

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-501188

(P2012-501188A)

(43) 公表日 平成24年1月19日(2012.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
<b>GO1N 33/50 (2006.01)</b>	GO1N 33/50 P	4B024
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53 D	4B063
<b>GO1N 37/00 (2006.01)</b>	GO1N 37/00 I02	4C084
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A61K 45/00	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-525256 (P2011-525256)  
 (86) (22) 出願日 平成21年8月28日 (2009. 8. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成23年4月25日 (2011. 4. 25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/055434  
 (87) 国際公開番号 W02010/025414  
 (87) 国際公開日 平成22年3月4日 (2010. 3. 4)  
 (31) 優先権主張番号 61/093, 161  
 (32) 優先日 平成20年8月29日 (2008. 8. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625  
 ジェネンテック, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス  
 サンフランシスコ ディーエヌエー  
 ウェイ 1  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教  
 (72) 発明者 ファーララ, ナポレオン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 941  
 09, サン フランシスコ, 704番  
 , パシフィック アヴェニュー 209  
 0

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGF非依存性腫瘍についての診断薬および治療

(57) 【要約】

VEGF非依存性腫瘍を診断又は同定する方法及びVEGF非依存性腫瘍を治療する方法を提供する。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象から得た試験試料中の1つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定することを含む対象のVEGF非依存性腫瘍を検出する方法であって、参照試料と比較した、試験試料中の1つまたは複数の遺伝子の発現レベルの変化が、対象のVEGF非依存性腫瘍の存在を示し、少なくとも1つの遺伝子は、S100A8、S100A9、Tie-1、Tie-2、PDGFCおよびHGFからなる群から選択される方法。

**【請求項 2】**

発現レベルがmRNA発現レベルである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

mRNA発現レベルを、マイクロアレイまたはqRT-PCRを使用して測定する、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

mRNA発現レベルの変化が増加である、請求項2に記載の方法。

**【請求項 5】**

遺伝子のうちの1つが、S100A8またはS100A9である、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

mRNA発現レベルの変化が減少である、請求項2に記載の方法。

**【請求項 7】**

遺伝子のうちの1つが、PDGFC、Tie-1またはTie-2である、請求項6に記載の方法。

**【請求項 8】**

遺伝子のうちの1つがTie-1またはTie-2であり、前記方法が試験試料中の第2の遺伝子のmRNA発現レベルを決定することをさらに含み、第2の遺伝子がCD31、CD34、VEGFR1またはVEGFR2である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

試験試料中のCD31、CD34、VEGFR1またはVEGFR2のmRNA発現レベルが、参照試料と比較して減少している、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

発現レベルがタンパク質発現レベルである、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

タンパク質発現レベルを、免疫学的アッセイを使用して測定する、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

免疫学的アッセイがELISAである、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

タンパク質発現レベルの変化が増加である、請求項10に記載の方法。

**【請求項 14】**

遺伝子のうちの1つがHGFである、請求項13に記載の方法。

**【請求項 15】**

対象から得た試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現レベルを決定することを含む対象のVEGF非依存性腫瘍を検出する方法であって、参照試料と比較した、試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現レベルの変化が、対象のVEGF非依存性腫瘍の存在を示し、少なくとも2つの遺伝子は、S100A8、S100A9、Tie-1、Tie-2、CD31、IL-1、PLGF、PDGFCおよびHGFからなる群から選択される方法。

**【請求項 16】**

発現レベルがmRNA発現レベルである、請求項15に記載の方法。

**【請求項 17】**

mRNA発現レベルの変化が増加である、請求項16に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 18】  
遺伝子のうちの1つが、S100A8、S100A9、PLGFまたはIL-1である、請求項17に記載の方法。
- 【請求項 19】  
mRNA発現レベルの変化が減少である、請求項16に記載の方法。
- 【請求項 20】  
遺伝子のうちの1つが、PDGFC、Tie-1、Tie-2またはCD31である、請求項19に記載の方法。
- 【請求項 21】  
発現レベルがタンパク質発現レベルである、請求項15に記載の方法。 10
- 【請求項 22】  
タンパク質発現レベルの変化が増加である、請求項21に記載の方法。
- 【請求項 23】  
遺伝子のうちの1つが、IL-1、PLGFまたはHGFである、請求項22に記載の方法。
- 【請求項 24】  
遺伝子のうちの2つが、IL-1およびPLGFである、請求項23に記載の方法。
- 【請求項 25】  
対象がヒトである、請求項1または15に記載の方法。
- 【請求項 26】  
対象が癌と診断されている、請求項25に記載の方法。 20
- 【請求項 27】  
癌が、非小細胞肺癌、腎臓細胞癌、神経膠芽腫、乳癌および結腸直腸癌からなる群から選択される、請求項26に記載の方法。
- 【請求項 28】  
VEGF非依存性腫瘍を有する対象を治療することをさらに含み、該治療がIL-1アンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニストまたはc-Metアンタゴニストのうちのいずれか1つの有効量を対象に投与することを含む、請求項1または15に記載の方法。
- 【請求項 29】  
有効量の化学療法剤を対象に投与することをさらに含む、請求項28に記載の方法。 30
- 【請求項 30】  
有効量のVEGFアンタゴニストを対象に投与することをさらに含む、請求項28に記載の方法。
- 【請求項 31】  
VEGFアンタゴニストが抗VEGF抗体である、請求項30に記載の方法。
- 【請求項 32】  
抗VEGF抗体がモノクローナル抗体である、請求項31に記載の方法。
- 【請求項 33】  
抗VEGF抗体がペバシズマブである、請求項32に記載の方法。 40
- 【請求項 34】  
IL-1アンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニストまたはc-Metアンタゴニストのうちのいずれか1つの有効量を対象に投与することを含む、対象のVEGF非依存性腫瘍を治療する方法。
- 【請求項 35】  
有効量のVEGFアンタゴニストを対象に投与することをさらに含む、請求項34に記載の方法。
- 【請求項 36】  
VEGFアンタゴニストが抗VEGF抗体である、請求項35に記載の方法。 50

## 【請求項 37】

抗 V E G F 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

抗 V E G F 抗体がベバシズマブである、請求項 37 に記載の方法。

## 【請求項 39】

I L - 1 アンタゴニストが抗 I L - 1 抗体である、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 40】

c - M e t アンタゴニストが抗 c - M e t 抗体である、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 41】

H G F アンタゴニストが抗 H G F 抗体である、請求項 34 に記載の方法。 10

## 【請求項 42】

対象がヒトである、請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 43】

対象が癌と診断されている、請求項 42 に記載の方法。

## 【請求項 44】

癌が、非小細胞肺癌、腎臓細胞癌、神経膠芽腫、乳癌および結腸直腸癌からなる群から選択される、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

有効量の化学療法剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 34 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】 20

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

本出願は、米国特許法施行規則第 1 . 5 3 条第 ( b ) 項第 ( 1 ) 号の下に出願する非仮特許出願であり、内容が参照により本明細書に組み込まれている 2 0 0 8 年 8 月 2 9 日出願の仮特許出願第 6 1 / 0 9 3 , 1 6 1 号に対して、米国特許法第 1 1 9 条第 ( e ) 項に基づく優先権を主張する。

## 【0002】

本発明は、腫瘍の成長および腫瘍型の分野に関する。本発明は、癌および腫瘍の成長の診断および治療のための阻害剤および診断薬の腫瘍マーカーならびにそれらの使用に関する。 30

## 【背景技術】

## 【0003】

米国においては、悪性腫瘍（癌）が心臓疾患に次ぐ主要な死亡原因である（例えば、Boringら、CA Cancel J. Clin. 43:7 (1993) を参照されたい）。癌は、正常組織に由来する、増殖して腫瘍塊を形成する異常細胞または新生物細胞の数の増加、これらの新生物腫瘍細胞の隣接組織への浸潤、ならびに血液またはリンパ系を介して局所リンパ節にも、転移と呼ばれるプロセスを介して遠位部位にも最終的に広がる悪性細胞の発生によって特徴付けられる。癌の状況においては、正常細胞であれば成長しない条件下でも細胞が増殖する。癌は、多種多様な形で現れ、浸潤性および侵襲性の違いによって特徴付けられる。 40

## 【0004】

典型的には、癌型に応じて、患者が利用することができる治療の選択肢はいくつかあり、これらとして、化学療法、放射線照射および抗体に基づいた薬物が挙げられる。異なる治療計画から臨床転帰を予測するのに有用な診断方法があれば、これらの患者の臨床管理にとって大いに有益であろう。遺伝子発現と特定の癌型の同定との相関性を、例えば、突然変異特異的アッセイ、マイクロアレイ解析、qPCR等によって探索した研究がいくつかある。そのような方法は、患者が提示する癌の同定および分類に有用であり得る。

## 【0005】

今では、血管新生が、多様な障害の病変形成に関連があることが十分確立している。こ 50

これらの障害は、固形腫瘍および転移、アテローム動脈硬化、後水晶体線維増殖、血管腫、慢性炎症、増殖性網膜症、例えば、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性（AMD）、血管新生緑内障等の眼内血管新生疾患、移植した角膜組織およびその他の組織の免疫拒絶、関節リウマチ、ならびに乾癬を含む。Folkmanら、*J. Biol. Chem.*、267:10931~10934(1992); Klagsbrunら、*Annu. Rev. Physiol.* 53:217~239(1991); および Garner A.、「*Vascular diseases*」、In: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*、Garner A.、Klintworth GK編、2版(Marcel Dekker、NY、1994)、1625~1710頁。

10

#### 【0006】

腫瘍が成長する際に、血管新生は、過形成から新生物への移行の点でも、腫瘍の成長および転移に栄養を与える点でも重大であるようである。Folkmanら、*Nature* 339:58(1989)。血管新生によって、腫瘍細胞は、正常細胞と比較して、成長の利点および増殖の自律性を獲得することが可能になる。腫瘍は通常、利用可能な毛細血管床から離れているため、わずか数立方ミリメートルのサイズまでしか増殖できない単一の異常細胞として始まり、長期間にわたりさらに成長および播種することなく「休止状態」に留まることができる。次いで、いくつかの腫瘍細胞が、血管新生の表現型に転換して内皮細胞を活性化し、これらの細胞は、増殖および成熟して新しい毛細血管となる。これらの新たに形成された血管によって、原発性腫瘍の成長の継続のみならず、転移性腫瘍細胞の播種および再コロニー形成も可能になる。したがって、乳癌およびいくつかの他の腫瘍において、腫瘍切片中の微小血管の密度と、患者の生存との間に相関性が認められている。Weidnerら、*N. Engl. J. Med.* 324:1~6(1991); Horakら、*Lancet* 340:1120~1124(1992); Macchiariniら、*Lancet* 340:145~146(1992)。血管新生の転換を制御する正確な機構は十分には理解されていないが、腫瘍塊の血管新生は、多数の血管新生の刺激剤と阻害剤との正味のバランスの結果として生じると考えられている(Folkman、1995、*Nat Med* 1(1):27~31)。

20

#### 【0007】

血管内皮増殖因子(VEGF)が、病理学的状態における血管新生の主要な制御因子であるという認識から、VEGF活性を遮断する多数の試みがなされている。VEGFは、最も十分に特徴付けられている、最も強力な血管新生の正の制御因子のうちの1つである。例えば、Ferrara、N. および Kerbel、R. S. *Angiogenesis as a therapeutic target. Nature* 438:967~74(2005)を参照されたい。VEGFは、血管新生および血管形成における血管新生因子であることに加え、多面的な増殖因子として、内皮細胞の生存、血管透過性および血管拡張、単核球走化性、ならびにカルシウムの流入等のその他の生理学的プロセスにおいて、複数の生物学的な作用を示す。FerraraおよびDavis-Smyth(1997) *Endocrine Rev.* 18:4~25。さらに、VEGFが、網膜色素上皮細胞、隣管細胞およびシュワン細胞等のいくつかの非内皮細胞型に対して分裂促進作用を及ぼすことを報告した研究もある。例えば、Guerrinら *J. Cell Physiol.* 164:385~394(1995); Oberg-Welshら *Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125~132(1997); および Sondellら *J. Neurosci.* 19:5731~5740(1999)を参照されたい。

30

40

#### 【0008】

VEGF活性を遮断するために、多数の試みがなされている。阻害性の抗VEGF受容体抗体、可溶性受容体構築物、アンチセンス戦略、VEGFに対するRNAアプタマーおよび低分子量VEGF受容体チロシンキナーゼ(RTK)阻害剤は全て、VEGFシグナル伝達を妨害するのに使用するために提案されたものである。例えば、Siemeist

