した。１００μｌ　９Ｅ１０を含有する５％カゼイン／０．５％　ＢＳＡ－ＰＢＳ（１：５０００希釈）を各々のウェルに添加して、３７℃で１時間インキュベートしてＰＢＳを用いて６回洗浄した。１００μｌ　ＨＲＰヤギ抗マウス抗体（１：１００００希釈）を各々のウェルに添加して、３７℃で１時間インキュベートして、ＰＢＳを用いて５回洗浄した。１００μｌ　０．０５％ＯＰＤを各々のウェルに添加して、５分間発色させた。１００μｌ　０．１８Ｍ　H_2SO_4を添加して反応を停止させてＯ．Ｄ．４９０で読み取った。

【０９８９】

抗原陽性クローンを２×ＴＹＡＧプレート上にストリークして、３０℃で一晩増殖させた。陽性の単一のコロニーを３ｍｌ　２×ＴＹＡＧ培地中に拾い上げて、３７℃で１２時間増殖させた。プラスミドを抽出して、ｓｃＦｖ遺伝子挿入物を酵素消化およびＰＣＲによってチェックした。正確なサイズの挿入物を有するものを配列決定した。

【０９９０】

正確なサイズの挿入物を有するコロニーを１００ｍｌ　２×ＴＹＡＧ培地中で増殖させて、３７℃　ＯＤ　６００＝０．５で振盪させた。これらを９００ｍｌ　２×ＴＹＡに移して、ＯＤ６００＝０．９まで増殖させた。１Ｍ　ＩＰＴＧを最終濃度１ｍＭに添加して３０℃で一晩振盪させた。前と同じＥＬＩＳＡ方法を用いて上清をチェックした。Ni^{++}アガロースアフィニティークロマトグラフィーを用いて周辺質画分からｓｃＦｖタンパク質を精製した。

【０９９１】
Ｄ．結果
４回のパンニング後、以下のクローンはＰＳプレート上の見込みのあるＥＬＩＳＡシグナルを生じて、正確なサイズの挿入物を有する：３Ｅ５、３Ａ２、Ｇ５、Ｃ８、Ｅ４および４Ｄ５。これらをサブクローニングさせたが、ここではＥ４は、５つの陽性のサブクローンを有して、４Ｄ５は、５つの陽性のサブクローンを有した（表１４）。
【０９９２】
（表１４：ＰＳプレート上のＥＬＩＳＡ）
【０９９３】
【表２０】

0.099	0.107	0.118	0.115	0.100	0.094	0.084	0.086	0.166	0.164	0.102	**0.191**
0.113	0.106	0.127	**0.150**	0.128	0.097	0.078	0.087	**0.190**	0.144	0.102	0.154
0.122	0.115	0.117	0.112	0.105	0.097	0.085	0.088	**0.230**	0.071	0.168	0.150
0.107	0.108	0.121	0.123	0.107	0.101	0.083	0.085	0.191	**0.246**	**0.186**	0.150
0.138	0.121	0.114	0.131	0.100	0.096	0.082	0.079	0.183	0.187	**0.275**	**0.171**
0.118	0.115	0.116	0.132	0.099	0.094	0.082	0.086	0.185	0.073	**0.208**	0.102
0.111	**0.176**	0.126	0.118	0.096	0.087	0.123	0.087	0.144	**0.226**	0.112	0.126
0.102	0.107	0.131	0.125	0.089	0.102	0.082	0.084	**0.188**	0.073	**0.142**	0.151
3E5		3A2		G5		C8		E4		4D5	

一旦陽性クローンが同定されれば、それらのクローンを配列決定した。ＳｃＦｖ核酸およびクローン３Ａ２のタンパク質の配列を、それぞれ配列番号５および配列番号６に示す。陽性クローンを大規模に増殖させて、Ｎｉｃｋｅｌアガロースアフィニティークロマトグラフィーを用いてｓｃＦｖを精製させた。Ｐｈａｓｔゲル電気泳動を用いて、精製されたｓｃＦｖを得た。
【０９９４】
実施例ＸＶ
ＰＥ結合ペプチド誘導体の合成
本実施例は、腫瘍およびウイルス疾患を処置するのにおける使用のための例示的なＰＥ結合ペプチド誘導体および結合体の設計および合成に関する。例示的なデュラマイシン誘導体の構造は、図１３Ａ～図１３Ｏのパネルに示されており、これは以下の説明に合致する。
【０９９５】
Ａ．ＤＬＢ
０．３８７ｍｌの０．１Ｍ　$NaHCO_3$を含有する水に溶解された０．５ｍｇ（０．２５μｍｏｌ）のデュラマイシンを０．１１３ｍｇ（０．２５μｍｏｌ）のＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｓｉｇｍａ）に添加した。この反応混合物を室温で１時間、次いで４℃で一晩インキュベートさせた。サンプルをシリカカラムにロードして、０．１％トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）を用いて洗浄して、０．１％ＴＦＡおよび７０％CH_3CNを用いて溶出させた。この溶出物を収集して、遠心分離によって濃縮した。総収量は０．５ｍｇであった（図１３Ａ）。
【０９９６】
Ｂ．ＤＩＢ
０．２８６ｍｌの０．１Ｍ　$NaHCO_3$を含有する水に溶解された０．５ｍｇ（０．２５μｍｏｌ）のデュラマイシンを０．０３４ｍｇ（０．２５μｍｏｌ）の２－イミノチオラン塩酸塩（２－ＩＴ）に添加した。この混合物を室温で１時間インキュベートさせた。０．１３ｍｇ（０．２６μｍｏｌ）のヨードアセチル－ＬＣ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）を添加して、その反応物を室温で１時間、そして４℃で一晩インキュベートさせた。サンプルをシリカカラムにロードして、０．１％　ＴＦＡを用いて洗浄して、０．１％ＴＦＡおよび７０％CH_3CNを用いて溶出させた。この溶出物を収集して、遠心分離によって濃縮した。総収量は０．５ｍｇであった（図１３Ｂ）。

【０９９７】
Ｃ．（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ
０．５ｍｌの０．１Ｍ　ＮａＨＣＯ$_3$を含有する水に１．９ｍｇ（０．９４μｍｏｌ）のデュラマイシンを溶解した。ここに、０．４ｍｇ（０．８８μｍｏｌ）のＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｓｉｇｍａ）を含有する２００μｌジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）を添加した。この混合物を室温で４時間インキュベートさせた。１０ｍｇ（０．１７μｍｏｌ）ニュートラビジン（ＮＡ）を含有する１ｍｌをこの反応混合物に添加して、これを室温で２時間、次いで４℃で一晩インキュベートさせた。次いでこの反応混合物を、ＰＢＳ緩衝液を含むＧ－２５カラム（容積５０ｍｌ）上にロードさせた。この画分を収集して、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ（ｐｈａｓｔゲル）によって解析した。タンパク質含有画分（７～１６）を一緒にプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌して、２８０ｎｍでの吸光度を測定することによって濃度を決定した。総収量は５．１ｍｇであった。
【０９９８】
次いで、サンプルをＦＰＬＣによって分画した。以下に相当する３つのピークを収集した：ピーク１：［（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ］$_3$（画分１７～２３）；ピーク２：［（ＤＬＢ）$_4$］$_2$（画分２４　３３）およびピーク３：（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ（画分３５～４８）。全てのサンプルを０．２２μｍのフィルターを通した濾過によって滅菌した。得られた最終収量は以下であった：０．３４ｍｇの［（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ］$_3$；０．５９ｍｇの［（ＤＬＢ）$_4$］$_2$および１．４１ｍｇの（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ（図１３Ｃ）。
【０９９９】
Ｄ．（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ－Ｆ
０．６１ｍｇの（ＤＬＢ）$_4$ＮＡを含有するＰＢＳ緩衝液を、０．００５ｍｇＮ－ヒドロキシスクシンイミジルフルオレセイン（ＮＨＳ－フルオレセイン）（Ｓｉｇｍａ）を含有するＤＭＦに添加した。この混合物を室温で１時間インキュベートした。次いで、この反応物をＰＤ１０カラム（１０ｍｌ）に分画した。（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ－Ｆを、タンパク質含有画分（３および４）に溶出させて、これを一緒にプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌した。総収量は０．５ｍｇであった（図１３Ｄ）。
【１０００】
Ｅ．（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ
ヒトＩｇＧ（ＨＩｇＧ）を最初に以下のとおり精製した：１．３ｍｌ　ＨＩｇＧ（これは、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ９を有するホウ酸緩衝液に１００ｍｇ／ｍｌ　ＨＩｇＧ、２２．５ｍｇ／ｍｌグリシンおよび３ｍｇ／ｍｌアルブミンを含んだ）を、ＦＰＬＣ（Ｓ２００、２５０ｍｌ）カラムに加えた。この画分を収集して、ｐｈａｓｔゲル上でＳＤＳ　ＰＡＧＥによって解析した。単量体のＩｇＧを含む画分（２１～３２）を一緒にプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌した。２８０ｎｍでの吸光度によって決定される総収量は１１１ｍｇであった。
【１００１】
精製したＨＩｇＧ（５５ｍｇを１３ｍｌのホウ酸緩衝液、ｐＨ９に含む）を、０．５ｍｌの、ＳＭＣＣ（Ｐｉｅｒｃｅ）を含むＤＭＦに１．００３ｍｇに添加した。この混合物を室温で１時間インキュベートした。同時に、６ｍｇのデュラマイシンを含む別の反応混合物（３μｍｏｌ；０．５ｍｌ　０．１Ｍ　ＮａＨＣＯ$_3$に溶解される）および０．４１３ｍｇ　２－ＩＴ（３μｍｏｌ；０．１Ｍ　ＮａＣＯ$_3$に含まれる）を室温で１時間インキュベートさせた。反応の終了後、２つの反応混合物を合わせて、室温で２時間、そして４℃で一晩インキュベートさせた。この反応産物を、ｐｈａｓｔゲル上のＳＤＳ　ＰＡＧＥによって解析した。この反応産物を、ホウ酸緩衝液、ｐＨ９を含むＦＰＬＣカラムにロードした。三量体（５～１４）、二量体（１５～２４）、および単量体（２５～３７）に相当するＦＰＬＣ画分をプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌した。単量体の総収量は５４．６ｍｇであった。５～７つのデュラマイシン基をＨｉｇＧの各々の分子に結合させた（図１３Ｅ）。
【１００２】

Ｆ．（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ－Ｆ
１ｍｇ（０．７ｍｌ）の（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧを、５μｌの、ＮＨＳ－フルオレセインを含有するＤＭＦに添加した。反応混合物を室温で１時間インキュベートして、ＰＤ－１０カラムで脱塩した。タンパク質含有画分（２～３）をプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌した。総収量は０．９ｍｇであった（図１３Ｆ）。
【１００３】
Ｇ．（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ－Ｂおよび［（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ］$_2$－Ｂ
［（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ］$_2$のビオチン化誘導体を合成するために、０．６６ｍｇ（１ｍｌ）の［（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ］$_2$を８μｌの、１ｍｇ／ｍｌのＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）を含有するＤＭＦに添加した。この混合物を室温で１時間インキュベートした。次いで、この反応混合物をＰＤ－１０カラムで脱塩した。タンパク質含有画分（３および４）をプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌した。最終の収量は０．４６ｍｇであった。
【１００４】
単量体（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧのビオチン化を同じ様式で行なった。要するに、１．０６ｍｇ（０．７５ｍｌ）の（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧを、１２μｌの１ｍｇ／ｍｌ　ＮＨＳ－ＬＣ－ビオチンを含有するＤＭＦに添加した。室温での１時間のインキュベーション後、反応産物をＰＤ－１０カラムで脱塩した。タンパク質含有画分（３および４）をプールして、０．２２μｍフィルターを通した濾過によって滅菌した。最終の収量は０．６２ｍｇであった（図１３Ｇ）。
【１００５】
Ｈ．（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ
２ｍｇ（０．９９μモル）のデュラマイシンを、０．５ｍｌ　０．１Ｍ　ＮａＨＣＯ$_3$に溶解して、０．１３６ｍｇ（０．９９μｍｏｌ）の２－ＩＴに添加した。この反応混合物を室温で１時間インキュベートした。その後に、０．４８３ｍｇ（０．９５μｍｏｌ）のヨードアセチル－ＬＣ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）を添加してその反応混合物を室温で１時間インキュベートした。１０ｍｇ（０．１７μｍｏｌ）のニュートラビジンを含む１ｍｌのＨ$_2$Ｏを添加して、４℃で一晩インキュベートした。反応混合物をＦＰＬＣによって分画した。３つの異なるピークを収集してプールした：［（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ］$_3$（画分１７～２３）；［（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ］$_2$（画分２４～３３）および（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ（画分３５～４８）。全てのサンプルを０．２２μｍのフィルターを通した濾過によって滅菌した。得られた最終収量は以下であった：０．８７ｍｇの［（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ］$_3$；１．２５ｍｇの［（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ］$_2$；および１．８３ｍｇの（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ（図１３Ｈ）。
【１００６】
Ｉ．（ＤＩＢ）$_4$ＮＡ－Ｂ
０．０２３ｍｇ（０．３μｍｏｌ）の（ＤＩＢ）$_4$ＮＡを、０．９μｇのＮＨＳ－ＬＣ－ビオチン（Ｐｉｅｒｃｅ）に添加した。この反応物を室温で１時間インキュベートして、次いでＰＤ１０カラムで脱塩した。総収量は０．０４ｍｇであった（図１３Ｉ）。
【１００７】
Ｊ．ＤＳ－１
０．５ｍｌ　０．１Ｍ　ＮａＨＣＯ$_3$を含有する水に溶解した５ｍｇ（２．５μｍｏｌ）のデュラマイシンを、０．３１９ｍｇ（２．６μｍｏｌ）の１，３プロパンスルトンに添加した。この混合物を４℃で一晩インキュベートした。このサンプルをシリカカラムにロードして、０．１％ＴＦＡで洗浄して、０．１％　ＴＦＡおよび７０％　ＣＨ$_3$ＣＮを用いて溶出させた。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は５ｍｇであった（図１３Ｊ）。
【１００８】
Ｋ．ＤＳ－２
０．３ｍｌ　０．１Ｍ　ＮａＨＣＯ$_3$を含有する水に溶解した１ｍｇ（０．４９７μｍ

ｏｌ）のデュラマイシンを、０．０７２ｍｇ（０．５２３μｍｏｌ）の２－ＩＴに添加した。この反応混合物を室温で１時間インキュベートした。０．１２５ｍｇ（０．４９μｍｏｌ）のＳＢＦ－塩化物（Ｐｉｅｒｃｅ）を添加した。この反応混合物を室温で１時間および４℃で一晩インキュベートした。このペプチドをシリカカラムで精製した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は１ｍｇであった（図１３Ｋ）。

【１００９】

Ｌ．ＤＳ－３

０．４ｍｌ　０．１Ｍ　$NaHCO_3$を含有する水に溶解した１ｍｇ（０．４９７μｍｏｌ）のデュラマイシンを、０．１０９ｍｇ（０．５９２μｍｏｌ）の２－スルホ安息香酸環状無水物に添加した。この反応物を室温で１時間、４℃で一晩インキュベートした。このペプチドをシリカカラム上で精製した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は１ｍｇであった（図１３Ｌ）。

【１０１０】

Ｍ．ＤＳ－４

０．５ｍｌの、０．１Ｍ　$NaHCO_3$を含有する水に溶解した０．２５ｍｇ（０．１２４μｍｏｌ）のデュラマイシンを、０．０１７ｍｇ（０．１２４μｍｏｌ）の２－ＩＴに添加した。この反応混合物を室温で１時間インキュベートした。次いで、この混合物を０．０４９ｍｇ（０．１２４μｍｏｌ）のＥｌｌｍａｎ試薬に添加した。この混合物を室温で２時間および４℃で一晩インキュベートした。２５０μｌの１ｍｇ／ｍｌの４－アミノ－５－ヒドロキシ－２，７－ナフタレンジスルホン酸一ナトリウム塩水和物を１００μｌの１ｍｇ／ｍｌ　２－ＩＴに添加した。この反応物を室温で１時間インキュベートした。５０μｌの反応混合物を前の反応物に添加して、室温で１時間インキュベートした。このペプチドをシリカカラムで精製した。溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した（図１３Ｍ）。

【１０１１】

Ｎ．ＤＳ－５

０．５ｍｌ　０．１Ｍ　$NaHCO_3$を含有する水に溶解した５ｍｇ（２．５μｍｏｌ）のデュラマイシンを、０．３５６ｍｇ（２．６μｍｏｌ）の１，３－ブタンスルトンに添加した。この混合物を４℃で一晩インキュベートした。このサンプルをシリカカラムにロードして、０．１％ＴＦＡで洗浄して、０．１％　ＴＦＡおよび７０％　CH_3CNで溶出した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した。総収量は５ｍｇであった（図１３Ｎ）。

【１０１２】

Ｏ．ＤＣ－１

０．５ｍｌ　０．１Ｍ　$NaHCO_3$を含有する水に溶解した０．２５ｍｇ（０．１２４μｍｏｌ）のデュラマイシンを、０．０１７ｍｇ（０．１２４μｍｏｌ）の２－ＩＴに添加した。この反応混合物を室温で１時間インキュベートした。次いで、この混合物を０．０４９ｍｇ（０．１２４μｍｏｌ）のＥｌｌｍａｎ試薬に添加した。この混合物を室温で２時間および４℃で一晩インキュベートした。このペプチドをシリカカラムで精製した。この溶出物を収集して、減圧下での遠心分離によって濃縮した（図１３Ｏ）。

【１０１３】

実施例ＸＶＩ

デュラマイシン誘導体はＰＥに特異的に結合する

本実施例は、実施例ＸＶにおいて合成されたデュラマイシン誘導体がＰＳに特異的であり、従って細胞不浸透性の標的化または抗ウイルス剤に対して連結すること、ならびに腫瘍およびウイルス疾患の処置における使用によって設計されたとおり用いることができることが示される。

【１０１４】

デュラマイシン誘導体の特異性、詳細には他のリン脂質よりもＰＥに対する結合を試験

するために、一連の競合ＥＬＩＳＡを行なった。ＰＥに対する結合についてＤＩＢまたはＤＬＢのいずれかと競合するデュラマイシン誘導体の能力を以下の方法で試験した。

【１０１５】

ＰＥおよびＰＣをエタノール中で別々に溶解した。最終濃度は５μｇ／ｍｌであった。９６ウェルＥＬＩＳＡプレート（ＤＹＮＥＸ　ＩＭＭＵＬＯＮ（登録商標）１Ｂ）の各々のウェルに１００μｌを添加した。これらのプレートを冷室において４℃でエバポレートした。２５０μｌ　２．５％カゼインを各々のウェルに添加して、カバーして３７℃で１時間ブロックした。ブロッキング緩衝液を破棄して、１００μｌ　２．５％カゼインを各ウェルに添加した。（ＤＩＭ）ｎＨＩｇＧ、（ＤＩＢ）４ＮＡ、（ＤＬＢ）４ＮＡ、ＤＳ、デュラマイシンおよびＤＩＢのようなプレートを横切る連続希釈としてデュラマイシン化合物を添加した。

【１０１６】

（ＤＩＭ）ｎＨＩｇＧの出発濃度は、１．４ｍｇ／ｍｌであって、（ＤＩＢ）４ＮＡ出発濃度は８００μｇ／ｍｌであって、（ＤＬＢ）４ＮＡ出発濃度は８００μｇ／ｍｌであった。これらを３７℃で１時間インキュベートして、ＰＢＳを用いて５回洗浄した。１００μｌ　ＨＲＰ－ストレプトアビジン（１：５０００希釈）を各々のウェルに添加して、３７℃で１時間インキュベートして、ＰＢＳを用いて５回洗浄した。１００μｌの０．０５％　ＯＰＤを各々のウェルに添加して、５分間発色させた。１００μｌ　０．１８Ｍ　Ｈ２ＳＯ４を添加して、反応を停止させて、Ｏ．Ｄ．４９０で読み取った。

【１０１７】

得られたデータを作表して、次いでグラフにプロットした。図１４Ｃおよび図１４Ｄにおけるデータによって例示されるように、デュラマイシン誘導体の濃度の増大につれて、４９０ｎｍでの吸光度は低下して、このことはデュラマイシン誘導体が、ホスファチジルエタノールアミンに対する結合について、ＤＩＢおよびＤＬＢと競合することを示す。

【１０１８】

デュラマイシン構築物のリン脂質結合プロフィールを、さらなるＥＬＩＳＡを用いて確認した。各々の試験脂質ＰＳ、ＰＥ、ＰＩ、ＣＬ、ＰＣ、ＰＧ、ＳＭおよびコレステロールをエタノール中に別々に溶解して、これを用いてＥＬＩＳＡプレートをコーティングした。デュラマイシン化合物を、このプレートを横切って連続希釈として添加した。インキュベーションおよび洗浄工程の後に、上記のように、二次検出試薬を各々のウェルに添加して、比色アッセイを用いて反応性を決定した。

【１０１９】

デュラマイシンビオチン誘導体、ＤＩＢおよびＤＬＢについて代表的なリン脂質結合プロフィールを図１４Ａに示した。ＤＩＢおよびＤＬＢは、ＰＥについて特異的であり、ここではＰＳ、ＰＩ、ＣＬ、ＰＣ、ＰＧおよびＳＭの各々についての結合は無視できるかまたは検出不能であることが示されている。（ＤＩＭ）$_{n}$ＨＩｇＧ－Ｂおよび［（ＤＩＭ）$_{n}$ＨＩｇＧ］$_{2}$－Ｂは本質的にＤＬＢと同じ結合プロフィールを有した。ＰＳに対する最小結合は、高濃度のＤＩＢで観察されたが（図１４Ａ）、これは、この研究の状況では意味がない。なぜならＰＳに対する結合は、ＰＥ結合について飽和しているかまたは最大半減のＤＩＢ濃度では検出不能であったからである。従って、このデュラマイシン構築物はホスファチジルエタノールアミンに特異的に結合する。

【１０２０】

血清はデュラマイシン誘導体によるＰＥ結合に対して有意な効果を有さないことも示された。これは血清（ＢＳＡ）の有無におけるＰＥコーティングＥＬＩＳＡプレートに対するデュラマイシンビオチン誘導体であるＤＬＢの結合によって例示されており、ここでは結合プロフィールは有意な相違を示さない（図１４Ｂ）。

【１０２１】

実施例ＸＶＩＩ

ＰＥ結合ペプチド誘導体の抗ウイルス効果

実施例ＸＩＩおよび実施例ＸＩＩＩに示されるとおり、抗ＰＳ抗体によって媒介される

抗ウイルス効果に加えて、本実施例は、他の共通のアミノリン脂質ＰＥに特異的に結合するペプチド誘導体の抗ウイルス効果を実証する。

【１０２２】

Ａ．方法

１．インビトロにおけるＣＭＶ感染細胞の処置

６ウェルプレートにおけるヒト二倍体包皮線維芽細胞（ＨＨＦ－Ｒ２）のコンフルエント単層を、実施例ＸＩＩに記載されるように、ＭＯＩ＝０．０１で、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）を発現するヒトＣＭＶ　ＡＤ１６９を用いて感染させた（Ｂｒｅｓｎａｈａｎら、１９９６）。この細胞を１ウェルあたりの１．５ｍｌの総容積でウイルスとともに３７℃で９０分間インキュベートした。感染の間、３０分ごとにこのプレートを穏やかにロッキングさせた。感染の後に、細胞上清取り出して、ＤＭＥＭ／１０％　ＦＢＳ／ｐｅｎ－ｓｔｒｅｐ（１ウェルあたり２ｍｌ）を各々のウェルに添加した。

