

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 508352

(P2003 - 508352A)

(43)公表日 平成15年3月4日(2003.3.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 0 7 K 14/705	ZNA	C 0 7 K 14/705	ZNA 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 5 0
39/395			N 4 B 0 6 4
		45/00	4 C 0 8 4
45/00		A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 68数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 509766(P2001 - 509766)

(86)(22)出願日 平成12年7月13日(2000.7.13)

(85)翻訳文提出日 平成14年1月15日(2002.1.15)

(86)国際出願番号 PCT/US00/19095

(87)国際公開番号 W001/004157

(87)国際公開日 平成13年1月18日(2001.1.18)

(31)優先権主張番号 60/143,581

(32)優先日 平成11年7月13日(1999.7.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/152,495

(32)優先日 平成11年9月2日(1999.9.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ユニバーシティ・オブ・サザン・カリフォルニア

アメリカ合衆国90007 - 4344カリフォルニア州ロサンゼルス、サウス・ホープ・ストリート3716番、スウィート313

(72)発明者 ブルックス, ピーター シー.

アメリカ合衆国,カリフォルニア 90028,ハリウッド,ホーソーン アベニュー 7054

(72)発明者 ハッサニー, ルーブナ

アメリカ合衆国,カリフォルニア 91301,アグーラ ヒルズ,ディア ブルック ロード 6443

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 MMP - 9および 1 インテグリンに基づくアンタゴニストを用いた血管形成の抑制のための新規な方法および組成物

(57)【要約】

MMP - 9および/または 1 インテグリン内にある種のアミノ酸配列を含むタンパク質 - タンパク質相互作用を修飾するためのアンタゴニストが記載される。このようなアンタゴニストは、血管形成、腫瘍増殖および疾病状態を抑制する。アンタゴニストの例は、ポリペプチドおよび非ポリペプチド分子、例えば、新規の抗体Ma b F M155および新規の合成ペプチドF R I P - 1である。このようなアンタゴニストを投与することによる血管形成および疾患状態の抑制方法が開示される。MMP - 9および/または 1 インテグリン内にある種のアミノ酸配列を含むタンパク質 - タンパク質相互作用を修飾するアンタゴニストの同定方法も開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質 - タンパク質相互作用を修飾することにより血管形成を抑制するアンタゴニストであって、タンパク質 - タンパク質相互作用が第一タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列間の相互作用を含むアンタゴニスト。

【請求項2】 第一タンパク質がMMP - 9である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項3】 第一タンパク質が 1含有インテグリンである請求項1のアンタゴニスト。

【請求項4】 第一タンパク質がMMP - 9であり、第二タンパク質が 1含有インテグリンである請求項1のアンタゴニスト。

【請求項5】 タンパク質 - タンパク質相互作用がMM - 9を 1含有インテグリンと結合させる請求項4のアンタゴニスト。

【請求項6】 1含有インテグリンが 5 1インテグリンである請求項3のアンタゴニスト。

【請求項7】 1含有インテグリンが 5 1インテグリンである請求項4のアンタゴニスト。

【請求項8】 タンパク質 - タンパク質相互作用が細胞表面または血管における第一タンパク質および第二タンパク質の同時局在化を引き起こす請求項1のアンタゴニスト。

【請求項9】 血管形成を抑制する請求項1のアンタゴニスト。

【請求項10】 腫瘍増殖を抑制する請求項1のアンタゴニスト。

【請求項11】 転移を抑制する請求項1のアンタゴニスト。

【請求項12】 疾患状態を抑制する請求項1のアンタゴニスト。

【請求項13】 疾患が乾癬、黄斑変性、神経学的疾患またはある組織における再狭窄である請求項12のアンタゴニスト。

【請求項14】 モノクローナル抗体である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項15】 前記モノクローナル抗体がモノクローナル抗体FM155である請求項14のアンタゴニスト。

【請求項16】 モノクローナル抗体F M155の少なくとも1つの標的に対する結合特異性を有する請求項1のアンタゴニスト。

【請求項17】 ポリクローナル抗体である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項18】 ポリペプチド、線状ペプチドまたは環状ペプチドである請求項1のアンタゴニスト。

【請求項19】 非ペプチド化合物である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項20】 小型有機化合物である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項21】 オリゴヌクレオチドである請求項1のアンタゴニスト。

【請求項22】 ヒト化または化学的修飾化モノクローナル抗体である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項23】 モノクローナル抗体の断片である請求項1のアンタゴニスト。

【請求項24】 細胞傷害剤または細胞分裂抑制剤に結合される請求項1のアンタゴニスト。

【請求項25】 血管形成および/または腫瘍増殖を抑制するためのポリペプチドであって、MMP-9に対する配列番号3の結合能力より有意に大きい結合親和性でMMP-9と特異的に結合するポリペプチド。

【請求項26】 タンパク質である請求項25のポリペプチド。

【請求項27】 配列番号1からなる配列を有する請求項25のポリペプチド。

【請求項28】 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号1を含む請求項25のポリペプチド。

【請求項29】 モノクローナル抗体である請求項25のポリペプチド。

【請求項30】 モノクローナル抗体がF M155である請求項29のポリペプチド。

【請求項31】 血管形成または腫瘍増殖を抑制するためのポリペプチドであって、 $\alpha 1$ 含有インテグリンに対する配列番号3の結合親和性より有意に大きい結合親和性で $\alpha 1$ 含有インテグリンと特異的に結合するポリペプチド。

【請求項32】 タンパク質である請求項31のポリペプチド。

【請求項33】 配列番号1である請求項31のポリペプチド。

【請求項34】 ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号1を含む請求項31のポリペプチド。

【請求項35】 モノクローナル抗体である請求項31のポリペプチド。

【請求項36】 モノクローナル抗体がF M155である請求項35のポリペプチド。

【請求項37】 配列番号1と特異的に結合するが、配列番号3とは実質的に低減された親和性で結合するアンタゴニスト。

【請求項38】 血管形成を抑制する請求項37のアンタゴニスト。

【請求項39】 腫瘍増殖を抑制する請求項37のアンタゴニスト。

【請求項40】 ポリペプチドである請求項37のアンタゴニスト。

【請求項41】 タンパク質である請求項40のポリペプチド。

【請求項42】 配列番号1を含む請求項40のポリペプチド。

【請求項43】 モノクローナル抗体である請求項40のポリペプチド。

【請求項44】 モノクローナル抗体がF M155である請求項43のポリペプチド。

【請求項45】 細胞表面または血管におけるMMP-9の局在化を乱すアンタゴニスト。

【請求項46】 血管形成を抑制する請求項45のアンタゴニスト。

【請求項47】 腫瘍増殖を抑制する請求項45のアンタゴニスト。

【請求項48】 ポリペプチドである請求項45のアンタゴニスト。

【請求項49】 タンパク質である請求項48のポリペプチド。

【請求項50】 配列番号1を含む請求項48のポリペプチド。

【請求項51】 モノクローナル抗体である請求項48のポリペプチド。

【請求項52】 モノクローナル抗体がF M155である請求項51のポリペプチド。

【請求項53】 組織中の血管形成の抑制方法であって、請求項1のアンタゴニストを投与することを含む方法。

【請求項54】 前記アンタゴニストが静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内

、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される請求項53の方法。

【請求項55】 前記アンタゴニストが化学療法とともに投与される請求項53の方法。

【請求項56】 前記アンタゴニストが放射線照射とともに投与される請求項53の方法。

【請求項57】 組織が炎症を起こし、血管形成が起きている請求項53の方法。

【請求項58】 組織が哺乳類に存在する請求項57の方法。

【請求項59】 組織が関節炎、眼、網膜または血管腫である請求項58の方法。

【請求項60】 組織中の腫瘍増殖または転移の抑制方法であって、請求項1のアンタゴニストを投与することを包む方法。

【請求項61】 前記アンタゴニストが静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、局所的または経口的に投与される請求項60の方法。

【請求項62】 前記アンタゴニストが化学療法とともに投与される請求項60の方法。

【請求項63】 前記アンタゴニストが放射線照射とともに投与される請求項60の方法。

【請求項64】 腫瘍または転移が黒色腫、癌腫、肉腫、繊維肉腫、神経膠腫または星状細胞腫である請求項60の方法。

【請求項65】 請求項1のアンタゴニストを投与することによる乾癬、黄斑変性またはある組織における再狭窄の抑制方法。

【請求項66】 前記アンタゴニストが静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される請求項65の方法。

【請求項67】 前記アンタゴニストが化学療法とともに投与される請求項65の方法。

【請求項68】 前記アンタゴニストが放射線照射とともに投与される請求

項65の方法。

【請求項69】 請求項1のアンタゴニストを前記組織と接触させることによる組織中の血管形成の検出方法。

【請求項70】 前記組織が生体外である請求項69の方法。

【請求項71】 前記組織が生体内であり、そして前記アンタゴニストが静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される請求項69の方法。

【請求項72】 前記アンタゴニストが蛍光色素、放射性タグ、常磁性重金属、診断用染料または酵素と複合される請求項69の方法。

【請求項73】 請求項1のアンタゴニストの投与による腫瘍または腫瘍侵襲の検出方法。

【請求項74】 前記組織が生体外である請求項73の方法。

【請求項75】 前記組織が生体内であり、そして前記アンタゴニストが静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される請求項73の方法。

【請求項76】 前記アンタゴニストが蛍光色素、放射性タグ、常磁性重金属または診断用染料と複合される請求項73の方法。

【請求項77】 MMP-9アンタゴニストに関するスクリーニング方法であって、以下の：

- a) 推定アンタゴニストを提供し、
- b) MMP-9との結合に関する前記推定アンタゴニストの第一親和性を測定し、
- c) MMP-9との結合に関する配列番号3の第二親和性を測定し、
- d) 前記第二親和性が前記第一親和性より実質的に低い場合にはMMP-9アンタゴニストとして前記推定アンタゴニストを選択することを含む方法。

【請求項78】 前記推定アンタゴニストが非ペプチド化合物である請求項77の方法。

【請求項79】 前記非ペプチド化合物が小型有機化合物である請求項77

の方法。

【請求項80】 前記非ペプチド化合物がオリゴヌクレオチドである請求項78の方法。

【請求項81】 前記推定アンタゴニストがポリペプチド、線状ペプチドまたは環状ペプチドである請求項77の方法。

【請求項82】 前記推定アンタゴニストが抗体である請求項77の方法。

【請求項83】 前記抗体がモノクローナルである請求項82の方法。

【請求項84】 前記抗体がポリクローナルである請求項82の方法。

【請求項85】 前記第一および前記第二親和性が酵素結合免疫吸着剤検定により測定される請求項77の方法。

【請求項86】 前記第二親和性が前記第一親和性の約3分の1である請求項77の方法。

【請求項87】 前記第二親和性が前記第一親和性の約5分の1である請求項77の方法。

【請求項88】 前記第二親和性が前記第一親和性の約10分の1である請求項77の方法。

【請求項89】 1インテグリンアンタゴニストに関するスクリーニング方法であって、以下の：

- a) 推定アンタゴニストを提供し、
- b) 1インテグリンとの結合に関する前記推定アンタゴニストの第一親和性を測定し、
- c) 前記 1インテグリンとの結合に関する配列番号3の第二親和性を測定し、
- d) 前記第二親和性が前記第一親和性より実質的に低い場合には 1インテグリンアンタゴニストとして前記推定アンタゴニストを選択することを含む方法。

【請求項90】 前記推定アンタゴニストが非ペプチド化合物である請求項89の方法。

【請求項91】 前記非ペプチド化合物が小型有機化合物である請求項89

の方法。

【請求項92】 前記非ペプチド化合物がオリゴヌクレオチドである請求項90の方法。

【請求項93】 前記推定アンタゴニストがポリペプチド、線状ペプチドまたは環状ペプチドである請求項89の方法。

【請求項94】 前記推定アンタゴニストが抗体である請求項89の方法。

【請求項95】 前記抗体がモノクローナルである請求項93の方法。

【請求項96】 前記抗体がポリクローナルである請求項93の方法。

【請求項97】 前記第一および前記第二親和性が酵素結合免疫吸着剤検定により測定される請求項89の方法。

【請求項98】 前記第二親和性が前記第一親和性の約3分の1である請求項89の方法。

【請求項99】 前記第二親和性が前記第一親和性の約5分の1である請求項89の方法。

【請求項100】 前記第二親和性が前記第一親和性の約10分の1である請求項89の方法。

【請求項101】 請求項1のアンタゴニストにより認識されるエピトープをコードする配列を含むペプチド。

【請求項102】 前記アンタゴニストがモノクローナル抗体である請求項101のペプチド。

【請求項103】 前記抗体がF M155である請求項102のペプチド。

【請求項104】 前記ペプチドが配列番号1である請求項101のペプチド。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

関連出願データ

本出願は、米国特許出願第60/152,495号（1999年9月2日出願）および第60/143,581号（1999年7月13日出願）（これらの記載内容はともに、参照により本明細書に含まれる）の35 U.S.C.119(e) 下での利点を要求する。

【0002】

政府後援

本発明は、National Institute of Healthによる約定番号R29CA74132下での政府後援により成された。

【0003】

産業上の利用分野

本発明は、一般的に医療分野に関するものであり、特にMMP - 9および/または 1 インテグリン内で見出された特定の配列のアンタゴニストを用いて、組織における血管形成を抑制するための、あるいは血管形成を検出するための方法および組成物に関する。

【0004】

発明の背景

腫瘍の増殖および転移は、毎年多数の人々に衝撃を与えている。実際、米国だけで毎年、優に600,000例を越える癌の新症例が診断されている（Varner, J.A., Brooks, P.C. および Cheres, D.A. (1995) Cell Adh. Commun. 3, 367-374）。すべての固形腫瘍の増殖は、最小サイズを超えた腫瘍の連続拡張のためには新規の血管増殖を要する、ということを経験してきた（Varner 他 1995; Blood, C.H. および Zetter, B.R. (1990) Biocim. Biophys. Acta. 1032: 89-118; Weidner, N. 他 (1992) J. Natl. Cancer Inst.84:1875-1887; Weidner, N. 他 (1991) . N. Engl. J. Med. 324:1-7; Brooks, P.C. 他 (1995) J. Clin. Invest. 96:1815-1822; Brooks, P.C. 他 (1994) Cell 79:1157-1164; Brooks, P.C. 他 (1996) Cell 85, 683-693; Brooks, P.C. 他 (1998) Cell 92:391-400）。眼性疾患、例えば、黄斑変性および糖尿病性網膜症を含めた広範な種々の

その他のヒト疾患も、不規則血管発達により特性化される。さらに、多数の炎症性疾患も、非制御化新生血管形成 (neovascularization)、例えば、関節炎および乾癬に関連する (Varner 他 1995)。

【0005】

新しい血管は、血管形成 (angiogenesis) として既知の生理学的過程により先在する血管から発達する (Varner 他 1995; Blood および Zetter 1990; Weidner 他 1992)。この複雑な過程は、増殖因子、細胞接着受容体、マトリックス分解酵素および細胞外マトリックス構成成分を含めた種々の分子の協同作用を要する (Varner 他 1995; Blood および Zetter 1990; Weidner 他 1992)。したがって、血管形成を遮断するよう意図された療方は、固形腫瘍の増殖に影響を及ぼし得る。実際、腫瘍新生血管形成の遮断は種々の動物モデルにおける腫瘍増殖を抑制し得るという明らかな証拠が提示されており、ヒト臨床データはこの論点を同様に支持し始めている (Varner, J.A., Brooks, P.C. および Cheresch, D.A. (1995) Cell Adh. Commun. 3, 367-374)。