50

erら *Cancer Metastasis Rev.* 17:241~248 (1998)を参照されたい。抗VEGF中和抗体が、ヌードマウスにおいて、多様なヒト腫瘍細胞系の成長を抑制することが示されており (Kimら *Nature* 362:841~844 (1993); Warrenら *J. Clin. Invest.* 95:1789~1797 (1995); Borgstromら *Cancer Res.* 56:4032~4039 (1996); および Melnykら *Cancer Res.* 56:921~924 (1996))、虚血性網膜障害モデルにおける眼内血管新生も示されている (Adamisら *Arch. Ophthalmol.* 114:66~71 (1996))。実際に、ヒト化抗VEGF抗体であるベバシズマブ (AVASTIN (登録商標)、Genentech、South San Francisco、CA) が、最初に米国FDAから承認を得た、血管新生を阻害するように設計された治療薬である。例えば、Ferraraら、*Nature Reviews Drug Discovery*, 3:391~400 (2004)を参照されたい。ベバシズマブの適応は、転移性結腸直腸癌患者の第一選択または第二選択の治療のための、静脈内5-フルオロウラシルに基づく化学療法と組み合わせた使用；切除不能な、局所進行性、再発性または転移性の非扁平上皮性非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の第一選択の治療のための、カルボプラチンおよびパクリタキセルによる化学療法と組み合わせた使用；ならびに転移性、HER2陰性の乳癌について化学療法を受けたことがない患者の治療のための、パクリタキセルによる化学療法と組み合わせた使用である。

10

20

## 【0009】

しかし、治療用化合物の、腫瘍の成長を妨げる長期の能力が、その薬物耐性の獲得によって制限されることがある。種々の細胞傷害性化合物に対する耐性のいくつかの機構が、主として単細胞腫瘍モデルにおいて、同定され、機能的に特徴付けられている。例えば、Longley, D. B. および Johnston, P. G. *Molecular mechanisms of drug resistance. J Pathol* 205:275~92 (2005)を参照されたい。さらに、宿主の間質細胞と腫瘍細胞の相互作用が、薬物耐性の表現型に関与する場合もある。間質細胞は、多様な血管新生促進因子を分泌し、腫瘍細胞ほどには遺伝子が不安定ではなく、突然変異速度が増加しない (Kerbel, R. S. *Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. Bioessays* 13:31~6 (1991); Ferrara および Kerbel ならびに Hazlehurstらによる総説、Ferrara, N. および Kerbel, R. S. *Angiogenesis as a therapeutic target. Nature* 438:967~74 (2005); ならびに Hazlehurst, L. A., Landowski, T. H. および Dalton, W. S. *Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. Oncogene* 22:7396~402 (2003))。

30

40

## 【0010】

前臨床モデルにおいて、ヒト化モノクローナル抗体であるベバシズマブ (AVASTIN (登録商標)、Genentech、South San Francisco、CA)、またはベバシズマブのマウス前駆体 (A4.6.1 (A4.6.1を産生するハイブリドーマ細胞系、1991年3月29日に寄託、ATCC HB-10709))を用いてVEGFシグナル伝達を遮断することによって、試験した異種移植モデルの大部分において腫瘍の成長が顕著に阻害され、腫瘍の血管新生が低下した (Gerber および Ferrara による総説、Gerber, H. P. および Ferrara, N., *Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination wi*

50

th cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 65:671~80 (2005)。単一薬剤による抗 VEGF 治療の薬理的な作用は、治療を腫瘍の成長の早期に開始した場合に、最も目覚ましかつた。治療を腫瘍が十分に確立されるまで遅延させた場合には、阻害作用は典型的には一過性であり、最終的には腫瘍に耐性が発生した。例えば、Klement, G.ら *Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. Clin Cancer Res* 8:221~32 (2002) を参照されたい。抗 VEGF 治療に対するそのような耐性の根底にある細胞事象および分子事象は複雑である。例えば、Casnovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G. および Hanahan, D. *Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. Cancer Cell* 8:299~309 (2005); ならびに Kerbel, R. S.ら *Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. Cancer Metastasis Rev* 20:79~86 (2001) を参照されたい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、抗 VEGF 治療に対する耐性を有する対象を同定し、治療するために使用することができる分子に基づいた診断方法があれば、非常に好都合であろう。本発明は、以下の開示を精査することによって明らかになるであろう、これらおよびその他の必要性に対処する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の方法は、例えば、VEGF 非依存性腫瘍の同定、診断および治療を含めて、多様な状況において活用することができる。特定の実施形態では、本発明は、VEGF 非依存性腫瘍を同定するためのマーカーのセットを提供する。

【0013】

本明細書では、対象の VEGF 非依存性腫瘍を検出する方法を提供する。例えば、この方法は、対象から得た試験試料中の 1 つまたは複数の遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、参照試料と比較した、試験試料中の 1 つまたは複数の遺伝子の発現レベルの変化が、対象の VEGF 非依存性腫瘍の存在を示し、少なくとも 1 つの遺伝子は、S100A8、S100A9、Tie-1、Tie-2、PDGFC および HGF からなる群から選択される。

【0014】

特定の実施形態では、発現レベルは、mRNA 発現レベルである。特定の実施形態では、mRNA 発現レベルを、マイクロアレイまたは qRT-PCR を使用して測定する。特定の実施形態では、mRNA 発現レベルの変化は増加である。一実施形態では、mRNA 発現レベルの増加を示す遺伝子のうちの 1 つは、S100A8 または S100A9 である。特定の実施形態では、mRNA 発現レベルの変化は減少である。一実施形態では、mRNA 発現レベルの減少を示す遺伝子のうちの 1 つは、PDGFC、Tie-1 または Tie-2 である。特定の実施形態では、mRNA 発現レベルの減少を示す遺伝子のうちの 1 つは、Tie-1 または Tie-2 であり、この方法は、試験試料中の第 2 の遺伝子の mRNA 発現レベルを決定するステップをさらに含み、第 2 の遺伝子は、CD31、CD3

4、VEGFR1またはVEGFR2である。特定の実施形態では、試験試料中のCD31、CD34、VEGFR1またはVEGFR2のmRNA発現レベルは、参照試料と比較して減少している。

【0015】

特定の実施形態では、発現レベルは、タンパク質発現レベルである。特定の実施形態では、タンパク質発現レベルを、免疫学的アッセイを使用して測定する。特定の実施形態では、免疫学的アッセイはELISAである。特定の実施形態では、タンパク質発現レベルの変化は増加である。一実施形態では、タンパク質発現レベルの増加を示す遺伝子のうちの1つは、HGFである。

【0016】

特定の実施形態では、VEGF非依存性腫瘍を検出する方法は、対象から得た試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、参照試料と比較した、試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現レベルの変化が、対象のVEGF非依存性腫瘍の存在を示し、少なくとも2つの遺伝子は、S100A8、S100A9、CD31、Tie-1、Tie-2、IL-1、PLGF、PDGFCおよびHGFからなる群から選択される。特定の実施形態では、VEGF非依存性腫瘍を検出する方法は、対象から得た試験試料中の5つ以上の遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、参照試料と比較した、試験試料中の5つ以上の遺伝子の発現レベルの変化が、対象のVEGF非依存性腫瘍の存在を示し、少なくとも5つの遺伝子は、S100A8、S100A9、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、VEGFR1、VEGFR2、IL-1、PLGF、PDGFCおよびHGFからなる群から選択される。

【0017】

特定の実施形態では、発現レベルはmRNA発現レベルである。特定の実施形態では、mRNA発現レベルの変化は増加である。一実施形態では、mRNA発現レベルの増加を示す遺伝子のうちの1つは、S100A8、S100A9、PLGFまたはIL-1である。特定の実施形態では、mRNA発現レベルの変化は減少である。一実施形態では、mRNA発現レベルの減少を示す遺伝子のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つまたは7つは、PDGFC、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、VEGFR1および/またはVEGFR2である。

【0018】

特定の実施形態では、発現レベルはタンパク質発現レベルである。特定の実施形態では、タンパク質発現レベルの変化は増加である。一実施形態では、タンパク質発現レベルの増加を示す遺伝子のうちの1つは、IL-1、PLGFまたはHGFである。別の実施形態では、タンパク質発現レベルの増加を示す遺伝子のうちの2つは、IL-1およびPLGFである。

【0019】

特定の実施形態では、上記の方法は、VEGF非依存性腫瘍を有する対象を治療するステップをさらに含み、このステップは、IL-1アンタゴニスト、IL-6アンタゴニスト、LIFアンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニストまたはc-Metアンタゴニストのうちのいずれか1つの有効量を対象に投与することを含む。一実施形態では、有効量のc-Metアンタゴニストを、VEGF非依存性腫瘍を有する対象に投与する。一実施形態では、有効量のHGFアンタゴニストを、VEGF非依存性腫瘍を有する対象に投与する。特定の実施形態では、上記の方法は、VEGF非依存性腫瘍を有する対象を治療するステップをさらに含み、このステップは、有効量のVEGFアンタゴニストを、第2の薬剤と組み合わせて対象に投与することを含み、第2の薬剤は、IL-1アンタゴニスト、IL-6アンタゴニスト、LIFアンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニストまたはc-Metアンタゴニストのうちのいずれか1つである。一実施形態では、第2の薬剤はc-Metアンタゴニストである。一実施形態では、第2の薬剤はHGFアンタゴニストである。

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体である。特定の実施形態では、抗VEGF抗体はモノクローナル抗体である。一実施形態では、抗VEGF抗体はベパシズマブである。特定の実施形態では、c-Metアンタゴニストは抗c-Met抗体である。特定の実施形態では、HGFアンタゴニストは抗HGF抗体である。特定の実施形態では、この方法は、有効量の化学療法剤を対象に投与するステップをさらに含む。

【0020】

また、本明細書では、対象のVEGF非依存性腫瘍を治療する方法も提供する。特定の実施形態では、この方法は、対象のVEGF非依存性腫瘍を治療するステップを含み、このステップは、IL-1アンタゴニスト、IL-6アンタゴニスト、LIFアンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニストまたはc-Metアンタゴニストのうちのいずれか1つの有効量を対象に投与することを含む。一実施形態では、有効量のc-Metアンタゴニストを、VEGF非依存性腫瘍を有する対象に投与する。一実施形態では、有効量のHGFアンタゴニストを、VEGF非依存性腫瘍を有する対象に投与する。別の実施形態では、有効量のIL-1アンタゴニストを、VEGF非依存性腫瘍を有する対象に投与する。特定の実施形態では、この方法は、対象のVEGF非依存性腫瘍を治療するステップを含み、このステップは、有効量のVEGFアンタゴニストを、第2の薬剤と組み合わせて対象に投与することを含み、第2の薬剤は、IL-1アンタゴニスト、IL-6アンタゴニスト、LIFアンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニストまたはc-Metアンタゴニストのうちのいずれか1つである。一実施形態では、第2の薬剤はc-Metアンタゴニストである。特定の実施形態では、第2の薬剤はHGFアンタゴニストである。特定の実施形態では、第2の薬剤はIL-1アンタゴニストである。一実施形態では、IL-1アンタゴニストは抗IL-1抗体である。別の実施形態では、c-Metアンタゴニストは抗c-Met抗体である。別の実施形態では、HGFアンタゴニストは抗HGF抗体である。特定の実施形態では、抗VEGF抗体はベパシズマブである。特定の実施形態では、この方法は、有効量の化学療法剤を、VEGF非依存性腫瘍を有する対象に投与するステップをさらに含む。

【0021】

特定の実施形態では、対象はヒトである。特定の実施形態では、対象は、癌と診断されている。特定の実施形態では、対象は、VEGF非依存性腫瘍を有すると診断されている。一実施形態では、癌は、非小細胞肺癌、腎臓細胞癌、神経膠芽腫、乳癌および結腸直腸癌からなる群から選択される。

【0022】

特定の実施形態では、本発明は、対象の腫瘍が、抗血管新生療法以外のまたは抗血管新生療法に加えた抗癌療法に有効に応答するかどうかを予測する方法を提供し、この方法は、1つまたは複数の遺伝子が試験試料中で参照試料中の発現レベルよりも高いレベルで発現する細胞を、対象由来の試験試料が含むかどうかを決定するステップを含み、少なくとも1つの遺伝子は、S100A8、S100A9、IL-1、PLGFおよびHGFからなる群から選択される。特定の実施形態では、この方法は、IL-1アンタゴニスト、PLGFアンタゴニスト、S100A8アンタゴニスト、S100A9アンタゴニスト、HGFアンタゴニスト、c-Metアンタゴニスト、LIFアンタゴニストまたはそれらの任意の組合せの有効量を対象に投与することをさらに含む。特定の実施形態では、本発明は、対象の腫瘍が、抗血管新生療法以外のまたは抗血管新生療法に加えた抗癌療法に有効に応答するかどうかを予測する方法を提供し、この方法は、1つまたは複数の遺伝子が試験試料中で参照試料中の発現レベルよりも減少したレベルで発現する細胞を、対象由来の試験試料が含むかどうかを決定するステップを含み、少なくとも1つの遺伝子は、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、PDGFC、VEGFR1およびVEGFR2からなる群から選択される。特定の実施形態では、発現レベルはmRNA発現レベルである。特定の実施形態では、発現レベルはタンパク質発現レベルである。特定の実施形