【１０２３】

デュラマイシン誘導体（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ、（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ、ＤＳ－１、ＤＳ－２、ＤＳ－３およびＤＣ－１の種々の希釈物を、ウイルスの添加前にそのウェルに添加してその後に感染させた。感染した細胞を３７℃で全部で１４日間インキュベートさせた。各々のウェルにおいて培地およびデュラマイシン誘導体を３日ごとに置き換えた。

【１０２４】

２．蛍光顕微鏡

実施例ＸＩＩに記載のとおり、組み換えＣＭＶは、ＳＶ４０プロモーターの制御下でＧＦＰを発現する。従って、感染した細胞は、蛍光顕微鏡下で緑にみえる。これらの研究では、デュラマイシン誘導体で処置したＣＭＶ感染した細胞は、４日および６日に蛍光顕微鏡下で観察された。

【１０２５】

Ｂ．結果

４日目に、未処理のウェルならびに（ＤＬＢ）$_4$ＮＡおよび（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧで処理したウェルに単一の感染したＧＦＰ陽性緑色細胞がある（図１５、左パネル）。従って、これらのデュラマイシン誘導体でのＨＨＦ－Ｒ２細胞の処置は、細胞へのウイルスの侵入を阻害しないようである。デュラマイシン誘導体ＤＳ－１、ＤＳ－２およびＤＳ－３が細胞へのウイルス進入を阻害するといういくつかの前段階的な証拠がある。

【１０２６】

（ＤＬＢ）$_4$ＮＡおよび（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧでの処置の６日後、未処置ウェル対デュラマイシン誘導体処置ウェルにおける感染したＧＦＰ陽性細胞の数は著しく異なる（図１５、中央のパネル）。６日目までに、ウイルスは、未処理のウェルにおいて周囲の細胞に４日目にみられる単一の感染した細胞から伝播した（図１５、上部、左パネルと中央パネルを比較する）。しかし、（ＤＬＢ）$_4$ＮＡおよび（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧで処理したウェルにおいては６日目において、ウイルスは、もとの１つだけ感染した細胞に限定される（図１５、中央および底部、左パネルと中央パネルを比較する）。

【１０２７】

従って、（ＤＬＢ）$_4$ＮＡおよび（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧは、ＣＭＶの伝播を、もとの感染した細胞から周囲の細胞に制限する。細胞を種々の濃度の（ＤＬＢ）$_4$ＮＡ（１００μｇ／ｍｌおよび５０μｇ／ｍｌ）および（ＤＩＭ）$_n$ＨＩｇＧ（２００μｇ／ｍｌおよび１００μｇ／ｍｌ）で処理した場合の、ウイルス伝播の阻害を観察する。

【１０２８】

実施例ＸＶＩＩＩ

３Ｇ４抗体の利点

実施例ＩＶに記載のように、本発明者らの固有のプロトコールによって開発された３Ｇ４抗体は、文献の抗ＰＳ抗体を上回る多くの利点を有するが、これには卓越した抗ＰＳ抗体である３ＳＢが挙げられる（Ｒｏｔｅら、（１９９３）。本実施例は、これらの特有の利点を記載する。

【１０２９】
Ａ．クラスおよび特異性
３Ｇ４はＩｇＧ抗体であり、一方３ＳＢはＩｇＭである。ＩｇＧクラスの抗体は、高い親和性、インビボにおける低いクリアランス速度、ならびに精製、改変および取り扱いの容易さを含む、ＩｇＭを超える多くの利点を有する。ＩｇＭ抗体である３ＳＢのＰＳ結合の、３Ｇ４および別のＩｇＧ抗体との比較を図１９Ａおよび図１９Ｂに示す。
【１０３０】
３Ｇ４は、ほぼ同じ強度を有する陰イオン性リン脂質であるＰＳ、ＰＡ、ＰＩ、ＰＧおよびＣＬと強力に反応して、アミノリン脂質ＰＥに対しては弱い強度で結合する。これは、ＰＣおよびＳＭとの反応性は有さず、そして結合特異性プロフィール：ＰＳ＝ＰＡ＝ＰＩ＝ＰＧ＞ＣＬ＞＞ＰＥを有する（実施例ＩＶ；表４）。３Ｇ４は、ヘパリンにも、硫酸ヘパランにも、または二本鎖もしくは一本鎖のＤＮＡにも、ウエスタンブロットでｂＥｎｄ．３細胞から抽出された細胞タンパク質にも検出可能には結合しない。３Ｇ４の結合は、５ｍＭ　ＥＤＴＡの存在によって影響されず、このことはCa^{2+}が陰イオン性リン脂質に対する３Ｇ４結合に必要ないことを示す。３Ｇ４は、リン脂質でコーティングされたＥＬＩＳＡプレートに結合せず、そのため０．２％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む生理食塩水で洗浄されて、これによってこの結合が吸収されたリン脂質に対してであったことが確認された。
【１０３１】
３Ｇ４によって認識されるエピトープは、陰イオン性リン脂質のホスホグリセロールコア内に存在すると考えられ、これは全ての哺乳動物種由来のリン脂質において同じである。従って、この抗体は、マウスおよびヒトのリン脂質の両方と反応し、これは前臨床開発および臨床開発について重要である。３Ｇ４は、天然のリガンドであるアネキシンＶよりも陰イオン性リン脂質に対してさらに特異的である。３Ｇ４とは異なり、アネキシンＶはまた、生理学的な濃度のCa^{2+}で、中性のリン脂質に強力に結合する。
【１０３２】
陰イオン性リン脂質についての３Ｇ４の特異性は、異なるリン脂質から形成されたリポソームを用いて、免疫されたＰＳに対する３Ｇ４結合と競合するアッセイによって確認された。５ｍｇの単一のリン脂質を含むクロロホルムの溶液からリポソームを調製した。この溶液を窒素下で乾燥させて、丸底ガラスフラスコにおいて薄層を形成させた。次いで、１０ｍｌのＴｒｉｓ緩衝液（０．１Ｍ、ｐＨ７．４）を添加して、このフラスコを２分間５回超音波処理した。３Ｇ４抗体（０．１μｇ／ｍｌ）を、緩衝液かまたは種々のリン脂質リポソームのいずれかに添加して、室温で３０分間プレインキュベートさせた。この混合物をＰＳコーティングプレートに添加して（標準的ブロッキング後）、１時間インキュベートして、洗浄し、二次抗体を添加した。１時間後、このプレートを洗浄して、ＯＰＤを用いて５分間発色させた。
【１０３３】
実施例ＩＶに示されるとおり、３Ｇ４は、固定されて、固定されたＰＥに対してより少ない程度まで結合するが、固定されたＰＣに対しては結合しないとき、ＰＳ、ＰＡ、ＰＩ、ＰＧおよびＣＬに結合する。種々のリポソームの有無において、３Ｇ４が固定されたＰＳに結合する能力を図２０に示す。これらのリポソーム競合研究からの結果によって、ＥＬＩＳＡプレートに対して吸着されたＰＳに対する３Ｇ４の結合は、ＰＳ、ＰＡ、ＰＩ、ＰＧおよびＣＬから調製されたリポソームによってブロックされたが、ＰＥおよびＰＣから調製されたリポソームは、３Ｇ４結合において検出可能な低下を生じなかったことが示される（図２０）。また、ＳＭリポソームは、阻害性ではなかった。
【１０３４】
Ｂ．細胞増殖の阻害
３Ｇ４は、ＰＳおよび他の陰イオン性リン脂質を外面化する、活性化された、分裂中の、傷害されたアポトーシスおよび悪性の細胞に結合する。３Ｇ４抗体は、インビトロにおいて内皮細胞の増殖を阻害して、静止期細胞と対照的に、分裂している内皮細胞の顕著な

選択性阻害を示す。

【１０３５】

インビトロにおけるｂＥｎｄ．３細胞の増殖に対する、抗ＰＳ抗体３Ｇ４、９Ｄ２、３Ｂ１０、１Ｂ９、２Ｇ７、７Ｃ５および３ＳＢの効果を決定した。ｂＥｎｄ．３細胞（１０，０００／ウェル）を４８ウェルプレートに播種して、結合させた。２０％　ＤＭＥＭ単独（コントロール）または抗体を含む２０％　ＤＭＥＭ（１ウェルあたりの２０μｇ～４０μｇ総ＩｇＧ）を、播種後４時間添加した。各々のクローンを２つの別のプレートにおいて三連で試験した。細胞を４８時間後および９６時間後に脱離させた。細胞カウントを各々のウェルにおいて決定した。１処置あたりの平均細胞数を算出した。

【１０３６】

３Ｇ４および９Ｄ２抗体が、特に有効であって、続いて、３ＳＢおよび３Ｂ１０であって、１Ｂ９、２Ｇ７および７Ｃ５は阻害性効果が少ない。各々の抗体が、静止期の（コンフルエントな）細胞とは対照的に、分裂している（サブコンフルエントな）内皮細胞の選択性阻害を示す。競合的研究において、３Ｇ４が最大の阻害効果を示し、続いて９Ｄ２であって、その各々が３ＳＢよりも阻害性であった（図１６）。

【１０３７】

Ｃ．抗腫瘍効果

３Ｇ４は、インビボにおいて腫瘍血管内皮細胞の表面に結合する。種々の腫瘍を保有するマウスに静脈内注射した場合、３Ｇ４は腫瘍に特異的かつ一貫して局在するが、正常な器官には局在しない。染色は腫瘍血管内皮（図２２）、壊死領域および個々の悪性細胞で観察された。腫瘍には、腫瘍内皮および腫瘍細胞の両方の同時の標的を可能にする、３Ｇ４についてのマルチ結合部位が存在する。

【１０３８】

３Ｇ４は、インビボにおいて血管形成および腫瘍増殖を抑制し、そして腫瘍保有マウスにおいて検出可能な器官毒性を示さない。最初の研究では、抗体が腫瘍血管損傷を生じ、血管分布および腫瘍壊死を低下させる、同系および異種の腫瘍モデルにおいて３Ｇ４は、印象的な抗腫瘍効果を示している（実施例ＸＩ）。樹立された腫瘍の退行は、処置された動物のうち３０％～５０％で観察されている。

【１０３９】

３Ｇ４抗体の代表的な血管新生抑制および血管標的化効果を、それぞれ図１７Ａおよび図１７Ｂに示す。３Ｇ４で処置したＭＤＡ－ＭＢ－２３１正所性腫瘍を保有するヌードマウスからの腫瘍切片の解析によって、全ての処置腫瘍において血管新生抑制効果が明らかになった。図１７Ａは、コントロール抗体とは対照的に、３Ｇ４で処置したマウスからの腫瘍の代表的画像を示す。このコントロールの腫瘍は、壊死の兆候を示さず、そして腫瘍血管上で検出された汎内皮細胞マーカーＣＤ３１によって実証されるように、高度に血管新生されている（図１７Ａ、左パネル）。対照的に、３Ｇ４で処置したマウスからの腫瘍は、８０～９０％の壊死およびＣＤ３１陽性構造のほぼ完全な消失を示し、これによってこの処置は実質的な血管新生抑制効果を生じたことが示される（図１７Ａ、右パネル）。

【１０４０】

３Ｇ４の抗ガン活性の別の成分は、腫瘍血管損傷の誘導である。これは、同じコントロール研究に由来するＨ＆Ｅ染色腫瘍の代表的な画像を提供する、図１７Ｂに例示される。コントロール腫瘍における血管は十分に灌流され、形態学的にインタクトであり、そして生存可能な分裂している腫瘍細胞によって囲まれる（図１７Ｂ、左パネル）。対照的に、３Ｇ４処置された動物における血管は、分解している内皮細胞層を有することが頻繁に観察され、脱落した内皮細胞によって、そしておそらくは裸出された血管に誘引される宿主細胞によってブロックされる（図１７Ｂ、右パネル）。３Ｇ４処置された腫瘍における代表的な血管によって、周囲の腫瘍細胞の前壊死性層によって示されたとおり、機能の損失が明確に示される（図１７Ｂ、右パネル）。

【１０４１】

まとめると、３Ｇ４を用いる正所性のＭＤＡ－ＭＢ－２３１腫瘍の処置後の組織学的検

査によって以下が示される：１）腫瘍における約５０％の血管における血管内皮の分解；２）腫瘍内皮細胞への白血球の結合および腫瘍間質への単核細胞の浸潤；３）血小板凝集および赤血球による腫瘍血管の閉塞；４）３Ｇ４処置マウス対未処置マウス由来の腫瘍における微小血管密度の７０％低下；および５）ＶＴＡに代表的な、腫瘍細胞の末梢辺縁の生存を伴う、腫瘍の中央壊死。従って、３Ｇ４抗体の一次抗腫瘍作用は、腫瘍脈管構造に対する効果を通じて発揮される。他の機構、詳細には腫瘍細胞自体に対する抗体依存性の細胞傷害性が、抗腫瘍効果に寄与する可能性が高い。これは重要であって、末梢の辺縁における腫瘍細胞を含む、さらに多くの腫瘍細胞の殺傷を可能にし得る。

【１０４２】

フォローアップ研究において、腫瘍増殖に対する３Ｇ４の効果は、同系（マウスＭｅｔｈ　Ａ線維肉腫）、皮下異種腫瘍（Ｌ５４０ヒトホジキンリンパ腫）および正所性腫瘍（ヒトＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳ガンおよびヒトＭＤＡ－ＭＢ－４３５乳ガン）を含む他のマウスモデルにおいて試験されている。３Ｇ４抗体を有するマウスの処置によって、それぞれ、これらの腫瘍の９０％、６５％および５０％および７０％の増殖遅延が生じた。小さい腫瘍（０．１ｃｍ直径）および十分樹立された腫瘍（０．３ｃｍ直径、２００ｍｍ^3）の両方とも同様に阻害された。抗ＰＳ処置は、Ｍｅｔｈ　Ａ保有マウスの５０％およびＭＢＡ－ＭＤ－２３１腫瘍を有するマウスの３０％において長期の完全な緩和を誘導した。３Ｇ４は、免疫応答性のマウスにおいて最高の阻害性効果を有する。ヒト胸部腫瘍がマウスの乳腺脂肪パッドにおいて増殖されるヒト胸部腫瘍（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１およびＭＤＡ－ＭＢ－４３５）の正所性モデルは重要である。なぜなら、これらは、ヒトの胸部内で増殖するヒト胸部腫瘍の実際的かつ現実的なモデルであるからである。

【１０４３】

Ｄ．安全性プロフィール

３Ｇ４抗体は、文献で記載される抗リン脂質抗体とは異なる。代表的には、抗リン脂質抗体は、凝固カスケードを妨害する病原性抗体とみなされる。それらは、インビトロにおいて凝固反応を阻害してインビボで血栓を生じる。対照的に３Ｇ４、９Ｄ２および同様の抗体は、病原性効果のない治療抗体である。

【１０４４】

１．凝固

血清の非存在下と同じく血清の存在下で強力にＰＳコーティングプレートに結合する抗体を同定するためのスクリーニングを用いて、好ましくは所望の抗体が選択されるべきであるという本発明者らの認識から、３Ｇ４、９Ｄ２および同様の抗体の基部の重要な局面が得られる。この新規な展開によってＰＳタンパク質および血清タンパク質の複合体を認識する抗体を同定して排除する能力が得られる。なぜならこのような複合体は、抗リン脂質症候群および関連の病態の原因であるかまたはその重要な要因であると考えられるからである。

【１０４５】

インビトロにおける血液凝固の研究において、組織因子（Ｔｉｓｓｕｅ　Ｆａｃｔｏｒ）（ＴＦ）－誘導性凝固の弱い阻害が、高用量の３Ｇ４抗体を用いて観察された。それより低い用量を用いる他の研究では、３Ｇ４処置マウス由来のカルシウム再添加血清は、組織因子の存在下においてＢＢＧ３処置マウス由来のカルシウム再添加血漿と同じ速度で凝固した。またインビトロにおける細胞プラス組織因子への１００μｇ／ｍｌの３Ｇ４の添加は、プロプレックス（ｐｒｏｐｌｅｘ）における凝固因子Ｘａの生成速度に影響しなかった（外因系凝固経路）。

【１０４６】

インビトロにおける高い抗体レベルを用いるＴＦ誘導性凝固の弱い阻害にかかわらず、３Ｇ４抗体はインビボで試験されており、正常マウスでも腫瘍保有マウスでも血栓の合併症を生じない（例えば、実施例ＸＩを参照のこと）。３Ｇ４抗体はまた、インビボにおいてサルで試験されており、有意な副作用は観察されていない。

【１０４７】

２．低い毒性または毒性のないことの他の指標
３Ｇ４はマウスにおいて毒性を有さないか毒性が低いという最初の証拠は、３Ｇ４が毒性の証拠なしにマウスにおいてハイブリドーマとして増殖するという知見によってもたらされる。また、１ｍｇの精製された３Ｇ４が腹腔内に注射された場合、毒性は観察されなかった。
【１０４８】
系統的なインビボ研究がここで行なわれており、ここでは３匹の８週齢のＢＡＬＢ／ｃマウスの群に１００μｇの精製した３Ｇ４または同位体マッチしたコントロールＩｇＧ$_3$（ＢＢＧ３）を２～３週間の間に週に３回、腹腔内注射した。毒性の生理学的兆候は観察されておらず、そして器官毒性も形態学的異常の組織病理学的兆候も、３Ｇ４処置されたマウスから取り出された主な器官の切片で検出されていない。以下のパラメーターを特に試験した。
【１０４９】
体重に関して、３Ｇ４処置したマウスはＢＢＧ３処置マウスと同じ速度で体重増加した。初期の研究において体重の低下は観察されなかった。毒性の身体的兆候、例えば、脱毛、食欲の低下などは観察されなかった。赤血球、血小板、白血球、絶対リンパ球カウントまたは絶対好中球カウントを含む血球カウントでは変化はない。骨髄細胞質を解析するために、３Ｇ４またはＢＢＧ３処置マウス（６注射、１００μｇ）由来の骨髄のパラフィン切片を、総細胞質および細胞組成について試験した。処置動物における骨髄は本質的に完全に細胞性であった（若齢の哺乳動物について予想されるとおり）。赤血球、顆粒球、リンパ球性前駆体および巨核球が正常な数で存在した。
【１０５０】
まとめると、高用量の３Ｇ４（０．１ｍｇ）を用いて２～３週間の間、週に３回処置した２００匹を超えるマウスで、毒性の事例は観察されていない。２ｍｇより多い程度の用量が与えられた場合でさえ、毒性の兆候は示されなかった。マウスは正常な肉体的兆候、骨髄細胞質、白血球カウント、組織学および凝固機能を保持している。
【１０５１】
３Ｇ４抗体はまた安全性研究においてサルに投与されており、副作用は観察されていない。
【１０５２】
血液クリアランス動態の研究はまたマウスで行なわれた。３Ｇ４を、Ｂｏｌｔｏｎ　Ｈｕｎｔｅｒ試薬を用いて放射ヨウ素標識して、マウスに静脈内注射した（２５ｇ）。血液のサンプルを、種々の時点後に尾静脈を介して取り出した。３Ｇ４の血液クリアランスは、マウスのマウスＩｇＧに代表的であった。クリアランスのα相の半減期は３時間であって、β相の半減期は５日であった。分布の容積は正常であった（１００ｍｌ／ｋｇ）。これらの研究によって３Ｇ４は、正常な宿主組織とは反応せず、加速されたクリアランスをもたらすことが示される。
【１０５３】
Ｅ．抗ウイルス効果
３Ｇ４抗体はまた、有意な抗ウイルス効果を発揮する。実施例ＸＩＩＩに示されるとおり、３Ｇ４を用いたＲＳＶ感染細胞の処置は、３ＳＢを用いて観察される効果よりも優れていた。従って、これらの結果によって、文献における目立った抗ＰＳ抗体である３ＳＢを上回る３Ｇ４抗体の別の利点が強調される（Ｒｏｔｅら（１９９３））。
【１０５４】
３Ｇ４抗体はまた、インビトロ（実施例ＸＩＩ）においてＣＭＶを阻害するのに、そしてインビボにおいて（実施例ＸＸＩ）ｍＣＭＶに感染されたマウスの生存を増強するのにおいて極めて有効であることが示される。それに加えて、３Ｇ４抗体は、ラッサ熱の感染因子であるＰｉｃｈｉｎｄｅウイルス感染を阻害することがさらに示される（実施例ＸＸＩＶ）。ウイルス感染後に示される本明細書の細胞表面ＰＳ露出、および３Ｇ４抗体がワクシニアウイルスに感染した細胞に結合する能力（実施例ＸＸＩＩＩ）によって、３Ｇ４

抗体が、広いスペクトルの抗ウイルス剤として大きい能力を有することが示される。

【１０５５】

実施例ＸＩＸ

３Ｇ４抗体、ＣＤＲ配列およびキメラ

従って３Ｇ４抗体は、血管新生阻害、抗腫瘍血管、および抗ウイルス剤の合わせた特性を保有する。細胞分裂、血管新生、腫瘍増殖およびウイルス性感染に対する３Ｇ４の阻害活性は、明白な毒性の欠失とともに考慮すれば、血管新生障害、ガン、糖尿病およびウイルス性感染の処置を含む、この抗体についての広範な治療指標を示す。

【１０５６】

３Ｇ４抗体と実質的に同じエピトープを認識する抗体は、例えば、免疫により、血管新生阻害、抗腫瘍血管および抗ウイルス治療の１つ以上における使用のために生成され得、そして抗体競合研究によって確認され得る。３Ｇ４抗体と実質的に同じエピトープに結合する抗体はまた、本明細書に提供される３Ｇ４抗体の配列の知識から生成され得る。本実施例によって３Ｇ４抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）の配列およびその配列情報の用途が得られる。

【１０５７】

Ａ．３Ｇ４抗体配列

抗体の可変領域のもとの配列を、３Ｇ４抗体を生成するハイブリドーマからＲＡＣＥによって得て、そしてその配列を確証した。３Ｇ４抗体ＣＤＲ１－３の重鎖（Ｖｈ）の可変領域の核酸およびアミノ酸の配列は、それぞれ配列番号１および配列番号２によって提示される。

【１０５８】

配列番号１および配列番号２は、図１８Ａに示されるようにマウスのリーダー配列および定常鎖配列の一部を含む。リーダー配列は、配列番号２のアミノ酸１～１９によって提示され、そして成熟タンパク質は図１８Ａにおける矢印によって示されるように始まる。十分な相補性決定領域の配列情報は、ＶＳＳを含む配列部分までの成熟タンパク質の配列によって含まれ、その後のアミノ酸は抗原結合には必須ではない。従って、核酸配列におけるＢｓｔＥＩＩ部位は、機能的なマウス可変領域を調製するため、例えば、ヒト定常領域上への接合における使用のための便利な部位として用いられ得る（図１８Ａ）。

【１０５９】

実際には、３Ｇ４－２ＢＶＨ配列は、Ｌｏｎｚａ　ｐＥＥベクターを用いてＢｓｔＩＩ部位のヒトγ１定常領域上に接合されている。得られた産物はマウスリーダー配列を含み、そのＶＨは、図１８Ａにおいて示される様式でヒトＣＨ１配列に結合され、ここでＡＳＴＬＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号７）は、ヒトＣＨ１配列の第一の部分に相当する。

【１０６０】

３Ｇ４抗体ＣＤＲ１－３の軽鎖（Ｖκ）の可変領域の核酸およびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号３および配列番号４によって示される。配列番号３および配列番号４はここでも、配列番号１８Ｂに示されるとおりマウスリーダー配列および定常鎖配列の一部を含む。このリーダー配列は、配列番号４のアミノ酸１～２２であり、その成熟タンパク質は、図１８Ｂにおける矢印によって示されるとおり始まる。ＴＶＦを含む配列部分までの成熟タンパク質の配列によって、十分な相補性決定領域の配列情報が含まれ、その後ろのアミノ酸は、抗原結合に必須ではない。従って、核酸配列におけるＢｂｓＩ部位は、機能的なマウス可変領域を調製するため、例えば、ヒト定常領域上への接合における使用のための便利な部位として用いられ得る（図１８Ｂ）。