【0006】

血管形成の抑制は、(1)「血管形成分子」、例えば、FGF (繊維芽細胞増殖因子) の放出の抑制、(2)抗-FGF抗体の使用によるといった血管形成分子の中和、および(3)血管形成性刺激に対する内皮細胞応答の抑制により影響され得る、ということも提唱されている。この後者の戦略は、注目されており、Folkman等 (Cancer Biology, 3:89-96 (1992)) は、血管形成を抑制するために用い得るいくつかの内皮細胞応答阻害剤、例えば、コラゲナーゼ阻害剤、基底膜代謝回転阻害剤、血管分裂抑制ステロイド、真菌由来血管形成阻害剤、血小板因子4、トロンボスポンジン、関節炎薬、例えば、D-ペニシラミンおよび金チオマレエート、ビタミンD3類似体、 α -インターフェロン等を記載している。血管形成の提唱されたさらに別の阻害剤に関しては、Blood および Zetter 1990; Moses 他 (1990) 「Science」 248:1408-1410; Ingber 他 (1988) 「Lab. Invest.」 59:44-51; および米国特許第5,092,885号、第5,112,946号、第5,192,744号および第5,202,352号を参照されたい。

【0007】

血管形成を遮断するために、多数の研究者が血管形成を開始する増殖因子およびサイトカインに焦点を絞ってきた (Varner 他 1995; Blood および Zetter 1990; Weidner 他 1992; Weidner 他 1991; Brooks 他 1995; Brooks 他 1994; Brooks 他 1997)。しかしながら、血管形成を刺激する能力を有する多数の別個の増殖因子およびサイトカインが存在する。単一サイトカインを遮断することの療法的利点は、この冗長性のために限定された利点を有し得るに過ぎない。したがって、必要なのは、血管形成およびタンパク質分解を抑制するためのその他の抗-血管形成性標的である。

【0008】

発明の要約

侵襲性細胞は、細胞表面にタンパク質分解活性を局在させるために、そして侵襲性細胞行動を促すために、酵素およびインテグリン受容体を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を利用する。本発明は、細胞接着および細胞外マトリックス (ECM) のタンパク質分解を標的にするアンタゴニストを用いて血管形成および腫瘍増殖を抑制するための方法および組成物を提供する。特に本発明は、細胞表面に関与する、侵襲性細胞がタンパク質分解活性を局在化する、独特のメカニズムの発見に基づいた血管形成を抑制するための新規の組成物および方法を提供する。

【0009】

本発明の特定の一局面は、細胞接着および細胞外マトリックス (ECM) のタンパク質分解のアンタゴニストを含むタンパク質-タンパク質相互作用の血管形成アンタゴニストを抑制するための組成物を提供する。

【0010】

本発明の別の局面は、タンパク質分解酵素 MMP-9 および / または 1 インテグリン受容体内に見出されるある種の配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を修飾するアンタゴニストを含む血管形成を抑制するための組成物を提供する。このようなアンタゴニストとしては、MMP-9 および 1 インテグリン受容体と免疫反応する抗体またはその機能的断片、あるいは MMP-9 および 1 インテグリン受容体の複合体に対する特異性を有するポリペプチドまたはペ

プチドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0011】

本発明のさらに別の局面は、細胞接着および細胞外マトリックス（ECM）のタンパク質分解のアンタゴニスト、例えば、MMP-9および α 1インテグリン受容体と免疫反応する抗体またはその機能的断片、あるいはMMP-9および α 1インテグリン受容体の複合体に対する特異性を有するポリペプチドまたはペプチド（これらに限定されない）に組織を接触させることを包含する血管形成の抑制方法を含む。

【0012】

本発明の別の局面は、疾病状態または組織中の血管形成の抑制方法も記載する。これらの方法は、例えば、血管形成抑制量のタンパク質分解酵素MMP-9の細胞表面への局在のアンタゴニストを含む組成物を組織に投与することを含む。

【0013】

本発明が適用される疾病状態は、腫瘍増殖または転移、黄斑変性、乾癬、ある組織における再狭窄等であり得る。

処置される組織は、血管形成の抑制が望ましい任意の組織、例えば、新生血管形成が起こりつつある疾病組織である。組織の例としては、炎症組織、固形腫瘍、転移、再狭窄を受けている組織等が挙げられる。

【0014】

本発明のアンタゴニストを組織と接触させることによる、血管形成、腫瘍性組織、転移および組織への腫瘍侵襲を検出するための方法も提供される。

本発明は、本発明のアンタゴニストをスクリーニングするための方法も提供する。

【0015】

（発明の詳細な説明）

本発明にしたがって、タンパク質分解酵素MMP-9および α 1インテグリン受容体内にある種の配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用が、細胞表面にタンパク質分解活性を局在化することにより血管形成および/または腫瘍増殖に関与する、ということが発見された。したがって、MMP-9およ

び/または 1 インテグリン受容体内に見出されるある種の配列を包含するこのようなタンパク質 - タンパク質相互作用を修飾することは血管形成および/または腫瘍増殖を阻害し得る。

【0016】

MMP - 9 および 1 インテグリン間の相互作用

MMP - 9

生理学的状態においては、結合組織の合成は細胞外マトリックスの分解と動的平衡状態にある。その分解は、一部は、結合組織の分解およびリモデリングに関与するプロテアーゼ(酵素)の一ファミリーであるマトリックスメタロプロテアーゼ(「MMP」)による。このファミリーのエンドペプチダーゼ酵素の成員は、結合組織中に存在するかまたはそれに関連した種々の種類の細胞、例えば、繊維芽細胞、単球、マクロファージ、内皮細胞および侵襲性または転移性腫瘍細胞からプロ酵素として分泌される。MMP発現は、局所組織環境中の増殖因子およびサイトカインにより刺激されるが、この場合、これらの酵素は細胞外マトリックスのタンパク質構成成分、例えば、コラーゲン、プロテオグリカン(タンパク質コア)、フィブロネクチンおよびラミニンを特異的に分解するよう作用する。これらの遍在性細胞外マトリックス構成成分は、関節、間隙性結合組織、基底膜および軟骨の内張り中に存在する。MMPは、亜鉛およびカルシウム依存性、チモーゲンとしての分泌および40~50%アミノ酸配列相同性を含めた多数の特性を共有する。

【0017】

MMPによる細胞外マトリックスの過剰分解は、慢性および急性の両方の多数の疾患の病因に関係がある。例えば、「Exp. Opin. Invest. Drugs」5, 323-335(1996)で再検討されているような多数の研究が、MMPの発現および活性化は腫瘍の増殖、侵襲および転移における重大事象であることを確定している。さらに、MMP活性は、腫瘍増殖にならびにその他の病理学的症状、例えば、黄斑変性に必要である血管形成のために必要であることが見出されている。

【0018】

このファミリーの酵素の成員としては、コラゲナーゼ(MMP - 1)、ゼラチ

ナーゼまたはI V型コラゲナーゼ(MMP - 2、MMP - 9)、マトリリシン(MMP - 7、PUMP - 1)およびストロメリシン(MMP - 3)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

ここで特に興味深いのは、ゼラチナーゼMMP - 9が、単核貪食細胞、好中球、隔膜上皮細胞、腫瘍細胞、栄養膜細胞層およびケラチノサイトにより放出される92-kD酵素であることである。

【0020】

多数の生理学的過程が、細胞が他の細胞および/または細胞外マトリックスとぴったり接触するようになることを必要とする。このような接着事象は、細胞の活性化、移動、増殖および分化に必要であり得る。細胞 - 細胞および細胞 - マトリックス相互作用は、セレクチン、インテグリン、カドヘリンおよび免疫グロブリンを含めた細胞接着分子(Cam)のいくつかのファミリーにより媒介される。Camは、正常および病理生理学的過程の両方において本質的役割を演じる。したがって、正常細胞機能の妨害を伴わないある種の疾患状態における特定のおよび関連するCamのターゲティングは、細胞 - 細胞および細胞 - マトリックス相互作用を抑制する有効且つ安全な治療薬には不可欠である。

【0021】

前記の種々のCamのうち、インテグリンスーパーファミリーは、ほとんどすべての哺乳類細胞型に関する種々の組合せにおいて見出される(再検討のためには、E.C. Butcher, Cell, 67, 1033 (1991); T.A. Springer, Cell, 76, 301 (1994); D. Cox 他 "The Pharmacology of the Integrins." Medicinal Research Rev. 14, 195 (1994) およびV.W. Engleman 他 "Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets." in Ann. Repts. in Medicinal Chemistry, Vol. 31, J.A. Bristol 編; Acad. Press, NY, 1996, p.191参照)。

【0022】

インテグリンは、接着受容体の最良に特性化されたスーパーファミリーのうちの1つを代表する。インテグリンは、非共有的会合アルファ()およびベータ()サブユニットを含有する糖タンパク質ヘテロ二量体である。インテグリン

サブユニットは、細胞外マトリックスまたは細胞構成成分と相互作用するための細胞外ドメイン、細胞膜に及ぶ膜貫通ドメイン、ならびに1つ以上の細胞骨格構成成分と相互作用するための細胞質ドメインを含有する膜貫通タンパク質である。

【0023】

対合して少なくとも20の異なるインテグリン分子を生成し得る14の既知のアルファサブユニットおよび8つの既知のサブユニットが存在する。いくつかの別個のインテグリン鎖は、ある型の鎖と対合して鎖サブファミリーを形成し得る。

【0024】

ここで特に興味深いのは、サブ1()サブファミリーで、これは、7つの成員(VLAタンパク質: 1 1~ 7 1としても既知である)を含む。下記の例が示すように、血管形成および疾患状態は、このようなインテグリンの一例である1インテグリン 5 1のある種のアミノ酸配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を修飾するためのアンタゴニストを用いて抑制し得る。本明細書を通して、1インテグリンおよび1含有インテグリンという用語は、交換可能的に用いられる。

【0025】

本発明のアンタゴニスト

本明細書中に提供された実施例は、MMP-9がインテグリン、5 1インテグリンと直接結合することを確定する。したがって、1インテグリンを作るための遺伝子を欠く細胞は、かなり低減されたMMP-9結合能力を示す。実施例は、MMP-9および5 1インテグリンがヒト血管区画内ならびに腫瘍細胞それ自体に密接に関連していることを示すために、MMP-9および5 1インテグリンが細胞の表面および血管に同時局在化し得るということも示唆する。

【0026】

さらにMMP-9および5 1インテグリンのアミノ酸配列の分析は、これら2つのタンパク質間の相互作用を媒介するためのFRIP-1(配列番号1)

と同定されるポリペプチドをもたらす。FRIP-1はMMP-9と結合するが、しかし対照ペプチドAAAA（配列番号3）は実質的に低減された親和性で、MMP-9と結合する。FRIP-1は、血管形成を抑制することが判明した。

【0027】

さらに、実施例が示すように、FRIP-1は、MMP-9および/または51インテグリン内にある種のアミノ酸配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を修飾するためのアンタゴニストを同定するために用い得る。したがって、Mab FM155は、担体タンパク質と結合されたFRIP-1をマウスに注入することにより同定された。Mab FM155は、FRIP-1に対する高特異性を有するが、しかし対照ペプチドAAAA：配列番号3と反応しなかった。

【0028】

Mab FM155は腫瘍増殖を生体内で強力に抑制し得ることを実施例は説明する。したがってMab FM155は、MMP-9および/または51インテグリン内にある種のアミノ酸配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を修飾する。

【0029】

本発明のアンタゴニストは、あらゆる種類の分子であり得る。その例としては、ペプチド、ポリペプチド、非ペプチド分子、例えば、有機分子およびオリゴヌクレオチド、タンパク質、酵素、抗体（モノクローナルおよびポリクローナル）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

本発明のアンタゴニストはFRIP-1と結合するが、しかし実質的に低減化された親和性で対照ペプチドAAAAと結合する。見掛けの親和性は、酵素結合免疫吸着剤検定（ELIS）のような方法によりまたは当業者に周知の任意のその他の技法により確定し得る。真の親和性は、当業者に既知の技法により測定し得る。

【0031】

さらに、当業者に既知であるように、Mab FM155により限定されるエピ

トープに特異的に向けられるその他のアンタゴニストは、同様の抗血管形成および抗腫瘍活性を有し得る。このようなアンタゴニストとしては、付加的機能遮断 M a b、ヒト化 M a b、キメラ M a b、毒素結合 M a b、ポリクローナル抗体、このエピトープに向けられる小型ペプチドアンタゴニスト、ならびに F M 155により限定されるエピトープの有機および非ペプチド性模倣物が挙げられる。さらに、モノクローナル抗体 F M 155により限定されるエピトープは、それ自体、有力な抗血管形成および/または抗腫瘍化合物として機能する。さらにアンタゴニストにより認識されるペプチド含有エピトープは、それ自体用い得る。したがって、本発明はいくつかの実施態様を採用し得る。

【0032】

例えば、本発明の一実施態様は、タンパク質 - タンパク質相互作用を特異的に修飾するアンタゴニストであって、この場合、タンパク質 - タンパク質相互作用は第一タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列間の相互作用を含む。このようなアンタゴニストの第一タンパク質は、MMP - 9であり、あるいはそれは 1 含有インテグリンであり得る。あるいは、第一タンパク質はMMP - 9であり、第二タンパク質は 1 含有インテグリンであり得る。さらにこのような場合、タンパク質 - タンパク質相互作用はMMP - 9を 1 含有インテグリンと結合させるようなものであり得る。

【0033】

あるいは、第一タンパク質が 1 含有インテグリンである場合、それは 5 1 インテグリンであるか、あるいは第二タンパク質が 1 含有インテグリンである場合、それは 5 1 インテグリンであり得る。

【0034】

一実施態様では、アンタゴニストはタンパク質 - タンパク質相互作用が、細胞表面または血管における第一タンパク質および第二タンパク質の同時局在化を引き起こすようなものである。

【0035】

本発明のアンタゴニストは、血管形成、腫瘍増殖または転移を抑制するアンタ

ゴニストである。一般の場合、それは疾患を抑制するアンタゴニストであり得る。このような疾患の例は、乾癬、黄斑変性、神経学的疾患およびある組織における再狭窄である。

【0036】

別の実施態様では、本発明のアンタゴニストはモノクローナル抗体である。例えば、それはM a b F M155であり得るし、それはモノクローナル抗体F M155、ヒト化または化学的修飾化モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体の断片の少なくとも1つの標的に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体であり得る。あるいはそれは、ポリクローナル抗体であり得る。

【0037】

さらに別の実施態様では、本発明のアンタゴニストは、ポリペプチド、線状ペプチドまたは環状ペプチドである。あるいはそれは、非ペプチド化合物であり得る。例えば、本発明のアンタゴニストは、小型有機化合物またはオリゴヌクレオチドであり得る。

【0038】

一実施態様では、本発明のアンタゴニストは細胞傷害剤または細胞分裂抑制剤に結合される。

【0039】

別の実施態様では、本発明は、血管形成または腫瘍増殖を抑制するためのポリペプチドであって、この場合、ポリペプチドはMMP - 9に対する配列番号3の結合能力より有意に大きい結合能力でMMP - 9と特異的に結合する。例えば、このようなポリペプチドはタンパク質である。

【0040】

好ましい一実施態様では、本発明のポリペプチドは配列番号1である。あるいはポリペプチドは、ポリペプチドのアミノ酸配列が配列番号1を含むようなものである。

【0041】

さらに別の実施態様では、本発明のポリペプチドはモノクローナル抗体である。例えば、ポリペプチドは、モノクローナルF M155である。

別の実施態様では、本発明は、血管形成または腫瘍増殖を抑制するためのポリペプチドであって、この場合、ポリペプチドは 1 含有インテグリンに対する配列番号 3 の結合能力より有意に大きい結合能力で 1 含有インテグリンと特異的に結合する。この実施態様では、ポリペプチドは、タンパク質、配列番号 1 であり、そのアミノ酸配列が配列番号 1 を含むポリペプチド、またはモノクローナル抗体、例えば、F M155である。