態では、抗血管新生療法は、VEGFアンタゴニストを含む。特定の実施形態では、VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体である。特定の実施形態では、抗VEGF抗体はペバシズマブである。

【0023】

特定の実施形態では、本発明は、癌患者の抗VEGF療法に対する応答性を予測するための方法を提供し、この方法は、癌患者から得た試験試料中の1つまたは複数の上記の遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、参照試料と比較した、試験試料中の1つまたは複数の遺伝子の発現レベルの顕著な変化が、癌患者の抗VEGF療法に対する応答性の低下または完全な欠如を示す。

【0024】

特定の実施形態では、本発明は、癌患者において抗VEGF療法の有効性をモニターするための方法を提供し、この方法は、抗VEGF療法のコースの間に癌患者から得た試験試料中の1つまたは複数の上記の遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、参照試料と比較した、試験試料中の1つまたは複数の遺伝子の発現レベルの顕著な変化が、抗VEGF療法の有効性の低下または完全な欠如を示す。

【0025】

特定の実施形態では、本発明は、抗VEGF療法に対して耐性である癌患者の亜集団を同定するための方法を提供し、この方法は、各癌患者から得た試験試料中の1つまたは複数の上記の遺伝子の発現レベルを決定するステップを含み、参照試料と比較した、試験試料中の1つまたは複数の遺伝子の発現レベルの顕著な変化が、癌患者が、抗VEGF療法に対して耐性である亜集団に属することを示す。

【0026】

本明細書に記載する任意の実施形態またはそれらの任意の組合せが、本明細書に記載する本発明のあらゆる方法に適用される。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1A - B】乳腺の発達を示す図である。(A) 8週齢の未交尾のVEGF+/+由来の代表的な乳腺の全載、および(B) epiVEGF-/-乳腺である。バーは、1000 μmを示す。

【0028】

【図2A - D】腫瘍の発達および進行を示すグラフである。(A) PyMT・VEGF+/+マウス(n=24)およびPyMT・epiVEGF-/-マウス(n=20)における、最初の触診可能な腫瘍の時期。(B) 8~16週齢のPyMT・VEGF+/+(n=20)マウスおよびPyMT・epiVEGF-/-マウス(n=15)に由来する累積腫瘍数/マウス。(C) PyMT・VEGF+/+マウス(n=20)およびPyMT・epiVEGF-/-マウス(n=15)における累積腫瘍体積の平均。(D) 腫瘍重量の平均。16週齢のマウス。\*は、群間の統計学的に有意な(P<0.05)差を示す。

【0029】

【図3A - F】腫瘍血管密度を示す図である。(A) PyMT・VEGF+/+マウス由来の腫瘍血管網の代表的な最大強度を投影した画像、および(B) PyMT・epiVEGF-/-マウス、(C) 対照IgG(GP120)を用いて治療したPyMT・VEGF+/+マウス、または(D) 抗VEGF(G6.31mAb)を用いて治療したPyMT・VEGF+/+マウス。(E) PyMT・VEGF+/+腫瘍およびPyMT・epiVEGF-/-腫瘍における血管の直径に対する血管容積。(F) PyMT・VEGF+/+腫瘍とPyMT・epiVEGF-/-腫瘍とを比較した、血管直径に対する%血管容積(当該半径の血管容積/総血管容積)。

【0030】

【図4A - C】腫瘍の微小血管の血流を示す図である。(A) 相対的な微小血管の血流速度。データを平均±SEMとして示す。\*は、群間の有意な(P<0.05)差を示す。

10

20

30

40

50

サイズを一致させた (B) PyMT・VEGF + / + 腫瘍および (C) PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍における微小血管の血流を示す造影超音波灌流解析の代表的な画像。

【0031】

【図5A-H】腫瘍中のVEGFR1 mRNAおよびVEGFR2 mRNAの局在化を示す図である。(A) in situハイブリダイゼーションが、PyMT・VEGF + / + 腫瘍においては、VEGFR1 mRNAが、血管内皮と強力に結合していることを示す。(B) また、PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍においても、VEGFR1 mRNAが、血管内皮と結合している(矢印)が、シグナルは一般に、PyMT・VEGF + / + 腫瘍におけるシグナルよりも弱い。(C) PyMT・VEGF + / + 腫瘍および (D) PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍に由来するヘマトキシリンおよびエオシンで染色したスライドの平行画像。(E) in situハイブリダイゼーションが、PyMT・VEGF + / + 腫瘍においては、VEGFR2 mRNAが、血管内皮細胞と一致する個別の細胞クラスターと結合していることを示す。(F) PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍においては、VEGFR2 mRNAが、血管内皮に沿う点状クラスターに結合している(矢印)が、シグナルは一般に、PyMT・VEGF + / + 腫瘍におけるシグナルよりも弱い。(G) PyMT・VEGF + / + 腫瘍および (H) PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍に由来するヘマトキシリンおよびエオシンで染色したスライドの平行画像。平行画像は、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色したスライドを、暗視野(A、B、E、F)または明視野(C、D、G、H)の照明を用いて撮影した。スケールバーは100  $\mu$ mである。センス対照スライドは、顕著なシグナルを欠いた(データ未公開)。

10

20

【0032】

【図6A-B】Taqman解析による、腫瘍中のVEGFR1 mRNAおよびVEGFR2 mRNAの相対的なレベルを示すグラフである。PyMT・VEGF + / + 腫瘍およびPyMT・epi VEGF - / - 腫瘍中の(A) VEGFR1転写物および(B) VEGFR2転写物の相対的なレベル。データを、PyMT・VEGF + / + に対する倍率変化として示す(群間で絶対レベルの有意差( $P < 0.05$ )を示した、1群当たりn = 9個の腫瘍)。

【0033】

【図7A-E】PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍可溶化液中のVEGFレベルの減少を示す図である。(A) PyMT・VEGF + / + 腫瘍またはPyMT・epi VEGF - / - 腫瘍に由来する可溶化液中のVEGFタンパク質レベル。(B~E) VEGFについてのin situハイブリダイゼーション(欠失を検出するために、エクソン3についてのリボプローブを使用する)。(B) PyMT・VEGF + / + 腫瘍、発現(矢印)が、壊死性の領域に直ちに隣接する、生存可能であるがおそらく低酸素状態の腫瘍組織に重なっている、または(C) PyMT・epi VEGF - / - 腫瘍、発現が主として、壊死性の腫瘍の周囲の低酸素状態の領域には存在しない。平行画像は、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色したスライドを、暗視野(B、C)または明視野(D、E)の照明を用いて撮影した。スケールバーは100  $\mu$ mである。センス対照スライドは、顕著なシグナルを欠いた(データ未公開)。

30

40

【0034】

【図8A-B】PyMT・VEGF + / + 腫瘍またはPyMT・epi VEGF - / - 腫瘍を有するマウスの、抗VEGF治療の効果を示すグラフである。マウスを、5 mg / kg抗VEGF(B204.1)またはアイソタイプの対照抗体(IgG)を用いて1週当たり2回治療し、(A) マウス1匹当たりの腫瘍の累積数の平均、または(B) 累積腫瘍積載の平均を決定した。データを、平均  $\pm$  SEMとして示す(1群当たりn = 10 ~ 15匹の動物)。\*は、B204または対照抗体のいずれかで治療したPyMT・VEGF + / + マウス間の有意差( $P < 0.05$ )を示す。

【0035】

【図9A-E】腫瘍中の血管新生性および炎症性の相対的なmRNAレベルを示すグラフである。PyMT・VEGF + / + 腫瘍とPyMT・epi VEGF - / - 腫瘍とを比較

50

した、マウスの (A) P l G F mRNA、(B) I L - 1 mRNA、(C) S 1 0 0 A 8 mRNA、(D) S 1 0 0 A 9 mRNA および (E) P D G F C mRNA の発現レベルの定量的 R T - P C R 解析。データを、群間で絶対レベルの有意差 ( $P < 0.05$ ) を示した、P y M T . V E G F + / + に対する倍率変化として示す (1 群当たり  $n = 5 \sim 9$  個の腫瘍)。

【0036】

【図10A - C】腫瘍中の血管新生因子および炎症性因子のタンパク質レベルを示すグラフである。P y M T . V E G F + / + 腫瘍と P y M T . e p i V E G F - / - 腫瘍とを比較した、(A) P l G F タンパク質、(B) I L - 1 タンパク質、(C) H G F タンパク質のレベルの E L I S A または L u m i n e x による解析。データを、平均  $\pm$  S E M として示す。\* は、群間の有意差 ( $P < 0.05$ ) を示す。

10

【0037】

【図11A - D】腫瘍中の C D 3 1、C D 3 4、T i e - 1 および T i e - 2 の相対的な mRNA 発現レベルを示すグラフである。P y M T . V E G F + / + 腫瘍および P y M T . e p i V E G F - / - 腫瘍における、(A) C D 3 1 転写物、(B) C D 3 4 転写物、(C) T i e - 1 転写物および (D) T i e - 2 転写物のレベル。データを、群間で絶対レベルの有意差 ( $P < 0.05$ ) を示した、P y M T . V E G F + / + に対する倍率変化として示す (1 群当たり  $n = 5 \sim 7$  個の腫瘍)。

【0038】

【図12】P y M T . e p i V E G F - / - 腫瘍由来の初代上皮細胞が、P y M T . e p i V E G F + / + 腫瘍由来の初代上皮細胞と比較して、*in vitro* において H G F に対する遊走応答の増加を示すことを示すグラフである。エラーバーは S E M を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0039】

一般に、本明細書において記載または参照する技法および手順を、当業者であれば、十分に理解し、例えば、S a m b r o o k ら、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 3 版 (2001) C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、C o l d S p r i n g H a r b o r、N . Y . ; C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y (F . M . A u s u b e l ら編 (2003)) ; t h e s e r i e s M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y (A c a d e m i c P r e s s , I n c . ) : P C R 2 : A P R A C T I C A L A P P R O A C H (M . J . M a c P h e r s o n、B . D . H a m e s および G . R . T a y l o r 編 (1995)) ; H a r l o w および L a n e 編 (1988) A N T I B O D I E S , A L A B O R A T O R Y M A N U A L ; ならびに A N I M A L C E L L C U L T U R E (R . I . F r e s h n e y 編 (1987)) ; O l i g o n u c l e o t i d e S y n t h e s i s (M . J . G a i t 編、1984) ; M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、H u m a n a P r e s s ; C e l l B i o l o g y : A L a b o r a t o r y N o t e b o o k (J . E . C e l l i s 編、1998) A c a d e m i c P r e s s ; A n i m a l C e l l C u l t u r e (R . I . F r e s h n e y) 編、1987) ; I n t r o d u c t i o n t o C e l l a n d T i s s u e C u l t u r e (J . P . M a t h e r および P . E . R o b e r t s、1998) P l e n u m P r e s s ; C e l l a n d T i s s u e C u l t u r e : L a b o r a t o r y P r o c e d u r e s (A . D o y l e、J . B . G r i f f i t h s および D . G . N e w e l l 編、1993~8) J . W i l e y a n d S o n s ; H a n d b o o k o f E x p e r i m e n t a l I m m u n o l o g y (D . M . W e i r および C . C . B l a c k w e l l 編) ; G e n e T r a n s f e r V e c t o r s f o r M a m m a l i a n C e l l s (J . M . M i l l e r および M . P . C a l o s 編、1987) ; P C R : T h e P o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n (M u l l i s ら編、1994) ; C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u

30

40

50

nology (J. E. Coliganら編、1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons、1999); Immunobiology (C. A. JanewayおよびP. Travers、1997); Antibodies (P. Finch、1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty編、IRL Press、1988~1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. ShepherdおよびC. Dean編、Oxford University Press、2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. HarlowおよびD. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999)); The Antibodies (M. ZanettiおよびJ. D. Capra編、Harwood Academic Publishers、1995); ならびにCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVitaら編、J. B. Lippincott Company、1993)に記載されている広く活用されている方法等の従来の方法を使用して通常利用している。