【１０６１】

実際には、３Ｇ４－２ＢＶＬ配列は、Ｌｏｎｚａ　ｐＥＥベクターを用いてＢｓｔＥＩ部位のヒトκ定常領域上に接合されている。得られた産物はマウスリーダー配列を含み、そのＶＬは、図１８Ｂにおいて示される様式でヒトＣＬ１配列内に結合され、ここでＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳ（配列番号８）は、ヒトκ定常領域配列の第一の部分に相当

する。
【１０６２】
Ｂ．３Ｇ４キメラ抗体の生成および特徴づけ
マウス相補性決定領域およびヒト定常領域を含むキメラ構築物（ｃｈ３Ｇ４）を生成して、もとのマウス抗体と本質的に同じように挙動することが示された。
【１０６３】
マウス３Ｇ４抗体を、ヒトマウスキメラ抗体（Ａｖａｎｉｒ（Ｘｅｎｅｒｅｘ）Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）に変換した。マウス$Ｖ_{H}$をクローニングして、Ｌｏｎｚａ２ＢＶＨベクターの$ＢｓｔＥＩＩ$部位のヒト$γ_{1}$定常領域に接合した。マウス$Ｖ_{K}$をクローニングして、Ｌｏｎｚａ２ＢＶＬベクターのＢｂｓＩ部位のヒトＫ定常領域に接合した。この配列を確証した。全体的構築物をＣＨＯ細胞において発現させて、精製した。
【１０６４】
得られたｃｈ３Ｇ４は、リン脂質コーティングＥＬＩＳＡプレートに対してマウス３Ｇ４が結合するのと少なくとも同じように結合する。リン脂質のパネルに対するキメラ３Ｇ４のインビトロ結合プロフィールを図２１に示しており、ここでＰＳ、ＰＡ、ＣＬ、ＰＩおよびＰＧに対する結合は、同様に示される。この結合は抗原特異的である。なぜなら無関係の特異性のコントロール抗体とは結合が観察されなかったからである。特定の研究では、キメラ３Ｇ４対３Ｇ４抗体の見かけ上最大の結合が観察された；これは、二次抗体の優れた結合に起因し得る。
【１０６５】
インビボでは、ｃｈ３Ｇ４は、腫瘍血管内皮細胞に局在して、抗腫瘍効果を発揮する。マウスにおいて増殖しているＭＤＡ－ＭＢ－４３５ヒト乳ガン細胞におけるｃｈ３Ｇ４の抗腫瘍効果は、実施例ＸＩに記載されて、図８Ｇに示される。キメラ抗体を用いるＭＤＡ－ＭＢ－４３５腫瘍を有するマウスの処置は、コントロールとは対照的に腫瘍増殖を効率的に遅延させた。
【１０６６】
ｃｈ３Ｇ４の局在化を、マウスで増殖するＭＤＡ－ＭＢ－４３５ヒト乳ガン細胞において試験した。マウスにビオチン化ｃｈ３Ｇ４または無関係の特異性のコントロールＩｇＧを静脈内注射した。１時間後、マウスを放血させて、その腫瘍を取り出して凍結切片を切り出した。ビオチン化試薬を最初にストレプトアビジンＣｙ３結合体とインキュベートして、ＰＢＳ中で洗浄し、次いでＭＥＣＡ抗体とともに、続いてＦＩＴＣタグ化二次抗体とともにインキュベートした。それぞれＣｙ３の蛍光（赤）およびＦＩＴＣの蛍光（緑）について適切なフィルターでとった単一の画像を、デジタルカメラで撮ってコンピューターに移した。黄色（融合した緑および赤の蛍光の生成物）を示す集束型（ｃｏｎｖｅｒｇｅｄ）画像を、Ｍｅｔａｖｉｅｗソフトウェアの補助によって重ね合わせた。
【１０６７】
この二重染色方法において、ビオチン化タンパク質および血管内皮を赤および緑で標識する。ビオチン化タンパク質を内皮に結合する場合、この集束型画像は黄色にみえる。図２２に示されるとおり、ビオチン化ｃｈ３Ｇ４は、腫瘍血管内皮細胞に結合する。なぜなら染色パターンはＭＥＣＡ３２のパターンに収斂するからである。
【１０６８】
実施例ＸＸ
ドセタキセルとの併用療法における３Ｇ４抗体
本実施例は、３Ｇ４抗体および化学療薬ドセタキセルを用いる腫瘍処置のための併用療法に関する。これらの薬剤は、腫瘍脈管構造内皮細胞および腫瘍細胞区画を攻撃するように設計されて、毒性の低い相乗的な処置をもたらす。この結果によって、この併用療法は、処置効率を実際に有意に増強したことが示された。
【１０６９】
Ａ．Ｆｃドメイン媒介性抗腫瘍効果

インビトロでの腫瘍細胞に対する阻害効果について３Ｇ４抗体を試験した。腫瘍細胞に対する直接の阻害効果は観察されなかった。従って、３Ｇ４抗体の抗腫瘍効果は、Ｆｃドメイン媒介性の免疫エフェクター機能の増強、例えば、抗体媒介性食作用、ＡＤＣＣ、ＣＤＣおよびサイトカイン産生の刺激、またはこれらの機構の組み合わせの増強を含む可能性が高い。

【１０７０】

マクロファージによるＰＳ陽性細胞の食作用に対する３Ｇ４の効果を評価した。蛍光腫瘍細胞をH_2O_2で処置してＰＳ露出を誘導した。次いで、処置細胞および未処置の細胞を収集して３Ｇ４抗体またはコントロールの抗体（ＢＢＧ）と接触させた。次いで、マウス骨髄マクロファージを添加して、このマクロファージが蛍光腫瘍細胞を食菌する能力を、蛍光顕微鏡を用いて解析した。

【１０７１】

３Ｇ４は、マクロファージによるＰＳ陽性細胞の食作用を３倍を超えて増大し得ることが確認されている（図２３）。この知見によって、３Ｇ４抗体のＦｃドメインが抗体の抗腫瘍効果に寄与するという本発明者らの推論が支持される。すなわち、Ｆｃドメインは、宿主免疫エフェクター機能を活性化し、次いでこれが抗腫瘍効果を発揮する。従って３Ｇ４抗体は、ＮＫ細胞の溶解活性を増強してさらに有効なＡＤＣＣをもたらす。

【１０７２】

Ｂ．ドセタキセルは、内皮細胞上のＰＳ露出を誘導する。

【１０７３】

ドセタキセルの皮下濃度による内皮細胞上でのＰＳ露出の誘導をＦＡＣＳ解析によってインビトロで試験した。ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）およびヒト微小血管内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）を１０ｎＭのドセタキセルで２４時間処置して、ＦＡＣＳによって試験した。処置されたＨＵＶＥＣおよびＨＭＶＥＣの両方とも、未処置細胞に比べて３Ｇ４結合における有意な増大を示した（それぞれ、図２４Ａおよび図２４Ｂ）。４８時間および７２時間のドセタキセルインキュベーションをまた行なった。

【１０７４】

Ｃ．ドセタキセルは、腫瘍細胞上のＰＳ露出を誘導する。

【１０７５】

臨床未満の濃度のドセタキセルによるＰＳ露出のインビトロ誘導をまた、腫瘍細胞株のパネルを用いるＦＡＣＳ解析によって試験した。マウスルイス肺ガン腫３ＬＬ、マウス結腸ガンＣｏｌｏ２６およびヒト乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－４３５細胞を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処置して、ＦＡＣＳで試験した。試験した全ての腫瘍細胞株は、未処置の細胞と比較して３Ｇ４結合の有意な増大を示した（それぞれ、図２５Ａ、図２５Ｂおよび図２５Ｃ）。４８時間および７２時間のドセタキセルインキュベーションをまた行なった。マウス黒色腫Ｂ１６およびマウス線維肉腫Ｍｅｔｈ　Ａ腫瘍細胞株をさらに試験して、また未処置の細胞と比較して３Ｇ４結合における有意な増大が示された。

【１０７６】

ヒト乳ガンＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞を１０ｎＭのドセタキセルを用いて２４時間処置して、キメラ３Ｇ４抗体（ｃｈ３Ｇ４）またはコントロールのヒトＩｇＧのいずれかともにインキュベートしてＦＡＣＳによって解析した。これらの結果によって、抗体結合における有意な増大が抗原特異的であることおよびキメラ抗体が親の３Ｇ４抗体のように挙動することが示される（図２６）。

【１０７７】

Ｄ．３Ｇ４およびドセタキセルを用いた相乗的な腫瘍処置

従って、本発明者らは、臨床濃度未満のドセタキセルを用いた内皮細胞および腫瘍細胞の処置が３Ｇ４結合を有意に増大することを示した。それらによってまた、３Ｇ４抗体が、表面上にＰＳが露出されている腫瘍細胞のマクロファージ媒介性食作用を促進することが示された。従って、ドセタキセルによって媒介される３Ｇ４結合の増大は腫瘍細胞の食作用および３Ｇ４抗体のＦｃドメインによって媒介される他の抗腫瘍効果、例えば、ＮＫ

細胞の溶解活性を増強して、さらに有効なＡＤＣＣをもたらす。他の研究によってまた、ドセタキセルを用いた乳ガン患者の処置は血清のＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＩＬ－６およびＧＭ－ＣＳＦサイトカインのレベルの増大、ならびにＮＫおよびＬＡＫ細胞の活性の増強をもたらすことが示されている（Ｔｓａｖａｒｉｓら、２００２）。

【１０７８】

従って、ドセタキセルとの３Ｇ４の組み合わせ治療の抗腫瘍効果を、ヒトＭＤＡ－ＭＢ－４３５乳ガンを保有するＳＣＩＤマウスにおける正所性モデルにおいて試験した。正所性ＭＤＡ－ＭＢ－４３５ヒト乳ガンを保有するマウスを、腹腔内に３Ｇ４のみ（１００μｇ／１用量）、ドセタキセルのみ（１０ｍｇ／ｋｇ）または３Ｇ４をドセタキセルと組み合わせて（それぞれ１００μｇ／１用量および１０ｍｇ／ｋｇ）用いて、３週間、週に３回投与して処置した。処置は腫瘍細胞移植後６日で開始した。

【１０７９】

これらの研究によって、３Ｇ４に加えたドセタキセルの併用療法は９０％の増殖阻害を生じたことが示された。３Ｇ４に加えたドセタキセルの増殖阻害は３Ｇ４単独（ｐ＜０．００５）およびドセタキセル単独（ｐ＜０．０１）よりも有意に優れていた。

【１０８０】

（Ｅ．樹状細胞上のＦｃγＲに対するアポトーシス腫瘍細胞の３Ｇ４標的化）

３Ｇ４に加えてドセタキセルで処置したマウス由来の腫瘍はまた、コントロールの腫瘍に比較して異常な量のリンパ球を含んだ。この現象は腫瘍細胞を崩壊させることによる免疫細胞の代表的な化学誘引に相当しているが、これはまた、免疫エフェクター細胞上のＦｃγＲに対するＦｃ結合を通じて媒介された３Ｇ４による免疫系の活性化を反映し得る。

【１０８１】

腫瘍内免疫細胞浸潤に対する３Ｇ４およびドセタキセル投与の効果を特徴付けるために、これらの浸潤に存在する細胞のタイプを、マクロファージ、抗中球、顆粒球、ＮＫ細胞および活性化リンパ球の特異的マーカーに対する抗体を用いる、腫瘍組織の凍結切片および／またはパラフィン切片の免疫染色によって同定することができる（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）。この浸潤物の程度、表現型および活性化状態を等級付けしてもよい。ＩＬ－２およびＩＮＦを含む免疫細胞に浸潤することによるサイトカイン産生はまた、免疫組織化学的技術を介して解析され得る。血清サイトカインレベルは、ＥＬＩＳＡによって評価され得、そして細胞内染色を用いて、サイトカイン産生を担う特定の細胞区画を同定することができる。従って、腫瘍細胞の増殖およびアポトーシスに対する、浸潤する免疫細胞の効果は、体系的に評価することができる。

【１０８２】

前述のデータに照らして、本発明者らは、さらに樹状細胞上のＦｃγレセプター（Ｆｃ（γ）Ｒ）に対するアポトーシス腫瘍細胞の３Ｇ４媒介性標的化によって乳ガンの免疫療法の力価を増強する方法を企図する。有効な細胞性および体液性の免疫応答を誘導する効率的な抗原提示は、腫瘍ワクチンおよび免疫療法の発達に重要である。樹状細胞（ＤＣ）は、腫瘍関連抗原に対して細胞傷害性Ｔリンパ球をプライムする最も強力な抗原提示細胞（ＡＰＣ）である。樹状細胞（ＤＣ）による腫瘍抗原提示の改善は、さらに強力な腫瘍ワクチンの開発をもたらすはずである。

【１０８３】

ＤＣのＦｃ（γ）Ｒレセプター媒介性の内面化による抗原提示は、液体相の抗原飲作用と比較して１，０００倍まで増強され得る。アポトーシス腫瘍細胞（ＡＴＣ）は、樹状細胞ロードのための抗原の優れた供給源である。なぜなら複数の腫瘍特異的抗原（公知および未知の両方）が、ナイーブなＴ細胞に対して効率的に提示され得、特定のエピトープのロックに起因する可能性が低い免疫系回避改変体の出現が生じるからである。動物研究では、ＡＴＣでパルスされたＤＣは、インビトロおよびインビボで強力な抗腫瘍免疫を生じることが示されている。しかし、最近のデータでは、ＡＴＣ単独では、抗腫瘍免疫を活性化するためにいくらか効率が悪いことが実証されており、これはおそらくその効率の悪い取り込みおよびＤＣ成熟を誘導する能力の欠如による。

【１０８４】
最近の研究ではまた、アポトーシス腫瘍細胞に対する抗腫瘍抗体の結合によって形成されたＡＴＣ免疫複合体は、ＤＣ上のＦｃ（γ）Ｒに対して標的化され得ることが実証された。ＡＴＣ単独と比較して、ＡＴＣ免疫複合体は、ＤＣによってより効率的に内面化され、ＤＣ活性化および成熟を誘導するのにおいてより効率的であって、そしてさらに重要なことには、ＡＴＣ免疫複合体はＭＨＣ　ＩおよびＭＨＣ　ＩＩ制限抗原提示の両方を有意に増強し得、従って、強力な抗腫瘍ＴヘルパーおよびｃＴＬ免疫を誘導する。
【１０８５】
従って、本発明者らは、体液性および細胞性の抗腫瘍免疫の両方を増強する本発明の抗ＰＳ抗体を用いることを考えて、ＡＴＣベースのＤＣ腫瘍ワクチンの有効性をブーストする。ＰＳは、普遍的であって、アポトーシス腫瘍細胞の最も豊富な特異的マーカーであるので、本発明の抗体、詳細には３Ｇ４のパネルは、ＡＴＣ上のＰＳに結合し得る。３Ｇ４－ＡＴＣ複合体のＦｃ（γ）Ｒ媒介性内面化を通じて、３Ｇ４が３００％までアポトーシス腫瘍細胞のＤＣ取り込みを増強し得ることを、本発明者らは既に実証している。従って、Ｆｃ（γ）Ｒを通じて媒介されたＤＣによってＡＴＣの取り込みを増強することによって、３Ｇ４および同様の抗体は、ＭＨＣ　ＩおよびＭＨＣ　ＩＩ制限抗原提示の両方を大きく増強し得、強力な体液性および細胞性抗腫瘍免疫の両方を誘導し得、ＡＴＣベースのＤＣ腫瘍ワクチンの有効性をブーストし得るということが判断されている。これは、インビボにおいて、Ｔｈ１、ＣＴＬおよび抗体応答の誘導における、３Ｇ４－ＡＴＣ免疫複合体をロードされたＤＣの有効性を確立することによって、およびインビボにおいて３Ｇ４－ＡＴＣ免疫複合体をロードされたＤＣの免疫によって誘導された抗腫瘍免疫の力価を決定することによって、実証され得る。
【１０８６】
（実施例ＸＸＩ）
（抗ＰＳ抗体は、インビボにおいてＣＭＶ感染を処置する）
実施例ＸＩＩに示されるインビトロのＣＭＶに対する抗ウイルス効果に従い、本実施例は、ＣＭＶウイルスのマウスバージョン、ｍＣＭＶを感染させたマウスの生存の増大が実証される。
【１０８７】
Ｂａｌｂ／Ｃマウス（６週齢、１群あたり５匹のマウス）を、５×１０^{5}ｐｆｕのｍＣＭＶ　ＲＶＧ１０２を用いて腹腔内感染させた。このマウスを３Ｇ４抗体（マウス１匹あたり１ｍｇ）または上記のヒトマウスキメラ抗体ｃｈ３Ｇ４（マウス１匹あたり１ｍｇ）で１日目に腹腔内処置した。未処置のマウスをコントロールとして使用した。その後、マウス１匹あたり０．５ｍｇの抗体またはキメラ抗体を用いて４日ごとに、２６日までマウスを処置した。マウスを感染後９０日間、生存についてモニターした。
【１０８８】
３Ｇ４抗体の親およびキメラ型の両方を用いた処置によって、ｍＣＭＶ感染マウスの生存の向上が得られた。３Ｇ４またはｃｈ３Ｇ４を用いて処置したマウスは、感染マウスのうち２５％しか生存しなかった、未処置のマウスと比較して、それぞれ１００％および８０％の生存を有した（図２７）。
【１０８９】
（実施例ＸＸＩＩ）
（インビボにおいてＰＥ結合ペプチド誘導体はＣＭＶ感染を処置する）
実施例ＸＶＩＩに示されるＣＭＶに対するインビトロの抗ウイルス効果に加えて、本実施例によって、デュラマイシンビオチン誘導体であるＤＬＢがｍＣＭＶで感染されたマウスの生存を向上させたことが実証される。
【１０９０】
Ｂａｌｂ／Ｃマウス（１群あたり６週齢、マウス５匹）を、５×１０^{5}ｐｆｕのｍＣＭＶ　ＲＶＧ１０２で腹腔内感染させた。これらのマウスを、マウス１匹あたり２０μｇのデュラマイシン誘導体ＤＬＢを用いて１日目に、そして４日ごとに腹腔内処置した。未処

置のマウスをコントロールとして使用した。マウスを感染後９０日間、生存についてモニターした。

【１０９１】

デュラマイシン－ビオチン誘導体であるＤＬＢを用いた処置によって、ｍＣＭＶ感染マウスの生存が向上した。ＤＬＢで処置したマウスは、マウスのうち２５％しか感染から生存しなかった未処置のマウスと比較して、１００％の生存を有した（図２８）。

【１０９２】

（実施例ＸＸＩＩＩ）

（抗ＰＳ抗体は、ウイルス感染した細胞に結合する）

本実施例によって、ウイルス感染が細胞表面でＰＳ露出を誘導することおよび抗ＰＳ抗体がウイルス感染した細胞に結合することが示される。ＦＡＣＳ解析において実証される細胞表面に対するキメラ３Ｇ４抗体の結合の増大によって示されるように、ワクシニアウイルスに感染した細胞はＰＳ陽性になる。

【１０９３】

トリプシン処理されたワクシニアウイルスを２という高いｍ．ｏ．ｉで用いてＵ９３７細胞を感染させた。要するに、ワクシニアウイルスを、等容積の０．２５ｍｇ／ｍｌのトリプシンを用いて３７℃で３０分間処置した。このウイルスを０．５ｍｌの総容積でＵ９３７細胞に添加した。１．５時間後、新鮮な培地を細胞に添加して、細胞をＴ２５フラスコ中において３７℃で２日間インキュベートさせた。未感染の細胞をコントロールとして使用した。

【１０９４】

感染したＵ９３７細胞および未感染のＵ９３７細胞を、一次抗体を用い、コントロールとしてキメラ３Ｇ４抗体（ｃｈ３Ｇ４）またはヒトＩｇＧ（ＨＩｇＧ）のいずれかを用いて染色した。細胞を洗浄して、正常なマウス血清を用いてブロックし、次いで一次抗体を用いて氷上で４５分間染色した。３回の洗浄後、１：４００希釈のヤギ抗ヒトＦＩＴＣ結合体化二次抗体を用いて細胞を染色して、ＦＡＣＳｃａｎで解析した。

【１０９５】

ＦＡＣＳ解析からの結果によって、未感染のＵ９３７細胞上で得られたシフト（図２９Ａ、右（緑）ピーク）と比較して、ワクシニアウイルスで感染されたＵ－９３７細胞上にｃｈ３Ｇ４での有意なシフト（図２９Ｂ、右（緑）ピーク）が存在することが示される。従って本研究によって、ワクシニアウイルスを用いた細胞の感染が、細胞表面上でのＰＳ露出をもたらすこと、および抗ＰＳ抗体３Ｇ４のキメラバージョンが、これらのウイルス感染した細胞に対して結合し得ることが示される。

【１０９６】

（実施例ＸＸＩＶ）

（Ｐｉｃｈｉｎｄｅウイルスに対する抗ＰＳ抗体の抗ウイルス効果）

ＣＭＶおよびＲＳＶに対する抗ウイルス効果に加えて、本実施例によってさらに、抗ＰＳ抗体がインビトロでＰｉｃｈｉｎｄｅウイルス感染を阻害することが示される。Ｐｉｃｈｉｎｄｅウイルスは新世界（Ｎｅｗ　Ｗｏｒｌｄ）アレナウイルスであって、ヒトでは非病原性であり、ラッサ熱の動物モデルにおいて用いられる。

【１０９７】

Ｖｅｒｏ細胞のコンフルエントな単層を、Ｐｉｃｈｉｎｄｅウイルスを０．０１ｐｆｕ／細胞という低ｍ．ｏ．ｉ．で用いた感染後、３Ｇ４抗体またはアイソタイプマッチングしたコントロール抗体であるＧＶ３９Ｇで処置した。要するに、細胞を１ウェルあたり１ｍｌの総容積で、３７℃で９０分間、ウイルスとともにインキュベートさせた。感染の間、プレートを３０分ごとにおだやかにロッキングさせた。感染後、細胞上清を取り出して、ＤＭＥＭ／１０％　ＦＢＳ／ｐｅｎ－ｓｔｒｅｐを各々のウェルに添加した（１ウェルあたり２ｍｌ）。２日目に、細胞を、トリプシンを用いて回収して、Ｂｉｏｃｏａｔチャンバスライドに固着させた。それらを固定して、ポリクローナルウサギ抗ＰＩＣ血清、続いてビオチン結合体化ヤギ抗ウサギ二次（二次抗体単独では、図３０Ｃに示されるように

染色を生じない）を用いて染色した。１００細胞の領域あたりの感染細胞の数をカウントした。

【１０９８】

３Ｇ４を用いて処置した細胞では、ウイルスは、ほぼ１００個の細胞中約１個に達する、暗い赤に染まる単一の細胞に限定される（図３０Ａ）。これらはおそらく、ＣＭＶで見られるように、ウイルスによってもともと感染された細胞である（実施例ＸＩＩ）。しかし、コントロールのＣＶ３９Ｇ抗体で処置した細胞では、ウイルスは全ての細胞に伝播して感染した（図３０Ｂ）。

【１０９９】

ウイルス複製の阻害のこのパターンは、３Ｇ４を用いてＣＭＶ感染ヒト線維芽細胞を処置した場合に観察されたパターンと類似である。従って、抗ＰＳ抗体である３Ｇ４は、図３０Ｄにおいて定量されるように、細胞から細胞へのＰｉｃｈｉｎｄｅウイルスの伝播を効率的に妨げる。