【0042】

別の実施態様では、本発明は、配列番号 1 と特異的に結合するが、しかし配列番号 3 とは実質的に低減された親和性で結合するアンタゴニストである。このようなアンタゴニストは、血管形成および腫瘍増殖を抑制する。この実施態様では、アンタゴニストは、ポリペプチド、例えば、タンパク質であるか、またはそれは、そのアミノ酸配列が配列番号 1 を含むポリペプチドである。ポリペプチドはモノクローナル抗体、例えば、F M155であり得る。

【0043】

別の実施態様では、本発明は、細胞表面または血管における MMP - 9 の局在を乱すアンタゴニストである。この実施態様では、アンタゴニストは、血管形成および腫瘍増殖を抑制するようなものである。さらに、このようなアンタゴニストは、ポリペプチド、例えば、タンパク質、そのアミノ酸配列が配列番号 1 を含むポリペプチド、またはモノクローナル抗体、例えば、F M155であるポリペプチドである。

【0044】

別の実施態様では、本発明は、タンパク質タンパク質相互作用を特異的に修飾するアンタゴニストにより認識されるエピトープをコードする配列を含むペプチドであって、この場合、タンパク質 - タンパク質相互作用は第一タンパク質内の少なくとも 1 つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも 1 つのアミノ酸配列間の相互作用を含む。この実施態様の一バージョンでは、アンタゴニストはモノクローナル抗体、例えば、M a b F M155である。別の変形では、ペプチドは配列番号 1 のアミノ酸配列からなる。

【0045】

抗体アンタゴニスト

本発明は、一実施態様において、抗体の形態のアンタゴニストを記載するが、これは一般的な場合には、MMP - 9 および / または 1 インテグリン内のある種のアミノ酸配列を包含するタンパク質 - タンパク質相互作用を修飾する。このような抗体は、ポリペプチド配列、配列番号 1 を有するペプチドと結合するが、配列番号 3 の対照ペプチド配列と結合しない抗体を含み得る。このような抗体アンタゴニストも血管形成を抑制し得る。本発明は、抗体を産生する細胞株、細胞株を産生するための方法、およびモノクローナル抗体を産生するための方法も記載する。

【0046】

本発明の抗体は、モノクローナルまたはモノクローナルであり得る。一実施態様では、用いられる抗体はモノクローナルである。本発明のモノクローナル抗体は、MMP - 9 および 5 1 インテグリンと免疫反応する抗体分子を含む。

FRIP - 1 と優先的に結合する好ましいモノクローナル抗体としては、FM 155 と呼ばれるモノクローナル抗体が挙げられる。

【0047】

本発明の抗体アンタゴニストは、当業者に既知の多数の方法により生じさせ得る。例えば、動物は、FRIP - 1 またはその断片で免疫感作させ得る。このように生成される抗体は、FRIP - 1 (配列番号 1) と結合するが、しかし対照配列番号 3 と結合しないそれらの能力のために選択し得る。

【0048】

「抗体または抗体分子」という種々の文法的形態での用語は、本明細書中では、免疫グロブリン分子の集団および / または免疫グロブリン分子、即ち抗体結合部位またはパラトープを含有する分子の免疫学的活性部分を示す集合名詞として用いられる。

【0049】

「抗体結合部位」とは、抗原を特異的に結合する重鎖および軽鎖可変部および超可変部領域で構成される抗体分子の構造的部分である。

本発明で用いるための抗体の例は、無傷免疫グロブリン分子、実質的無傷免疫

グロブリン分子およびパラトープを含有する免疫グロブリン分子の一部、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂およびF (v)として当業界で既知で、抗体断片とも呼ばれる部分である。

【0050】

別の好ましい実施態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体由来のF a b断片を含む切頭化免疫グロブリン分子を意図する。F c受容体を欠くF a b断片は、可溶性であり、血清半減期における治療的利点、ならびに可溶性F a b断片の使用方式での診断的利点を提供する。可溶性F a b断片の調製は、免疫学の業界で一般的に既知であり、種々の方法により成し遂げ得る。

【0051】

例えば、抗体のF a bおよびF (a b')₂部分(断片)は、周知の方法により、実質的無傷抗体でのそれぞれパピインおよびペプシンのタンパク質分解反応により調製される(例えば、米国特許第4,342,566号(TheofilopoulosおよびDixon)参照)。F a b'抗体部分も周知であり、F (a b')サブ2部分から産生され、その後、メルカプトエタノールの場合と同様に2つの重鎖部分を連結するジスルフィド結合を還元し、そしてその後、その結果生じたタンパク質メルカプタンを、試薬、例えば、ヨードアセトアミドによりアルキル化する。無傷免疫グロブリン分子を含有する抗体が好ましく、本明細書中で説明されているように利用し得る。

【0052】

「モノクローナル抗体」という種々の文法的形態での語句は、特定のエピトープと免疫反応し得る1種の抗体結合部位のみを含有する抗体分子の集団を指す。したがって、モノクローナル抗体は、各々が異なるエピトープに対して免疫特異的である複数の抗体結合部位を有する抗体分子、例えば、二特異的モノクローナル抗体を含有する。

【0053】

モノクローナル抗体は、典型的には、1種類の抗体分子のみを分泌(産生)するハイブリドーマと呼ばれる単一細胞のクローンにより産生される抗体で構成される。ハイブリドーマ細胞は、抗体産生細胞および黒色腫またはその他の自己不

朽細胞株を融合することにより生成される。このような抗体の調製は、Kohler および Milstein 「Nature」 256:495-497 (1975) (この記載内容は、参照により本明細書中に含まれる) により最初に記載された。さらに別の方法は、Zola 「Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques」 CRC Press, Inc. (1987) により記載されている。そのように調製されたハイブリドーマ上清を、MMP-9 および/または 5 1 インテグリンと免疫反応する抗体分子の存在に関してスクリーニングし得る。

【0054】

要するに、モノクローナル抗体組成物が産生されるハイブリドーマを形成するために、黒色腫またはその他の自己不朽細胞株が、FRIP-1で高度免疫感作された哺乳類の脾臓から得られるリンパ球と融合される。

【0055】

ハイブリドーマを調製するために用いられる黒色腫細胞株は、リンパ球と同一種からであるのが好ましい。典型的には、129G1X.sup.+株のマウスが好ましい哺乳類である。本発明で用いるための適切なマウス黒色腫としては、それぞれCRL 1580およびCRL 1581の名称でAmerican Type Culture Collection, Rockville, Md.から入手可能なヒポキサンチン - アミノプテリン - チミジン感受性 (HAT) 細胞株P3X63-Ag8.653およびSp2/0-Ag14が挙げられる。

【0056】

脾臓細胞は、典型的にはポリエチレングリコール (PEG) 1500を用いて黒色腫細胞と融合される。融合ハイブリッドは、選択増殖培地、例えば、HAT (ヒポキサンチン アミノプテリン チミジン) 培地に対するそれらの感受性により選択される。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、実施例に記載された酵素結合免疫吸着剤検定 (ELISA) を用いて同定される。

【0057】

本発明のモノクローナル抗体は、適切な特異性を有する抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培地を含むモノクローナルハイブリドーマ培養を開始することによっても産生し得る。培養は、ハイブリドーマが培地中に抗体分子を分泌するのに十分な条件下および時間で保持される。次に抗体含有培地が集

される。次に周知の技法により、抗体分子をさらに単離し得る。

【0058】

これらの組成物の調製のために有用な培地は、当業界で周知であり、そして市販されており、その例としては、合成培地、近交系マウス等が挙げられる。合成培地の例は、4.5 g/Lのグルコース、20 nMのグルタミンおよび20%ウシ胎仔血清を補充したダルベッコの最小必須培地 (DME M; Dulbecco 他, Virol. 8:396, 1959) である。近交系マウス系統の例は、Balb/cである。

【0059】

モノクローナル抗体、ハイブリドーマ細胞またはハイブリドーマ細胞培養を産生するその他の方法も周知である。例えば、Sastry 他 (1989) 「Proc. Natl. Acad. Sci. USA」 86:5728-5732; および Huse 他 (1989) 「Science」 246:1275-1281により記載されたような免疫学的レパートリーからのモノクローナル抗体の単離方法を参照されたい。

【0060】

ハイブリドーマ細胞および本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を含有する培養も、本発明により意図される。特に好ましいのは、モノクローナル抗体 F M155を分泌するハイブリドーマ細胞株である。

【0061】

本発明は、一実施態様において、F M155の免疫反応特徴を有するモノクローナル抗体を意図する。

【0062】

モノクローナル抗体が本発明のモノクローナル抗体と等価の特異性 (免疫反応特徴) を有するか否かを確定する方法を、前者が予備選定標的分子との結合から後者を防止するか否かを確かめることにより、当業者は知るだろう。固相中に存在する場合に標的分子との結合に関する標準競合検定において本発明のモノクローナル抗体による結合の低減により示されるように、試験されているモノクローナル抗体が本発明のモノクローナル抗体と競合する場合には、2つのモノクローナル抗体は同一のまたは非常に関連するエピトープと結合すると思われる。

【0063】

モノクローナル抗体が本発明のモノクローナル抗体の特異性を有するか否かを確定するための付加的方法は、問題の抗体のCDR領域のアミノ酸残基配列を確定することである。CDR領域に同一のまたは機能的に等価のアミノ酸残基配列を有する抗体分子は、同一結合特異性を有する。ポリペプチドのシーケンシング方法は、当業界で周知である。これは、別個のCDR領域を有する抗体が同一エピトープと結合し得ないことを示唆しない。

【0064】

抗体の免疫特異性、標的分子結合能力およびエピトープに関して抗体が示す付随親和性は、抗体が免疫反応するエピトープにより限定される。エピトープ特異性は、少なくとも一部は、免疫グロブリン抗体の重鎖の可変部のアミノ酸残基配列により、そして一部は軽鎖可変部アミノ酸残基配列により限定される。

【0065】

「～の結合特異性を有する」という用語の使用は、等価のモノクローナル抗体が予備選定標的エピトープとの結合に関して競合することを示す。

ヒト化モノクローナル抗体は、特にそれらがヒトにおいて治療的に用い得る限りにおいて、ネズミモノクローナル抗体を上回る特定の利点を提供する。特に、ヒト抗体は「外来」抗原と同じくらい迅速に循環から清掃されるわけではなく、外来抗原および外来抗体と同様の方法で免疫系を活性化するわけではない。

【0066】

「ヒト化」抗体の調製方法は、当業界で一般的に周知であり、本発明の抗体に容易に適用し得る。

【0067】

したがって、本発明は、一実施態様において、抗原に結合する抗体の能力を実質的に妨げることなく、ヒト免疫系の構成成分を導入するための移植によりヒト化される本発明のモノクローナル抗体を意図する。

【0068】

本発明の抗体は、例えば、de Haard, H.J. 他(1999)「J. Biol. Chem.」274:18218-30およびWinter, G. 他(1994)「Annu. Rev. Immunol.」12:433-55に記載されているもののようなヒト一本鎖または二本鎖抗体を標示する抗体ファー

ジ標示ライブラリーからの選択により生成されるもののような完全ヒト抗体でもあり得る。

【0069】

ペプチド/ポリペプチドアンタゴニスト

本発明のアンタゴニストは、ポリペプチドまたはペプチドでもあり得る。ポリペプチドという用語は、連続アミノ酸残基の アミノ基およびカルボキシ基間のペプチド結合により互いに連結される3つ以上のアミノ酸の配列を指し、タンパク質として知られている化合物の種類をその意味内に含む。ペプチドという用語は、本明細書中で用いられる場合、ポリペプチドの場合と同様に互いに連結された2つ以上の線状列を指す。

【0070】

一実施態様において、本発明は、ポリペプチドの形態のアンタゴニストを意図する。細胞表面へのMMP-9の局在のポリペプチドアンタゴニストは、細胞表面へのMMP-9の局在を乱し得る、あるいはさらに一般的には、MMP-9および/または 1インテグリン内にある種のアミノ酸配列を含むタンパク質-タンパク質相互作用を修飾し得る任意のペプチドまたはポリペプチドであり得る。

MMP-9または 1インテグリンに対する選択性を有する好ましいアンタゴニストペプチドの同定は、実施例に記載したELISA検定のような結合検定の典型的抑制において、容易に同定し得る。

【0071】

ペプチドおよびポリペプチドアンタゴニストは、当業者に既知の多数の技法により生成させ得る。例えば、2つのハイブリッド系(例えば、Fields, S. (1989) Nature 340:245-6)は、FRIP-1と結合するライブラリーからタンパク質アンタゴニストを選定するための「餌」としてMMP-9の断片を用い得る。考え得るアンタゴニストのライブラリーは、例えば、cDNAライブラリーに由来し得る。別の実施態様では、考え得るアンタゴニストは、既知のMMP-9結合タンパク質の変異体であり得る。このようなタンパク質は、無作為突然変異誘発化させ得るか、あるいは遺伝子シャッフリングを、または配列構造分散性を生じ得るためのその他の利用可能な技法を施し得る。

【0072】

本発明のペプチドおよびポリペプチドアンタゴニストは、分子進化の技法によっても生成し得る。タンパク質のライブラリーは、突然変異誘発、遺伝子シャッフリングまたは分子構造分散性を生成するためのその他の利用可能な技法により生成させ得る。多数の変異体を示すタンパク質プールは、例えば、FRIP-1が結合されていた固体マトリックスからこのようなタンパク質プールをはずすことにより、FRIP-1に結合するそれらの能力に関して選択し得る。例えば、塩の勾配による溶離は、FRIP-1に対する親和性を有する変異体の精製を提供し得る。それによりこのようなプールが、対照ペプチドAAAA（配列番号3）が結合されていた固体マトリックスからはずされる陰性選択段階も含まれる。濾液は、AAAAに対する親和性低減を示すプール内にそれらの変異体を含有する。

【0073】

本発明のペプチドおよびポリペプチドアンタゴニストは、ファージ標示によっても生成させ得る。無作為化ペプチドまたはタンパク質は、ファージコートタンパク質との融合物としてファージミド粒子の表面に発現させ得る。一価ファージ標示の技法は、広範に利用可能である（例えば、Lowman H.B. 他（1991）Biochemistry 30:10832-8参照）。無作為化ペプチドまたはタンパク質ライブラリーを発現するファージは、AAAA分子が結合されていた固体マトリックスで捕らえられる。残りのファージは、AAAAを結合しないか、または実質的に低減された親和性でAAAAを結合する。次にファージは、FRIP-1が結合されていた固体マトリックスに対して捕らえられる。溶液条件の変化により、または適切に設計された構築物に関して、ファージコートタンパク質を無作為化ペプチドまたはタンパク質ライブラリーと連結するリンカー領域のタンパク質分解的切断により、結合ファージは単離され、固体マトリックスから分離される。単離ファージは、選定アンタゴニストの同一性を確定するためにシーケンシングさせ得る。

【0074】

別の実施態様では、ポリペプチドがFRIP-1のアンタゴニストであるが、しかし配列番号3の対照ペプチドのアンタゴニストでない限り、ポリペプチドは

、そのアミノ酸残基配列が本明細書中に示されているポリペプチドのあらゆる類似体、断片または化学的誘導体を含む。したがって、本発明のポリペプチドに種々の変化、置換、挿入および欠失を施し得るが、この場合、このような変化はその使用にある種の利点を提供する。この点では、本発明のFRIP-1アンタゴニストポリペプチドは1つ以上の変化が成され、それが1つ以上の本明細書中に記載した検定において本発明のアンタゴニストとして機能する能力を保持する引用ペプチドの配列に対応し、むしろそれと同一である。