#### 【0040】

別段に定義しない限り、本明細書で使用する科学技術用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解する意味と同じ意味を有する。Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2版、J. Wiley & Sons (New York、N. Y. 1994)およびMarch、Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4版、John Wiley & Sons (New York、N. Y. 1992)が、本出願に使用する用語のうちの多くに対する一般的な手引きを当業者に提供している。特許の出願および公開を含めた、本明細書に引用する参考文献は全て、それらの全体が参照により組み込まれている。

#### 【0041】

##### 定義

本明細書を解釈する目的で、以下の定義を適宜適用し、また、単数で使用する用語は複数も含み、その逆も当てはまる。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであって、制限する意図はないことを理解されたい。以下に記載する定義のいずれかが、参照により本明細書に組み込まれている任意の文献と矛盾する場合には、以下に記載する定義が優先するものとする。

#### 【0042】

本明細書では、「試験試料」または「試料」は、目的の対象から得たまたは目的の対象に由来する組成物であって、例えば、物理的、生化学的、化学的および/または生理学的な特徴に基づいて特徴付けおよび/または同定を行おうとする細胞実体および/またはその他の分子実体を含有する組成物を指す。一実施形態では、この定義は、血液および生物学的起源のその他の液体試料、ならびに生検検体または生検検体に由来する組織培養物もしくは細胞等の組織試料を包含する。組織試料の供給源は、新鮮な、凍結および/もしくは保存した器官もしくは組織の試料または生検もしくは吸引物に由来する固体の組織; 血液または任意の血液構成物; 体液; ならびに対象の妊娠もしくは発生における任意の時期に由来する細胞、または血漿であってよい。

#### 【0043】

別の実施形態では、この定義は、試薬を用いた処理、可溶化、またはタンパク質もしくはポリヌクレオチド等の特定の構成成分の濃縮、または切片化の目的でのセミ半固体もしくは固体のマトリックス中への包埋等の任意の方法で、調達後に操作されている生物学的試料を含む。本明細書における目的では、組織試料の「切片化」は、組織試料の単一の部分または小片、例えば、組織試料から切り出した組織または細胞の薄片を意味する。

## 【 0 0 4 4 】

試料として、これらに限定されないが、初代のまたは培養した細胞または細胞系、細胞上清、細胞可溶化液、血小板、血清、血漿、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳汁、全血、尿、脳脊髄液、唾液、痰、涙液、汗、粘液、腫瘍可溶化液および組織培養培地、ならびにホモジナイズした組織等の組織抽出液、腫瘍組織および細胞抽出液が挙げられる。

## 【 0 0 4 5 】

一実施形態では、試験試料は臨床試料である。別の実施形態では、試験試料を、診断アッセイにおいて使用する。いくつかの実施形態では、試験試料を、原発性または転移性の腫瘍から得る。しばしば、組織生検を使用して、腫瘍組織の代表的な小片を得る。あるいは、腫瘍細胞を、目的の腫瘍細胞を含有することが分かっているか、またはそうであると考えられる組織または液体の形態として間接的に得ることもできる。例えば、肺癌病変の生物学的試料を、切除、気管支鏡検査、細針による吸引もしくは気管支の刷毛による採取によってか、または痰、胸膜液もしくは血液から得ることができる。

10

## 【 0 0 4 6 】

一実施形態では、対象または患者から試験試料を抗血管新生療法の前に得る。別の実施形態では、対象または患者から試験試料を V E G F アンタゴニスト療法の前に得る。さらに別の実施形態では、対象または患者から試験試料を抗 V E G F 抗体療法の前に得る。特定の実施形態では、試験試料を、抗血管新生性の V E G F アンタゴニスト療法または抗 V E G F 抗体療法の間または後に得る。特定の実施形態では、試験試料を、癌が転移した後

20

## 【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する場合、「参照試料」は、比較の目的で使用する任意の試料、標準またはレベルを参照することを指す。一実施形態では、参照試料を、同じ対象または患者の身体の健全な部分および/または罹患していない部分から得る。別の実施形態では、参照試料を、同じ対象または患者の身体の治療していない組織および/または細胞から得る。

## 【 0 0 4 8 】

特定の実施形態では、参照試料は、V E G F アンタゴニスト療法に対して応答性である腫瘍を含む。特定の実施形態では、V E G F 療法は抗 V E G F 抗体を含む。特定の実施形態では、抗 V E G F 抗体はペパシズマブである。特定の実施形態では、参照試料は、V E G F 非依存性腫瘍ではない腫瘍を含む。

30

## 【 0 0 4 9 】

特定の実施形態では、参照試料は、同じ対象または患者からの単一の試料または複数の試料の組合せであって、試験試料を得る時点とは異なる1つまたは複数の時点で得る試料である。例えば、参照試料を、同じ対象または患者から、試験試料を得る時点より早い時点で得る。癌が転移性となる場合、参照試料を癌の最初の診断の間に得、試験試料をそれより後に得る場合には、そのような参照試料は有用であることがある。

## 【 0 0 5 0 】

一実施形態では、参照試料を、対象でも患者でもない個体の身体の健全な部分および/または罹患していない部分から得る。別の実施形態では、参照試料を、対象でも患者でもない個体の身体の治療していない組織部分および/または細胞部分から得る。

40

## 【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、参照試料は、用語「試料」の下に上記で定義した、対象でも患者でもない1つまたは複数の個体から得られるあらゆる種類の生物学的試料を含む。特定の実施形態では、参照試料を、対象でも患者でもない1つまたは複数の癌の個体から得る。

## 【 0 0 5 2 】

特定の実施形態では、参照試料は、対象でも患者でもない1つまたは複数の健全な個体から得た複数の試料の組合せである。特定の実施形態では、参照試料は、対象でも患者でもない1つまたは複数の癌の個体から得た複数の試料の組合せである。特定の実施形態では、参照試料は、対象でも患者でもない1つまたは複数の個体から得た正常組織に由来す

50

るプールしたRNA試料である。特定の実施形態では、参照試料は、対象でも患者でもない1つまたは複数の癌の個体から得た腫瘍組織に由来するプールしたRNA試料である。

【0053】

本明細書で使用する場合、「VEGF非依存性腫瘍」は、癌療法が、少なくともVEGFアンタゴニストを含む場合に、この癌療法の間に、完全には応答しないかまたは応答を喪失するもしくは応答の低下を示す癌、癌細胞または腫瘍を指す。特定の実施形態では、VEGF非依存性腫瘍は、抗VEGF抗体療法に対して耐性である腫瘍である。一実施形態では、抗VEGF抗体はベパシズマブである。特定の実施形態では、VEGF非依存性腫瘍は、少なくともVEGFアンタゴニストを含む癌療法に対して応答する可能性が低い腫瘍である。特定の実施形態では、癌療法に対する応答性は、本明細書で定義する癌療法に対する患者の応答性である。

10

【0054】

遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量を、これらに限定されないが、mRNA、cDNA、タンパク質、タンパク質断片および/または遺伝子コピー数を含めて、当技術分野で知られている任意の適切な判断基準に基づいて定性的および/または定量的に決定することができる。特定の実施形態では、第1の試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現/量が、第2の試料中の発現/量と比較して増加している。特定の実施形態では、第1の試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現/量が、第2の試料中の発現/量と比較して減少している。特定の実施形態では、第2の試料は参照試料である。

20

【0055】

特定の実施形態では、用語「増加」は、本明細書に記載する方法等の標準的な、当技術分野で既知の方法によって検出する場合に、参照試料と比較して、タンパク質または核酸のレベルが、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上全体的に増加することを指す。特定の実施形態では、増加という用語は、試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量の増加を指し、この増加は、参照試料中のそれぞれの遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量の少なくとも約1.25x、1.5x、1.75x、2x、3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、25x、50x、75xまたは100xである。

30

【0056】

特定の実施形態では、本明細書における用語「減少」は、本明細書に記載する方法等の標準的な、当技術分野で既知の方法によって検出する場合に、参照試料と比較して、タンパク質または核酸のレベルが、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%以上全体的に低下することを指す。特定の実施形態では、減少という用語は、試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量の減少を指し、この減少は、参照試料中のそれぞれの遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量の少なくとも約0.9x、0.8x、0.7x、0.6x、0.5x、0.4x、0.3x、0.2x、0.1x、0.05xまたは0.01xである。

40

【0057】

遺伝子の発現レベル/量を決定するための追加の開示を、本明細書において、本発明の方法の下に記載する。

【0058】

「検出」は、直接的な検出および間接的な検出を含めて、検出の任意の手段を含む。

【0059】

本明細書で使用する場合、単語「標識」は、核酸プローブまたは抗体等の試薬に直接的または間接的にコンジュゲートまたは融合させた化合物または組成物であって、それがコンジュゲートまたは融合している試薬の検出を促進する化合物または組成物を指す。標識はそれ自体が検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識もしくは蛍光標識）、または酵素標識の場合には、検出可能である基質の化合物もしくは組成物の化学変化を触

50

媒してもよい。

【0060】

特定の実施形態では、「相関させる (correlate)」または「相関 (correlating)」とは、任意の方法で、第1の解析またはプロトコルの性能および/または結果と、第2の解析またはプロトコルの性能および/または結果とを比較することを意味する。例えば、第2のプロトコルを実施する場合に第1の解析もしくはプロトコルの結果を使用してよく、かつ/または第1の解析もしくはプロトコルの結果を使用して、第2の解析もしくはプロトコルを実施すべきかどうかを決定してもよい。遺伝子発現の解析またはプロトコルの実施形態に関しては、遺伝子発現の解析またはプロトコルの結果を使用して、特定の療法計画を実施すべきかどうかを決定することができる。

10

【0061】

本明細書で使用する場合、用語「バイオマーカー」は一般に、遺伝子、タンパク質、炭水化物構造または糖脂質を含めた分子を指し、哺乳動物の組織または細胞の中または表面におけるその発現を、標準的な方法(または本明細書に開示する方法)によって検出することができ、バイオマーカーの発現によって、血管新生の阻害に基づく治療計画、例えば、抗血管新生剤、例として、VEGF特異的阻害剤に対する、哺乳動物の細胞または組織の感受性を予測し、診断し、かつ/またはその予後を示す。

【0062】

「小分子」とは、ここで、約500ダルトン未満の分子量を持つと定義される。

20

【0063】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。

【0064】

本明細書中で用いる「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長の、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

30

【0065】

「単離された」核酸分子は、同定され、ポリペプチド核酸の天然供給源に通常付随している少なくとも一つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子には、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にある核酸を通常発現する細胞に含まれる核酸分子が含まれる。

40

【0066】

「プライマー」は、一般に、標的配列とハイブリダイズすることによって、対象の試料中に存在しうる標的に結合して、その後、標的に相補的なポリヌクレオチドの重合を促進する、一般に遊離した3'-OH基を有する短い単鎖のポリヌクレオチドである。

【0067】

「ハウスキーピング遺伝子」なる用語は、活性が細胞機能の維持に必須であるタンパク質をコードする一群の遺伝子を指す。これらの遺伝子は一般的に、すべての細胞型において同じように発現される。

【0068】

50

本明細書で用いる「アレイ」又は「マイクロアレイ」なる用語は、基質上でのハイブリダイズ可能なアレイ成分、好ましくはポリヌクレオチドプローブ(例えばオリゴヌクレオチド)の規則正しい整列を指す。基質は、ガラススライドなどの固体基質、又はニトロセルロースメンブレンなどの半固体基質であってもよい。ヌクレオチド配列は、DNA、RNA又は何れかのその並べ換えでありうる。

【0069】

「天然配列」ポリペプチドは、天然由来の対応するポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでなる。よって、天然配列ポリペプチドは任意の哺乳動物からの天然に生じるポリペプチドのアミノ酸配列を有し得る。このような天然配列ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、あるいは組換え又は合成手段により生産することもできる。「天然配列」ポリペプチドという用語は特にポリペプチドの天然に生じる切断型又は分泌型(例えば細胞外ドメイン配列)、ポリペプチドの天然に生じる変異体型(例えば、選択的スプライシング型)及び天然に生じる対立遺伝子変異体を包含する。

10

【0070】

「単離された」ポリペプチド又は「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分は、ポリペプチドの診断又は治療への使用を妨害しうる物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。ある実施態様では、ポリペプチドは、(1)ローリー(Lowry)法により定量して、95重量%のポリペプチドより多くなるほど、又は99重量%より多くなるまで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度にまで、あるいは(3)クーマシーブルー又は銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように十分な程度にまで精製される。ポリペプチドの自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離されたポリペプチドには、組換え細胞内にインサイツのポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも一の精製工程により調製される。