【１１００】

（実施例ＸＸＶ）

（ＰＥ結合ペプチド誘導体を用いる腫瘍処置）

デュラマイシン誘導体の抗ウイルス効果に加えて、インビトロおよびインビボの両方で、本実施例は、腫瘍脈管構造に対するデュラマイシン誘導体の局在化および関連の抗腫瘍効果を実証する。

【１１０１】

（Ａ．デュラマイシンＨｕＩｇＧ結合体での腫瘍処置）

ヒトＩｇＧ（ＨＩｇＧ）を実施例ＸＶに記載されるように最初に精製した。精製したＨＩｇＧを、ＳＩＡＢリンカーを用いてデュラマイシンに連結して、得られた（Ｄ－ＳＩＡＢ）$_{n}$ＨＩｇＧ結合体を精製した。

【１１０２】

マウス線維肉腫細胞株ＭｅｔｈＡを増殖させて、対数期に回収して、ＤＰＢＳに再懸濁させた。約１０^{6}個のＭｅｔｈＡ腫瘍細胞を６～８週齢のＢＡＬＢ／ｃ雄性マウスの背中中央に皮下注射した。移植の５日後、マウスを２つの群に無作為に分離した（ｎ＝１５）。１０日目から、１つの群には腹腔内注射によって１５０μｇのデュラマイシンＨｕＩｇＧ結合体を連続して２週間投与した。もう一方の群にはコントロールとして同じ量のＨｕＩｇＧを投与した。腫瘍容積を週に２回測定して、式１／２ａｂ^{2}を用いて算出した（ここで、「ａ」は腫瘍の長軸であって、「ｂ」は、腫瘍の短軸である）。腫瘍が約１４００ｍｍ^{3}のサイズに達したとき、マウスを屠殺した。

【１１０３】

デュラマイシンＨＩｇＧ結合体は、ヒトＩｇＧコントロールと比較して、ＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて１５０μｇ／日の用量でＭｅｔｈ　Ａ腫瘍増殖を阻害した（図３１）。

【１１０４】

（Ｂ．デュラマイシンＨｕＩｇＧ結合体は腫瘍脈管構造に局在する）

腫瘍サイズが５００ｍｍ^{3}に達したとき、上記と同じＭｅｔｈＡマウス腫瘍モデルを用いて、１００μｇ（Ｄ－ＳＩＡＢ）$_{n}$ＨＩｇＧを含有する１００μｌＰＢＳを、尾静脈を介して注射した。同じ量のヒトＩｇＧをコントロールとして注射した。４時間後、マウスを屠殺して正常な生理食塩水を用いて５分間、１％パラホルムアルデヒドを用いて１０分間灌流させた。腫瘍および他の主な器官を切り取って液体窒素中で凍結させた。ＯＣＴに埋め込んだ後、組織を１０μｍの切片に凍結切片化してシラン処理したスライドにおいた。冷アセトン中での１０分間の固定後に、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトＩｇＧを用いてスライドを染色して、デュラマイシンＨｕＩｇＧの体内分布を検出した。Ｍｅｃａ３２およびペルオキシダーゼ標識したヤギ抗ラットＩｇＧを用いて組織の血管構造を検出した。

【１１０５】

本研究によって、処置した動物においてデュラマイシンＨＩｇＧ結合体が腫瘍血管脈管

構造に局在することが示された。

【１１０６】

（実施例ＸＸＶＩ）

（デュラマイシン結合体の生体分布および特性）

本実施例は、インビトロにおける細胞不浸透性デュラマイシン誘導体の毒性の欠失、インビボで投与されたデュラマイシン誘導体の体内分布、およびデュラマイシン－抗体結合体がマクロファージによるアポトーシス細胞の食作用を増大する能力を実証する。

【１１０７】

（Ａ．デュラマイシン－ビオチン結合体は細胞毒性ではない）

本発明のデュラマイシン誘導体および結合体は、親のデュラマイシン分子の非特異的な毒性効果を最小にするように設計する。多くの実施例では、これは細胞不浸透性基に対するデュラマイシンの連結によって達成される（実施例ＸＶ）。

【１１０８】

ビオチン化デュラマイシン構築物ＤＬＢを実施例ＸＶに記載の通り調製した。未改変のデュラマイシン化合物およびＤＬＢを、ＭＴＴアッセイを用いてＨＵＶＥＣ上での細胞毒性効果について試験した。未改変のデュラマイシンは用量依存性の毒性を示したが、ＤＬＢは毒性ではなく、未処置のコントロールにマッチした（図３２）。

【１１０９】

（Ｂ．肺におけるマクロファージに対するデュラマイシン－ビオチン結合体の局在化）

ヒト乳ガン細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－４３５を増殖させて、対数期に回収して、ＤＰＢＳに再懸濁した。約10^7個の細胞を、６～８週齢の雌性無胸腺ヌードマウスの乳房の脂肪パッドに注射した。１００μｇデュラマイシン－ビオチンを含む１００μｌ　ＰＢＳを尾静脈を介して注射した。４時間後、マウスを屠殺して正常な生理食塩水を用いて５分間、１％パラホルムアルデヒドを用いて１０分間灌流させた。心臓、肺、肝臓、腎臓、脳、小腸、胸腺および脾臓を含む主な器官を切り取って液体窒素中で凍結させた。ＯＣＴに埋め込んだ後、組織を１０μｍの切片に凍結切片化してシラン処理したスライドにおいた。冷アセトン中での１０分間の固定後に、Ｃｙ３標識したストレプトアビジンを用いてスライドを染色してデュラマイシン－ビオチン構築物の体内分布を検出した。Ｍｅｃａ３２およびＦＩＴＣ標識したヤギ抗ラットＩｇＧを用いて組織の血管構造を検出した。

【１１１０】

ＭＤＡ－ＭＢ－４３５腫瘍を保有するヌードマウスへのデュラマイシン－ビオチン結合体の静脈内注射によって、腫瘍細胞、尿細管および肺のマクロファージにおける薬物の沈着が得られた。肝臓に最小の沈着があり、脳、小腸、精巣には検出可能な分布はない。肺におけるマクロファージに対する局在は、本発明の抗ウイルスの実施形態において利用され得る。

【１１１１】

（Ｃ．デュラマイシン－抗体結合体はアポトーシス細胞の食作用を増強する）

デュラマイシン－抗体結合体（デュラマイシン－Ｃ４４、ＤｕＣ４４）がアポトーシス細胞の食作用を増大する能力を次に検討した。

【１１１２】

マクロファージを単離して、マウス骨髄から培養した。ＢＭマクロファージの単離、培養および刺激のために用いられる培地は、２ｍＭグルタミン、０．３７％（ｗ／ｖ）$NaHCO_3$、１０％（ｖ／ｖ）熱不活性化されたＦＣＳおよび０．５ｎｇ／ｍｌマウスＧＭ－ＣＳＦを含むＤＭＥＭであった。２５ゲージの針を通じた完全培地のジェットを用いて、解剖した大腿骨から骨髄細胞を無菌的にフラッシュさせた。次いでこの細胞を完全培地１ｍｌあたり約3×10^5個の細胞の密度に調節して、８ウェルチャンバスライド中の０．５ｍｌアリコートに分配した。

【１１１３】

加湿チャンバ中において３７℃で、５％CO_2中で１時間細胞をインキュベートして、マクロファージを固着させかつ広げさせた。各々のウェルに５ｍｌの暖めたＰＢＳを添加

することによって非固着細胞を取り出して、プレートを穏やかに叩くことによって非固着細胞を再懸濁して、このスライドを軽くたたいて非固着細胞を廃棄した。この洗浄を全部で３回行なった。細胞を７．５％（ｖ／ｖ）CO_2雰囲気下において３７℃で５日間維持した。細胞を用いるまで、完全培地を１日おきに交換した。

【１１１４】

以下の方法を用いて、蛍光細胞トレーサーを用いてＨＬ－６０標的細胞を標識した。１バイアル色素の含量を９０μＬのＤＭＳＯに溶解して、ＰＢＳ中で１０μＭに希釈することによって、使用の直前に１０ｍＭ　ＣＦＤＡ　ＳＥストック溶液を調製した。ＨＬ－６０細胞ペレットを得るために遠心分離を用いて、上清を吸引した。細胞をＣＦＤＡ／ＰＢＳに再懸濁して、３７℃で１５分間インキュベートした。サンプルを遠心分離して上清を吸引した。細胞を培地に再懸濁してさらに３０分間インキュベートした。細胞生存度および蛍光が９５％を超えることを確認した。

【１１１５】

この食作用アッセイにおいて、標識されたＨＬ－６０細胞をＵＶ２５４ｎｍに５分間露出して、３７℃で１時間インキュベートしてアポトーシスを誘導した。10^4個のアポトーシス性ＨＬ－６０細胞をマクロファージとともに１時間インキュベートした。デュラマイシンＣ４４結合体を１０μｇ／ｍｌの濃度で含んだ。同じ濃度のマウス抗体ＢＢＧ３を陰性コントロールとして用いて、３Ｇ４抗体をまた比較のために含んだ。Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２を、最後の４５分間に、１０μｇ／ｍｌの濃度で培地に添加した。

【１１１６】

スライドをＰＢＳで３回洗浄して、１５分間４％パラホルムアルデヒド中で固定した。スライドをラット抗マウスＣＤ１１抗体（ＣＤ１１は、マクロファージマーカーである）で染色して、０．２％ゼラチン中で１時間希釈して洗浄し、テキサスレッド標識ヤギ抗ラット二次抗体を用いて染色した。

【１１１７】

細胞を蛍光顕微鏡下で解析した。マクロファージはＣＤ１１マーカーに起因して赤い細胞として同定された。アポトーシス細胞を食菌したマクロファージは、標的細胞における蛍光トレーサーに起因して緑の細胞として同定される。赤および緑の細胞をカウントして、食作用を取り込みの食作用陽性の割合として定量する。

【１１１８】

この研究によって、デュラマイシン抗体結合体ＤｕＣ４４がマクロファージによるアポトーシス性ＨＬ－６０細胞の食作用を増強したことが示される（図３３）。従って、デュラマイシン部分は、アポトーシス細胞の表面に結合して、これによって結合体の突出する抗体部分がマクロファージによって認識されることが可能になる。従ってこのデュラマイシン－抗体結合体は、３Ｇ４抗体に類似して機能した。予想どおり、Ｆｃ領域を欠く３Ｇ４抗体の$(Fab)_2$フラグメントは、コントロールレベルを超える食作用を誘導しなかった。

【１１１９】

初期の研究では、デュラマイシン－ビオチン結合体がインビボにおいて肺投与後にマクロファージに局在することが示されたので、本研究において示されるアポトーシス細胞のマクロファージ媒介性食作用の刺激は、本発明の治療用途のために、例えば肺ウイルス感染を処置するのにおいて重要な意味を有する。

【１１２０】

＊　　＊　　＊

本明細書に開示されかつ特許請求された全ての組成物および方法は、本開示に照らして過度の実験なしに作製しかつ実行することができる。本発明の組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記載されているが、この組成物および方法に対して、そして本明細書に記載されるその方法の工程または工程の順序においては、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、変異が適用され得ることが当業者には理解される。さらに詳細には、化学的におよび生理学的にその両方で関連する特定の因子が本明細書に記載され

る因子に交換されてもよいが、同じかまたは同様の結果が達成されるということが理解される。全ての同様の置換および改変は、添付の特許請求の範囲として規定されるとおり本発明の精神、範囲および概念のうちであるとみなされることが当業者には明白である。

【１１２１】

（参考文献）

例示的な処置、または本明細書中に示される補足的な他の詳細を提供する程度に、以下の参考文献が、参考として本明細書中に特に援用される。

【１１２２】

【数１】

Abrams and Oldham, *In: Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer*, Foon and Morgan (Eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 103-120, 1985.

Adler, Ng, Rote, "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR," *Biol. Reprod.*, 53(4):905-910, 1995.

Alving, Banerji, Fogler and Alving, "Lupus anticoagulant activities of murine monoclonal antibodies to liposomal phosphatidylinositol phosphate", *Clin. Exp. Immunol.*, 69:403-408, 1987.

Andree, Reutelingsperger, Hauptmann, Hemker, Hermens, Willems, "Binding of vascular anticoagulant α (VACα) to planar phospholipid bilayers," *J. Biol. Chem.*, 265:4923-4928, 1990.

Antibodies: *A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory*, 1988.

Aoki, Uenaka, Aoki, Umeda and Inoue, "A Novel Peptide Probe for Studying the Transbilayer Movement of Phosphatidylethanolamine," *J. Biochem.*, 116:291-297, 1994.

Asano, Yukita, Matsumoto, Kondo, Suzuki, "Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor," *Cancer Res.*, 55:5296-5301, 1995.

Baca *et al.*, "Antibody humanization using monovalent phage display," *J. Biol. Chem.*, 272(16):10678-84, 1997.

Barbas, Kang, Lerner, Benkovic, "Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88(18):7978-7982, 1991.

Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88:4457-4461, 1992.

Barras, Bain, Hoekstra and Lerner, "Semisynthetic Combinatorial Antibody Libraries: A Chemical Solution to the Diversity Problem," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4457-4461, 1992.

Berman, Mellis, Pollock, Smith, Suh, Heinke, Kowal, Surti, Chess, Cantor, *et al.*, "Content and organization of the human Ig VH locus: definition of three new VH families and linkage to the Ig CH locus," *EMBO J.*, 7(3):727-738, 1988.

Bevers, Rosing, Zwaal, "Development of procoagulant binding sites on the platelet surface," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 192:359-371, 1985.

Bevilacqua, "Endothelial-leukocyte adhesion molecules," *Ann. Rev. Immunol.*, 11:767-804, 1993.

【１１２３】

【数２】

Bitbol, Fellmann, Zachowski, Devaux, "Ion regulation of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine outside-inside translocation in human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta*, 904(2):268-282, 1987.

Blackwood and Ernst, "Characterization of Ca2(+)-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins," *Biochem. J.*, 266(1):195-200, 1990.

Blankenberg, Katsikis, Tait, Davis, Naumovski, Ohtsuki, Kopiwoda, Abrams, Darkes, Robbins, Maecker, Strauss, "*In vivo* detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(11):6349-6354, 1998.

Bocci, "Efficient labeling of serum proteins with 131I using chloramine T," *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 15:449-456, 1964.

Bombeli, Karsan, Tait, Harlan, "Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant," *Blood*, 89(7):2429-2442, 1997.

Borgstrom *et al.*, "Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy," *Cancer Res.*, 56(17):4032-1439, 1996.

Borgstrom *et al.*, "Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors *in vivo*," *Prostate*, 35(1):1-10, 1998.

Bornstein, "Thrombospondins: structure and regulation of expression," *FASEB J*, 6(14):3290-3299, 1992.

Borrebaeck and Moller, "*In vitro* immunization. Effect of growth and differentiation factors on antigen-specific B cell activation and production of monoclonal antibodies to autologous antigens and weak immunogens," *J. Immunol.*, 136(10):3710-3715, 1986.

Boustead, Brown, Walker, "Isolation, characterization and localization of annexin V from chicken liver," *Biochem. J.*, 291:601-608, 1993.

Boyle, Pohlman, Cornejo, Verrier, "Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion," *Ann. Thor. Surg.*, 62(6):1868-1875, 1996.

Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.

Branch, Rote, Dostal, Scott, "Association of lupus anticoagulant with antibody against phosphatidylserine," *Clin. Immun. Immunopathol.*, 42:63-75, 1987.

Brem, "Angiogenesis antagonists: current clinical trials," *Angiogenesis*, 2:9-20, 1998.

Bresnahan, Boldogh, Thompson, and Albrecht, "Human Cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1", *Virology*, 224:150-160, 1996.

【１１２４】

【数３】

Bruijn and Dinklo, "Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in renal disease," *Lab. Invest.*, 69:329-335, 1993.

Burke *et al.*, "Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors", *Science*, 236, 806-812, 1987.

Burrows, Watanabe, Thorpe, "A murine model for antibody-directed targeting of vascular endothelial cells in solid tumors," *Cancer Res.*, 52:5954-5962, 1992.

Burrows and Thorpe, "Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:8996-9000, 1993.

Calderon and DeVries, "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a schwann cell line," *J. Neuro. Res.*, 49:372-380, 1997.

Callahan *et al.*, *J. Immunol.*, 170:4840-4845, 2003

Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Elseview, Amsterdam, pp. 75-83, 1984.

Carnemolla *et al.*, "A tumor-associated fibronectin isoform generated by alternative splicing of messenger RNA precursors," *J. Cell Biol.*, 108:1139-1148, 1989.

Cheng, Huang, Nagane, Ji, Wang, Shih, Arap, Huang, Cavenee, "Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:8502-8507, 1996.

Choung, Kobayashi, Inoue, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Hemolytic Activity of a Cyclic Peptide Ro09-0198 Isolated from *Streptoverticillium*," *Biochim. Biophys. Acta.*, 940:171-179, 1988a.

Choung, Kobayashi, Takemoto, Ishitsuka and Inoue, "Interaction of a Cyclic Peptide, Ro09-0198, with Phosphatidylethanolamine in Liposomal Membranes," *Biochem. Biophys. Acta*, 940:180-187, 1988b.

Christiansen, Sims, Hamilton, "Complement C5b-9 increases plasminogen binding and activation on human endothelial cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17(1):164-171, 1997.

Clapp *et al.*, "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis," *Endocrinology*, 133(3):1292-1299, 1993.

Comfurius, Senden, Tilly, *et al.*, "Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1026(2):153-160, 1990.

Coughlin *et al.*, "Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis," *J. Clin. Invest.*, 101(6):1441-1452, 1998.

【１１２５】

【数４】

Dachary-Prigent, Toti, Satta, Pasquet, Uzan, Freyssinet, "Physiopathological significance of catalytic phospholipids in the generation of thrombin," *Seminars In Thrombosis and Hemostasis*, 22:157-164, 1996.

D'Amato *et al.*, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(9):4082-4085, 1994.

D'Angelo *et al.*, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N- terminal fragment of prolactin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(14):6374-6378, 1995.

Daum, "Lipids of mitochondria," *Biochim. Biophys. Acta*, 822(1):1-42, 1985.

Davis and Yancopoulos, "The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 237:173-85, 1999.

Demo, Masuda, Rossi, *et al.*, "Quantitative measurement of mast cell degranulation using a novel flow cytomeric annexin-V binding assay," *Cytometry*, 36(4):340-348, 1999.

Denekamp, "Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer," *Cancer Metastasis Rev.*, 9:267-282, 1990.

Devaux, "Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21:417-439, 1992.

DeVore *et al.*, "Phase I Study of the Antineovascularization Drug CM101," *Clin. Cancer Res.*, 3(3):365-372, 1997.

Diehl, Pfreundschuh, Fonatsch, Stein, Falk, Burrichter, Schaadt, "Phenotypic genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications," *Cancer Surveys*, 4:399-416, 1985.

Dillon, Mancini, Rosen, *et al.*, "Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation," *J. Immunol.*, 164(3):1322-1332, 2000.

Donati and Falanga, "Pathogenic mechanisms of thrombosis in malignancy," *Acta Haematol.*, 106(1-2):18-24, 2001.

Drouvalakis and Buchanan, "Phospholipid specificity of autoimmune and drug induced lupus anticoagulants; association of phosphatidylethanolamine reactivity with thrombosis in autoimmune disease," *J. Rheumatol.*, 25(2):290-295, 1998.

Droz, Patey, Paraf, Chretien, Gogusev, "Composition of extracellular matrix and distribution of cell adhesion molecules in renal cell tumors," *Lab. Invest.*, 71:710-718, 1994.

Dvorak, Nagy, Dvorak, "Structure of Solid Tumors and Their Vasculature: Implications for Therapy with Monoclonal Antibodies," *Cancer Cells*, 3(3):77-85, 1991.

Edgington, Mackman, Brand, Ruf, "The Structural Biology of Expression and Function of Tissue Factor," *Thromb. Haemost.*, 66(1):67-79, 1991.

【１１２６】

【数５】

Emoto, Kobayashi, Yamaji, Aizawa, Yahara, Inoue and Umeda, "Redistribution of Phosphatidylethanolamine at the Cleavage Furrow of Dividing Cells During Cytokinesis," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:12867-12872, 1996.

Emoto, Toyama-Sorimachi, Karasuyama, Inoue and Umeda, "Exposure of Phosphatidylethanolamine on the Surface of Apoptotic Cells," *Exp. Cell Res.*, 232:430-434, 1997.

Ferrara, Clapp, Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, 129(2):896-900, 1991.

Ferrara, "The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis," *Breast Cancer Res. Treat.*, 36:127-137, 1995.

Folkman *et al.*, "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone," *Science*, 221:719-725, 1983.

Fotsis *et al.*, "The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth," *Nature*, 368(6468):237-239, 1994.

Frater-Schroder *et al.*, "Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(15):5277-5281, 1987.

Frazier, "Thrombospondins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 3(5):792-799, 1991.

Fridrikksson, Shipkiva, Sheets, Holowka, Baird and McLafferty, "Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry:, Biochemistry, 38: 8056-8063, 1999.

Fries, Williams, Atkins, Newman, Lipscomb, Collins, "Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model of endothelial activation," *Am. J. Pathol.*, 143:725-737, 1993.

Gaffet, Bettache, Bienvenüe, "Transverse redistribution of phospholipids during human platelet activation: evidence for a vectorial outflux specific to aminophospholipids," *Biochem.*, 34:6762-6769, 1995.

Gagliardi, Hadd, Collins, "Inhibition of angiogenesis by suramin," *Cancer Res.*, 52(18):5073-5075, 1992.

Gagliardi and Collins, "Inhibition of angiogenesis by antiestrogens," *Cancer Res.*, 53(3):533-535, 1993.

Gagliardi *et al.*, "Antiangiogenic and antiproliferative activity of suramin analogues," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 41(2):117-124, 1998.

Galli, Comfurius, Maassen Hemker, de Baets, van Breda-Vriesman, Barbui, Zwaal, Bevers, "Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor," *Lancet*, 335(8705):1544-1547, 1990.

Galli, Barbui, Zwaal, Comfurius, Bevers, "Antiphospholipid antibodies: involvement of protein cofactors," *Haematologica*, 78(1):1-4, 1993.

【１１２７】

【数６】

Gavrieli, Sherman, Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death *in situ via* specific labeling of nuclear DNA fragmentation," *J. Cell Biol.*, 119(3):493-501, 1992.

Gefter *et al.*, "A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells," *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.

Giovarelli *et al.*, "Tumor rejection and immune memory elicited by locally released LEC chemokine are associated with an impressive recruitment of APCs, lymphocytes, and granulocytes", *J. Immunol.*, 164, 3200-3206, 2000.

Goding, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2nd Edition*, Academic Press, Orlando, Fl., pp. 60-61, 65-66, 71-74, 1986.

Good *et al.*, "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(17):6624-6628, 1990.

Graham, *et al.*, "Primary respiratory syncytial virus infection in mice," *J. Med. Virol.*, 26(2):153-62, 1988.

Grant *et al.*, "Fibronectin fragments modulate human retinal capillary cell proliferation and migration," *Diabetes*, 47(8):1335-1340, 1998.

Hammill, Uhr, Scheuermann, "Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death," *Exp. Cell Res.*, 251(1):16-21, 1999.

Haran *et al.*, "Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth," *Cancer Res.*, 54(21):5511-5514, 1994.

Harris, Zhang, Moghaddam, Fox, Scott, Pattison, Gatter, Stratford, Bicknell, "Breast cancer angiogenesis--new approaches to therapy *via* antiangiogenesis, hypoxic activated drugs, and vascular targeting," *Breast Cancer Res. Treat.*, 38(1):97-108, 1996.