【0075】

したがって、ポリペプチドは、ペプチド誘導体の種々の形態のいずれかであり、その例としては、アミド、タンパク質との複合体、環化ペプチド、重合ペプチド、類似体、断片、化学的修飾ペプチド等の誘導体が挙げられる。

【0076】

その他のアンタゴニスト

本発明のアンタゴニストは、小型有機分子、例えば、天然物質、または慣用的有機合成または組合せ有機合成により合成された化合物でもあり得る。化合物は、MMP-9および/または1インテグリン内にある種のアミノ酸配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を修飾するそれらの能力に関して試験させ得る。化合物は、対照ペプチドAAAA、配列番号3に対する親和性低減に関しても選択される。

【0077】

本発明のアンタゴニストは、非ペプチド化合物でもあり得る。適切な非ペプチド化合物としては、例えば、オリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドは、本明細書中で用いる場合、プリン、ピリミジンおよびその他の芳香族塩基を含有する任意のヘテロポリマー物質を指す。DNAおよびRNAオリゴヌクレオチドは、糖（例えば、2'アルキル化リボース）および主鎖修飾（例えば、ホスホチオエートオリゴヌクレオチド）を有するオリゴヌクレオチドであるので、本発明とともに用いるのに適している。オリゴヌクレオチドは、一般的に見出されたプリンおよびピリミジン塩基、例えば、アデニン、チミン、グアニン、シチジンおよびウリジン、ならびに複素環式環タンパク質（例えば、7-デアザ

グアニン)内または環外位置で修飾された塩基を提示し得る。オリゴヌクレオチドは、ポリアミド核酸等を含めた芳香族塩基も提示する別個の構造を有するヘテロポリマーも包含する。

【0078】

本発明のオリゴヌクレオチドアンタゴニストは、当業者に既知の多数の方法により生成させ得る。一実施態様では、多数の配列を含有するオリゴヌクレオチドのプールが生成される。プールは、例えば、延長段階でモノマーの混合物を用いる固相合成により生成させ得る。オリゴヌクレオチドのプールは、プールを含有する溶液をFRIP-1またはその断片がくっつけられていた固体マトリックスからはずすことにより、分けられる。MMP-9と結合するプール内の配列は、固体マトリックス上に保持される。これらの配列は、異なる塩濃度またはpHの溶液で溶離される。選定された配列は、第二選択段階に付される。選定プールは、配列番号3がくっつけられていた第二固体マトリックスからはずされる。カラムは、配列番号3と結合するそれらの配列を保持し、したがってFRIP-1に特異的な配列に関してプールを濃化する。プールは増幅され、必要な場合には、突然変異誘発化され、その過程はプールが本発明のアンタゴニストの特徴を示すまで反復される。個々のアンタゴニストは、通常は前記の配列を宿主生物、例えば、大腸菌中にクローニング後に、オリゴヌクレオチドプールの成員をシーケンシングすることにより同定し得る。

【0079】

アンタゴニストを同定するための結合検定

本発明は、本発明の方法により使用するための候補アンタゴニストを同定するための検定方法も提供する。これらの検定方法においては、候補アンタゴニストは、FRIP-1およびAAAA対照ペプチドの両方を結合するそれらの能力に関して評価され、さらに組織中での血管形成の抑制におけるそれらの能力に関して評価し得る。

【0080】

E L I S A

第一検定は、E L I S Aにより固相中で、FRIP-1およびAAAA対照ペ

プチドとのアンタゴニストの結合を測定する。検定は、FRIP-1に対する特異性を示すが、AAAA対照ペプチドに対する特異性は示さない化合物を同定するためにも用い得る。特異性検定は、FRIP-1およびAAAA対照ペプチドを結合する能力に関して別個の検定小室で、考え得るアンタゴニストが共在的にスクリーニングされるパネルELISAを実行することにより行い得る。

【0081】

MMP-9および51インテグリン間の相互作用を乱すアンタゴニストは、結合に関して本発明のアンタゴニストと競合するそれらの能力によっても同定し得る。例えば、推定アンタゴニストは、ELISAのような結合検定において、既知のアンタゴニスト、例えば、FM155の親和性に及ぼすそれらの作用をモニタリングすることによりスクリーニングし得る。このようなアンタゴニストはFM155と同一の特異性を有し、同一の隠れたエピトープを認識すると思われる。このようなスクリーニング法によって選定される推定アンタゴニストは、MMP-9または51インテグリンと、あるいはアンタゴニストと結合し得る。アンタゴニストは、MMP-9または51インテグリンエピトープと結合するが、しかし既知のアンタゴニストとは結合しないものを確定するために、慣用的結合検定により推定アンタゴニストから選択し得る。

【0082】

以下は、候補アンタゴニストを同定するために用い得る本発明のいくつかの実施態様である。

【0083】

一実施態様では、本発明は、MMP-9アンタゴニストに関するスクリーニング方法であって、以下の：a)推定アンタゴニストを提供し、b)MMP-9との結合に関する前記推定アンタゴニストの第一親和性を測定し、c)MMP-9との結合に関する配列番号3の第二親和性を測定し、そしてd)前記第二親和性が前記第一親和性より実質的に低い場合にはMMP-9アンタゴニストとして前記推定アンタゴニストを選択することを含む方法である。この実施態様のバージョンでは、推定アンタゴニストは非ペプチド化合物、例えば、小型有機化合物またはオリゴヌクレオチドである。別のバージョンでは、推定アンタゴニスト

はポリペプチド、線状ペプチドまたは環状ペプチドである。あるいは、推定アンタゴニストは抗体であり、これはモノクローナルまたはポリクローナルであり得る。

【0084】

本方法の好ましい実施態様では、前記第一および前記第二親和性は酵素結合免疫吸着剤検定により測定される。

【0085】

特定の一実施態様では、第二親和性は第一親和性の約3分の1である。あるいは、第二親和性は第一親和性の約5分の1である。本発明のさらに別の実施態様では、第二親和性は第一親和性の約10分の1である。

【0086】

一実施態様では、本発明は、1インテグリンアンタゴニストに関するスクリーニング方法であって、以下の：a) 推定アンタゴニストを提供し、b) 1インテグリンとの結合に関する前記推定アンタゴニストの第一親和性を測定し、c) 前記1インテグリンとの結合に関する配列番号3の第二親和性を測定し、そしてd) 前記第二親和性が前記第一親和性より実質的に低い場合には1インテグリンアンタゴニストとして前記推定アンタゴニストを選択することを含む方法である。この実施態様のバージョンでは、推定アンタゴニストは非ペプチド化合物、例えば、小型有機化合物またはオリゴヌクレオチドである。別のバージョンでは、推定アンタゴニストはポリペプチド、線状ペプチドまたは環状ペプチドである。あるいは、推定アンタゴニストは抗体であり、これはモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。

【0087】

この方法の好ましい実施態様では、前記第一および前記第二親和性は酵素結合免疫吸着剤検定により測定される。

特定の一実施態様では、第二親和性は第一親和性の約3分の1である。あるいは、第二親和性は第一親和性の約5分の1である。本発明のさらに別の実施態様では、第二親和性は第一親和性の約10分の1である。

【0088】

血管形成検定

本発明のアンタゴニストは、組織中での血管形成を変調するそれらの能力に関しても検定し得る。このような作用をモニタリングするために、当業者に既知のあらゆる適切な検定を用い得る。いくつかのこのような技法が、本明細書中に記載されている。

【0089】

例えば、一検定は、ヒヨコ漿尿膜(CAM)における血管形成を測定し、CAM検定と呼ばれる。CAM検定は、他の研究者により詳細に記載されており、さらに腫瘍組織の血管形成および新生血管形成を測定するために用いられてきた(Ausprunk 他, Am. J. Pathol., 79:597-618 (1975) および Ossonski 他, Cancer Res., 40:2300-2309 (1980) 参照)。

【0090】

CAM検定は、全組織の新生血管形成が起こりつつあり、そして実際のヒヨコ胚血管がCAMにまたはCAM上に増殖する組織に増殖中であるため、生体内血管形成のための十分に認識された検定モデルである。

【0091】

本明細書中で実証されるように、CAM検定は、新血管増殖の量および程度の両方に基づいて新生血管形成の抑制を説明する。さらに、CAM上に移植された任意の組織、例えば、腫瘍組織の増殖をモニタリングするのは容易である。最後に、本検定系中に毒性に関する内部対照が存在するために、本検定は特に有用である。ヒヨコ胚は任意の試験試薬に曝露され、したがって胚の健康は毒性の指標である。

【0092】

血管形成を測定する第二検定は、生体内ウサギ眼モデルであり、ウサギ眼検定と呼ばれる。ウサギ眼検定は、他の研究者により詳細に記載されており、さらにサリドマイドのような血管形成阻害剤の存在下での血管形成および新生血管形成を測定するために用いられてきた(D'Amato 他 (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:4082-4085参照)。

【0093】

ウサギ眼検定は、角膜縁から角膜中に増殖中のウサギ血管により例示される新生血管形成が眼の天然透明角膜を通して容易に目に見えるため、生体内血管形成に関する十分に認識された検定モデルである。さらに、新生血管形成の刺激または抑制の、あるいは新生血管形成の退行の程度および量の両方を容易に長時間モニタリングし得る。

【0094】

最後に、ウサギは任意の試験試薬に曝露され、したがってウサギの健康は試験試薬の毒性の指標である。

【0095】

第四の検定は、キメラマウス：ヒトマウスもでるにおける血管形成を測定し、キメラマウス検定と呼ばれる。本検定は、他の研究者により詳細に記載されており、さらに血管形成、新生血管形成および腫瘍組織の退行を測定するために本明細書中で記載されている (Yan 他 (1993) J. Clin. Invest. 91:986-996参照)。

。

【0096】

キメラマウス検定は、移植された皮膚移植片が正常ヒト皮膚に組織学的に非常によく似ており、全組織の新生血管形成が起こりつつあり、この場合、実際のヒト血管は、移植ヒト皮膚から移植ヒト皮膚の表面のヒト腫瘍組織中に増殖中であるため、生体内血管形成に関する有用な検定モデルである。ヒト移植片中への新生血管形成の起源は、ヒト特異的内皮細胞マーカーを用いた新生血管系の免疫組織化学的染色により実証し得る。

【0097】

キメラマウス検定は、新血管増殖の退行の量および程度の両方に基づいた新生血管形成の退行を実証する。さらに、腫瘍組織のような移植皮膚上に移植された任意の組織の増殖に及ぼす作用をモニタリングするのは容易である。最後に、本検定は、検定系における毒性に関する内部対照が存在するために、有用である。キメラマウスは、任意の試験試薬に曝露され、したがって、マウスの健康は毒性の指標である。

【0098】

血管形成の抑制方法

本発明は、組織中の血管形成の抑制のために、そしてそれにより血管形成に依存する組織における事象を抑制する方法を提供する。一般に本方法は、MMP-9および/または1インテグリン内にある種のアミノ酸配列を包含するタンパク質-タンパク質相互作用を修飾する血管形成抑制量のアンタゴニストを含む組成物を組織に投与することを包含する。

【0099】

前記のように、血管形成は、「出芽」、血管形成、または血管拡張を含めた組織の新生血管形成を包含する種々の過程を含み、血管形成過程はすべて、血管中の細胞外マトリックスコラーゲンの崩壊を包含する。外傷性創傷治癒、黄体形成および胚形成を除いて、大多数の血管形成過程は疾患過程に関連があり、したがって本発明の治療法の使用は疾患に対して選択的である、と考えられる。

【0100】

血管形成が重要であると考えられる、血管形成性疾患と呼ばれる種々の疾患が存在し、その例としては、炎症性傷害、例えば、免疫および非免疫炎症、慢性関節リウマチおよび乾癬、血管の不適切なまたは時機を逸した侵襲に関連した疾患、例えば、糖尿病性網膜症、血管新生緑内障、再狭窄、アテローム硬化症性プラークにおける毛管増殖、骨粗鬆症、ならびに癌関連疾患、例えば、固形腫瘍、固形腫瘍転移、血管繊維腫、水晶体後繊維増殖症、血管腫、カポジ肉腫および腫瘍増殖を支持するために新生血管形成を要する癌が挙げられるが、これらに限定されない。その他の適切な腫瘍としては、黒色腫、癌腫、肉腫、繊維肉腫、神経膠腫および星状細胞腫が挙げられる。

【0101】

したがって、罹患組織における血管形成を抑制する方法は、疾患の症状を軽減し、疾患によっては、疾患の治癒に寄与し得る。一実施態様では、本発明は組織中の血管形成それ自体の抑制を意図する。

【0102】

本明細書中に記載したように、皮膚、筋肉、腸、結合組織、関節、骨ならびに血管が血管形成刺激時に侵襲し得る組織を含めた種々の組織または構築組織から

成る器官のいずれかは、疾患状態における血管形成を支持し得る。組織は、本明細書中で用いる場合、すべての体液、分泌物等、例えば、血清、血液、脳脊髄液、血漿、尿、滑液、硝子体液も包含する。

【0103】

したがって、関連実施態様では、処置される組織は炎症組織であり、抑制される血管形成は炎症組織血管形成であって、この場合、炎症組織の新生血管形成が認められる。この種類においては、本方法は、慢性関節リウマチ患者におけるような関節組織における、免疫または非免疫炎症組織における、乾癬組織等における血管形成の抑制を意図する。

【0104】

その多数の実施態様において本発明で処置される患者は、望ましくはヒト患者であるが、しかし本発明の原理は、本発明がすべての哺乳類に関して有効であることを示し、これは、「患者」という用語に含まれるよう意図される、と理解されるべきである。この状況では、哺乳類は、血管形成に関連した疾患の治療が望ましい任意の哺乳類種、特に農耕および家畜哺乳類種を含むと理解される。このような患者は、例えば、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ラバ、ロバ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウスおよびラットであり得る。

【0105】

別の関連実施態様では、処置される組織は、糖尿病性網膜症、黄斑変性または血管新生緑内障を有する患者の網膜組織であり、抑制される血管形成は、網膜組織の新生血管形成が認められる網膜組織血管形成である。

【0106】

さらに別の関連実施態様では、処置される組織は、固形腫瘍、転移、皮膚癌、乳癌、血管腫または血管繊維腫等の癌を有する患者の腫瘍組織であり、抑制される血管形成は、腫瘍組織の新生血管形成が認められる腫瘍組織血管形成である。本発明の方法により治療可能な典型的固形腫瘍組織としては、肺、膵臓、乳房、結腸、喉頭、卵巣、カポジ肉腫などの組織が挙げられる。腫瘍組織血管形成およびその抑制の例は、実施例に記載されている。

【0107】

腫瘍組織血管形成の抑制は、腫瘍増殖において新生血管形成が演じる重要な役割のために、特に好ましい実施態様である。腫瘍組織の新生血管形成の不存在下では、腫瘍組織は必要な栄養を得られず、増殖が遅れて、付加的増殖を終結し、退行して、結局は壊死状態になって、腫瘍殺害を引き起こす。

【0108】

言い換えれば、本発明は、腫瘍血管形成を抑制することにより、腫瘍新生血管形成の抑制方法を提供する。同様に、本発明は、血管形成抑制法を実行することにより腫瘍増殖の抑制方法を提供する。

【0109】

新生血管形成を抑制するそれらの能力により、(1) 転移癌細胞が原発性腫瘍を出るよう、それらの形成が原発性腫瘍の血管形成を必要とし、そして(2) 二次部位におけるそれらの確立が転移の増殖を支持するための新生血管形成を必要とするために、本発明の方法は転移の形成に対しても有効である。