20

【0071】

「ポリペプチド鎖」は、その各ドメインが、非共有相互作用又はジスルフィド結合とは対照的にペプチド結合(一又は複数)によって他のドメイン(一又は複数)に連結しているポリペプチドである。

30

【0072】

ポリペプチド「変異体」は対応する天然配列ポリペプチドと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変異体には、例えば一又は複数のアミノ酸(天然に生じるアミノ酸及び/又は天然に生じないアミノ酸)残基が、ポリペプチドのN末端及び/又はC末端に付加され、又は欠失されたポリペプチドが含まれる。通常は、変異体は天然配列ポリペプチドと少なくともおよそ80%のアミノ酸配列同一性、又は少なくともおよそ90%のアミノ酸配列同一性、又は少なくともおよそ95%のアミノ酸配列同一性を有する。また、変異体には、典型的には生物学的に活性な天然配列のポリペプチド断片(例えば、サブ配列、切断型など)が含まれる。

40

【0073】

本明細書中で用いる「タンパク質変異体」なる用語は、上記の変異体及び/又は一又は複数のアミノ酸突然変異を天然のタンパク質配列に含むタンパク質を指す。場合によって、一又は複数のアミノ酸突然変異にはアミノ酸置換(一又は複数)が含まれる。本発明での使用のためのタンパク質及びその変異体は当分野で公知の様々な方法によって調製される。タンパク質のアミノ酸配列変異体はタンパク質DNAの突然変異によって調製される。このような変異体には、タンパク質のアミノ酸配列内の残基の例えば欠失、挿入又は置換が含まれる。欠失、挿入及び置換の何かを組み合わせ、所望の活性を有する最終コンストラクトに達成してもよい。変異体をコードするDNA中に作製される突然変異は、リーディングフレーム外の配列におくべきでなく、好ましくは二次的mRNA構造を生産しうる相補的な領域を作製しないであろう。欧州特許第75444号A。

50

## 【0074】

「抗体」という用語は最も広義に使用され、モノクローナル抗体(完全長又は無傷のモノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多価抗体、少なくとも2つのインタクト抗体から形成される多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片(以下を参照)を具体的に包含する。

## 【0075】

特に断らない限りは、本明細書全体を通して「多価抗体」という表現は3又はそれ以上の抗原結合部位を含む抗体を指すために使用される。多価抗体は典型的には3又はそれ以上の抗原結合部位を持つように遺伝子操作されたもので、一般には天然配列IgM又はIgA抗体ではない。

## 【0076】

「抗体断片」は、一般には無傷の抗体の抗原結合を含み、よって抗原に結合する能力を保持している無傷の抗体の一部のみを含む。本定義に包含される抗体断片の例には、(i) VL、CL、VH及びCH1ドメインを持つFab断片；(ii) CH1ドメインのC末端に一又は複数のシステイン残基を持つFab断片であるFab'断片；(iii) VH及びCH1ドメインを持つFd断片；(iv) CH1ドメインのC末端に一又は複数のシステイン残基とVH及びCH1ドメインを持つFd'断片；(v) 抗体の単一アームのVL及びVHドメインを持つFv断片；(vi) VHドメインからなるdAb断片(Ward等, Nature 341, 544-546 (1989))；(vii) 単離されたCDR領域；(viii) ヒンジ領域がジスルフィド架橋によって結合された2つのFab'断片を含む二価断片であるF(a b')<sub>2</sub>断片；(ix) 単鎖抗体分子(例えば単鎖Fv；scFv)(Bird等, Science 242:423-426 (1988))；及びHuston等, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))；(x) 同一のポリペプチド鎖中で軽鎖可変ドメイン(VL)に結合した重鎖可変ドメイン(VH)を含む、2つの抗原結合部位を持つ「ダイアボディー(diabodies)」(例えば、欧州特許公報第404097号；国際公開第93/11161号；及びHollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照)；(xi) 相補的軽鎖ポリペプチドと共に一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)を含む「線形抗体」(Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995))；及び米国特許第5641870号)が含まれる。

## 【0077】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団に含まれる個々の抗体が、少量で存在しうる天然に生じる突然変異等の可能性のある突然変異を除いて、同一である。したがって、「モノクローナル」なる修飾語は、別の抗体の混合ではない抗体の性質を示す。モノクローナル抗体は非常に特異的で、単一抗原に対するものである。ある実施態様では、モノクローナル抗体は、一般に、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を包含しており、この場合の標的に結合するポリペプチドは、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスによって得られたものである。例えば、このような選択プロセスは、複数のクローン、例えばハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールからの、独特のクローンの選択であり得る。選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的に対する親和性を向上させる、標的結合配列をヒト化する、細胞培養液中でのその産生を向上させる、インビボでのその免疫原性を低減する、多特異性抗体を作製する等が可能であること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。一般に異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体は、1の抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、通常他の免疫グロブリンによって汚染されない点で有利である。

## 【0078】

「モノクローナル」との修飾詞は、ほぼ均一な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない

10

20

30

40

50

。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作ることができ、それらの技術には例えばハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975) ; Hongo等, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988) ; Hammerling等: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N. Y., 1981) )、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号参照）、ファージディスプレイ法（例えば、Clarkson等, *Nature*, 352:624-628 (1991) ; Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) ; Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004) ; Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004) ; Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004) ; 及びLee等, *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)参照)、及びヒト免疫グロブリン座位又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全部を有する動物においてヒト又はヒト様抗体を産生する技術（例えば、WO1998/24893 ; WO1996/34096 ; WO1996/33735 ; WO1991/10741 ; Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993) ; Jakobovits等, *Nature*, 362:255-258 (1993) ; Bruggemann等, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993) ; 米国特許第5,545,807号 ; 同第5,545,806号 ; 同第5,569,825号 ; 同第5,625,126号 ; 同第5,633,425号 ; 及び同第5,661,016号 ; Marks等, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992) ; Longerg等, *Nature*, 368:856-859 (1994) ; Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994) ; Fishwild等, *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996) ; 及びLongerg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995) ) が含まれる。

10

20

#### 【 0 0 7 9 】

ここに記載のモノクローナル抗体は、特に、重鎖及びノ又は軽鎖の一部が、特定の種から由来するか、特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である一方、鎖の残りが、他の種から由来するか、他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である「キメラ」抗体、並びにそれらが所望の生物活性を示す限りはそのような抗体の断片を含む(米国特許第4816567号 ; 及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

#### 【 0 0 8 0 】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域からの残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種の高頻度可変領域からの残基(ドナー抗体)によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRsがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部をまた含む。更なる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525 (1986) ; Riechmann等, *Nature* 332:323-329 (1988) ; 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照のこと。また例として、Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998) ; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995) ; Hurlle and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) ; 及び米国特許第6,982,321号及び同第7,087,409号を参照。また、van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)も参照のこと。抗原刺激に应答して抗体を産生するように修飾されているが、その内在性遺伝子座が無効になっているトランスジェニック動物、例えば免疫化ゼノマウスに抗原を投与することによってヒト抗体を調製することができる(例として、XENOMOUSE<sup>TM</sup>技術に関する米国特許第6075181号及び同第

30

40

50

6150584号を参照)。また、例えば、ヒトのB細胞ハイブリドーマ技術によって生成したヒト抗体に関するLi等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)も参照のこと。

#### 【0081】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここで開示されたヒト抗体を製造するための何れかの技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。ヒト抗体は、当該分野で知られている様々な技術を使用することによって生産することが可能である。一実施態様では、ヒト抗体はファージライブラリーから選択され、ここでファージライブラリーがヒト抗体を発現する(Vaughan等, Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheets等, PNAS, (USA)95:6157-6162(1998); Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991))。また、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されたマウス中に導入することにより産生することができる。暴露時に、遺伝子再構成、アセンブリ及び抗体レパートリーを含む、あらゆる点でヒトに見られるものと密接に類似しているヒト抗体の産生が観察される。このアプローチ法は、例えば米国特許第5545807号;第5545806号;第5569825号;第5625126号;第5633425号;第5661016号、及び次の科学文献: Marks等, Bio/Technology 10:779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison等, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14:826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)に記載されている。あるいは、ヒト抗体は、標的抗原に対して抗体を生産するヒトBリンパ球の不活化によって調製されてもよい(そのようなBリンパ球は、個体から回収されてもよいし、インビトロで免疫化されていてもよい)。例えば、Cole等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77(1985); Boerner等, J. Immunol., 147(1): 86-95(1991); 及び米国特許第5750373号を参照のこと。

#### 【0082】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

#### 【0083】

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。例えば、高頻度可変領域は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つのHVRを含み; VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。天然の抗体では、H3及びL3は6つのHVRのうちで最も高い多様性を示す、特にH3は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすように思われる。例として、Xu等 (2000) Immunity 13:37-45; Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)のJohnson and Wu (2003)を参照。実際

、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が無い状態で安定である。Hamers-Casterman等 (1993) Nature 363:446-448 ; Sheriff等 (1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736。

#### 【 0 0 8 4 】

多数のHVRの描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(CDR)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbMHVRは、カバットHVRとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」HVRは、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これらHVRのそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	AbM	Chothia	接触	
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	(カバット番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	(Chothia番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	

10

20

#### 【 0 0 8 5 】

HVRは、次のような「拡大HVR」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、Kabat等、上掲に従って番号を付した。

#### 【 0 0 8 6 】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

#### 【 0 0 8 7 】

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、上掲のKabat等の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82b及び82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

30

40

#### 【 0 0 8 8 】

本明細書及び特許請求の範囲すべてにわたって、一般的に、可変ドメインの残基を指す場合にはカバット番号付けシステムを用いる(およそ、軽鎖の残基1-107と重鎖の残基1-113)(例として、Kabat等, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。一般的に、イムノグロブリン重鎖定常領域内の残基を指す場合には、「EU番号付けシステム」又は「EUインデックス」を用いる(EUインデックスはKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において報告されており、出典明記によって本明細書中に特別に組み込まれる)。本明細書中で特に述べない限り、抗体の可変ドメイン内の

50

残基の数の参照は、カバット番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する。本明細書中で特に述べない限り、抗体の定常ドメイン内の残基の数の参照は、E U番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する(例として、米国特許仮出願第60/640323号、E U番号付けについての図を参照)。

【0089】

イムノグロブリンの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(イムノグロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。イムノグロブリンには5つの主要なクラスがある: I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M、更にそれらは、I g G<sub>1</sub>(非A及びAアロタイプを含む)、I g G<sub>2</sub>、I g G<sub>3</sub>、I g G<sub>4</sub>、I g A<sub>1</sub>、及びI g A<sub>2</sub>等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。イムノグロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、及び $\mu$ と呼ばれる。イムノグロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、一般に、例えばAbbas等 Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)に記載されている。抗体は、抗体と一又は複数の他のタンパク質ないしペプチドとの共有的不いしは非共有的結合によって形成される大きな融合分子の一部であってもよい。

10

【0090】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、 kappa( )及び lambda( )と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0091】

「Fc領域」なる用語は、インタクト抗体のパパイン消化によって生成されうる免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Fc領域は天然配列Fc領域又は変異形Fc領域であってもよい。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトI g G重鎖Fc領域はおよそCys 226の位置又はおよそPro 230からの位置のアミノ酸残基からFc領域のカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(E U番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてのK447残基が除去された抗体群、K447残基が除去されていない抗体群、及びK447残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含みうる。免疫グロブリンのFc領域は一般に、CH2ドメインとCH3ドメインの2つの定常ドメインを含み、場合によってCH4ドメインを含む。

20

30

【0092】

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明記によって本明細書中に特別に援用される上掲のKabat等のE Uインデックスのものである。「KabatのE Uインデックス」はヒトI g G<sub>1</sub> E U抗体の残基番号を指す。

【0093】

本明細書中の「Fc領域鎖」は、Fc領域の2つのポリペプチド鎖の1つを意味する。

【0094】

ヒトI g G Fc領域の「CH2ドメイン」(「Cg2」ドメインとも呼ばれる)は、通常、約231位のアミノ酸残基から約340位のアミノ酸残基まで延びている。CH2ドメインは、別のドメインと親密な対にならないという点で独特である。代わりに、2つのN結合分岐炭水化物鎖が、無傷の天然IgG分子の2つのCH2ドメインの間に挿入される。炭水化物はドメイン-ドメイン対の代替物を提供し、CH2ドメインの安定化を助けることができる。BurtonによるMolec. Immunol. 22:161-206 (1985)を参照のこと。ここで、CH2ドメインは天然配列のCH2ドメイン又は変異体CH2ドメインとすることができる。