Hasegawa, Suzuki, Ishii, Takakuwa, Tanaka, "Establishment of two distinct anti-cardiolipin antibody-producing cell lines from the same individual by Epstein-Barr virus transformation," *Throm. Res.*, 74(1):77-84, 1994.

Hasselaar and Sage, "SPARC antagonizes the effect of basic fibroblast growth factor on the migration of bovine aortic endothelial cells," *J. Cell Biochem.*, 49(3):272-283, 1992.

Hayashi, Nagashima, Terui, Kawamura, Matsumoto and Itazaki, "The Structure of PA48009; The Revised Structure of Duramycin," *J. Antibiotics*, XLIII(11):1421-1430, 1990.

Hellerqvist *et al.*, "Antitumor effects of GBS toxin: a polysaccharide exotoxin from group B beta-hemolytic streptococcus," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 120(1-2):63-70, 1993.

Herrmann and Devaux, "Alteration of the aminophospholipid translocase activity during *in vivo* and artificial aging of human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta.*, 1027(1):41-46, 1990.

Hinkovska-Galcheva, Petkova, Koumanov , "Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation," *Cryobiology*, 26(1):70-75, 1989.

【１１２８】

【数７】

Hiscox and Jiang, "Interleukin-12, an emerging anti-tumour cytokine," *In Vivo*, 11(2):125-132, 1997.

Holash *et al.*, "Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF", *Science*, 284:1994-1998, 1999.

Hori *et al.*, "Differential effects of angiostatic steroids and dexamethasone on angiogenesis and cytokine levels in rat sponge implants," *Br. J. Pharmacol.*, 118(7):1584-1591, 1996.

Hotchkiss, Ashton, Mahmood, Russell, Sparano, Schwartz, "Inhibition of endothelial cell function *in vitro* and angiogenesis *in vivo* by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center", *Mol. Cancer Ther.*, 1 (13):1191-200, 2002.

Huang, Molema, King, Watkins, Edgington, Thorpe, "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Science*, 275:547-550, 1997.

Huse, Sastry, Iverson, Kang, Alting-Mees, Burton, Benkovic, Lerner, *Science*, 246(4935):1275-1281, 1989.

Igarashi, Umeda, Tokita, Soo Nam, Inoue, "Effective induction of anti-phospholipid and anticoagulant antibodies in normal mouse," *Thrombosis Res.*, 61:135-148, 1991.

Ingber *et al.*, "Angioinhibins: Synthetic analogues of fumagillin which inhibit angiogenesis and suppress tumor growth," *Nature*, 48:555-557, 1990.

Iwamoto *et al.*, "Inhibition of angiogenesis, tumour growth and experimental metastasis of human fibrosarcoma cells HT1080 by a multimeric form of the laminin sequence Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR)," *Br. J. Cancer*, 73(5):589-595, 1996.

Jackson *et al.*, "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein," *Science*, 266(5190):1581-1584, 1994.

Jendraschak and Sage, "Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin: implications for tumor cell biology," *Semin. Cancer Biol.*, 7(3):139-146, 1996.

Jirholt, Ohlin, Borrebaeck, Soderlind, "Exploiting Sequence Space: Shuffling *In Vivo* Formed Complementarity Determining Regions Into a Master Framework," *Gene*, 215:471-476, 1998.

Jones, Dear, Foote, Neuberger, Winter, *Nature*, 321(6069):522-525, 1986.

Julien, Tournier, Tocanne, "Differences in the transbilayer and lateral motions of fluorescent analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the apical plasma membrane of bovine aortic endothelial cells," *Exp. Cell. Res.*, 208(2):387-389, 1993.

Julien, Tournier, Tocanne, "Basic fibroblast growth factor modulates the aminophospholipid translocase activity present in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells," *Eur. J. Biochem.*, 230:287-297, 1995.

Julien, Millot, Tocanne, Tournier, "12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate inhibits aminophospholipid translocase activity and modifies the lateral motions of fluorescent

【数８】

phospholipid analogs in the plasma membrane of bovine aortic endothelial cells," *Experimental Cell Res.*, 234:125-131, 1997.

Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, pp 647-669 in particular.

Kang, Barbas, Janda, Benkovic, Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A*, 88(10):4363-4366, 1991.

Katsuragawa, Kanzaki, Inoue, Hirano, Mori, Rote, "Monoclonal antibody against phosphatidylserine inhibits *in vitro* human trophoblastic hormone production and invasion," *Biology of Reproduction*, 56:50-58, 1997.

Kellermann, Lottspeich, Henschen, Muller-Esterl, "Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication," *Eur. J. Biochem.*, 154(2):471-478, 1986.

Kendall and Thomas, "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10705-10709, 1993.

Kenyon, Browne, D'Amato, "Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization," *Exp. Eye Res.*, 64(6):971-978, 1997.

Keyt *et al.*, "Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis," *J. Biol. Chem.*, 271(10):5638-46, 1996.

Kim, Li, Houck, Winer, Ferrara, "The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies," *Growth Factors*, 7:53-64, 1992.

Kim *et al.*, "Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*," *Nature*, 362:841-844, 1993.

Kim, Kwak, Ahn, So, Liu, Koh, Koh, "Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3", *FEBS Lett.*, 443(3):353-6, 1999.

Kim *et al.*, "Immunohistological analysis of immune cell infiltration of a human colon tumor xenograft after treatment with Stealth liposome-encapsulated tumor necrosis factor-alpha and radiation", *Int. J. Oncol.*, 21(5):973-9, 2002.

Kisch, and Johnson, "A plaque assay for respiratory syncytial virus," *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:583-9, 1963.

Kitamura, Kitagawa, Fukushima, Takagaki, Miyata, Nakanishi, "Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution," *J. Biol. Chem.*, 260(14):8610-8617, 1985.

Kleinman *et al.*, "The laminins: a family of basement membrane glycoproteins important in cell differentiation and tumor metastases," *Vitam. Horm.*, 47:161-186, 1993.

【１１３０】

【数９】

Kohler and Milstein, "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity," *Nature,* 256:495-497, 1975.

Kohler and Milstein, "Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion," *Eur. J. Immunol.,* 6:511-519, 1976.

Kondo, Asano, Suzuki, "Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194:1234-1241, 1993.

Konieczny, Bobrzecka, Laidler, Rybarska, "The combination of IgM subunits and proteolytic IgG fragment by controlled formation of interchain disulphides," *Haematologia,* 14(1):95-99, 1981.

Krajewska, Wang, Krajewski, *et al.*, "Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease," *Cancer Res.*, 57(8):1605-1613, 1997.

Kuzu, Bicknell, Fletcher, Gatter, "Expression of adhesion molecules on the endothelium of normal tissue vessels and vascular tumors," *Lab. Invest.*, 69(3):322-328, 1993.

Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.

Lane, Iruela-Arispe, Sage, "Regulation of gene expression by SPARC during angiogenesis *in vitro*. Changes in fibronectin, thrombospondin-1, and plasminogen activator inhibitor-1," *J. Biol. Chem.*, 267(23):16736-16745, 1992.

Lee *et al.*, "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression," *Endocrinology,* 139(9):3696-3703, 1998.

Leppink, Bishop, Sedmak, Henry, Ferguson, Streeter, Butcher, Orosz, "Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration," *Transplantation,* 48(5):874-877, 1989.

Levy, Gharavi, Sammaritano, Habina, Lockshin, "Fatty acid chain is a critical epitope for antiphospholipid antibody," *J. Clin. Immunol.*, 10(3):141-145, 1990.

Lichtenbeld, Van Dam-Mieras, Hillen, "Tumour angiogenesis: pathophysiology and clinical significance," *Neth. J. Med.*, 49(1):42-51, 1996.

Lin, Buxton, Acheson, Radziejewski, Maisonpierre, Yancopoulos, Channon, Hale, Dewhirst, George, Peters, "Anti-angiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 95(15):8829-34, 1998.

Lin, Sankar, Shan, Dewhirst, Polverini, Quinn, Peters, "Inhibition of tumor growth by targeting tumor endothelium using a soluble vascular endothelial growth factor receptor," *Cell Growth Differ.*, 9:49-58, 1998b.

Linder and Borden, "Effects of tamoxifen and interferon-beta or the combination on tumor-induced angiogenesis," *Int. J. Cancer*, 71(3):456-461, 1997.

【１１３１】

【数１０】

Lingen, Polverini, Bouck, "Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells," *Lab. Invest.*, 74(2):476-483, 1996.

Lingen, Polverini, Bouck, "Retinoic acid and interferon alpha act synergistically as antiangiogenic and antitumor agents against human head and neck squamous cell carcinoma," *Cancer Res.*, 58(23):5551-5558, 1998.

Liu, Moy, Kim, Xia, Rajasekaran, Navarro, Knudsen, Bander, "Monoclonal antibodies to the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen also react with tumor vascular endothelium", *Cancer Res.*, 57:3629-3634, 1997.

Lucas, Garcia, Donati, Hribar, Mandriota, Giroud, Buurman, Fransen, Suter, Nunez, Pepper, Grau, "Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells," *Eur. J. Immunol.*, 28(11):3577-3586, 1998.

Luo, Toyoda, Shibuya, "Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody," *Cancer Res.*, 58(12):2594-2600, 1998a.

Luo *et al.*, "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors," *Cancer Res.*, 58(12):2652-2660, 1998b.

Lupu, Moldovan, Ryan, Stern, Simionescu, "Intrinsic procoagulant surface induced by hypercholestrolaemia on rabbit aortic endothelium," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 4(5):743-752, 1993.

Majewski *et al.*, "Vitamin D3 is a potent inhibitor of tumor cell-induced angiogenesis," *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 1(1):97-101, 1996.

Maneta-Peyret, Bessoule, Geffard, Cassagne, "Demonstration of high specificity antibodies against phosphatidylserine," *J. Immun. Meth.*, 108:123-127, 1988.

Maneta-Peyret, Freyburger, Bessoule, Cassagne, "Specific immunocytochemical visualization of phosphatidylserine," *J. Immun. Methods*, 122:155-159, 1989.

Manetti *et al.*, "Synthesis and binding mode of heterocyclic analogues of suramin inhibiting the human basic fibroblast growth factor," *Bioorg. Med. Chem.*, 6(7):947-958, 1998.

Massey *et al.*, *Nature*, 328:457-458, 1987.

McEvoy, Williamson, Schlegel, "Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythocyte recognition by macrophages," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(10):3311-3315, 1986.

McNeil, Simpson, Chesterman, Krilis, "Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H)," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(11):4120-4124, 1990.

Menon, Rahman, Ravirajan, Kandiah, Longhurst, McNally, Willaims, Latchman, Isenberg, "The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies", *J. Autoimmunity*, 10:43-57, 1997.

【１１３２】

【数１１】

Mesiano, Ferrara, Jaffe, "Role of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer: inhibition of ascites formation by immunoneutralization," *Am. J. Pathol.*, 153(4):1249-1256, 1998.

Millauer, Longhi, Plate, Shawver, Risau, Ullrich, Strawn, "Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*," *Cancer Res.*, 56:1615-1620, 1996.

Mills, Brooker, Camerini-Otero, "Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription," *Nucl. Acids Res.*, 18:7305-7316, 1990.

Moore *et al.*, "Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines," *J. Lab. Clin. Med.*, 132(2):97-103, 1998.

Morrison, Johnson, Herzenberg, Oi, "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(21):6851-6855, 1984.

Morrison, Wims, Kobrin, Oi, "Production of novel immunoglobulin molecules by gene transfection," *Mt. Sinai J. Med.*, 53(3):175, 1986.

Muller, *et al.*, "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 A resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, 6(9):1153-67, 1998.

Muyldermans, Cambillau and Wyne, "Recognition of Antigens by Single-Domain Antibody Fragments: The Superfluous Luxury of Paired Domains," *TRENDS*, 26(4):230-235, 2001.

Munro, "Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases," *European. Heart Journal*, 14:72-77, 1993.

Nagler, Feferman, Shoshan, "Reduction in basic fibroblast growth factor mediated angiogenesis *in vivo* by linomide," *Connect Tissue Res.*, 37(1-2):61-68, 1998.

Nakamura *et al.*, Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Chapter 27.

Nakamura and Racker, "Inhibitory Effect of Duramycin or Partial Reactions Catalyzed by (Na^+, K^+)-Adenosinetriphosphatase from Dog Kidney," *Biochemistry*, 23(2):385-389, 1984.

Nilsson, Kosmehl, Zardi, Neri, "Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice," *Cancer Res.*, 61(2):711-716, 2001.

Nuttall, Irving and Hudson, "Immunoglobulin V_H Domains and beyond: Design and Selection of Single-Domain Binding and Targeting Reagents," *Current Pharma. Biotech.*, 1(3):253-262, 2000.

Ohizumi, Tsunoda, Taniguchi, Saito, Esaki, Makimoto, Wakai, Tsutsumi, Nakagawa, Utoguchi, Kaiho, Ohsugi, Mayumi, "Antibody-based therapy targeting tumor vascular

【１１３３】

【数１２】

endothelial cells suppresses solid tumor growth in rats," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 236:493-496, 1997.

Oikawa *et al.*, "A highly potent antiangiogenic activity of retinoids," *Cancer Lett.*, 48(2):157-162, 1989.

O'Reilly *et al.*, "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma," *Cell*, 79:315-328, 1994.

O'Reilly *et al.*, "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth," *Cell*, 88(2):277-285, 1997.

Orr, Wang, Lafrenie, Scherbarth, Nance, "Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis," *J. Pathology*, 190:310-329, 2000.

Parmley and Smith, "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes," *Gene*, 73(2):305-318, 1988.

Patey, Vazeux, Canioni, Potter, Gallatin, Brousse, "Intercellular adhesion molecule-3 on endothelial cells: Expression in tumors but not in inflammatory responses," *Am. J. Pathol.*, 148:465-472, 1996.

Pepper *et al.*, "Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis *in vitro*," *J. Cell Sci.*, 108(Pt 1):73-83, 1995.

Presta, Chen, O'Connor, Chisholm, Meng, Krummen, Winkler, Ferrara, "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Res.*, 57:4593-4599, 1997.

Price, "Metastasis from human breast cancer cell lines," *Breast Cancer Research Treatment.*, 39:93-102, 1996.

Qamar, Gharavi, Levy, Lockshin, "Lysophosphatidylethanolamine is the antigen to which apparent antibody to phosphatidylethanolamine binds," *J. Clin. Immunol.*, 10(4):200-203, 1990.

Qu, Conroy, Walker, Wooding, Lucy, "Phosphatidylserine-mediated adhesion of T-cells to endothelial cells," *J. Biochem.*, 317(Pt 2):343-346, 1996.

Quinn *et al.*, CM101, a polysaccharide antitumor agent, does not inhibit wound healing in murine models," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 121(4):253-256, 1995.

Ran, Gao, Duffy, Watkins, Rote, Thorpe, "Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature," *Cancer Res.*, 58(20):4646-4653, 1998.

Ran, Downes, Thorpe, "Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of activated endothelial cells and tumor blood vessels," *Proceedings of AACR*, No. 2615 (Abstract):527, 2002.

Rao, Tait, Hoang, "Binding of annexin V to a human ovarian carcinoma cell line (OC-2008). Contrasting effects on cell surface factor VIIa/tissue factor activity and prothrombinase activity," *Thromb. Res.*, 67(5):517-531, 1992.

【１１３４】

【数１３】

Rauch, Tannenbaum, Tannenbaum, Ramelson, Cullis, Tilcock, Hope, Janoff, "Human hybridoma lupus anticoagulants distinguish between lamellar and hexagonal phase lipid systems," *J. Biol. Chem.*, 261(21):9672-9677, 1986.

Rauch and Janoff, "Phospholipid in the hexagonal II phase is immunogenic: evidence for immunorecognition of nonbilayer lipid phases *in vivo*," *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87(11):4112-4114, 1990.

Ravirajan, Harmer, McNally, Hohmann, Mackworth-Young, Isenberg, "Phospholipid binding specificities and idiotype expression of hybridoma derived monoclonal autoantibodies from splenic cells of patients with systemic lupus erythematosus", *Ann. Rheumatic Diseases*, 54:471-476, 1995.

RayChaudhury and D'Amore, "Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta," *J. Cell Biochem.*, 47(3):224-229, 1991.

Richer and Lo, "Introduction of human DNA into mouse eggs by injection of dissected human chromosome fragments", *Science* 245, 175-177, 1989.

Riechmann, Clark, Waldmann, Winter, "Reshaping human antibodies for therapy," *Nature*, 332(6162):323-327, 1988.

Riechmann and Muyldermans, "Single Domain Antibodies: Comparison of Camel VH and Camelised Human VH Domains," *J. Immunol. Methods.*, 231:25-38, 1999.

Rimassa *et al.*, "Unexpected low efficacy of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) and vinorelbine in the treatment of metastatic breast cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, 77 (2):185-8, 2003.

Rosenthal *et al.*, "A phase I study of SPI-077 (Stealth liposomal cisplatin) concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck cancer", *Investigational New Drugs*, 20(3)343-9:, 2002.

Rote, Ng, Dostal-Johnson, Nicholson, Siekman, "Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation," *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 66:193-200, 1993.

Rote, Chang, Katsuragawa, Ng, Lyden, Mori, "Expression of phosphatidylserine-dependent antigens on the surface of differentiating BeWo human choriocarcinoma cells," *Am. J. Reprod. Immun.*, 33:114-121, 1995.

Rote, "Antiphospholipid antibodies and recurrent pregnancy loss," *Am. J. Reprod. Immun.*, 35:394-401, 1996.

Ruf, Rehemtulla, Edgington, "Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function," *Biol. Chem.*, 266:2158-2166, 1991.

Ruf and Edgington, "Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis *in vivo*," *FASEB J.*, 8:385-390, 1994.

Sakamoto *et al.*, "Heparin plus cortisone acetate inhibit tumor growth by blocking endothelial cell proliferation," *Canc. J.*, 1:55-58, 1986.

【１１３５】

【数１４】

Saleh, Stacker, Wilks, "Inhibition of growth of C6 glioma cells *in vivo* by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence," *Cancer Res.*, 56:393-401, 1996.

Sambrook, Fritsch, Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis," *Cell Res.*, 8(3):171-177, 1998.

Sanlioglu, Williams, Samavati, Butler, Wang, McCray, Ritchie, Hunninghake, Zandi, and Engelhardt, *J. Biol. Chem.*, 32:30188, 2001.

Schlaepfer, Mehlman, Burgess, Haigler, "Structural and functional characterization of endonexin II, a calcium- and phospholipid-binding protein," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(17):6078-6082, 1987.

Schorer, Rick, Swaim, Moldow, "Structural features of endotoxin required for stimulation of endothelial cell tissue factor production; exposure of preformed tissue factor after oxidant-mediated endothelial cell injury," *J. Lab. Clin. Med.*, 106:38-42, 1985.

Seigneuret and Devaux, "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81(12):3751-3755, 1984.

Sessions and Horwitz, "Myoblast aminophospholipid asymmetry differs from that of fibroblasts," *FEBS Lett.*, 134(1):75-78, 1981.

Shaughnessy, Buchanan, Turple, Richardson, Orr, "Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen speciesm" *A. J. Path.*, 134(4):787-796, 1989.

Sheibani and Frazier, "Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(15):6788-6792, 1995.

Sheu *et al.*, "Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody," *Biochim. Biophys. Acta*, 1336(3):445-454, 1997.

Shotwell, Stodola, Michael, Lindenfelser, Dworschack and Pridham, "Antibiotics Against Plant Disease. III. Duramycin, a New Antibiotic from *Streptomyces Cinnamomeus* Forma *Azacoluta*, *N. Utiliza. Res. Dev. Div.*, 80:3912-3915, 1958.

Sideras, Mizuta, Kanamori, Suzuki, Okamoto, Kuze, Ohno, Doi, Fukuhara, Hassan, *et al.*, "Production of sterile transcripts of C gamma genes in an IgM-producing human neoplastic B cell line that switches to IgG-producing cells," *Intl. Immunol.*, 1(6):631-642, 1989.

Siemeister, Martiny-Baron, Marme, "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities," *Cancer Metastasis Rev.*, 17(2):241-248., 1998.

【１１３６】

【数１５】

Singh *et al.*, "Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment", *Journal of Controlled Release*, 59(1):43-53, 1999.

Sioussat, Dvorak, Brock, Senger, "Inhibition of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) with antipeptide antibodies," *Arch. Biochem. Biophys.*, 301:15-20, 1993.

Sipos *et al.*, "Inhibition of tumor angiogenesis," *Ann. NY Acad. Sci.*, 732:263-272, 1994.

Sluiter, Pietersma, Lamers, Koster, "Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression," *J. Cardiol. Pharmacol.*, 22:S37-S44, 1993.

Smirnov, Triplett, Comp, Esmon, Esmon, "On the role of phosphatidylethanolamine in the inhibition of activated protein C activity by antiphospholipid antibodies," *J. Clin. Invest.*, 95(1):309-316, 1995.

Soares, Shaughnessy, MacLarkey, Orr, "Quantification and morphologic demonstration of reactive oxygen species produced by Walker 256 tumor cells *in vitro* and during metastasis *in vivo*," *Laboratory Invest.*, 71(4):480-489, 1994.

Soderlind, Ohlin and Carlsson, "Complementarity-Determing Region (CDR) Implantation: A Theme of Recombination," *Immunotech.*, 4:279-285, 1999.

Soderlind, Strandberg, Jirholt, Kobayashi, Alexeiva, Aberg, Nilsson, Jansson, Ohlin, Wingren, Danielsson, Carisson and Borrebaeck, "Recombining Germline-Derived CDR Sequences for Creating Diverse Single-Framework Antibody Libraries," *Nature Biotech.*, 18:852-856, 2000.

Soff *et al.*, "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model," *J. Clin. Invest.*, 96(6):2593-2600, 1995.

Staal-van den Brekel, Thunnissen, Buurman, Wouters, "Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in non-small-cell lung carcinoma," *Virchows Arch.*, 428:21-27, 1996.

Staub, Harris, Khamashta, Savidge, Chahade, Hughes, "Antibody to phosphatidylethanolamine in a patient with lupus anticoagulant and thrombosis," *Ann. Rheum. Dis.*, 48(2):166-169, 1989.

Stella *et al.*, "Prodrugs: A chemical approach to targeted drug delivery ", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, Eds. Human Press, 1985, pp 247-267.

Stone, Ruf, Miles, Edgington, Wright, "Recombinant soluble human tissue factor secreted by Saccharomyces cerevisiae and refolded from *E. coli* inclusion bodies: glycosylation of mutants, activity, and physical characterization," *Biochem. J.*, 310(2):605-614, 1995.

Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to phosphatidylethanolamine (PE) recognize a kininogen-PE complex, " *Blood*, 86(8):3083-3089, 1995.

Sugi and McIntyre, "Phosphatidylethanolamine induces specific conformational changes in the kininogens recognizable by antiphosphatidylethanolamine antibodies," *Thromb. Haemost.*, 76(3):354-360, 1996a.

【１１３７】

【数１６】

Sugi and McIntyre, "Autoantibodies to kininogen- phosphatidylethanolamine complexes augment thrombin-induced platelet aggregation," *Thromb. Res.*, 84(2):97-109, 1996b.

Sugimura, Donato, Kakar, Scully, "Annexin V as a probe of the contribution of anionic phospholipids to the procoagulant activity of tumor cell surfaces," *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5(3):365-373, 1994.

Symon *et al.*, "Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by stealth liposomes", *Cancer*, 86(1):72-8, 1999.

Tada *et al.*, "Inhibition of tubular morphogenesis in human microvascular endothelial cells by co-culture with chondrocytes and involvement of transforming growth factor beta: a model for avascularity in human cartilage," *Biochim. Biophys. Acta*, 1201(2):135-142, 1994.