【0110】

一関連実施態様では、本発明は、固形腫瘍に向けられる慣用的化学療法のような、そして転移の確立の制御のためのその他の療法とともに本発明の実行を意図する。血管形成阻害剤の投与は、典型的には化学療法中またはその後に実行されるが、しかし腫瘍組織への血液供給および栄養の提供により回復するよう血管形成を誘導することにより腫瘍組織が毒性襲撃に応答しつつある時期の化学療法の養生法の後に血管形成を抑制するのが好ましい。さらに、転移に対する予防策として固形腫瘍が除去された手術後に血管形成抑制方法を施すのが好ましい。

【0111】

本発明の方法が腫瘍新生血管形成の抑制に適用する限り、本方法は、確立された腫瘍の退行にも適用可能である。

【0112】

再狭窄は、血管形成術の成功を妨げる経皮管腔貫通冠状動脈血管形成の部位での平滑筋細胞(SMC)移動および増殖の過程である。再狭窄中の血管に関連したSMCの移動および増殖は、本発明の方法により抑制される血管形成の過程に関連する。したがって、本発明は、血管形成術後の患者における本発明の方法に

よる血管形成関連過程の抑制による再狭窄の抑制も意図する。再狭窄の抑制のためには、本発明のアンタゴニストは、典型的には血管形成術後に、約2～約28日間、さらに典型的には術後最初の約14日間、投与される。

【0113】

組織中の血管形成を抑制するための、したがって血管形成関連疾患の治療のための方法も実行するための本発明の方法は、血管形成が起きているかまたは起きる危険がある組織を、MMP-9および/または 1インテグリン内にある種のアミノ酸配列を含むタンパク質-タンパク質相互作用を修飾する治療的有効量のアンタゴニストを含む治療用組成物と接触させることを含む。したがって、本方法は、MMP-9および/または 1インテグリン内にある種のアミノ酸配列を含むタンパク質-タンパク質相互作用をアンタゴニストが修飾する本発明のアンタゴニストを含有する生理学的に許容できる治療的有効量の組成物を患者に投与することを包含する。本発明のアンタゴニストの治療用組成物および治療的有効量は、以下の「治療用組成物」の項に記載されている。

【0114】

アンタゴニストの投与のための投与量範囲は、本明細書中でさらに説明されるようにアンタゴニストの形態、およびその効力によっており、血管形成および血管形成により媒介される疾患症状が改善される所望の作用を生じるのに十分多い量である。投与量は、副作用、例えば、過粘稠度症候群、肺水腫、うっ血性心不全等を引き起こすほど多量であるべきでない。一般に投与量は、年齢、症状、性別および患者における疾患の程度に伴って変わり、当業者により決定し得る。投与量は、あらゆる合併症の事象において、個々の医師によっても調整し得る。

【0115】

本発明のモノクローナル抗体またはポリペプチドは、注射により、または長時間に漸次注入により、非経口的に投与し得る。処置される組織は典型的には全身投与より身体で接近され、したがって最もしばしば、治療用組成物の静脈内投与により処置され、標的化された組織が標的分子を含有するという可能性があるその他の組織および送達手段が意図される。したがって、モノクローナル抗体、ポリペプチドおよびそれらの誘導体を含むアンタゴニストは、静脈内、腹腔内、筋

肉内、皮下、体腔内、経皮的、局所的、眼内、経口的、鼻腔内的に投与され、蠕動的手段により送達し得る。

【0116】

本発明のモノクローナル抗体またはポリペプチドを含有する治療用組成物は、慣用的には静脈内に、例えば、単位用量の注射により投与される。「単位用量」という用語は、本発明の治療的組成物を参照して用いる場合、被験者に対する単一用量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な希釈剤、即ち担体またはビヒクルを伴って所望の治療的作用を生じるよう算定された予定量の活性物質を含有する。

【0117】

実施例に示されているような好ましい一実施態様では、アンタゴニストは1回投与で静脈内的に投与される。

【0118】

組成物は、投与処方物と相溶性の方式で、治療的有效量で投与される。投与される量および時機は、治療される患者、活性成分を利用する患者の系の能力、および所望の治療効果の程度によって異なる。投与するのに必要な活性成分の的確な量は、担当医の判定によっており、各個体に固有である。しかしながら、全身適用のための適切な投与量範囲は、本明細書中に開示されており、投与経路によって異なる。投与のための適切な養生法も可変的であるが、しかし初期投与と、その後の注射またはその他の投与による1時間またはそれ以上の間隔での反復投与により定型化される。あるいは、生体内療法のために特定された範囲で血中の濃度を保持するのに十分な連続静脈内注入が意図される。

【0119】

血管形成または疾患状態を抑制するための方法の特定の例として、本発明の以下の実施態様が提供される。

【0120】

一実施態様において、本発明は組織中の血管形成の抑制方法であって、タンパク質-タンパク質相互作用を特異的に修飾するアンタゴニストを投与することを含む方法であり、この場合、タンパク質-タンパク質相互作用は第一タンパク質

内の少なくとも1つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列間の相互作用を含む。この方法では、前記のアンタゴニストは、静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される。さらにアンタゴニストは、化学療法とともに、または放射線照射とともに投与し得る。本方法は、組織が炎症を起こし、血管形成が起きている場合、組織が哺乳類に存在する場合、あるいは組織が関節炎、眼、網膜または血管腫である場合に用いられる。

【0121】

本発明の別の治療方法では、組織中の腫瘍増殖または転移は、タンパク質 - タンパク質相互作用を特異的に修飾するアンタゴニストを投与することを含む方法で抑制され、この場合、タンパク質 - タンパク質相互作用は、第一タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列間の相互作用を包含する。この方法では、前記のアンタゴニストは、静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される。さらにアンタゴニストは、化学療法とともに、または放射線照射とともに投与し得る。本方法は、腫瘍または転移が黒色腫、癌腫、肉腫、繊維肉腫、神経膠腫である場合に適用可能である。別の実施態様では、本発明は、タンパク質 - タンパク質相互作用を特異的に修飾するアンタゴニストを投与することによる乾癬、黄斑変性またはある組織における再狭窄の抑制方法であって、この場合、タンパク質 - タンパク質相互作用は、第一タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列間の相互作用を含む。この方法では、前記のアンタゴニストは、静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される。さらにアンタゴニストは、化学療法とともに、または放射線照射とともに投与し得る。

【0122】

疾患治療

本発明は一般に、MMP - 9および/または 1インテグリン内にある種のアミノ酸配列を含むタンパク質 - タンパク質相互作用を修飾することが疾患状態

および血管形成を抑制するという発見に関する。この発見は、種々の疾患過程において血管形成が演じる役割のために、重要である。

【0123】

新しい血管の増殖が疾患に関連した病変の原因であるかまたはそれに関与する場合、血管形成の抑制は疾患の有害作用を低減する。例としては、乾癬、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、炎症性疾患、再狭窄、黄斑変性等が挙げられる。新しい血管の増殖が有害組織の増殖を支持するのに必要である場合、血管形成の抑制はその組織への血液供給を低減し、それにより血液供給要件を基礎にした組織塊の低減に寄与する。例としては、腫瘍が2~3mmの厚みを越えて増殖するために、そして固形腫瘍転移の確立のために、新生血管形成が連続要件である腫瘍の増殖が挙げられる。

【0124】

本発明の方法は、特に療法が血管形成に関して高度に選択的であり、そして他の生物学的過程に関してはそうでないために、有効である。実施例に示されているように、MMP-9の局在化を乱すアンタゴニストにより、新血管増殖のみが抑制され、したがって、本治療法は成熟血管に悪影響を及ぼさない。さらに、本発明のある種の血管形成はMMP-9の局在にのみ影響を及ぼして、MMP-9のタンパク質分解活性または $\alpha 1$ インテグリンの接着機能を直接的に遮断しないために、これらの化合物は、MMP-9のタンパク質分解活性または $\alpha 1$ インテグリンの接着機能が正常の生理学的機能を有し得るために、副作用は少ないと思われる。

【0125】

さらに、本発明のアンタゴニストは非常に効き目がよく、これはそれらが低濃度で治療的利点を有し得ることを示唆する。

本発明の発見の前には、血管形成、ならびに血管形成に依存している過程のいずれかを、MMP-9および $\alpha 1$ インテグリンの間の相互作用を中和する試薬の使用により生体内で抑制させ得ることは知られていなかった。

【0126】

治療用組成物

本発明は、本明細書中に記載した治療法を実行するのに有用な治療用組成物を意図する。本発明の治療用組成物は、生理学的に許容できる担体を、活性成分としてその中に溶解または分散される、本明細書中に記載したような治療的有効量のアンタゴニストとともに含有する。好ましい実施態様では、治療用アンタゴニスト組成物は、治療のために哺乳類またはヒト患者に投与した場合、免疫原性でなく、または低免疫原性を有する。

【0127】

治療的有効量は、治療される組織中での血管形成の測定可能な抑制を生じるのに十分な本発明のアンタゴニストの量、即ち血管形成抑制量である。血管形成の抑制は、本明細書中に記載したように免疫組織化学的に、または当業者に既知のその他の方法で、in-situで測定し得る。

【0128】

本発明のアンタゴニストの効力は、CAM検定における血管形成の抑制、生体内ウサギ眼検定、生体内キメラマウス：ヒト検定を含めた種々の手段により測定し得る。

【0129】

モノクローナル抗体の形態での本発明のアンタゴニストの治療的有効量は、典型的には、生理学的に許容できる組成物中で投与される場合、約0.01マイクログラム (μg) / ミリリットル (mL) ~ 約100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、通常約5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の血漿濃度を達成するのに十分な量である。言い換えれば、投与量は、1日1回以上投与で、1または数日間、約0.1 mg/kg ~ 約300 mg/kg、好ましくは約0.2 mg/kg ~ 約200 mg/kg、最も好ましくは約0.5 mg/kg ~ 約20 mg/kgで変わり得る。

【0130】

アンタゴニストがモノクローナル抗体の断片の形態である場合、その量は、全抗体の質量に対する断片の質量を基礎にして容易に調整し得る。好ましい血漿濃度は、モルで、約2マイクロモル (μM) ~ 約5ミリモル (mM)、好ましくは約100 μM ~ 1mMの抗体アンタゴニストである。

【0131】

ポリペプチドまたは小型分子の形態の本発明のアンタゴニストの治療的有効量は、典型的には、生理学的に許容できる組成物中で投与される場合、約0.1マイクログラム (μg) / ミリリットル (mL) ~ 約200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、好ましくは約1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 約150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の血漿濃度を達成するのに十分な量である。約500 g/molの質量を有するポリペプチドを基礎にして、好ましい血漿濃度は、モルで、約2マイクロモル (μM) ~ 約5ミリモル (mM)、好ましくは約100 μM ~ 1mMのポリペプチドアンタゴニストである。言い換えれば、体重当たりの投与量は、1日1回以上投与で、1または数日間、約0.1 mg/kg ~ 約300 mg/kg、好ましくは約0.2 mg/kg ~ 約200 mg/kgで変わり得る。

【0132】

本明細書中で用いる場合、「医薬として許容し得る」、「生理学的に許容できる」という用語、およびそれらの文法的変形は、それらが組成物、担体、希釈剤および試薬と呼ばれる場合、交換可能的に用いられ、その物質が哺乳類へのまたは哺乳類上の投与が可能であることを表す。

【0133】

それに溶解または分散された活性成分を含有する薬理組成物の調製は当業界で十分理解されており、処方物に基づいて限定する必要はない。典型的には、このような組成物は、液体溶液または懸濁液として注射可能物質として調製されるが、しかしながら、溶液または懸濁液に適した固体形態も、使用前の液体中で調製され得る。調製物は乳化もさせ得る。

【0134】

活性成分は、医薬として許容し得る且つ活性成分と相溶性である賦形剤と、本明細書中に記載した治療方法に用いるのに適した量で混合し得る。適切な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどまたはそれらの組合せである。さらに、所望により、組成物は少量の補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤等、活性成分の効力を強化するものを含有し得る。

【0135】

本発明の治療用組成物は、その中の構成成分の医薬として許容し得る塩を含み

得る。医薬として許容し得る塩としては、無機酸、例えば、塩酸またはリン酸、あるいは有機酸、例えば、酢酸、酒石酸、マンデル酸等を用いて生成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基により生成される）が挙げられる。遊離カルボキシル基を用いて生成される塩は、無機塩基、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムまたは第二鉄、ならびに有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエーテル、ヒスチジン、プロカインなどからも得られる。特に好ましいのは、TFAおよびHClの塩である。

【0136】

生理学的に許容性の担体は、当業界で周知である。液体担体の例は、活性成分と水の他に何も物質を含有しないか、または生理学的pH値の緩衝剤、例えば、リン酸ナトリウム、生理学的食塩水またはその両方を含有する滅菌水性溶液、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水である。さらに、水性担体は、1つより多い緩衝剤塩、ならびに塩化ナトリウムおよびカリウム、デキストロース、ポリエチレングリコールおよびその他の溶質を含有し得る。

【0137】

液体組成物は、水の他に、そして水を除外して、液体相も含有し得る。このような付加的液体相の例は、グリセリン、植物油、例えば、綿実油、および水-油エマルションである。

【0138】

治療用組成物は、典型的には少なくとも0.01質量%のアンタゴニスト/総治療用組成物の質量の量含有するよう処方される、血管形成抑制量の本発明のアンタゴニストを含有する。質量%は、総組成物に対する阻害剤の質量を単位とした比である。したがって、例えば、0.01質量%は、0.01グラムの阻害剤/100グラムの総組成物である。

【0139】

抗体は、腫瘍または血管形成を受けているその他の組織への送達のために、細胞毒素、細胞傷害剤と複合させ得る。このような複合体は、サイトリシンまたは外毒素、例えば、リシンA、ジフテリア毒素Aまたはシュードモナス外毒素およ

びそれらの断片を用いて作製し得る。細胞傷害剤は、有毒線量の放射能を新生血管形成組織に局所的に送達するために同位元素で放射能標識させ得る。

本発明のアンタゴニストは、酵素を標的に送達するためにも用い得るが、この場合、酵素は、例えば、抗体特異的酵素活性化プロドラッグ療法 (ADEPT) に用いるためにプロドラッグを薬剤の活性形態に転化し得る (例えば、Syrigos, K.N. (1999) *Anticancer Res.* 19:605-13参照)。要するに、本発明のアンタゴニストは、非毒性または不活性プロドラッグを毒性または活性薬剤に転化し得る酵素、例えば、ラクタマーゼ、プロテアーゼまたはエステラーゼと複合される。本発明のアンタゴニストは血管形成の部位に、特に腫瘍または転移の部位に局在するため、有毒薬はこのような部位に向けることができる。

【0140】

検出方法

本発明のアンタゴニストは、組織中の血管形成の検出にも適している。例えば、アンタゴニストが抗体である場合、アンタゴニストは組織を生体外で染色するために免疫組織化学技法に用い得る。免疫学的技法、例えば、免疫染色および ELISA は、例えば、「Receptor Binding Techniques, Methods in Molecular Biology」106, 編 M. Keen. Humana Press, 1999; Brooks 他 (1998) 「Cell」 92:391-400; Brooks 他 (1996) 「Cell」 85:683-693; および Brooks 他 (1993) 「J. Cell. Biol.」 122:1351-1359 に記載されている。

【0141】

本発明のアンタゴニストは、一旦標的組織に結合されると、直接または間接的に検出し得る。直接検出は、検出可能標識、例えば、蛍光色素、放射能タグ、常磁性重金属または診断染料を含むアンタゴニストで実行し得る。