40

【0095】

「CH3ドメイン」は、Fc領域におけるC末端からCH2ドメインまでの範囲(つまり、I g Gの約341位のアミノ酸から約447位のアミノ酸)を含む。ここでは、CH

50

3領域は、天然配列のC H 3ドメインか、又は変異体C H 3ドメイン(例えば、その一鎖に「protruberance」が導入され、それに対応して他の鎖に「空洞」が導入されたC H 3ドメイン：出典明記によって特別に本明細書中に援用される米国特許第5 8 2 1 3 3 3号参照)とすることができる。このような変異体C H 3ドメインを使用して本明細書に開示する多重特異性(例えば二重特異性)抗体をつくることができる。

【0096】

「ヒンジ領域」は、通常、ヒトI g G 1の約G l u 2 1 6又は約C y s 2 2 6から約P r o 2 3 0まで延びていると定義される(Burton, Molec. Immunol.22:161-206, 1985)。他のI g Gタイプのヒンジ領域は、同じ位置に内部重鎖S - S結合を形成する最初と最後のシステイン残基を配置することによりI g G1と整列させることができる。本明細書のヒンジ領域は、天然配列のヒンジ領域か、又は変異体ヒンジ領域とすることができる。変異体ヒンジ領域の2つのポリペプチド鎖は、通常、1つのポリペプチド鎖につき少なくとも1つのシステイン残基を保持しており、よって2つの変異体ヒンジ領域のポリペプチド鎖は2つの鎖の間にジスルフィド結合を形成することができる。本発明の好ましいヒンジ領域は、天然配列のヒトヒンジ領域、例えば天然配列のヒトI g G 1ヒンジ領域である。

10

【0097】

「機能的F c領域」は、天然配列F c領域の少なくとも1つの「作動体機能」を有する。例示的「作動体機能」には、C 1 q結合、補体依存性細胞障害作用(C D C)、F cレセプター結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(A D C C)、食作用、細胞表面レセプター(例えばB細胞レセプター； B C R)の下方制御などが含まれる。そのような作動体機能は、通常、F c領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、そのような抗体の作動体機能を評価するための当技術分野で既知の様々なアッセイを使用して評価される。

20

【0098】

「天然配列のF c領域」は、天然に見出されるF c領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒトF c領域は、天然配列のヒトI g G 1 F c領域(非A-及びA-アロタイプ)；天然配列のヒトI g G 2 F c領域；天然配列のヒトI g G 3 F c領域；及び天然配列のヒトI g G 4 F c領域；並びに、これらの自然に生じる変異体が含まれる。

30

【0099】

「変異体F c領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾により、天然配列のF c領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。ある実施態様では、変異体F c領域は、天然配列のF c領域もしくは親ポリペプチドのF c領域と比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列のF c領域又は親のポリペプチドのF c領域におよそ1からおよそ10のアミノ酸置換、好ましくはおよそ1からおよそ5のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体F c領域は、典型的には、天然配列のF c領域及び/又は親ポリペプチドのF c領域と、例えば少なくともおよそ80%の同一性を有するか、又は少なくともおよそ90%の配列同一性を、又は少なくともおよそ95%の配列又はそれ以上の同一性を有するものであろう。

40

【0100】

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のF c領域(天然配列F c領域又はアミノ酸配列変異体F c領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C 1 q結合及び補体依存性細胞障害(C D C)；F cレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(A D C C)；貪食作用；細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。

【0101】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「A D C C」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(N K)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するF cレセ

50

プター (FcRs) と結合した分泌 Ig により、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。ADCC を媒介する主要な細胞 NK 細胞は FcRIII のみを発現するのに対し、単球は FcRI、FcRII 及び FcRIII を発現する。造血細胞での FcR の発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991) の 464 頁の表 3 に要約されている。対象の分子の ADCC 活性をアッセイするために、米国特許第 5500362 号又は同第 5821337 号に記載されているようなインビトロ ADCC アッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞 (PBMC) 及びナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子の ADCC 活性は、例えば、Clynes 等, (USA) 95:652-656 (1998) において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

10

## 【0102】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数の FcRs を発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。ある実施態様では、その細胞が少なくとも FcRIII を発現し、ADCC エフェクター機能を実行する。ADCC を媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞 (PBMC)、ナチュラルキラー (NK) 細胞、単球、細胞障害性 T 細胞及び好中球が含まれるが、PBMC と NK 細胞が一般的に好まれる。エフェクター細胞はその天然源、例えば本明細書中に記載の血液又は PBMC から単離してもよい。

20

## 【0103】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体の Fc 領域に結合するレセプターを記載するものである。いくつかの実施態様では、FcR は天然ヒト FcR である。いくつかの実施態様では、FcR は、IgG 抗体 (ガンマレセプター) と結合するもので、FcRI、FcRII 及び FcRIII サブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRII レセプターには、FcRIIA (「活性型レセプター」) 及び FcRIIB (「阻害型レセプター」) が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプター FcRIIA は、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM) を含んでいる。阻害型レセプター FcRIIB は、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM) を含んでいる (例として Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997) を参照)。FcRs に関しては、例えば Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel 等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及び de Haas 等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995) に概説されている。将来的に同定されるものも含む他の FcRs はここでの「FcR」という言葉によって包含される。

30

また、「Fcレセプター」又は「FcR」なる用語には、母性 IgG の胎児への移送 (Geyer 等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) Kim 等, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) と、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う新生児性レセプター FcRn も含まれる。FcRn への結合の測定方法は公知である (例として Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18:592-8 (1997); Ghetie 等, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton 等, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); 国際公開第 2004/92219 号 (Hinton 等) を参照)。

40

## 【0104】

インビボでのヒト FcRn への結合とヒト FcRn 高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒト FcRn を発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又は変異形 Fc 領域を有するポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。国際公開公報 2000/42072 (Presta) に FcR への結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。例として Shields 等, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001) も参照のこと。

## 【0105】

50

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体(変異形Fc領域を有するポリペプチド)は、米特許第6194551号B1及び国際公開第1999/51642号に記載される。また例としてIdusogie等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)も参照のこと。

#### 【0106】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる。一実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和性成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

#### 【0107】

抗体の「機能的抗原結合部位」は標的抗原に結合可能なものである。抗原結合部位の抗原結合親和性は、抗原結合部位が由来する親抗体と必ずしも同じほどは強くはないが、抗原に結合する能力は、抗原に結合する抗体を評価するために知られている既知の様々な方法の何れか一つを使用して測定できるものでなければならない。更に、この多価抗体の抗原結合部位の各々の抗原結合親和性は定量的に同じである必要はない。この多量体抗体に対して、機能的抗原結合部位の数は超遠心分離分析法を使用して評価することができる。この分析法によれば、多量体抗体に対する標的抗原の異なった比を組み合わせ、複合体の平均分子量を、機能的結合部位の異なった数を仮定して算定する。これらの理論値を、機能的結合部位の数を評価するために得られた実際の実権値と比較する。

#### 【0108】

指定された抗体の「生物学的特性」を有する抗体は同じ抗原に結合する他の抗体とは区別されるその抗体の生物学的特性の一又は複数を保有するものである。

対象の抗体が結合する抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載のものなどの常套的な交差遮断(cross-blocking)アッセイを行ってもよい。

本明細書中で用いられる「アンタゴニスト」なる用語は、リガンドの場合には一又は複数のレセプターへの結合、又はレセプターの場合には一又は複数のリガンドへの結合を含む、本発明のタンパク質の活性を中和、遮断(ブロック)、阻害、抑止、低減又は干渉することができる分子を指す。アンタゴニストには、抗体及びその抗原結合断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖類、オリゴ糖類、核酸、バイオ有機分子、ペプチド模倣薬、製薬的薬剤及びその代謝物、転写及び翻訳制御配列などが含まれる。また、アンタゴニストには、本発明のタンパク質の小分子インヒビター、及び融合タンパク質、タンパク質に特異的に結合することによってその標的への結合を隔離するレセプター分子及び誘導體、タンパク質のアンタゴニスト変異体、本発明のタンパク質に対するアンチセンス分子、RNAアプタマー、及び本発明のタンパク質に対するリボザイムが含まれる。

#### 【0109】

「遮断(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、結合する抗原の生物学的活性

10

20

30

40

50

を阻害するか又は低減させるものである。特定の遮断抗体ないしアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を実質的に又は完全に阻害する。

本明細書中で用いる「VEGF」又は「VEGF-A」なる用語は、Leung等 Science, 246:1306 (1989)、Houck等 Mol. Endocrin., 5:1806 (1991)、及びRobinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5): 853-865 (2001)によって記載されているように、165アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子と、関連した121-、145-、183-、189-、及び206-アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子、並びにそれらの天然に生じる対立遺伝子型及びプロセシング型を意味する。VEGF-Aは、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F及びPLGFを含む遺伝子ファミリーの一部である。VEGF-Aは、VEGFR-1(Flt-1)及びVEGFR-2(Flk-1/KDR)の2つの高親和性レセプターチロシンキナーゼに主に結合する。この後者はVEGF-Aの血管内皮細胞増殖促進シグナルの主な伝達物質である。また、「VEGF」又は「VEGF-A」なる用語は、マウス、ラット又は霊長類などの非ヒト動物腫由来のVEGFも意味する。特定の種由来のVEGFは、ヒトVEGFはhVEGF、マウスVEGFはmVEGFなどの用語で表されることが多い。また、「VEGF」なる用語は、165アミノ酸のヒト血管内皮細胞増殖因子のアミノ酸8~109、又は1~109を含むポリペプチドの切断型ないしはその断片を意味する。「切断した(切断型の)」天然のVEGFのアミノ酸位置は、天然のVEGF配列に示される数で示す。例えば、切断型の天然VEGFのアミノ酸位置17(メチオニン)は、天然のVEGF中の位置17(メチオニン)でもある。切断型の天然VEGFは天然のVEGFに匹敵するKDR及びFlt-1レセプター結合親和性を有する。

#### 【0110】

「VEGFアンタゴニスト」は、一又は複数のVEGFレセプターへの結合を含む、VEGF活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減又は干渉することができる分子(ペプチジル又は非ペプチジル)を指す。VEGFアンタゴニストには、抗VEGF抗体及びその抗原結合性断片、VEGFに特異的に結合することによって一又は複数のレセプターへの結合を隔離するレセプター分子及び誘導体(例えば、可溶性VEGFレセプタータンパク質、又はそのVEGF結合断片、又はキメラVEGFレセプタータンパク質)、VEGFRチロシンキナーゼの小分子インヒビターなどの抗VEGFレセプター抗体及びVEGFレセプターアンタゴニスト、及び融合タンパク質、例として、VEGF-Trap(Regeneron)、VEGF<sub>121</sub>-ゲロニン(Peregine)が含まれる。また、VEGFアンタゴニストには、VEGFのアンタゴニスト変異体、VEGFに対するアンチセンス分子、RNAアプタマー、及びVEGFないしはVEGFレセプターに対するリボザイムが含まれる。さらに、本発明の方法に有用なVEGFアンタゴニストには、VEGFを特異的に結合するペプチジルないしは非ペプチジル化合物、例えば、抗VEGF抗体ないしその抗原結合性断片、ポリペプチド、又はVEGFに特異的に結合するその断片；VEGFポリペプチドをコードする核酸分子の少なくとも断片に相補性があるアンチセンス核酸塩基のオリゴマー；VEGFポリペプチドをコードする核酸分子の少なくとも断片に相補性がある小RNA；VEGFを標的とするリボザイム；VEGFに対するペプチボディ；及び、VEGFアプタマーが含まれる。一実施態様では、VEGFアンタゴニストは、VEGFの発現レベル又は生物学的活性を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又はそれ以上低減するか、又は阻害する。他の実施態様では、VEGFアンタゴニストによって阻害されるVEGFは、VEGF(8-109)、VEGF(1-109)又はVEGF<sub>165</sub>である。

「抗VEGF抗体」又は「VEGFに結合する抗体」なる用語は、抗体がVEGFを標的とした診断上の薬剤及び/又は治療上の薬剤として有用であるために十分な親和性と特異性を有してVEGFに結合することができる抗体を指す。例えば、本発明の抗VEGF抗体は、VEGF活性が関与する疾患及び症状を標的とし、干渉する際の治療上の薬剤として有用でありうる。例として米国特許第6582959号、同第6703020号；国際公開第98/45332号；国際公開第96/30046号；国際公開第94/102