Tait and Smith, "Phosphatidylserine receptors: role of CD36 in binding of anionic phospholipid vesicles to monocytic cells," *J. Biol. Chem.*, 274(5):3048-3054, 1999.

Takano *et al.*, "Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator," *Cancer Res.*, 54(10):2654-2660, 1994.

Tanaka *et al.*, "Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth," *Nat. Med.*, 3(4):437-442, 1997.

Test and Mitsuyoshi, "Activation of the alternative pathway of complement by calcium-loaded erythrocytes resulting from loss of membrane phospholipid asymmetry," *J. Lab. Clin. Med.*, 130(2):169-182, 1997.

Thornhill, Kyan-Aung, Haskard, "IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils," *J. Immunol.*, 144:3060-3065, 1990.

Thorpe *et al.*, "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice," *Cancer Res.*, 53:3000-3007, 1993.

Thorpe and Ran, "Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature", *Cancer J. Sci. Am.*, 6(Suppl 3):S237-S244, 2000.

Tolsma *et al.*, "Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity," *J. Cell Biol.*, 122(2):497-511, 1993.

Tryggvason, "The laminin family," *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5(5):877-882, 1993.

Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, Boulamatsis, "Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes", *Brit. J. Cancer*, 87(1):21-7, 2002.

Umeda, Igarashi, Nam, Inoue, "Effective production of monoclonal antibodies against phosphatidylserine: Stereo-specific recognition of phosphatidylserine by monoclonal antibody," *J. Immun.*, 143(7):2273-2279, 1989.

Umeda and Emoto, "Membrane Phospholipid Dynamics During Cytokinesis: Regulation of Actin Filament Assembly by Redistribution of Membrane Surface Phospholipid", *Chem. Phys. Lipids*, 101:81-91, 1999.

【１１３８】

【数１７】

Utsugi, Schroit, Connor, Bucana, Fidler, "Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes," *Cancer Res.*, 51(11):3062-3066, 1991.

Valenzuela, Griffiths, Rojas, Aldrich, Jones, Zhou, McClain, Copeland, Gilbert, Jenkins, Huang, Papadopoulos, Maisonpierre, Davis, Yancopoulos, "Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96(5):1904-9, 1999.

van Dijk, Warnaar, van Eendenburg, Thienpont, Braakman, Boot, Fleuren, Bolhuis, "Induction of tumor-cell lysis by bi-specific monoclonal antibodies recognizing renal-cell carcinoma and CD3 antigen," *Int. J. Cancer*, 43:344-349, 1989.

Vitetta *et al.*, "Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma," *Cancer Res.*, 15:4052-4058, 1991.

Vlachoyiannopoulos, Beigbeder, Duelanes, Youinou, Hunt, Krilis, Moutsopoulos, "Antibodies to phosphatidylethanolamine in antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus: their correlation with anticardiolipin antibodies and beta 2 glycoprotein-I plasma levels," *Autoimmunity*, 16(4):245-249, 1993.

Vogt, Ng, Rote, "A model for the antiphospholipid antibody syndrome: Monoclonal antiphosphatidylserine antibody induces intrauterine growth restriction in mice," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 174:700-707, 1996.

Vogt, Ng, Rote, "Antiphosphatidylserine antibody removes Annexin V and facilitates the binding prothrombin at the surface of a choriocarcinoma model of trophoblast differentiation," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 177:964-972, 1997.

Volpert, Lawler, Bouck, "A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(11):6343-6348, 1998.

Vukanovic *et al.*, "Antiangiogenic effects of the quinoline-3-carboxamide linomide," *Cancer Res.*, 53(8):1833-1837, 1993.

Wakamatsu, Choung, Kobayashi, Inoue, Higashijima and Miyazawa, "Complex Formation of Peptide Antibiotic Ro09-0198 with Lysophosphatidylethanolamine: ^{1}H NMR Analysis in Dimethyl Sulfoxide Solution," *Biochemistry*, 29(1):113-118, 1986.

Waltenberger *et al.*, "Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action," *J. Mol. Cell Cardiol.*, 28(7):1523-1529, 1996.

Wamil *et al.*, "Soluble E-selectin in cancer patients as a marker of the therapeutic efficacy of CM101, a tumor-inhibiting anti-neovascularization agent, evaluated in phase I clinical trail," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 123(3):173-179, 1997.

Wang and Joseph, "Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells," *Free Rad. Biol. Med.*, 28(8):1222-1231, 2000.

Wells, "Starving cancer into submission", *Chem. Biol.*, 5(4):R87-88, 1998.

【１１３９】

【数１８】

Wiesmann, *et al.*, "Crystal structure at 1.7 A resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor," *Cell*, 91(5):695-704, 1997.

Weiss, Young, LoBuglio, Slivka and Nimeh, "Role of Hydrogen Peroxide in Neutrophil-Mediated Destruction of Cultured Endothelial Cells, " *J. Clin. Invest.*, 68:714-721, 1981.

Williamson and Schlegel, "Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells," *Molec. Mem. Biol.*, 11:199-216, 1994.

Willman *et al.*, "Prodrugs in cancer therapy", *Biochem. Soc. Trans.*, 14:375-382, 1988.

Winter and Milstein, "Man-made antibodies,"*Nature,* 349:293-299, 1991.

Wolff *et al.*, "Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures *in vitro* and angiogenesis *in vivo*," *Klin. Padiatr.*, 209(4):275-277, 1997.

Yamada, Moldow, Sacks, Craddock, Boogaens and Jacob, "Deleterious Effects of Endotoxin on Cultured Endothelial Cells: An *in vitro* Model of Vascular injury," *Inflammation*, 5:115-116, 1981.

Yamamura *et al.*, "Effect of Matrigel and laminin peptide YIGSR on tumor growth and metastasis," *Semin. Cancer Biol.*, 4(4):259-265, 1993.

Yoon *et al.*, "Inhibitory effect of Korean mistletoe (Viscum album coloratum) extract on tumour angiogenesis and metastasis of haematogenous and non-haematogenous tumour cells in mice," *Cancer Lett.*, 97(1):83-91, 1995.

Yoshida *et al.*, "Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase," *Cancer Res.*, 58(16):3751-3756, 1998.

Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062, 1995.

Zhao, Zhou, Wiedmer, Sims, "Level of expression of phospholipid scramblase regulates induced movement of phosphatidylserine to the cell surface," *J. Biol. Chem.*, 273:6603-6606, 1998.

Zhou, Zhao, Stout, Luhm, Wiedmer, Sims, "Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids," *J. Biol. Chem.*, 272(29):18240-18244, 1997.

Ziche *et al.*, "Linomide blocks angiogenesis by breast carcinoma vascular endothelial growth factor transfectants," *Br. J. Cancer*, 77(7):1123-1129, 1998.

Zulueta, Yu, Hertig, Thannickal, Hassoun, "Release of hydrogen peroxide in response to hypoxia-reoxygenation: role of an NAD(P)H oxidase-like enzyme in endothelial cell plasma membrane," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 12(1):41-49, 1995.

Zwaal, Bevers, Comfurius, Rosing, Tilly, Verhallen, "Loss of membrane phospholipid asymmetry during activation of blood platelets and sickled red cells; mechanisms and physiological significance," *Mol. Cell. Biochem.*, 91:23-31, 1989.

【１１４０】
【数１９】

Zwaal and Schroit, "Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells," *Blood*, 89(4):1121-1132, 1997.

【図１】

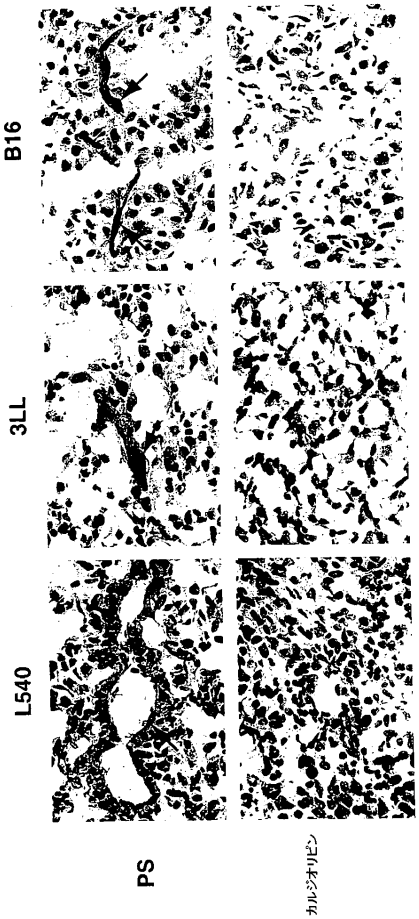


FIG. 1

【図２】

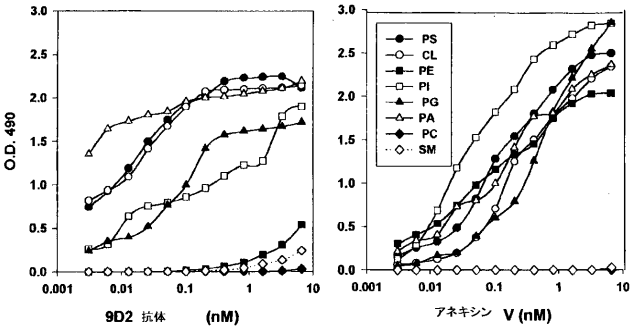


FIG. 2A

FIG. 2B

【図３】

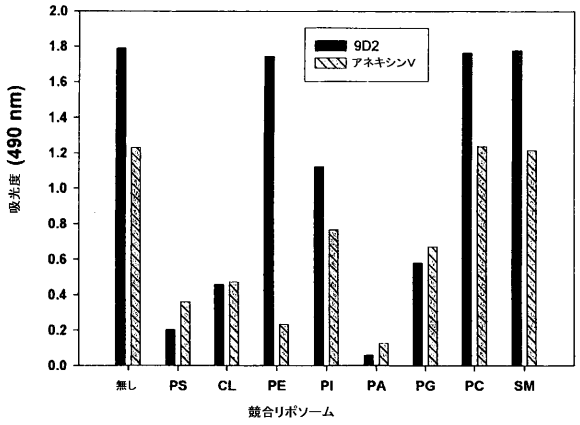


FIG. 3

【図４】

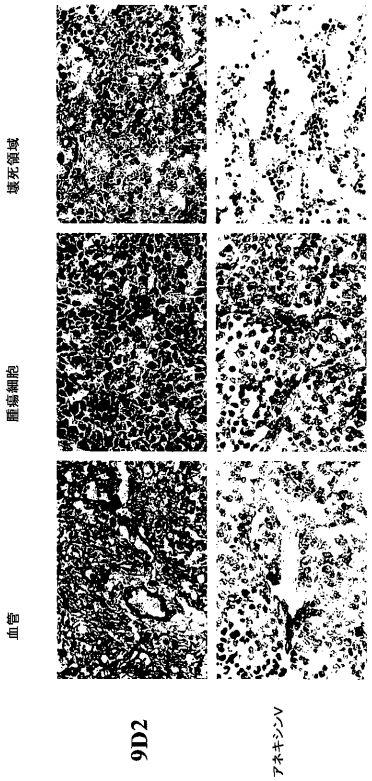


FIG. 4

【図５】

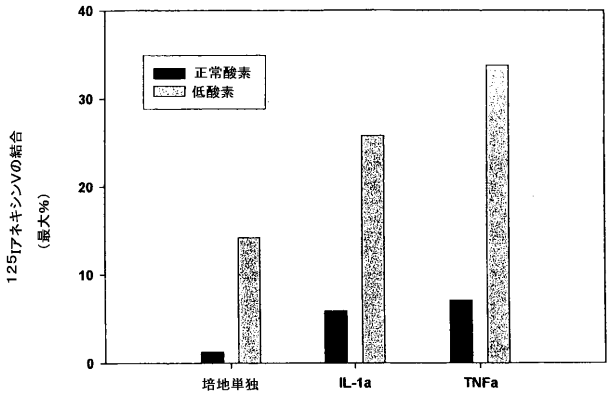


FIG. 5

【図６】

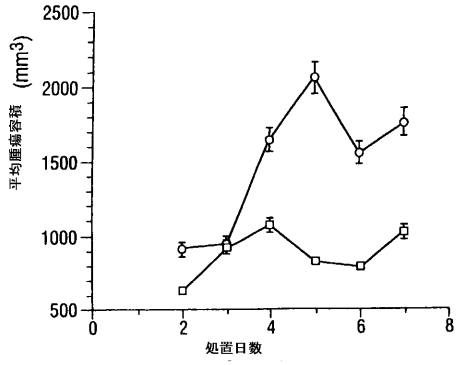


FIG. 6A

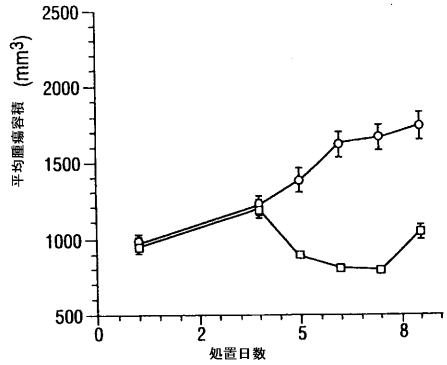


FIG. 6B

【図７】

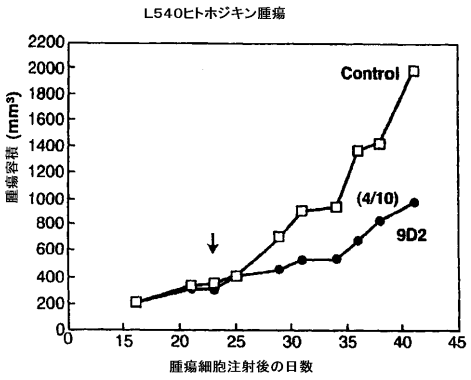
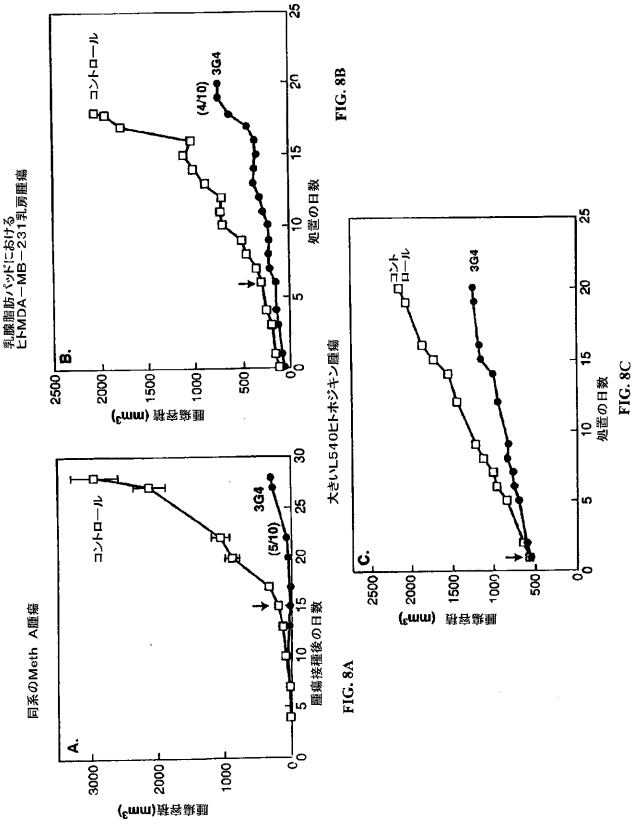