【0142】

あるいは、検出は、第二相互作用により起こり得る。例えば、アンタゴニストを認識する検出可能的標識化抗体を用いて、アンタゴニストの位置を可視化し得る。例えば、アンタゴニストがマウス起源のモノクローナル抗体である場合、適切に標識されたヤギ抗マウス抗体を用い得る。当業者は、種々のアンタゴニストとともに用いるための適切な第二抗体を確定し得る。

【0143】

生体内検出のためには、検出可能な標識化アンタゴニストを用いるのが好ましい。標識化アンタゴニストは、静脈内に、筋肉内に等で患者に投与される。患者内の検出に適した標識が、特に好ましい。例えば、常磁的標識化アンタゴニストは、磁気共鳴造影により検出し得る。放射性タグ化アンタゴニストも検出し得る。

【0144】

検出に適した本発明の特定の実施態様の例を以下に示す。

一実施態様において、本発明は、タンパク質 - タンパク質相互作用を特異的に修飾するアンタゴニストを接触させることによる組織中の血管形成の検出方法であるが、この場合、タンパク質 - タンパク質相互作用は、第一タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列および第二タンパク質内の少なくとも1つのアミノ酸配列間の相互作用を含む。この方法では、例えば、前記の組織は生体外であるかまたは前記の組織は生体内であり、前記のアンタゴニストは、静脈内、経皮的、滑液包内、筋肉内、腫瘍内、眼内、鼻腔内、鞘内、局所的または経口的に投与される。あるいは、この方法では、前記のアンタゴニストは、蛍光色素、放射性タグ、常磁性重金属、診断染料または酵素と複合される。

【0145】

本明細書中に引用した参考文献はすべて、それらの記載内容が参照により本明細書中に含まれる。

【0146】

実施例

実施例 1

5 1 の精製

フィブロネクチンの110 kD細胞結合ドメインを利用して、胎盤溶解物から 5 1 を精製した。溶離分画を濃縮し、10% SDS PAGEにより分離し、その後、銀染色した。90 kDタンパク質が、図1に示したようにMMP - 9と同じ分子量を有するインテグリン 5 1 と同時精製する。図では、レーン1は商業的に調製されたヒト 5 1 (1 μ g)に対応し、レーン2はヒト胎盤組織から精製

された 5 1 (50 μ l) に対応する。少量の90kD夾雑物 (矢印) が認められる。

【0147】

MMP - 2 および u 3 間の直接的相互作用についての我々の従来の知見に基づいて、この90kDタンパク質がインテグリンと結合するMMPの別の例であり得るか否かを調べた。

【0148】

実施例 2

5 1 の電気泳動分析

ゼラチンと共重合させた10% SDS PAGEゲル上で、精製 5 1 および 3 を分離した。トリトン X-100 で洗浄してゲルから SDS を除去し、ゲルをコラゲナーゼ緩衝液中でインキュベートした。クーマシーブルーで染色して、ゼラチン分解性帯域を可視化した。精製 5 1 調製物は、図 2 に示したように MMP - 9 と同一分子量で移動するゼラチン分解性活性 (90kD) を含有する。図では、レーン 1 は proMMP - 9 (1 μ g) に対応し、レーン 2 は APMa 活性化 MMP - 9 (1 μ l) に対応し、レーン 3 は胎盤組織からの prep-1 精製 5 1 (1 μ g) に対応し、レーン 4 は胎盤組織からの精製 3 (1 μ g) に対応し、そしてレーン 5 は胎盤組織からの prep-2 精製 5 1 (1 μ g) に対応する。

【0149】

これらのデータは、5 1 と同時精製する夾雑90kDタンパク質がMMP - 9 であり得ることを示唆する。さらに、これらの試験は、MMP - 9 がインテグリン 5 1 と直接結合し得ることを示唆する。

【0150】

実施例 3

精製インテグリン 5 1 のウエスタンブロット分析

10% SDS PAGE により精製インテグリン 5 1 および 3 (1 μ g) を分離し、ニトロセルロースに移して、抗 - MMP - 9 Ma b でブロット化した。MMP - 9 に向けられるモノクローナル抗体を用いた図 3 に示した精製 5 1 のウエスタンブロット分析は、5 1 の調製物内の MMP - 9 の存在を

確証する。図3において、レーン1は組換えMMP-9 (1 μ g) に対応し、レーン2は胎盤組織からの精製 5 1 (1 μ l) に対応し、レーン3は胎盤組織からの精製 3 (1 μ g) に対応する。

【0151】

実施例4

組換えMMP-9は 5 1 と結合する

5 1 または対照タンパク質 - カゼインをマイクロ滴定ウエル上に固定した (10 μ g/ml)。組換えヒトMMP-9 (2 μ g/ml) を対照被覆ウエルと1時間結合させた。抗MMP-9 Mabを用いて、MMP-9結合を検出した。図4から分かるように、精製MMP-9はインテグリン 5 1 と直接結合する。データ棒は、三重反復試験ウエルからの平均光学濃度 \pm 標準偏差を表す。

【0152】

実施例5

5 1 陰性細胞の表面と結合するMMP-9の低減

5 1 が細胞表面とのMMP-9の結合の促進に関与し得るか否かを評価するために、結合検定を実施した。内因性MMP-9をもし存在してもほとんど発現しないヒトHT29細胞を、組換えMMP-9とともにインキュベートした (0~100 ng/ml)。非結合酵素を除去し、全細胞溶解物を調製した。ゼラチンと重合させた10% SDS PAGEゲル上で細胞溶解物 (100 μ g/レーン) を分離し、クーマシーブルーで染色して、ゼラチン分解性帯域を可視化した。図5に示した結果は、5 1 を欠く腫瘍細胞がMMP-9と結合する能力を有意に低減したことを示唆し、5 1 が細胞表面へのタンパク質分解性活性の局在化において重要な役割を演じ得るというさらなる証拠を提供した。図では、上部は 5 1 発現HT29-30に対応し、下部は、5 1 陰性HT29-1に対応し、NTは非処置であり、50は50 ng/mlのMMP-9を用いてインキュベートした細胞であり、100は100 ng/mlのMMP-9とともにインキュベートした細胞である。

【0153】

実施例6

ヒト黒色腫血管中のMMP-9および 5 1 の同時局在化

黒色腫患者からのヒト剖検試料を即時凍結し、組織切片を、MMP - 9に向けられるポリクローナル抗体および $\alpha 1$ に向けられるモノクローナル抗体で同時染色した後、ローダミン結合ヤギ抗マウスおよびFITC結合ヤギ抗ウサギIgGとともにインキュベートした。顕微鏡写真を200倍で撮影した。顕微鏡写真において、赤色は $\alpha 1$ インテグリン発現を示し、緑色はMMP - 9発現を示し、黄色はMMP - 9および $\alpha 1$ の同時局在化を示す。モノクロ写真である図6では、白色領域は黄色を表し、黒色領域は赤色、緑色または主要細胞を表す。図6は、MMP - 9および $\alpha 1$ インテグリンが、ヒト黒色腫剖検試料中の腫瘍細胞表面および血管に同時局在化することを示す。

【0154】

これらの知見は、MMP - 9および $\alpha 1$ インテグリンがともにヒト血管区画内に、ならびに腫瘍細胞それ自体に密接に関連することを示唆する。

【0155】

実施例7

MMP - 9と結合する合成ペプチドの生成

MMP - 9および $\alpha 5$ $\alpha 1$ の両方のアミノ酸配列の分析は、これら2つのタンパク質間の相互作用を媒介し得る配列を示唆した。例えば、合成ペプチドを生成し、MMP - 9の結合活性に関して分析した。本ペプチドの結合能力を、固相結合検定により分析した。

【0156】

分析した配列の間で、ペプチドは、MMP - 9または $\alpha 1$ インテグリンに対する結合特異性を示すことが判明した。したがって、図7に示したように、FRIP - 1と呼ばれるペプチドは、固相結合分析においてMMP - 9と特異的に結合することが示された。3つの鍵となる重要なアミノ酸が変化している以外はFRIP - 1と同一であるAAAペプチドは、いかなる結合能力もほとんど示さなかった。これらの知見は、合成ペプチドFRIP - 1がMMP - 9 / $\alpha 5$ $\alpha 1$ 相互作用に参与する重要なアミノ酸を表すと思われるということを示唆する。

【0157】

FRIP - 1合成ペプチドは、配列番号1：

CysArgLeuArgSerGlyGluProGlnCys
を有する。

FRIP-1 (配列番号1) アミノ酸配列は、ヒト酵素MMP-9のC末端ホモペキシ様ドメイン内の領域に由来した。

【0158】

AAA対照ペプチドは、以下の配列を有する：配列番号2：

CysArgAlaAlaAlaGlyGluProGlnCys。

【0159】

対照の結合は、以下の配列を有するAAAA対照ペプチドを用いても実施した：配列番号3：

CysArgAlaAlaAlaAlaGluProGlnCys。

【0160】

実施例8

FRIP-1ペプチドはヒヨコ胚における血管形成を抑制するbFGFを用いて10日齢ヒヨコ胚のCAM上で血管形成を誘導した。24時間後、胚に100 μ gのFRIP-1またはAAA対照ペプチドを1回静注した。3日後、フィルター円板の面積内の血管分枝点の数を計数して、血管形成を定量した。図8Aは、典型的実験からのCAM組織の代表例を示す。図8Bは、血管形成実験の定量である。図8Bの結果は、MMP-9と結合するFRIP-1合成ペプチドがヒヨコ胚CAMモデルにおける血管形成を遮断することを示す。図8Bでは、NTはbFGFなしに対応し、FRIP-1はbFGF+FRIP-1ペプチドに、そしてAAAはbFGF+対照AAAペプチドに対応する。データ棒は、5~10胚/条件の平均 \pm 標準偏差を表す。

このデータは、MMP-9 / 5 1相互作用が血管形成において重要な役割を演じ得ることを示唆する。

【0161】

実施例9

合成ペプチドに向けられるMabの生成

FRIP-1ペプチドを担体タンパク質KLHと複合させて、マウスに注入し

た。5つの代表的ハイブリドーマクローンからの順化培地を、FRIP-1ペプチドとのまたは対照AAAペプチドとの結合に関してELISAにより分析した。図9に示したデータは、三重反復試験ウエルからの平均相対結合（光学濃度）±標準偏差を表す。

【0162】

図9に示したように、FRIP-1ペプチドに対して多数のMabを生じ、これらの抗体のうちのいくつか、例えば、MabFM155は、FRIP-1ペプチドに対して高特異性を示したが、対照ペプチドAAAとは反応しなかった。したがって、MabFM155をさらなる評価のために選定した。

【0163】

実施例10

MMP-9 / 5 1相互作用に及ぼすMabFM155の影響

結論：

5 1をマイクロ滴定ウエル上に固定した（10µg/ml）。組換えヒトMMP-9（2µg/ml）を、MabFM155またはLM609の存在下または不存在下で結合させた。抗MMP-9ポリクローナル抗体を用いて、MMP-9結合を検出した。結果を図10に示す。データ棒は、三重反復試験ウエルからの平均光学濃度±標準偏差を表す。図では、NTは非処置に対応し、FM155はMab抗FRIP-1に対応し、そしてLM609は抗 3 Mabに対応する。

【0164】

図10は、MabFM155が精製 5 1と結合するMMP-9の能力を特異的に遮断することを示し、これは、FM155がこの相互作用を生体内で乱すために用い得ることを示唆する。

【0165】

実施例11

黒色腫増殖に及ぼすFM155の全身投与の影響

CS-1黒色腫細胞（ 5×10^6 ）を10日齢ヒヨコ胚のCAM上に接種した。24時間後、胚に精製MabFM155（2.0µg、10.0µg、50.0µg）を1回静注した。7日後、腫瘍を切除し、湿質量を測定した。図11は、腫瘍の質量の定量を表

す。データ棒は、5～10胚 / 条件の平均 ± 標準偏差を表す。NTは非処置に関するデータを表す。

【0166】

図11は、MabFM155がCS-1黒色腫増殖を生体内で有効に抑制することを説明する。これらの知見は、MMP-9および51の相互作用の遮断が血管形成および腫瘍増殖の生体内での調節において有意の役割を演じ得ることを示す。

【0167】

本明細書の本文中に引用した以下の出版物はすべて、それらの記載内容が参照により本明細書中に含まれる。

本発明の前記の説明は説明および例示のために示したもので、本明細書中での実施の厳密な方式に本発明を限定するものではないと理解されるべきである。したがって、本発明の精神を逸脱しない限り、当業者は変更をなし得るし、本発明の範囲は以下の特許請求の範囲に関して解釈されるべきである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> University of Southern California
Brooks, Peter C.
Hassanieh, Loubna
Rodriguez, Dorothy

<120> NOVEL METHOD AND COMPOSITION FOR
INHIBITION OF ANGIOGENESIS USING ANTAGONISTS BASED ON MMP-9
AND BETA 1 INTEGRINS

<130> 13761-734PCT

<140> Not Yet Assigned
<141>

<150> US 60/143,581
<151> 1999-07-13

<150> US 60/152,495
<151> 1999-09-02

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence, FRIP-1

<223> Binds to MMP-9 and beta 1 integrins.

<400> 1
Cys Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro Gln Cys
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence, AAA

<223> Binds to MMP-9 and beta 1 integrins with
substantially reduced binding capacity compared to
the binding capacity of FRIP-1 to MMP-9 and beta 1
integrins.

<400> 2
Cys Arg Ala Ala Ala Gly Glu Pro Gln Cys
1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic sequence, AAAA

<223> Binds to MMP-9 and beta 1 integrins with
substantially reduced binding capacity compared to
the binding capacity of FRIP-1 to MMP-9 and beta 1
integrins.