10

20

30

40

50

02号、国際公開第2005/044853号；；欧州特許第0666868号B1；米国特許公開第20030206899号、同第20030190317号、同第20030203409号、同第20050112126号、同第20050186208号及び同第20050112126号；Popkov等、Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)；及び国際公開第2005012359号を参照のこと。選択した抗体は通常、VEGFに対して十分に強い結合親和性を有する。例えば、抗体は100nM - 1pMの間のKd値でhVEGFを結合しうる。抗体親和性は、例えば、表面プラスモン共鳴をベースとしたアッセイ(PCT出願公開番号WO2005/012359に記載のあるBIACoreアッセイなど)；酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)；及び、競合アッセイ(例えばRIAのもの)によって決定されうる。例えば治療としての有効性を評価するために、抗体を他の生物学的な活性アッセイに用いてもよい。このようなアッセイは当分野で公知であり、標的抗原と抗体の使用目的に依存する。例として、HUVEC阻害アッセイ；腫瘍細胞増殖阻害アッセイ(例えば国際公開第89/06692号に記載のもの)；抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び補体媒介性細胞障害(CDC)アッセイ(米国特許第5500362号)；及び、アゴニスト活性又は造血アッセイ(国際公開第95/27062号を参照)などがある。抗VEGF抗体は通常、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D又はVEGF-Eなどの他のVEGFホモログにも、PLGF、PDGF又はbFGFなどの他の増殖因子にも結合しないだろう。一実施態様では、抗VEGF抗体には、ハイブリドーマATCC HB 10709によって産生されるモノクローナル抗VEGF抗体A4.6.1と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体；組み換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体(Presta等(1997)Cancer Res. 57: 4593-4599)であり、限定するものではないが「ベバシズマブ(BV)」とも「rhUMA b VEGF」又は「AVASTIN(登録商標)」としても知られる抗体が含まれる。ベバシズマブは、ヒトVEGFのそのレセプターへの結合をブロックするマウス抗体A.4.6.1から、変異したヒトのIgG1フレームワーク領域と抗原結合性相補性決定領域を含む。フレームワーク領域のほとんどを含め、ベバシズマブのアミノ酸配列のおよそ93%は、ヒトのIgG1に由来し、配列のおよそ7%はA4.6.1に由来する。ベバシズマブは、およそ149000のダルトンの分子量を有し、グリコシル化されている。ベバシズマブ及び他のヒト化抗VEGF抗体は、2005年2月26日に発行の米国特許第6884879号にさらに記載されている。PCT出願公開番号WO2005/012359に記載のあるように、更なる抗VEGF抗体には、G6又はB20系列抗体(例えば、G6-23、G6-31、B20-4.1)が含まれる。さらに好適な抗体については、米国特許第7060269号、同第6582959号、同第6703020号；同第6054297号；国際公開第98/45332号；国際公開第96/30046号；国際公開第94/10202号；欧州特許第0666868号B1；米国特許公開第2006009360号、同第20050186208号、同第20030206899号、同第20030190317号、同第20030203409号、及び同第20050112126号；及び、Popkov等、Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)を参照のこと。

#### 【0111】

本明細書で使用する場合、用語「B20シリーズのポリペプチド」は、VEGFに結合する抗体を含めて、ポリペプチドを指す。B20シリーズのポリペプチドとして、これらに限定されないが、米国特許出願公開第20060280747号、米国特許出願公開第20070141065号および/または米国特許出願公開第20070020267号に記載されているB20抗体またはB20由来の抗体の配列から得た抗体が挙げられ、これらの特許出願の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれている。一実施形態では、B20シリーズのポリペプチドは、米国特許出願公開第20060280747号、米国特許出願公開第20070141065号および/または米国特許出願公開第20070020267号に記載されているB20-4.1である。別の実施形態では、B20シリーズのポリペプチドは、PCT公開第WO2009/073160号に記載されているB20-4.1.1であり、この開示の全体が、参照により本明細書に明確に組み込ま

10

20

30

40

50

れている。

【0112】

本明細書で使用する場合、用語「G6シリーズのポリペプチド」は、VEGFに結合する抗体を含めて、ポリペプチドを指す。G6シリーズのポリペプチドとして、これらに限定されないが、米国特許出願公開第20060280747号、米国特許出願公開第20070141065号および/または米国特許出願公開第20070020267号に記載されているG6抗体またはG6由来の抗体の配列から得た抗体が挙げられる。米国特許出願公開第20060280747号、米国特許出願公開第20070141065号および/または米国特許出願公開第20070020267に記載されているG6シリーズのポリペプチドとして、これらに限定されないが、G6~8、G6~23およびG6~31が挙げられる。

10

【0113】

「URVINA」は、VEGF非依存性腫瘍中で上方制御される核酸を指す。URVINAとして、これらに限定されないが、S100A8(配列番号1)、S100A9(配列番号3)、PLGF(配列番号5)、IL-1(配列番号7)、IL-6(配列番号9)、およびLIF(配列番号11)が挙げられる。

「URVIP」は、VEGF非依存性腫瘍中で上方制御されるタンパク質を指す。URVIPとして、これらに限定されないが、S100A8(配列番号2)、S100A9(配列番号4)、PLGF(配列番号6)、IL-1(配列番号8)、IL-6(配列番号10)、LIF(配列番号12)、およびHGF(配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22)が挙げられる。

20

「DRVINA」は、VEGF非依存性腫瘍中で下方制御される核酸を指す。DRVINAとして、これらに限定されないが、Tie-1(配列番号25)、Tie-2(配列番号27)、VEGFR1(配列番号29)、VEGFR2(配列番号31)、CD31(配列番号33)、CD34(配列番号35)、およびPDGFC(配列番号37)が挙げられる。

「DRVIP」は、VEGF非依存性腫瘍中で下方制御されるタンパク質を指す。特定の実施形態では、DRVIPは、VEGF非依存性腫瘍中で下方制御される核酸、例えば、DRVINAによってコードされるタンパク質である。

【0114】

本明細書で使用する場合、用語「IL-1アンタゴニスト」は、IL-1に結合し、IL-1の生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。IL-1アンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、IL-1アンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトIL-1に結合する抗IL-1抗体である。別の実施形態では、IL-1アンタゴニストは、インターロイキン-1受容体アンタゴニスト(IL-1Ra)であるKineret(登録商標)(アナキンラ)(Amgen, Thousand Oaks, CA)である。さらに別の実施形態では、IL-1アンタゴニストは、IL-1 Trap(Regeneron, Tarrytown, NY)である。

30

40

【0115】

本明細書で使用する場合、用語「IL-6アンタゴニスト」は、IL-6に結合し、IL-6の生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。IL-6アンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、IL-6アンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトIL-6に結合する抗IL-6抗体である。

本明細書で使用する場合、用語「LIFアンタゴニスト」は、LIFに結合し、LIF

50

の生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。L I Fアンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、L I Fアンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトL I Fに結合する抗L I F抗体である。

#### 【0116】

本明細書で使用する場合、用語「P l G Fアンタゴニスト」は、P l G Fに結合し、P l G Fの生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。P l G Fは、胎盤増殖因子を指す。P l G Fは主として、2つのスプライス変異体またはアイソフォーム、すなわち、149個のアミノ酸のP l G F - 1、またはカルボキシ末端領域における21個のアミノ酸の挿入を含む170個のアミノ酸のP l G F - 2が存在することが見出されているが、また、その他のアイソフォームも見出されている。P l G Fアンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、P l G Fアンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトP l G Fに結合する抗P l G F抗体である。一実施形態では、P l G F抗体は、抗P l G F T B - 403 (ThromboGenics NV, Leuven, Belgium)である。例えば、Fischer Cら、Anti - P l G F Inhibits Growth of VEGF (R) - Inhibitor - Resistant Tumors Without Affecting Healthy Vessels, Cell, 131: 463 ~ 475 (2007)を参照されたい。別の実施形態では、P l G Fアンタゴニストは、P l G FのFlt - 1受容体への結合を阻害することができる抗P l G F抗体である。

10

20

#### 【0117】

本明細書で使用する場合、用語「H G Fアンタゴニスト」は、H G Fに結合し、H G Fの生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。H G Fアンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、H G Fアンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトH G Fに結合する抗H G F抗体である。別の実施形態では、H G Fアンタゴニストは、A M G 102、すなわち、H G F / S F (細胞分散因子 (scatter factor)) に対するヒトモノクローナル抗体である。

30

#### 【0118】

「c - Metアンタゴニスト」(「c - Met阻害剤」とも互換的に呼ぶ)は、c - Metの活性化または機能を妨げる薬剤である。c - Metの核酸配列およびタンパク質配列を、本明細書においてそれぞれ、配列番号23および配列番号24の下に開示する。c - Met阻害剤の例として、c - Met抗体；H G F抗体；小型分子c - Metアンタゴニスト；c - Metチロシンキナーゼ阻害剤；アンチセンスおよび阻害性のRNA (例えば、shRNA)分子 (例えば、WO2004/87207を参照されたい)が挙げられる。特定の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metに結合する抗体または小型分子である。特定の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metに対して、約1,000 nM以下の結合親和性 (解離定数)を有する。別の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metに対して、約100 nM以下の結合親和性を有する。別の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metに対して、約50 nM以下の結合親和性を有する。特定の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metに共有結合する。特定の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metシグナル伝達を、1,000 nM以下のIC50で阻害する。別の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metシグナル伝達を、500 nM以下のIC50で阻害する。別の実施形態では、c - Met阻害剤は、c - Metシグナ

40

50

ル伝達を、50 nM以下のIC50で阻害する。

「c-Met活性化」は、c-Met受容体の活性化またはリン酸化を指す。一般に、c-Met活性化の結果、シグナル伝達（例えば、c-Met中のc-Met受容体リン酸化チロシン残基の細胞内キナーゼドメインまたは基質ポリペプチドによって引き起こされる）シグナル伝達が発生する。c-Met活性化は、目的のc-Met受容体にc-Metリガンド（HGF）が結合することによって媒介され得る。c-MetにHGFが結合すると、c-Metのキナーゼドメインが活性化され、それによって、c-Met中のチロシン残基のリン酸化および/または追加の（1つもしくは複数の）基質ポリペプチドのチロシン残基のリン酸化が生じ得る。

#### 【0119】

本明細書で使用する場合、用語「S100A8アンタゴニスト」は、S100A8に結合し、S100A8の生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。S100A8アンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、S100A8アンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトS100A8に結合する抗S100A8抗体である。

本明細書で使用する場合、用語「S100A9アンタゴニスト」は、S100A9に結合し、S100A9の生物学的活性を阻害するまたは実質的に低下させる分子を指す。S100A9アンタゴニストの非限定的な例として、抗体、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生物有機分子、ペプチド模倣薬、薬理作用を示す物質およびそれらの代謝産物、転写および翻訳を制御する配列等が挙げられる。本発明の一実施形態では、S100A9アンタゴニストは、抗体、とりわけ、ヒトS100A9に結合する抗S100A9抗体である。

#### 【0120】

ポリペプチドに関する「生物学的活性」および「生物学的に活性な」という用語は、分子が、細胞に特異的に結合し、細胞応答、例えば、増殖、遊走等を制御する能力を指す。また、細胞応答としては、これらに限定されないが、遊走および/または増殖を含めた、受容体を通して媒介されるものも挙げられる。この文脈では、用語「調節する」は、促進および阻害の両方を含む。

#### 【0121】

「VEGFの生物学的活性」は、任意のVEGF受容体への結合、または正常な血管新生および血管形成ならびに異常な血管新生および血管形成の両方の調節等、任意のVEGFシグナル伝達活性（FerraraおよびDavis-Smyth（1997）*Endocrine Rev.* 18:4~25；Ferrara（1999）*J. Mol. Med.* 77:527~543）；胚の血管形成および血管新生の促進（Carmelietら（1996）*Nature* 380:435~439；Ferraraら（1996）*Nature* 380:439~442）；さらに、雌の生殖器系における、ならびに骨の成長および軟骨の形成のための周期性の血管増殖の調節（Ferraraら（1998）*Nature Med.* 4:336~340；Gerberら（1999）*Nature Med.* 5:623~628）を含む。血管新生および血管形成における血管新生因子であることに加え、VEGFは、多面的な増殖因子として、内皮細胞の生存、血管透過性および血管拡張、単核球走化性、ならびにカルシウムの流入等のその他の生理学的プロセスにおいて、複数の生物学的な作用を示す（FerraraおよびDavis-Smyth（1997）、上記、ならびにCebe-Suarezら *Cell. Mol. Life Sci.* 63:601~615（2006））。さらに、最近の研究からは、網膜色素上皮細胞、膵管細胞およびシュワン細胞等のいくつかの非内皮細胞型に対するVEGFの分裂促進作用も報告されている。Guerrinら（1995）*J. Cell Physiol.* 164:385~394；Obergh-Welshら（1997）*Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125~132；Sondellら（199