FIG. 7

【図８－１】



【図８－２】

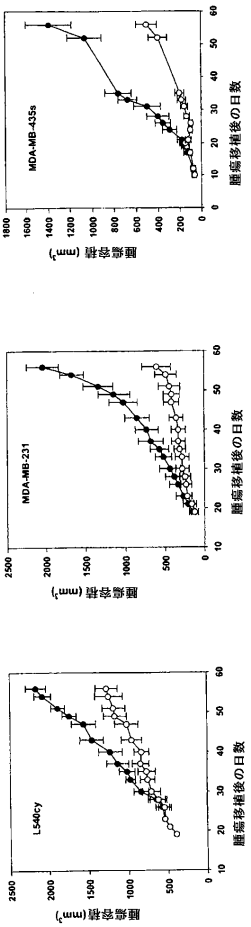


FIG. 8F

FIG. 8E

FIG. 8D

【図８－３】

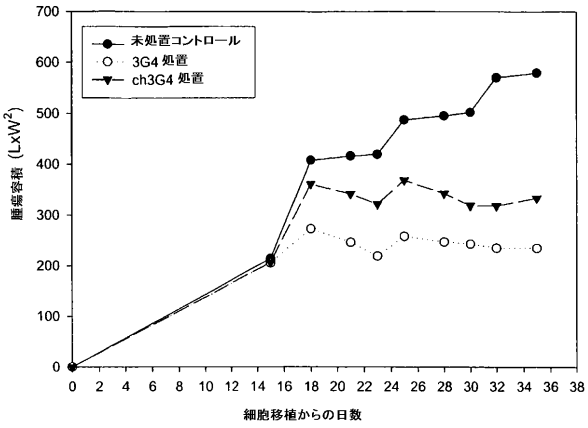


FIG. 8G

【図９－１】

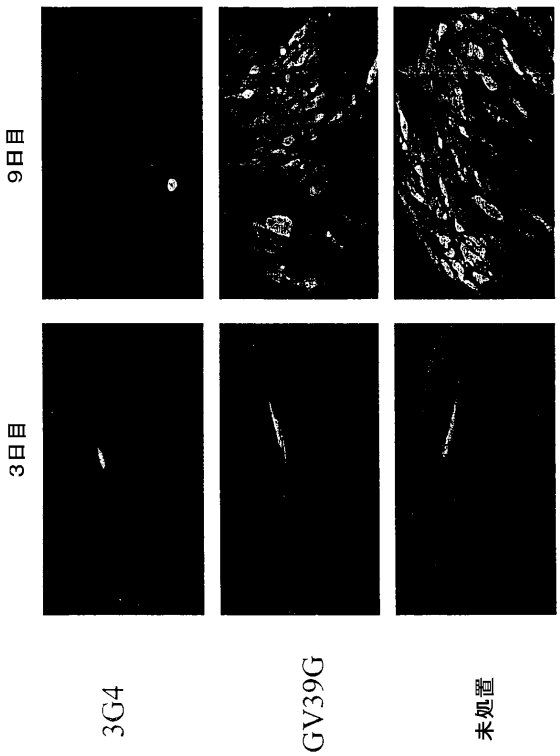


FIG. 9A

【図９－２】

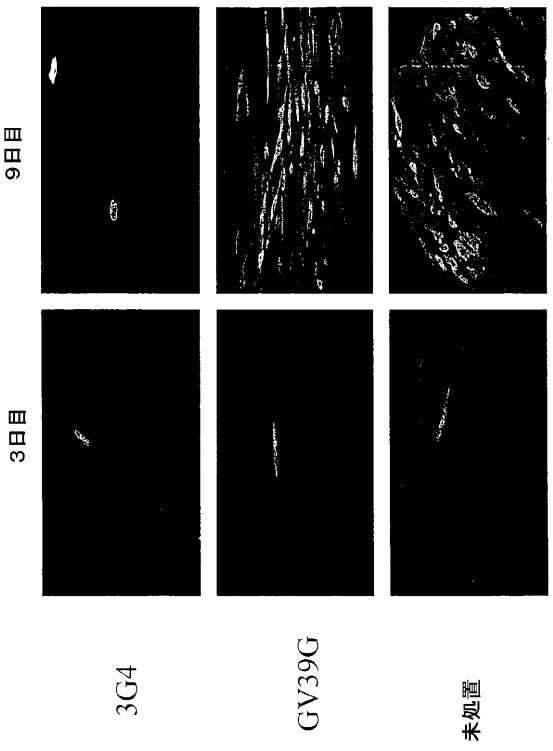


FIG. 9B

【図１０】

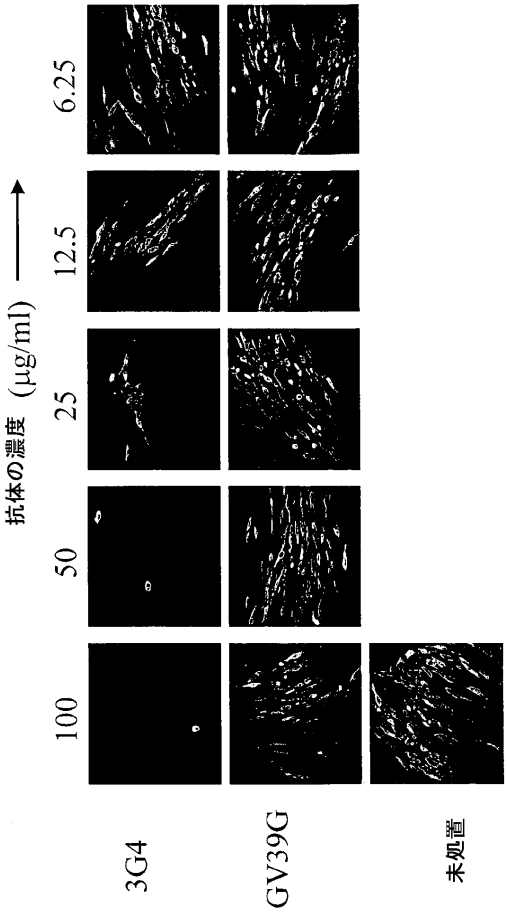


FIG. 10

【図１１－１】

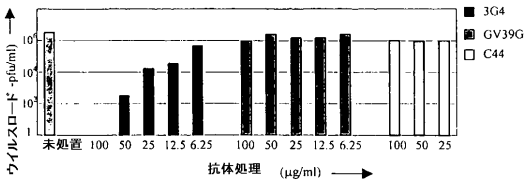


FIG. 11A

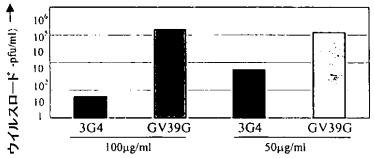


FIG. 11B

【図１１－２】

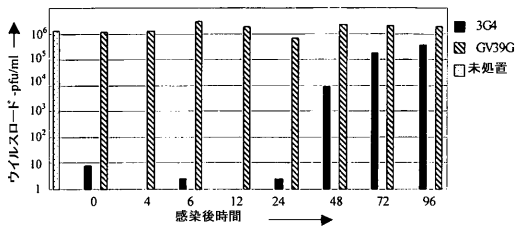


FIG. 11C

【図１２】

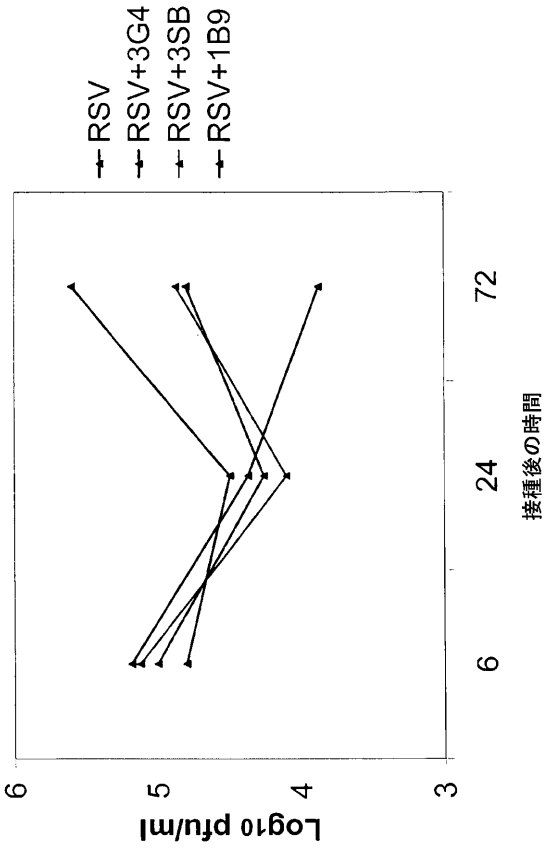


FIG. 12

【図１３－１】

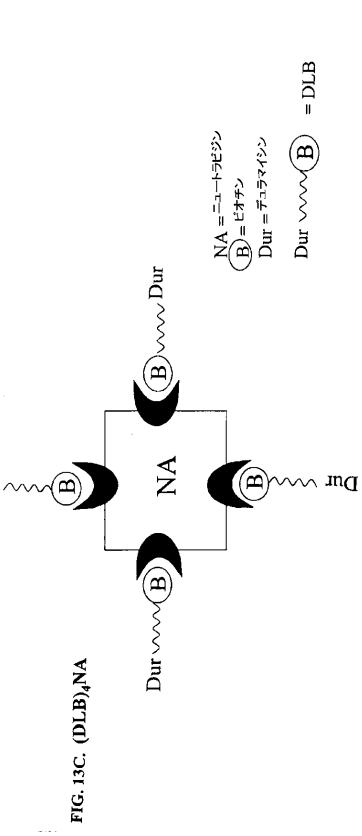


FIG. 13A. DLB

FIG. 13B. DIB

FIG. 13C. $(DLB)_4NA$

【図１３－２】

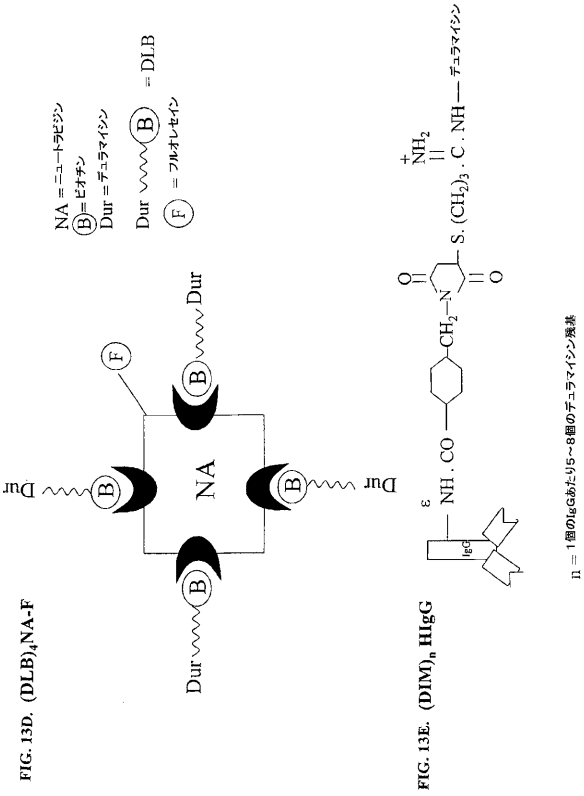


FIG. 13D. $(DLB)_4NA$-F

FIG. 13E. $(DIM)_n$ HIgG

【図１３－３】

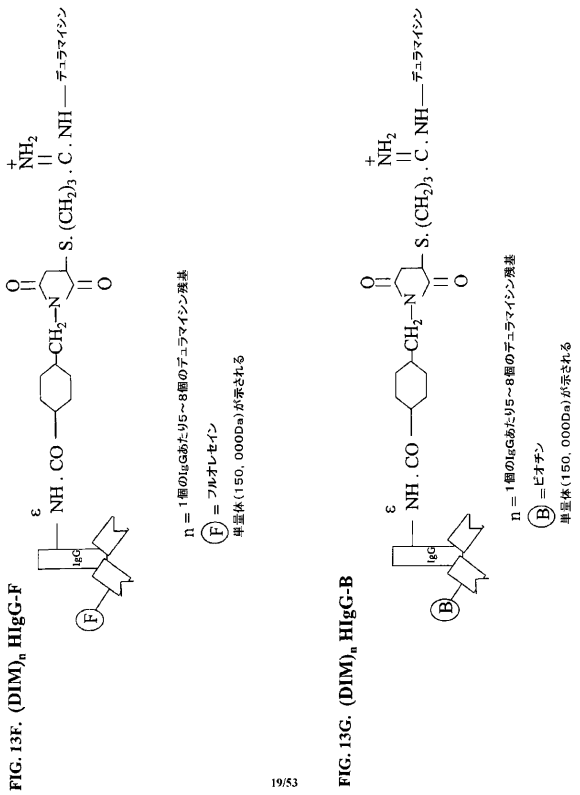


FIG. 13F. $(DIM)_n$ HIgG-F

FIG. 13G. $(DIM)_n$ HIgG-B

【図１３－４】

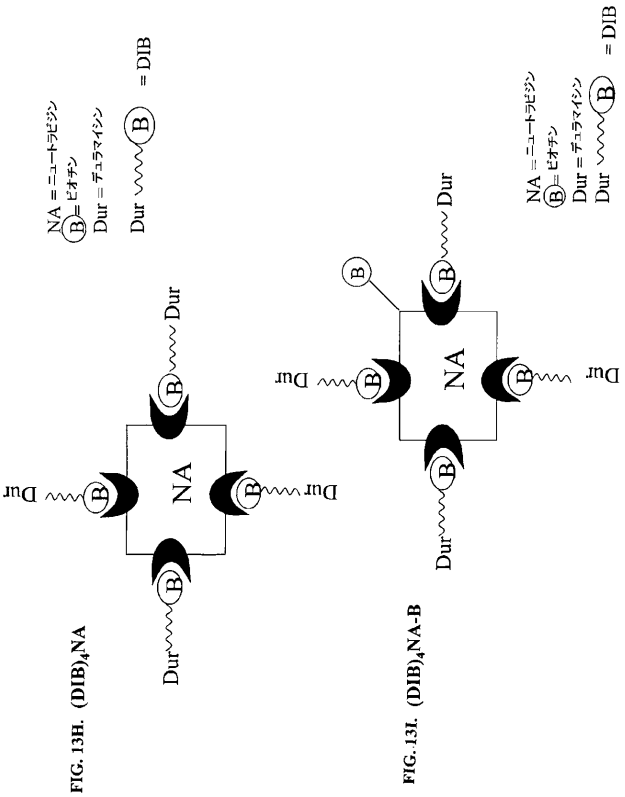


FIG. 13H. $(DIB)_4NA$

FIG. 13I. $(DIB)_4NA$-B

【図１３－５】

FIG. 13J. DS-1

FIG. 13K. DS-2

FIG. 13L. DS-3

FIG. 13M. DS-4

【図１３－６】

FIG. 13N. DS-5

FIG. 13O. DC-1

【図１３－７】

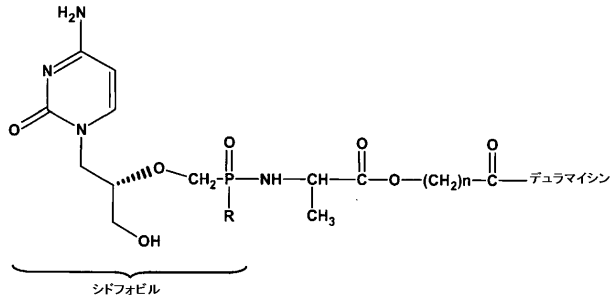
FIG. 13P

【図１３－８】

FIG. 13Q

【図１３－９】

FIG. 13R



R= シドフォビルにおける場合はOH、または不安定な疎水性基

【図１４－１】

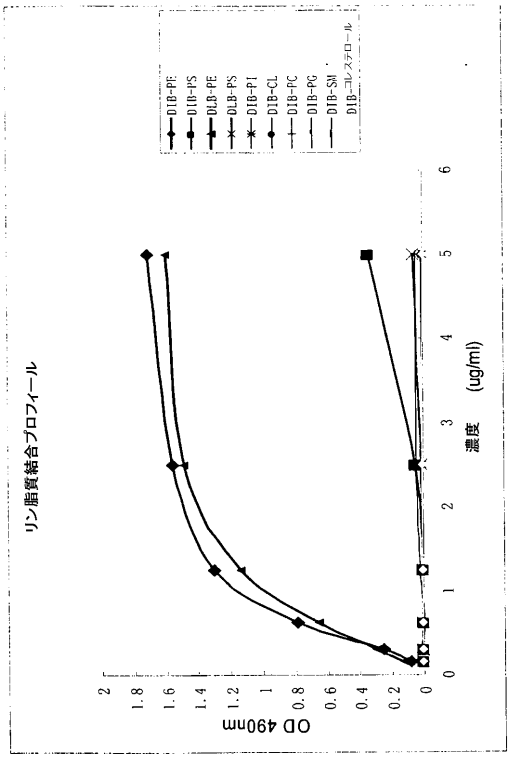


FIG. 14A

【図１４－２】

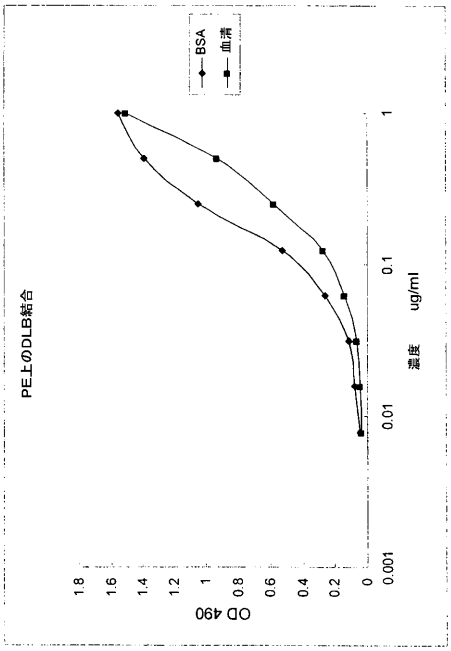


FIG. 14B

【図１４－３】

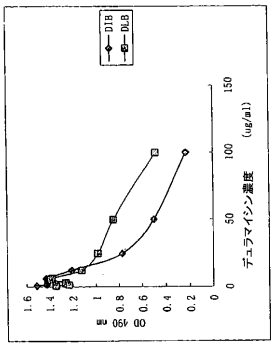


FIG. 14D

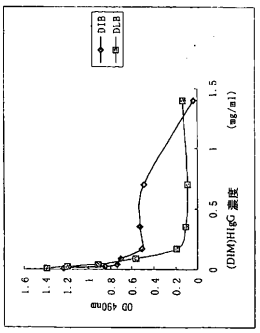


FIG. 14C

【図１５】

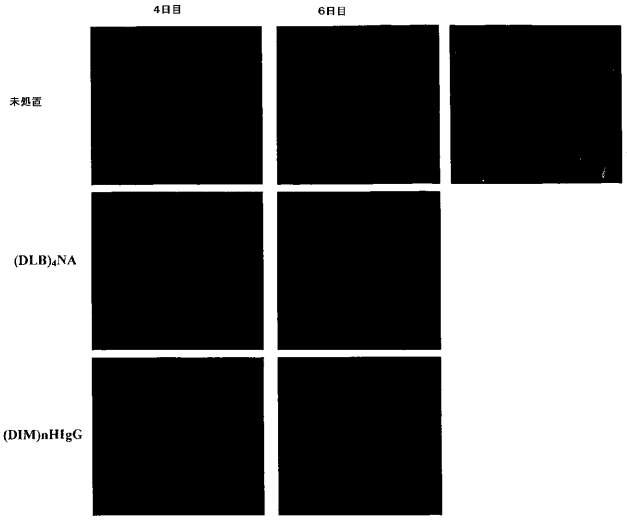


FIG. 15

【図１６】

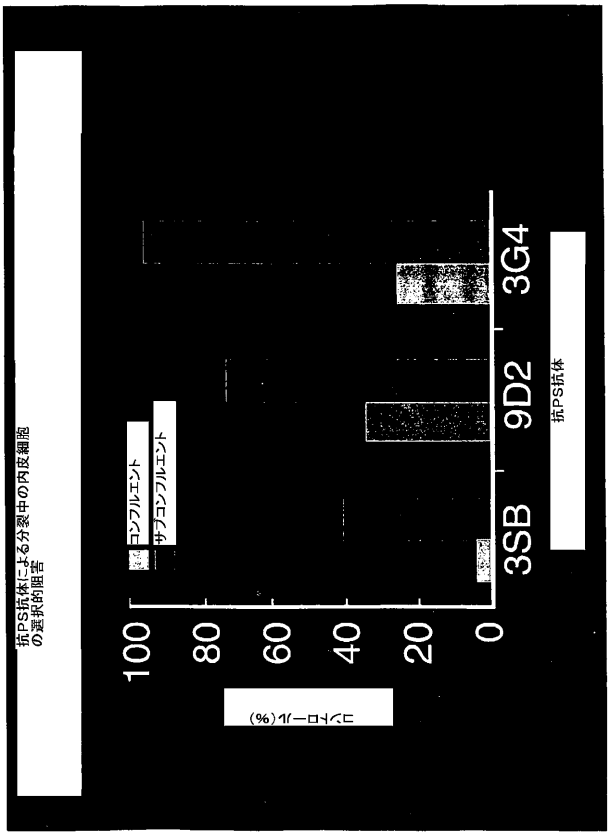


FIG. 16

【図１７－１】

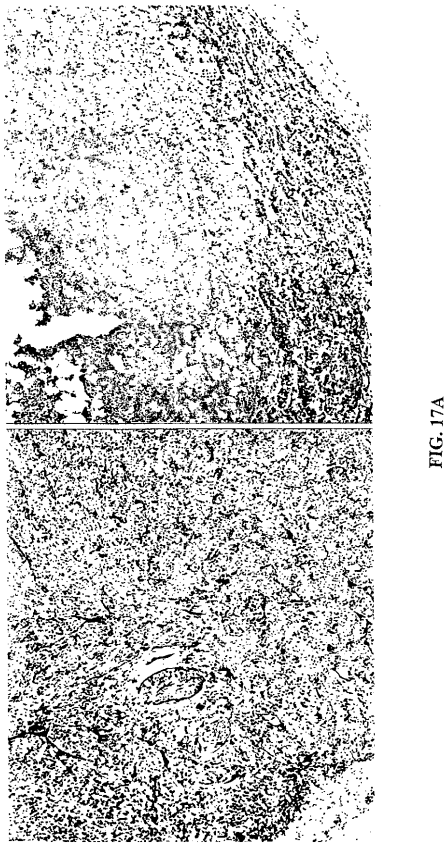


FIG. 17A

【図１７－２】

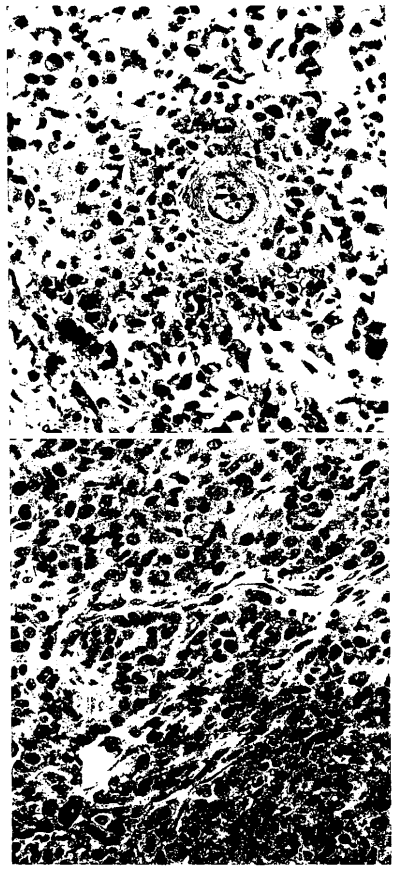


FIG. 17B

【図１８－１】

FIG. 18A

3G4－2BVHのもとの配列：

```
                                    M   G   W   T   W   I   F   I   L   I   L   S   V
121                                 ATG GGA TGG ACC TGG ATC TTT ATT TTA ATC CTG TCA GTA
                                    TAC CCT ACC TGG ACC TAG AAA TAA AAT TAG GAC AGT CAT
                                      PvuII
                                      --------
     T   T   G   V   H   S   E   V   Q   L   Q   Q   S   G   P   E   L   E   K   P
181  ACT ACA GGT GTC CAC TCT GAG GTC CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GAG AAG CCT
     TGA TGT CCA CAG GTG AGA CTC CAG GTC GAC GTC GTC AGA CCT GGA CTC GAC CTC TTC GGA
     G   A   S   V   K   L   S   C   K   A   S   G   Y   S   F   T   G   Y   N   M
241  GGC GCT TCA GTG AAG CTA TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC TCA TTC ACT GGC TAC AAC ATG
     CCG CGA AGT CAC TTC GAT AGG ACG TTC CGA AGA CCA ATG AGT AAG TGA CCG ATG TTG TAC
     N   W   V   K   Q   S   H   G   K   S   L   E   W   I   G   H   I   D   P   Y
301  AAC TGG GTG AAA CAG AGC CAT GGA AAG AGC CTT GAA TGG ATT GGA CAT ATT GAT CCT TAC
     TTG ACC CAC TTT GTC TCG GTA CCT TTC TCG GAA CTT ACC TAA CCT GTA TAA CTA GGA ATG
     Y   G   D   T   S   Y   N   Q   K   F   R   G   K   A   T   L   T   V   D   K
361  TAT GGT GAT ACT TCC TAC AAC CAG AAG TTC AGG GGC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAA
     ATA CCA CTA TGA AGG ATG TTG GTC TTC AAG TCC CCG TTC CGG TGT AAC TGA CAT CTG TTT
     S   S   S   T   A   Y   M   Q   L   K   S   L   T   S   E   D   S   A   V   Y
421  TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AAG AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT
     AGG AGG TCG TGT CGG ATG TAC GTC GAG TTC TCG GAC TGT AGA CTC CTG AGA CGT CAG ATA
     Y   C   V   K   G   G   Y   Y   G   H   W   Y   F   D   V   W   G   A   G   T
481  TAC TGT GTA AAG GGG GGT TAC TAC GGG CAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC
     ATG ACA CAT TTC CCC CCA ATG ATG CCC GTG ACC ATG AAG CTA CAG ACC CCG CGT CCC TGG
       BstEII
       ----------
     T   V   T   V   S   S   A   T   T   T   A   P   S   V   Y   P   L   V   P
541  ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCT ACA ACA ACA GCC CCA TCT GTC TAT CCC TTG GTC CCG GGC
     TGC CAG TGG CAG AGG AGT CGA TGT TGT TGT CGG GGT AGA CAG ATA GGG AAC CAG GGC CCG
     BamHI                   EcoRI                                   XhoI
     --------                --------                                --------
601  GGA TCC CCC GGG CTG CAG GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC CTC GAG GGG
     CCT AGG GGG CCC GAC GTC CTT AAG CTA TAG TTC GAA TAG CTA TGG CAG CTG GAG CTC CCC
```

RACE産物である3G4－2BVHをクローニングして、BstII部位でヒトγ1定常領域上に接合する。従って、これはマウスリーダー配列を含み、そしてそのVHを、以下の方法でヒトCH1配列と接続する：リーダー／3G4VH／VS S－AST

```
      マウスリーダー                ↓成熟タンパク質
  1  MGWTWIFILI LSVTTGVHSE VQLQQSGPEL EKPGASVKLS CKASGYSFTG
 51  YNMNWVKQSH GKSLEWIGHI DPYYGDTSYN QKFRGKATLT VDKSSSTAYM
                                          ↓BstEII 接合部位
101  QLKSLTSEDS AVYYCVKGGY YGHWYFDVWG AGTTVTVSS ASTKGPSVFPL
151  APSSKSTSG                                  ↑ ヒト γ1CH1
```

【図１８－２】

FIG. 18B

3G4－2BVHのもとの配列：

```
                                                                M   D   M   R   A
61                                                              ATG GAC ATG AGG GCT
                                                                TAC CTG TAC TCC CGA
     P   A   Q   I   L   G   F   L   L   L   L   F   P   G   T   R   C   D   I   Q
121  CCT GCA CAG ATT TTG GGC TTC TTG TTG CTC TTG TTT CCA GGT ACC AGA TGT GAC ATC CAG
     GGA CGT GTC TAA AAC CCG AAG AAC AAC GAG AAC AAA GGT CCA TGG TCT ACA CTG TAG GTC
     M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   L   G   E   R   V   S   L   T   C
181  ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC TTA TCT GCC TCT CTG GGA GAA AGA GTC AGT CTC ACT TGT
     TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG AAT AGA CGG AGA GAC CCT CTT TCT CAG TCA GAG TGA ACA
     R   A   S   Q   D   I   G   S   S   L   N   W   L   Q   Q   G   P   D   G   T
241  CGG GCA AGT CAG GAC ATT GGT AGT AGC TTA AAC TGG CTT CAG CAG GGA CCA GAT GGA ACT
     GCC CGT TCA GTC CTG TAA CCA TCA TCG AAT TTG ACC GAA GTC GTC CCT GGT CTA CCT TGA
     I   K   R   L   I   Y   A   T   S   S   L   D   S   G   V   P   K   R   F   S
301  ATT AAA CGC CTG ATC TAC GCC ACA TCC AGT TTA GAT TCT GGT GTC CCC AAA AGG TTC AGT
     TAA TTT GCG GAC TAG ATG CGG TGT AGG TCA AAT CTA AGA CCA CAG GGG TTT TCC AAG TCA
     G   S   R   S   G   S   D   Y   S   L   T   I   S   S   L   E   S   E   D   F
361  GGC AGT AGG TCT GGG TCA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AGC CTT GAG TCT GAA GAT TTT
     CCG TCA TCC AGA CCC AGT CTA ATA AGA GAG TGG TAG TCG TCG GAA CTC AGA CTT CTA AAA
     V   D   Y   Y   C   L   Q   Y   V   S   S   P   P   T   F   G   A   G   T   K
421  GTA GAC TAT TAC TGT CTA CAA TAT GTT AGT TCT CCT CCC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG
     CAT CTG ATA ATG ACA GAT GTT ATA CAA TCA AGA GGA GGG TGC AAG CCA CGA CCC TGG TTC
                                                  BbsI                BamHI
                                                  -------             ---------
     L   E   L   K   R   A   D   A   A   P   T   V   F   I   F   G   R   I   P
481  CTG GAG CTG AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTC TTC ATC TTC GGG CGG ATC CCC CGG
     GAC CTC GAC TTT GCC CGA CTA CGA CGT GGT TGA CAG AAG TAG AAG CCC GCC TAG GGG GCC
```

RACE産物である3G4－2BVLを、BbsI部位でヒトκ定常領域上に移植する。従って、これはマウスリーダー配列を含み、そしてそのVLを、以下の方法でヒトCL1配列内に接続する：リーダー／3G4VL／TVF－IFP

```
      マウスリーダー                ↓成熟タンパク質
  1  MDMRAPAQIL GFLLLLFPGT RCDIQMTQSP SSLSASLGER VSLTCRASQD
 51  IGSSLNWLQQ GPDGTIKRLI YATSSLDSGV PKRFSGSRSG SDYSLTISSL
                                    FR4↓          ↓BbsI 接合部位
101  ESEDFVDYYC LQYVSSPPTF GAGTKLELKR ADAAPTVF IFPPSDEQLKSGTAS
                                          ↑ヒトκ定常
```