<400> 3
Cys Arg Ala Ala Ala Ala Glu Pro Gln Cys
1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、フィブロネクチンの110 kD細胞結合ドメインを利用する胎盤溶解物からのインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の精製の結果を示す。

【図2】

図2は、精製 $\alpha 5 \beta 1$ および $\alpha v \beta 3$ がゼラチンと共重合させた10% SDS PAGEゲル上で分離された場合の、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の電気泳動分析の結果を示す。

【図3】

図3は、精製インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ および $\alpha v \beta 3$ (1 μ g) が分離された場合の、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図4】

図4は、 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ に結合する組換えMMP-9または対照タンパク質 - カゼインに関する結合検定の結果を示す。

【図5】

図5は、組換えMMP-9が $\alpha 5 \beta 1$ 陽性および陰性細胞とともにインキュベートされた実験の結果を示す。

【図6】

図6は、ヒト黒色腫血管におけるMMP-9および $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の同時局在化を確定するための実験の結果を示す。

【図7】

図7は、MMP-9と結合する合成ペプチドを同定するための実験の結果を示す。FRIP-1は、配列番号1であり、AAAはAAAペプチドであって、これは配列番号2である。

【図8A】

図8Aは、FRIP-1ペプチドが血管形成が誘導されていたヒヨコ胚中に注入された実験の結果を示す。

【図8B】

図8Bは、FRIP-1ペプチドが血管形成が誘導されていたヒヨコ胚中に注入された実験の結果を示す。

【図9】

図9は、合成ペプチドFRIP-1（配列番号1）に向けられるMabを生成するための実験の結果を示す。

【図10】

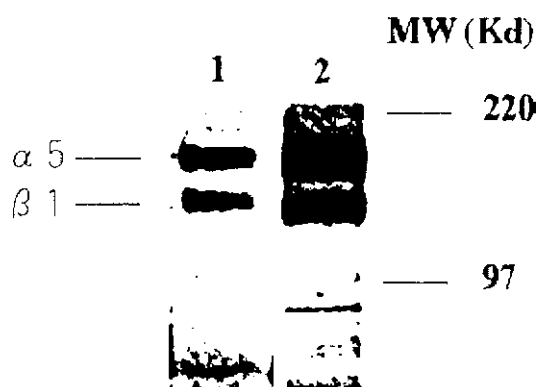
図10は、組換えヒトMMP-9（2 μ g/ml）をMab FM155またはLM609の存在下または不存在下で結合させた実験の結果を示す。

【図11】

図11は、黒色腫増殖に及ぼすFM155の全身投与の作用を確定するための実験の結果を示す。

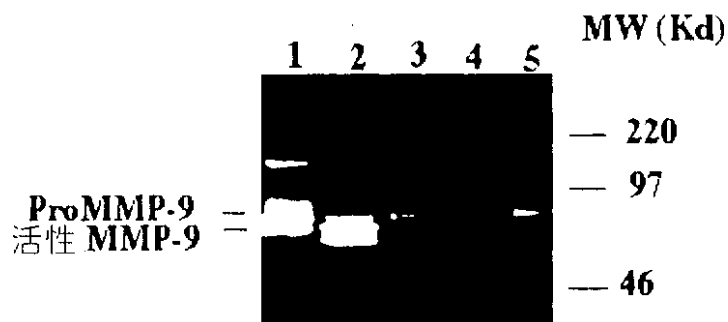
【図1】

FIGURE 1



【図2】

FIGURE 2



【図3】

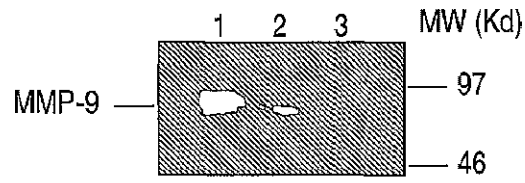
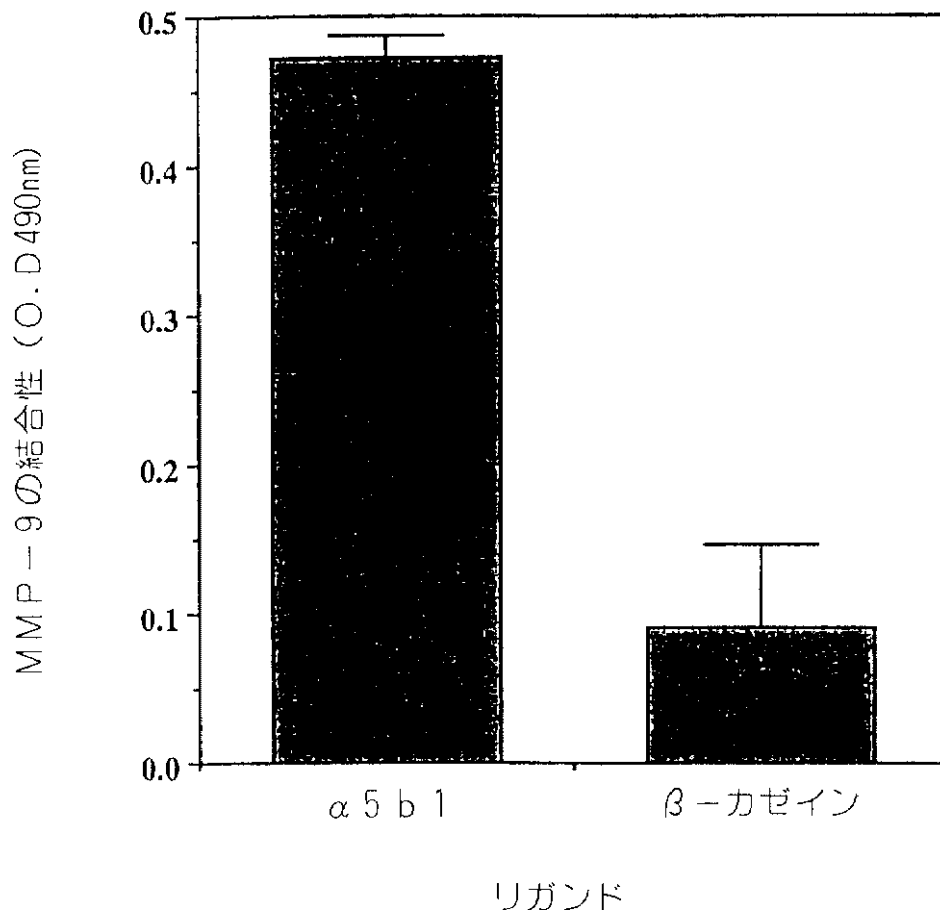


FIG. 3

【図4】

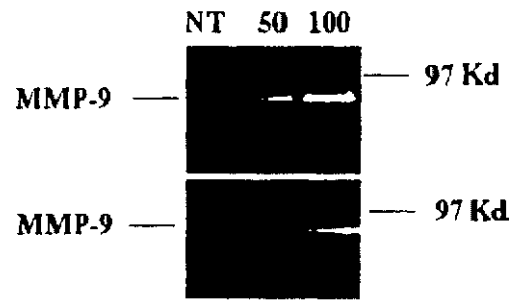
FIGURE 4



【図5】

FIGURE 5

$\alpha 5 \beta 1$ 陽性 (HT29-30)

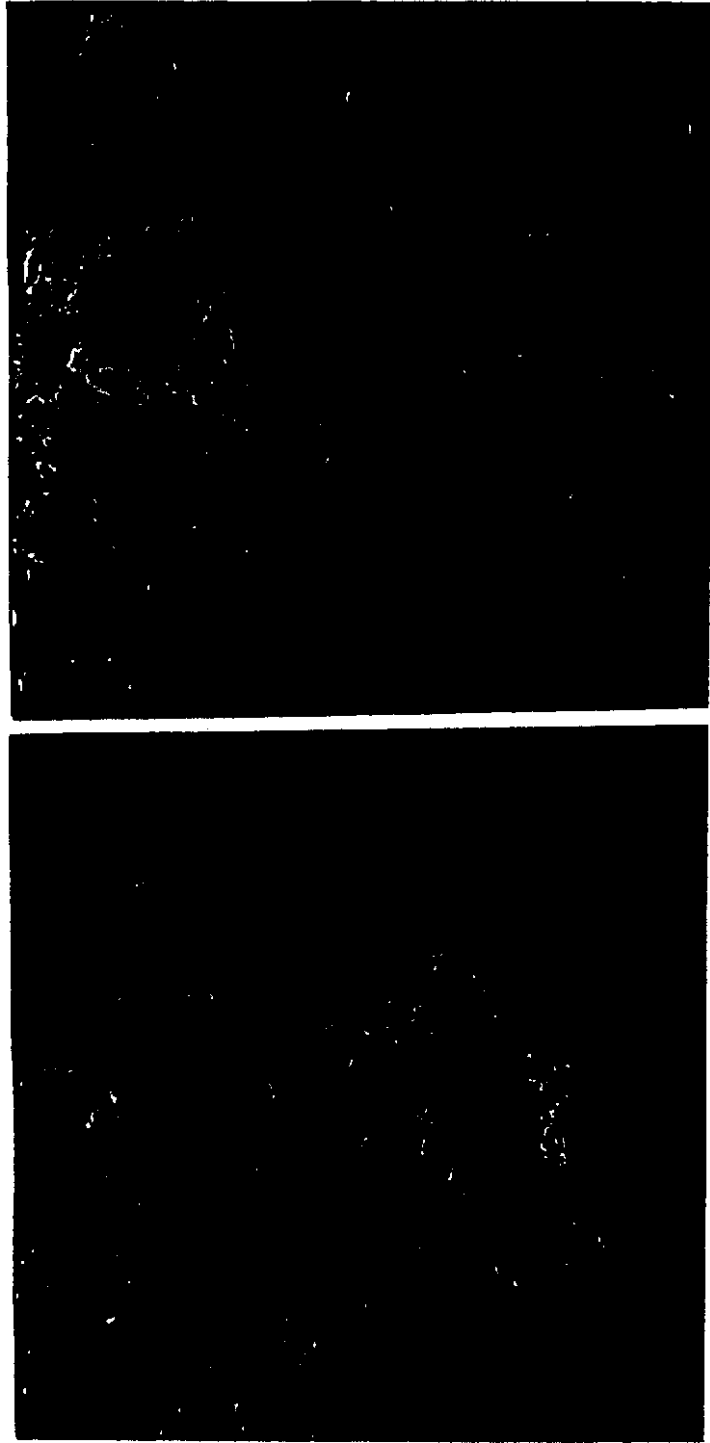


$\alpha 5 \beta 1$ 陰性 (HT29-1)