【図１９－１】

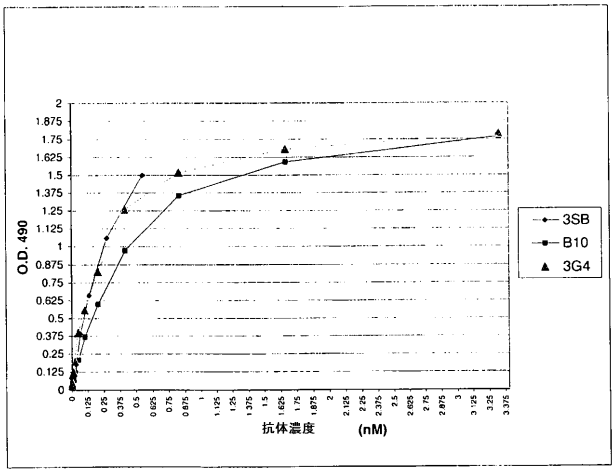


FIG. 19A

【図１９－２】

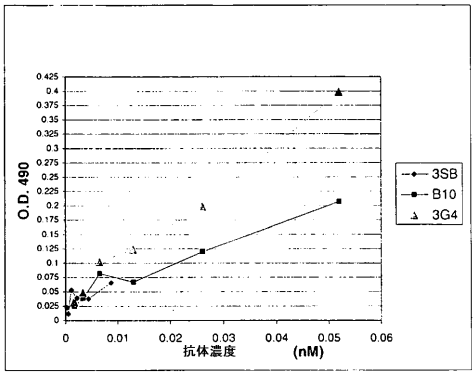


FIG. 19B

【図２０】

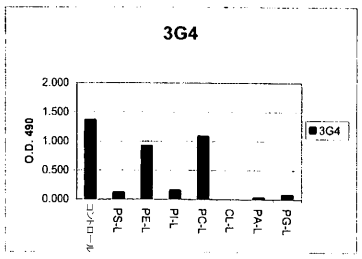


FIG. 20

【図２１】

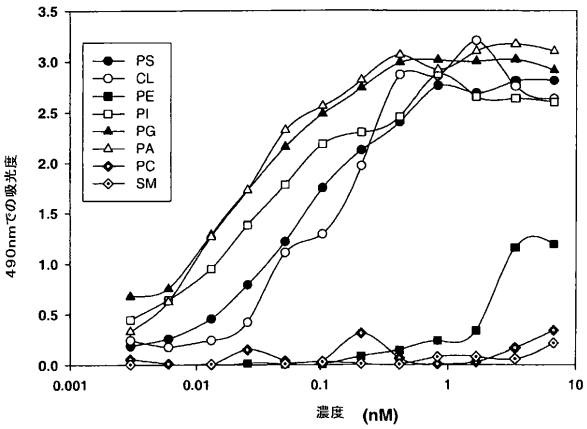


FIG. 21

【図２２】

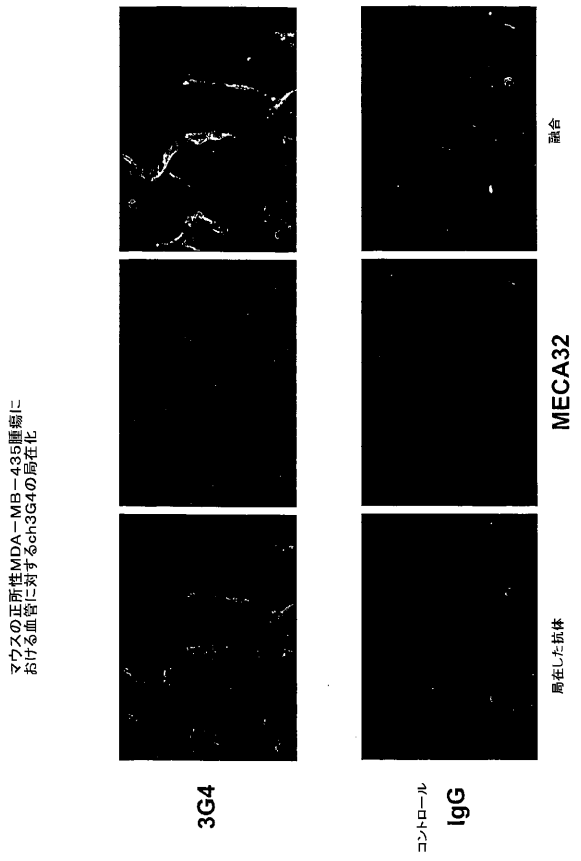


FIG. 22

【図２３】

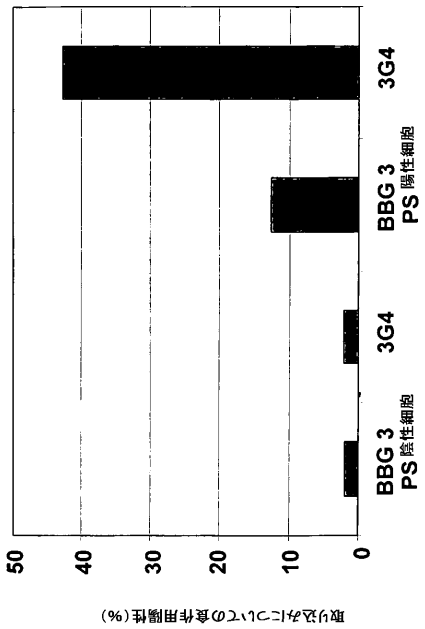


FIG. 23

【図２４－１】

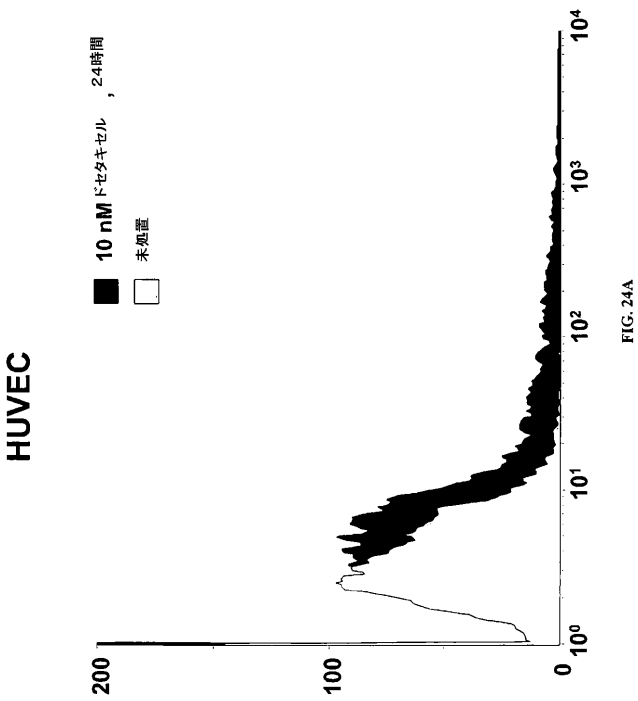


FIG. 24A

【図２４－２】

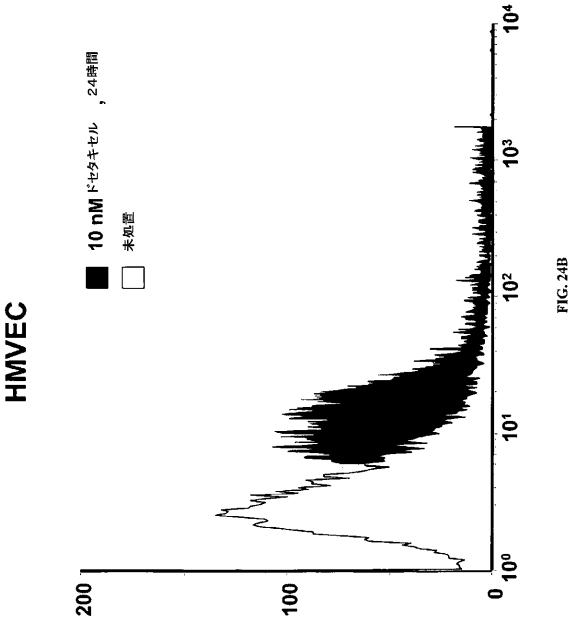


FIG. 24B

【図２５－１】

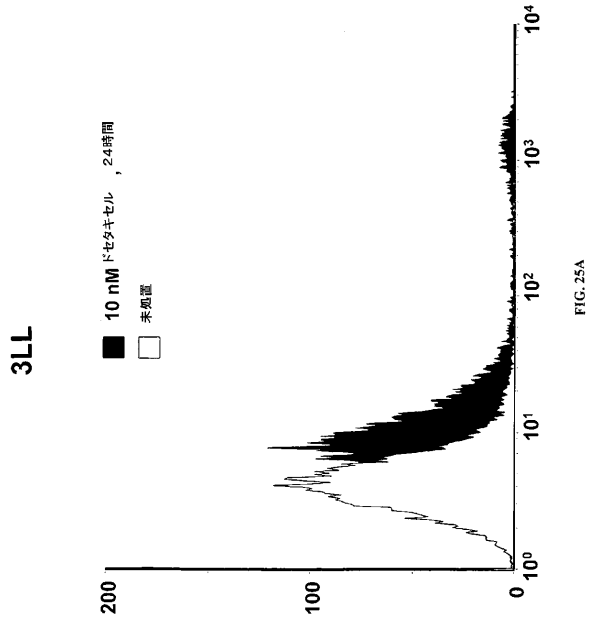


FIG. 25A

【図２５－２】

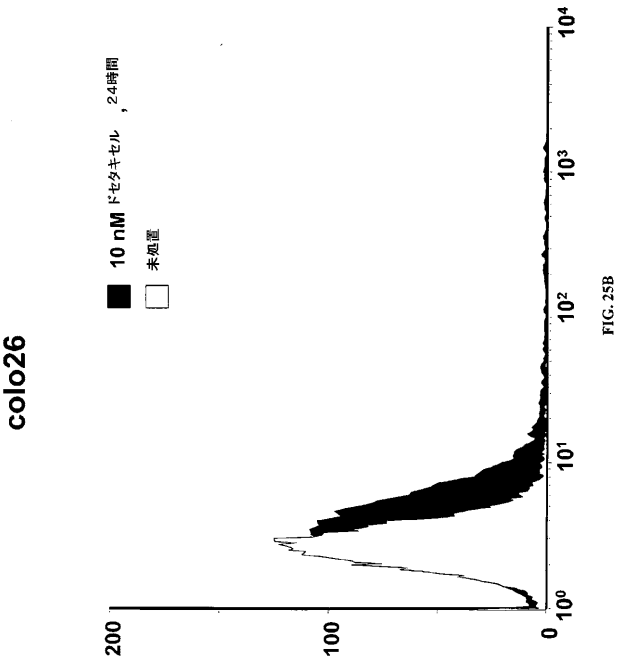


FIG. 25B

【図２５－３】

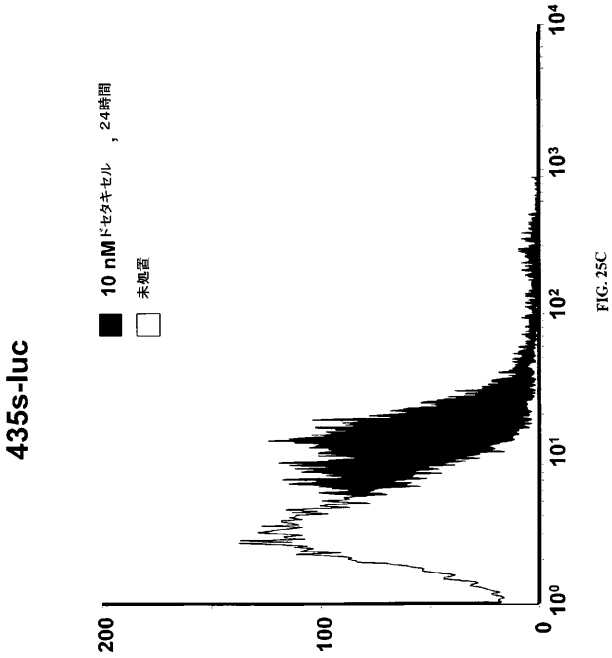


FIG. 25C

【図２６】

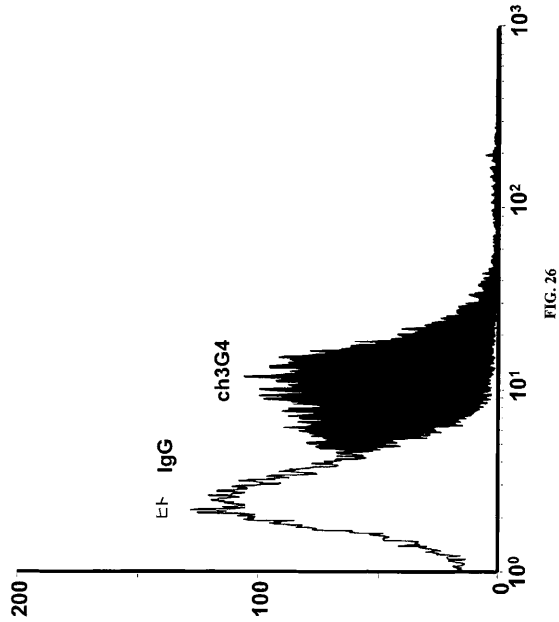


FIG. 26

【図２７】

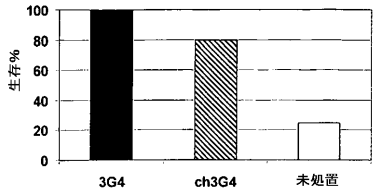


FIG. 27

【図２８】

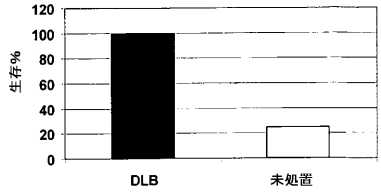


FIG. 28

【図２９】

FIG. 29A

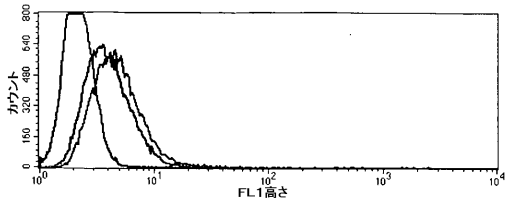
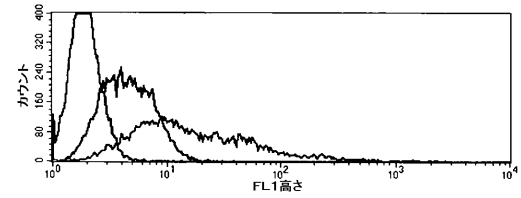


FIG. 29B



【図３０】

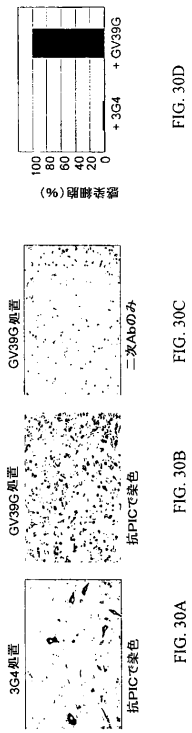


FIG. 30D
FIG. 30C
FIG. 30B
FIG. 30A

【図３１】

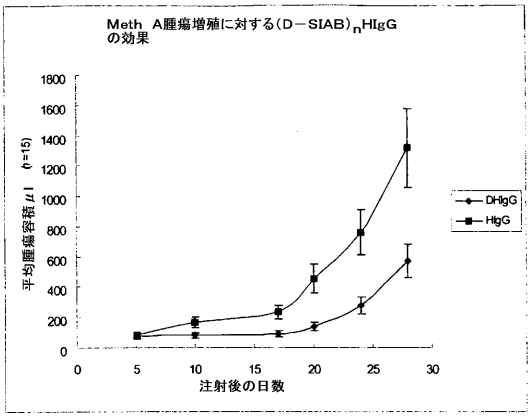


FIG. 31

【図３２】

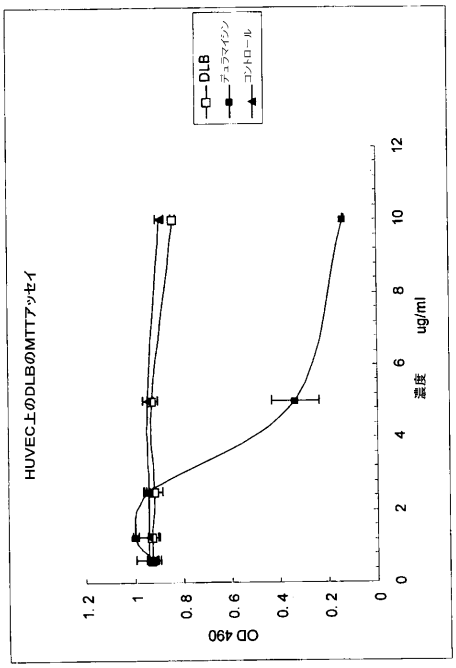


FIG. 32

【図３３】

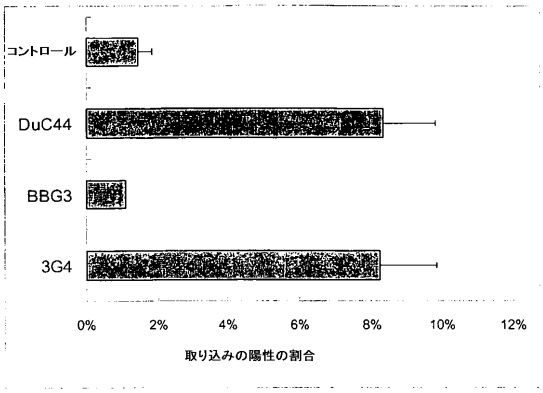


FIG. 33

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***48/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	49/00	Ｃ	４Ｈ０４５
A61K	***47/48***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00		
A61K	***9/127***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/48		
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	9/127		
A61P	***27/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00		
A61P	***19/02***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	27/02		
A61P	***29/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	19/02		
A61P	***9/10***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
A61P	***27/06***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	9/10		
A61P	***17/06***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	27/06		
A61K	***47/42***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	17/06		
G01N	***33/531***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/42		
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/531	Ａ	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		
C07K	*14/195*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/195		
			Ｃ０７Ｋ	16/18		
			Ｃ０７Ｋ	19/00		

(72)発明者　メリナ　エム.　ソーズ
アメリカ合衆国　テキサス　７５０８２,　リチャードソン,　グリーンフィールド　ドライブ　４１２１
(72)発明者　シャンミン　フアン
アメリカ合衆国　テキサス　７５２５２,　ダラス,　ウィンドフラワー　ウェイ　１７９３５
(72)発明者　ヒー　ジン
アメリカ合衆国　テキサス　７５２３５,　ダラス,　フリートウッド　オークス　ドライブ　５２２５,　ナンバー３１５
(72)発明者　ソフィア　ラン
アメリカ合衆国　イリノイ　６２５６１,　リバートン,　ドーソン　サークル　２６エー

Ｆターム(参考)　4B024 AA01 BA38 BA43 BA61 CA04 CA20 DA02 DA06 EA04 GA03 GA11 HA03
4B064 AG27 AG30 CA02 CA10 CA19 CB30 CC24 CE10 DA01 DA05 DA13
4C076 AA19 AA95 BB11 CC41 EE23 EE41 EE59 FF31
4C084 AA13 AA19 MA02 MA24 NA05 NA12 NA13 ZA331 ZA451 ZA891 ZA961 ZB151 ZB261 ZB331 ZC751
4C085 AA14 AA16 AA19 AA21 AA25 AA26 AA27 BB36 BB41 BB43 CC02 CC23 DD62 DD63 DD88 EE01 GG01 HH03 HH05 HH07 JJ05 KA04 KA28 KA29 LL01 LL18
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA17 BA30 BA32 BA41 BA50 BA53 BA55 BA71 BA72 CA11 CA40 DA01 DA02 DA14 DA65 DA76 DA83 DA86 DA89 EA20 EA23 EA28 EA29 EA50 FA50 FA74 GA21

专利名称(译)	与阴离子磷脂和氨基磷脂结合的选定抗体和耐久霉素肽及其在治疗病毒感染和癌症中的用途		
公开(公告)号	JP2015134791A	公开(公告)日	2015-07-27
申请号	JP2015036157	申请日	2015-02-26
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会，德州系统的通用名称		
[标]发明人	フィリップイーソープ メリナエムソーズ シャンミンフアン ヒージン ソフィアラン		
发明人	フィリップ イー. ソープ メリナ エム. ソーズ シャンミン フアン ヒー ジン ソフィア ラン		
IPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 A61P31/12 A61K51/00 A61K49/00 A61K48/00 A61K47/48 A61K9/127 A61K45/00 A61P27/02 A61P19/02 A61P29/00 A61P9/10 A61P27/06 A61P17/06 A61K47/42 G01N33/531 C07K16/46 C12N15/09 C12P21/08 C07K14/195 C07K16/18 C07K19/00 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/10 A61P19/06 A61P31/10 A61P31/22 A61P33/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K16/28 C07K16/44		
CPC分类号	A61K39/395 A61K39/39558 A61K47/62 A61K47/6811 A61K47/6835 A61K47/6849 A61K2039/505 A61P3/04 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/10 A61P19/02 A61P19/06 A61P27/02 A61P27/06 A61P29/00 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P35/00 C07K16/18 C07K16/2836 C07K16/44 C07K2317/24 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/77 A61K2300/00		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.N A61P35/00 A61P31/12 A61K39/395.L A61K49/02.A A61K49/00.C A61K48/00 A61K47/48 A61K9/127 A61K45/00 A61P27/02 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P9/10 A61P27/06 A61P17/06 A61K47/42 G01N33/531.A A61K39/395.D C07K16/46 C12N15/00.A C12P21/08 C07K14/195 C07K16/18 C07K19/00 A61K39/395.NZN.A A61K47/50 A61K47/68 A61K49/00 A61K49/04 A61K49/06 A61K49/08 A61K49/18 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 A61K51/12.200 C12N15/13		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA38 4B024/BA43 4B024/BA61 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/AG30 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CB30 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA05 4B064/DA13 4C076/AA19 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/CC41 4C076/EE23 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF31 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA24 4C084/NA05 4C084/NA12 4C084/NA13 4C084/ZA331 4C084/ZA451 4C084/ZA891 4C084/ZA961 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB331 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/HH03 4C085/HH05 4C085/HH07 4C085/JJ05 4C085/KA04 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/LL01 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA30 4H045/BA32 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/BA53 4H045/BA55 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA02 4H045/DA14 4H045/DA65 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA50 4H045/FA74 4H045/GA21		
代理人(译)	夏木森下		

优先权	60/396263 2002-07-15 US
其他公开文献	JP2015134791A5
外部链接	Espacenet

摘要(译)

公开了关于阴离子磷脂和氨基磷脂在肿瘤脉管系统和病毒进入和扩散中的作用的惊人发现，以及利用这些发现治疗癌症和病毒感染的组合物和方法。还公开了有利的抗体，免疫缀合物和基于耐久霉素的组合物和组合物，其结合并抑制阴离子磷脂和氨基磷脂，用于安全有效地治疗癌症，病毒感染和相关疾病。

(21) 出願番号　特願2015-36157 (P2015-36157)
(22) 出願日　平成27年2月26日 (2015.2.26)
(62) 分割の表示　特願2013-165247 (P2013-165247) の分割
原出願日　平成15年7月15日 (2003.7.15)
(31) 優先権主張番号　60/396,263
(32) 優先日　平成14年7月15日 (2002.7.15)
(33) 優先権主張国　米国 (US)

(71) 出願人　500039463
ボード・オブ・リージエンツ, ザ・ユニバーシテイ・オブ・テキサス・システム
アメリカ合衆国、テキサス・78701、オーステイン、ウエスト・セブンス・ストリート・201
(74) 代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74) 代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72) 発明者　フィリップ　イー.　ソーブ
アメリカ合衆国　テキサス　75205, ダラス,　ビバリー　ドライブ　4321

最終頁に続く