【図6】

FIGURE 6

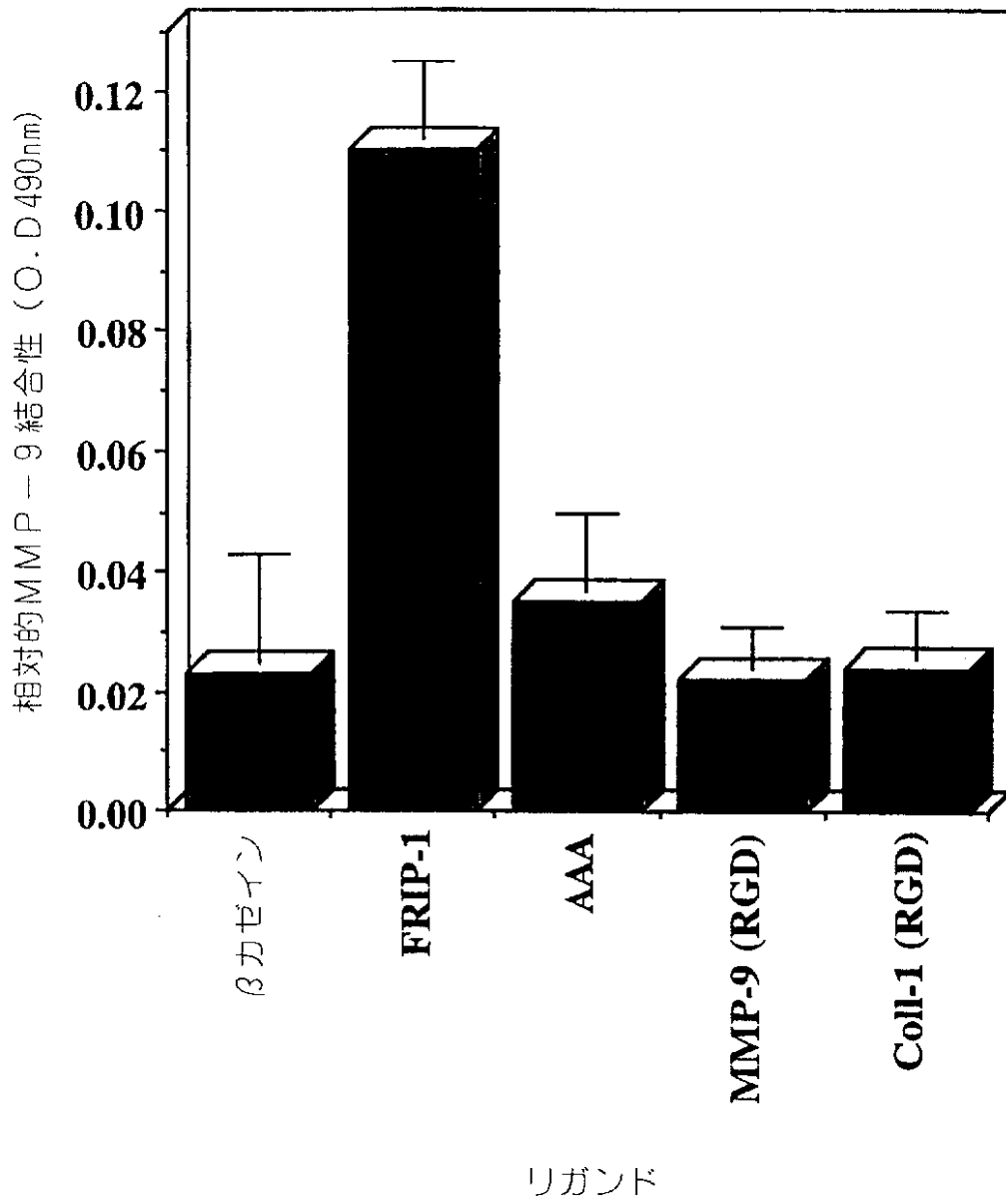
ヒトメラノーマ腫瘍生検内のMMP-9と
β1インテグリンの同時局在化



【図7】

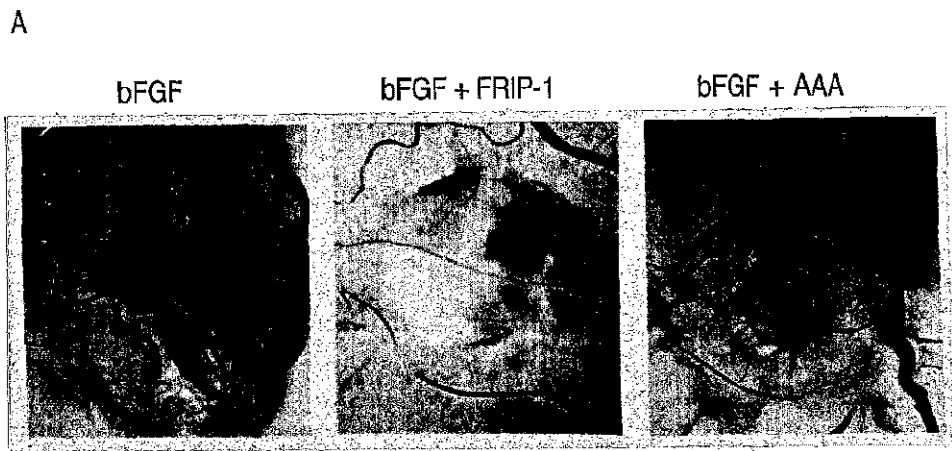
FIGURE 7

A



【図8A】

FIG. 8A



【図8B】

FIGURE 8B

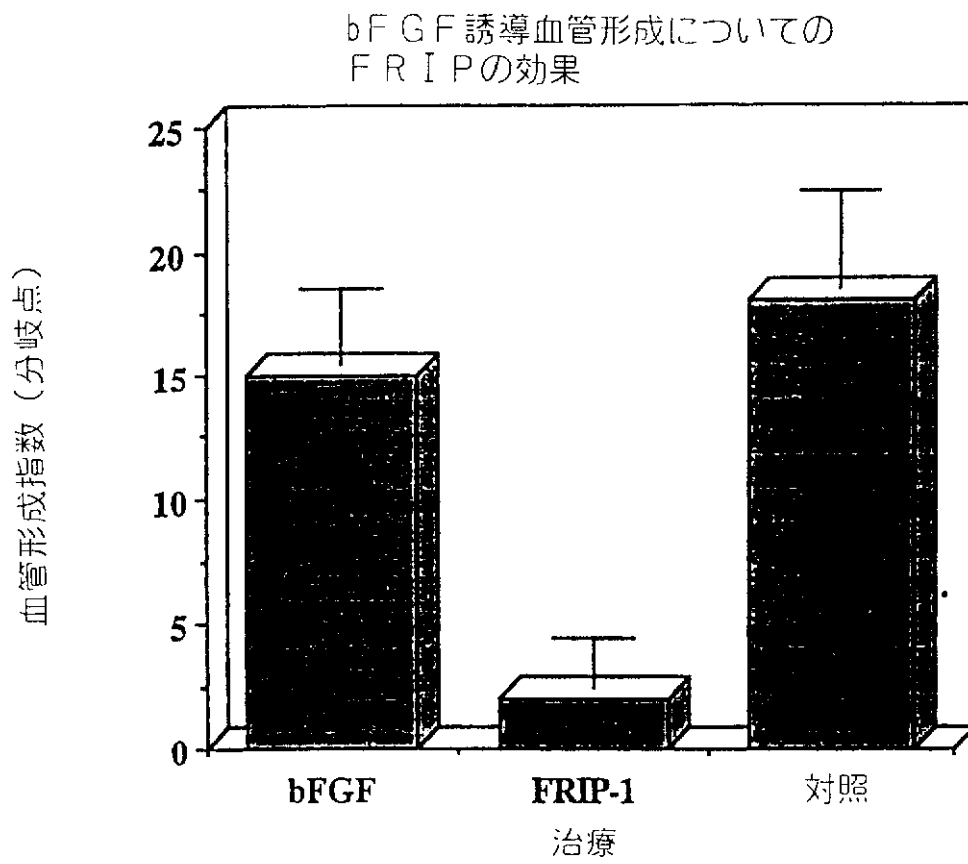


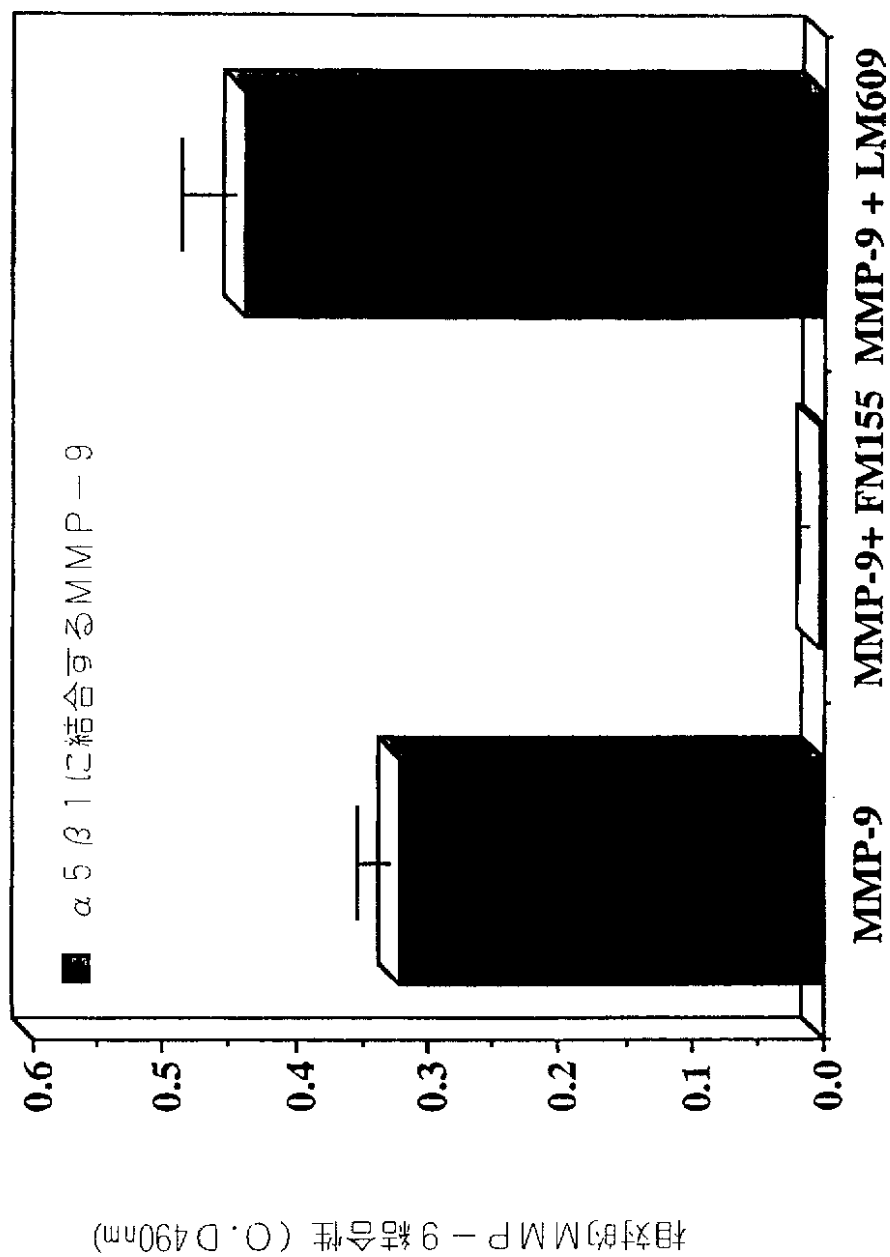
FIGURE 9

FRIP-1 ペプチドについてのハイブリドーマからの
順化培地の反応性

ハイブリドーマクローン名	FRIP-1 (O.D 490nm)	AAA (O.D 490nm)
FM 101	0.306 (± 0.041)	0.275 (± 0.033)
FM132	0.576 (± 0.022)	0.037 (± 0.026)
FM155	0.481 (± 0.063)	0.055 (± 0.039)
FM158	0.339 (± 0.039)	0.178 (± 0.066)
FM170	0.241 (± 0.037)	0.201 (± 0.012)

【図10】

FIGURE 10



【図11】

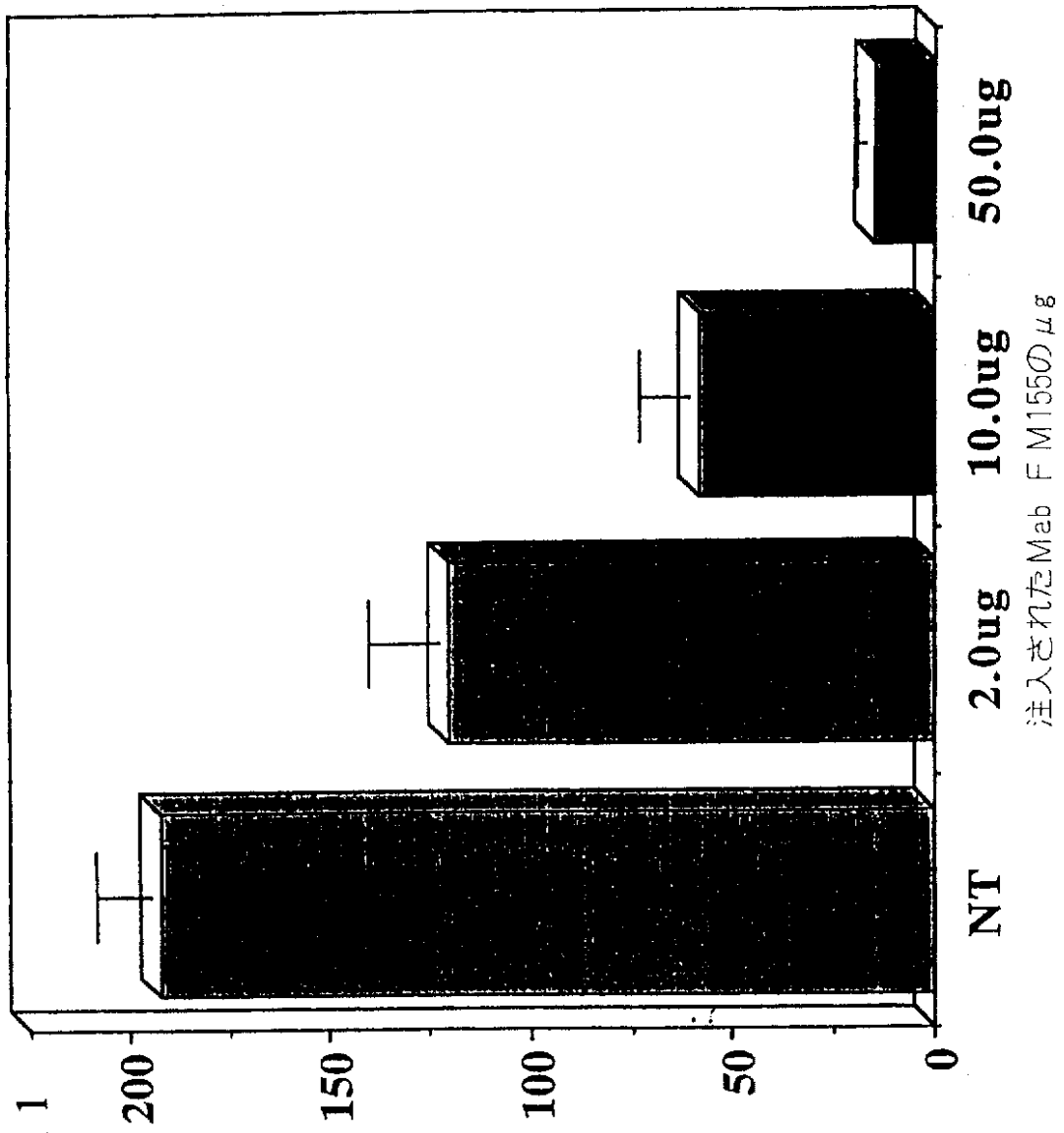


FIGURE 11

(87)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/19095					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	A61K39/395	A61K38/00	A61K31/00	A61K31/7088	C07K14/705
	A61K47/48	A61K51/00	G01N33/53	A61P9/00	A61P17/06
	A61P25/00	A61P35/00	A61P35/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 7 C07K					
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, STRAND					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	VARNER J A ET AL: "ANTAGONISTS OF VASCULAR CELL INTEGRIN ALPHA5BETA1 INHIBIT ANGIOGENESIS" CIRCULATION, US, AMERICAN HEART ASSOCIATION, DALLAS, TX, vol. 98, no. 17, November 1998 (1998-11), page 4166 XP000857372 ISSN: 0009-7322 the whole document				1,3,6, 8-12, 17-20, 53,54, 58,60, 61,64, 101-104
X	WO 95 14714 A (JOLLA CANCER RES FOUND) 1 June 1995 (1995-06-01) page 3 -page 4; claims 64-69; example VII -/--				1,3,6, 9-12, 18, 53,60, 101-104
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
15 December 2000			15.01.01		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer von Ballmoos, P		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/19095

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KOIVUNEN E ET AL: "Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 AUG) 17 (8) 768-74. ; XP000941541</p> <p>abstract page 770, right-hand column, paragraph 5 page 771, right-hand column, last paragraph</p>	<p>1,9-12, 18,28, 34,42, 45-50, 53,57, 58,60, 101-104</p>
X	<p>LOZONSCHI L ET AL: "Controlling tumor angiogenesis and metastasis of C26 murine colon adenocarcinoma by a new matrix metalloproteinase inhibitor, KB-R7785, in two tumor models." CANCER RESEARCH, (1999 MAR 15) 59 (6) 1252-8. ; XP000941536</p> <p>abstract page 1257</p>	<p>1,2, 9-12,28, 34,42, 45-47, 50,53, 54,57, 58,60, 61, 101-104</p>
A	<p>BROOKS P C: "Role of integrins in angiogenesis." EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, (1996 DEC) 32A (14) 2423-9. REF: 67 ; XP000941543</p> <p>the whole document</p>	<p>1-14, 17-24, 27,28, 33,34, 42, 45-51, 53-104</p>
P,X	<p>BROOKS, PETER C. (1): "MMP - 9 binds to a ligand induced cryptic site within b1 integrin: Role in angiogenesis and tumor growth." IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY ANIMAL, (MARCH, 2000) VOL. 36, NO. 3 PART 2, PP. 29.A. PRINT. MEETING INFO.: MEETING OF THE SOCIETY FOR IN VITRO BIOLOGY WORLD CONGRESS ON IN VITRO BIOLOGY SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA JUNE 10-15, 2000 , XP000943742</p> <p>the whole document</p>	<p>1-14, 17-24, 27,28, 33,34, 42, 45-51, 53-104</p>
P,X	<p>WO 99 58139 A (UNIV CALIFORNIA ;VARNER JUDITH A (US)) 18 November 1999 (1999-11-18)</p> <p>the whole document</p>	<p>1-14, 17-24, 27,28, 33,34, 42, 45-51, 53-104</p>

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US 00/19095
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 Although claims 53-76 (insofar as they relate to an in vivo method) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 15, 16, 25, 26, 29-32, 35-41, 43, 44, 52
 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
 see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 15,16,25,26,29-32,35-41,43,44,52

Claims 25,26,29,31,32,35,37-41,43 lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the polypeptide antagonist by reference to a result to be achieved, namely by having a certain binding affinity. The binding affinity is defined in terms of functional features which are unclear since it is not indicated under what conditions the affinity is measured. This lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has not been carried out for claims 25,26,29,31,32,35,37-41,43 but only for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the peptide antagonist clearly characterized by its sequence (dependent claims 27,28,33,34,42).

In claims 15,16,30,36,44,52 an indication of the deposit accession number is missing. According to Rule 13bis PCT, the information as to the accession number should have been given within 16 months from the priority date. Since, apart from the meaningless internal designation (Art. 6 PCT), no information is available in the application, the search could not be performed for claims 15,16,30,36,44,52.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/19095

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9514714 A	01-06-1995	US 5981478 A	09-11-1999
		AU 682561 B	09-10-1997
		AU 1259695 A	13-06-1995
		EP 0730607 A	11-09-1996
		EP 0906919 A	07-04-1999
		JP 9509142 T	16-09-1997
		US 5627263 A	06-05-1997
WO 9958139 A	18-11-1999	AU 3973499 A	29-11-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)		
A 6 1 P	9/00	A 6 1 P	17/06	4 H 0 4 5	
	17/06		25/00		
	25/00		35/00		
	35/00		35/04		
	35/04	C 0 7 K	16/28		
C 0 7 K	16/28		16/40		
	16/40	C 1 2 N	9/50		
C 1 2 N	9/50	G 0 1 N	33/15		Z
G 0 1 N	33/15		33/50		Z
	33/50		33/53		D
	33/53			M	
	33/566		33/566		
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 P	21/08		
		A 6 1 K	37/02		

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 ロドリゲズ, ドロシー
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 90631,
 ラ ハブラ, ラモナ アベニュー 2030

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA36 FB02 FB03
4B050 CC03 DD11 LL01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA05 DA13
4C084 AA02 AA07 AA17 DC02 DC32
MA17 MA66 NA14 ZA011
ZA361 ZA891
4C085 AA13 AA14 BB11 BB41 BB43
CC05 DD22 DD23 GG01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40
DA50 DA89 EA21 EA23 EA28
EA29 FA74

专利名称(译)	使用基于MMP-9和β1整联蛋白的拮抗剂抑制血管生成的新方法和组合物		
公开(公告)号	JP2003508352A	公开(公告)日	2003-03-04
申请号	JP2001509766	申请日	2000-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	南加州大学		
[标]发明人	ブルックスピーターシー ハッサニーループナ ロドリゲズドロシー		
发明人	ブルックス,ピーター シー. ハッサニー,ループナ ロドリゲズ,ドロシー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P9/00 A61P17/06 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/40 C12N9/50 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P9/00 A61P17/06 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/2842 C07K2317/34		
FI分类号	C07K14/705.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P9/00 A61P17/06 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/28 C07K16/40 C12N9/50 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12P21/08 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/LL01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/DC02 4C084/DC32 4C084/MA17 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA891 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA89 4H045/EA21 4H045/EA23 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/FA74		
优先权	60/143581 1999-07-13 US 60/152495 1999-09-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于修饰蛋白质-蛋白质相互作用的拮抗剂，所述拮抗剂包括MMP-9和/或β1整联蛋白内的某些氨基酸序列。此类拮抗剂抑制血管生成，肿瘤生长和疾病状态。拮抗剂的实例是多肽和非多肽分子，例如新型抗体MabFM155和新型合成肽FRIP-1。公开了通过施用此类拮抗剂来抑制血管生成和疾病状态的方法。还公开了鉴定修饰蛋白-蛋白质相互作用的拮抗剂的方法，所述相互作用包括MMP-9和/或β1整联蛋白内的某些氨基酸序列。