10

20

30

40

50

9) J. Neurosci. 19: 5731~5740。

【0122】

「血管新生因子又は薬剤」は、血管の発達を刺激する、例えば、血管新生、血管内皮細胞増殖、血管及び/又は脈管形成の安定性を促進する増殖因子である。例えば、血管新生因子には、限定するものではないが、例えば、VEGF及びVEGFファミリーのメンバー、PLGF、PDGFファミリー、線維芽細胞増殖因子ファミリー(FGF)、TIEリガンド(アンジオポイエチン)、エフリン、ANGPTL3、ANGPTL4などが含まれる。また、創傷治癒を促す因子、例として、成長ホルモン、インスリン様成長因子-I(IGF-I)、VIGF、上皮細胞増殖因子(EGF)、CTGF、及びそのファミリーのメンバー、及びTGF- $\beta$ 1及びTGF- $\beta$ 2が含まれる。例としてKlagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini等, Oncogene, 22:6549-6556 (2003)(例えば、血管新生因子を列挙する表1); 及びSato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)を参照。

10

【0123】

「抗血管新生剤」又は「血管新生インヒビター」は、小分子量物質、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、単離されたタンパク質、組換えタンパク質、抗体、又はこれらのコンジュゲートないし融合タンパク質を指し、直接又は間接的に、血管新生、脈管形成又は望ましくない血管透過を阻害するものである。例えば、抗血管新生剤は、上記に定義するように、血管新生剤に対する抗体又は他のアンタゴニスト、例えばVEGFに対する抗体、VEGFレセプターに対する抗体、VEGFレセプターシグナル伝達を遮断する小分子(例えばPTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248(リンゴ酸スニチニブ)、AMG706)である。また抗血管新生剤には、天然の血管新生インヒビター、例えばアンジオスタチン、エンドスタチンなどが含まれる。例としてKlagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003)(例えば、悪性メラノーマの抗血管新生療法を列挙する表3); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12): 1359-1364 (1999); Tonini等, Oncogene, 22:6549-6556 (2003)(例えば、抗血管新生因子を列挙する表2); 及び、Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)(例えば、臨床試験で用いられる抗血管新生剤を挙げる表1)を参照。

20

30

【0124】

「抗脈管形成療法」なる用語は、本明細書で定義されるように少なくとも一つの抗脈管形成剤の投与を含む脈管形成を抑制することに役立つ治療に関連する。ある実施態様において、抗脈管形成療法は、対象にVEGFアンタゴニストを投与することを含む。ある実施態様において、ここで定められるように、抗脈管形成療法はVEGF-アンタゴニストを投与することを含む。ある実施態様において、VEGFアンタゴニストは、抗-VEGF抗体である。別の実施態様において、抗-VEGF抗体は、ベバシズマブである。

【0125】

本明細書中で用いる「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書において治療される哺乳動物の免疫系を抑制するか又は隠すために作用する物質を指す。これには、サイトカイン産生を抑制する物質、自己抗原発現を下方制御又は抑制する物質、又は、MHC抗原をマスキングする物質が含まれる。このような薬剤の例には、2-アミノ-6-アリル-5-置換ピリミジン(米国特許第4665077号を参照); 非ステロイド性抗炎症薬(NSAID); ガンシクロビル、タクロリムス、糖質コルチコイド、例として、コルチゾール又はアルドステロン、抗炎症剤、例として、シクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リボキシゲナーゼインヒビター又はロイコトリエンレセプターアンタゴニスト; プリンアンタゴニスト、例として、アザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル(MMF); アルキル化剤、例として、シクロホスファミド; プロモクリプチン; ダナゾール; ダブソン; グルターールアルデヒド(MHC抗原をマスキングするもの、米国特許第4120649号に記載); MHC抗原及びMHC断片に対する抗イディオタイプ抗体; シクロスポリンA; ステロイド

40

50

、例として、副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質コルチコイド類似体、例えばプレドニゾン、メチルプレドニゾン及びデキサメサゾン；ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター、例えばメトトレキセート(経口又は皮下)；ヒドロキシクロロキン；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカインないしはサイトカインレセプター抗体、例えば抗インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 又は $\gamma$ 抗体、抗腫瘍壊死因子- $\alpha$ 抗体(インフリキシマブ又はアダリムマブ)、抗TNF- $\alpha$ イムノアドヘシン(エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子- $\beta$ 抗体、抗インターロイキン2抗体及び抗IL-2レセプター抗体；抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；抗L3T4抗体；異種性の抗リンパ球グロブリン；パン-T抗体、好ましくは抗CD3又は抗CD4/CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日に発行の国際公開第1990/08187号)；ストレプトキナーゼ；TGF- $\beta$ ；ストレプトドルナーゼ；宿主のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；デオキシスベルグアリン；ラバマイシン；T細胞レセプター(Cohen等、米国特許第5114721号)；T細胞レセプター断片(Offner等、Science, 251: 430-432 (1991)；国際公開第1990/11294号；laneway, Nature, 341: 482 (1989)；及び国際公開第1991/01133号)；及び、T細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)、例えばT10B9が含まれる。

10

## 【0126】

「非ステロイド系抗炎症薬」又は「NSAID」の例は、アセチルサリチル酸、イブプロフェン、ナプロキセン、インドメタシン、スリダク、トルメチン、これらの塩類及び誘導体などが含まれる。

20

## 【0127】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 及びLuの放射性同位体)、化学治療薬、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素を含むように意図されている。

## 【0128】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞の増殖をインビトロ及び/又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期で細胞の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス(ピンクリスチン及びビンブラスチン)、タキソール(登録商標)、及びトポII阻害剤、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

30

40

## 【0129】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インブロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標)；ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；

50

ベツリン酸；カンプトテシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT-11(イ  
 リノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン(scopole  
 ctin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1  
 065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィ  
 ロトキシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニボシド；クリプトフィシン(特  
 くにクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合  
 成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロピン；パンクラチス  
 タチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlor  
 naphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファ  
 ミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベン  
 ビチン(novembichin)、フェネスチリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustin  
 e)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマス  
 タード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)  
 、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物  
 質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケ  
 アマイシン 1I及びカリケアマイシン I1(例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:1  
 83-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；エスペラマイ  
 シン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質  
 発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシ  
 ン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カ  
 ラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマ  
 イシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6-ジアゾ-  
 5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標)、モルホリノ-ドキ  
 ソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、ドキシ  
 ソルピシンHCIRIボソーム注射剤(DOXIL(登録商標))及びデオキシドキシソルピシンを含む)  
 、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マ  
 イトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノ  
 ガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィ  
 ロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシ  
 ン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)  
 、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例  
 えばメトトレキセート、ゲムシタピン(gemcitabine)(GEMZAR(登録商標))、テガフル(teg  
 afur)(UFTORAL(登録商標))、カペシタピン(capecitabine)(XELODA(登録商標))、エポチ  
 ロン(epothilone)、及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテ  
 リン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセ  
 ート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラピン(fludarabine)、6-メルカプ  
 トプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、ア  
 ザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラピン、  
 ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジ  
 ン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ド  
 ロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)  
 ；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャ  
 ー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミ  
 ドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベスト  
 ラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；  
 デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；  
 エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エトグルシド(et  
 oglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイ  
 タンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(a  
 nsamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamo

l) ; ニトラクリン(nitracrine) ; ペントスタチン ; フェナメット(phenamet) ; ピラルピシン ; ロソキサントロン ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; P S K (登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR) ; ラゾキサン(razoxane) ; リゾキシン ; シゾフィラン ; スピロゲルマニウム(spirogermanium) ; テニユアゾン酸(tenuazonic acid) ; トリアジコン(triaziquone) ; 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin) A、ロリジン(roridine) A及びアングイジン(anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標)) ; ダカーバジン ; マンノムスチン(mannomustine) ; ミトブロニトール ; ミトラクトール(mitolactol) ; ピポブロマン(pipobroman) ; ガシトシン(gacytosine) ; アラビノシド(「A r a - C」) ; チオテパ ; タキソイド類、例えばパクリタキセル(TAXOL(登録商標))、パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(ABRAXANE™)、及びドキシタキセル(TAXOTERE(登録商標)) ; クロランブシル ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン ; ビンブラスチン(VELBAN(登録商標)) ; プラチナ ; エトポシド(V P - 1 6) ; イホスファミド ; マイトキサントロン ; ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標)) ; オキサリプラチン ; ロイコボビン(leucovovin) ; ビノレルピン(N A V E L B I N E (登録商標)) ; ノバントロン(novantrone) ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロナート(ibandronate) ; トポイソメラーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0 ; ジフルオロメチロールニチン(D M F O) ; レチノイン酸のようなレチノイド ; 上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体 ; 並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるC H O P、及び5-F U及びロイコボビン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATIN™)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

#### 【 0 1 3 0 】

またこの定義に含まれるものには、癌の増殖を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ(S E R M)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)(EVISTA(登録商標))、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(FARESTON(登録商標)) ; 抗プロゲステロン ; エストロゲンレセプター下方調節剤(ERD) ; 卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば酢酸リュープロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプテレリン(tripterelin) ; その他抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド ; 並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(MEGASE(登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、フォルメスタニー(formestanie)、ファドロゾール、ポロゾール(RIVISOR(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))、及びアナストロゾール(A R I M I D E X (登録商標))である。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロロン酸/ゾレドロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロン酸(SKELID(登録商標))、又はリセドロロン酸(ACTONEL(登録商標))、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばP K C-、R a f、及びH-R a s、及び上皮増殖因子レセプター(E G F - R) ; THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登

録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤(例えばLURTOTECAN(登録商標))；r m R H(例えばABARELIX(登録商標))；ラパチニブ(lapatinib ditosylate)(GW572016としても知られるE r b B - 2及びE G F R二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)；セレコシブ(celecoxib)などのC O X - 2阻害剤(CELEBREX(登録商標))；4-(5-(4-メチルフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾル-1-イル)ベンゼンスルホンアミド；及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

#### 【0131】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。そのようなサイトカインの例は、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(F S H)、甲状腺刺激ホルモン(T S H)、及び黄体形成ホルモン(L H)のような糖タンパク質ホルモン；肝増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 及び- ；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮増殖因子(例えばV E G F、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、V E G F - E)；胎盤由来の増殖因子(P L G F)；血小板由来成長因子(P D G F、例えばP D G F A、P D G F B、P D G F C、P D G F D)；インテグリン；トロンボポエチン(T P O)；神経成長因子、例えばN G F- ；血小板増殖因子；T G F- 及びT G F- のようなトランスフォーミング成長因子(T G F)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(E P O)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、例えばインターフェロン- 、 - 、 - ；コロニー刺激因子(C S F)、例えばマクロファージ-C S F(M - C S F)；顆粒球-マクロファージ-C S F(G M - C S F)；及び顆粒球-C S F(G - C S F)；I L - 1、I L - 1 、 I L - 1 、 I L - 2、I L - 3、 I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、 I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 19、I L - 20、I L - 30のインターロイキン(I L)；セクレトグロビン/ウテログロビン；オンコスタチンM(O S M)；T N F- 又はT N F- などの腫瘍壊死因子；及びL I F及びキットリガンド(K L)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合は、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

#### 【0132】

「被検体」または「患者」は、ヒト、又はウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ及びネコのような非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物を意味する。ある実施態様において患者はヒトである。別の実施態様において、癌と診断された患者yである。

#### 【0133】

治療のための「哺乳動物」とは、哺乳動物に分類される任意の動物を意味し、ヒト、家畜及び農場用動物、動物園、スポーツ、又は愛玩動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタなどを含む。ある実施態様では、哺乳動物はヒトである。

#### 【0134】

「疾患」は治療によって利益を得る任意の症状である。これには、哺乳動物が問題とする疾患に罹らしめる病理学的症状を含む、慢性及び急性の疾患ないし疾病が含まれる。本明細書中で治療される疾患の非限定的な例には、いずれかの形態の腫瘍、良性及び悪性の腫瘍；血管化の腫瘍；肥大；白血病及びリンパ系の悪性腫瘍；神経系疾患、膠細胞性疾患、星状性、視床下部及び他の腺性疾患、マクロファージ性疾患、上皮性疾患、間質性疾患、及び胚盤胞性疾患；及び、炎症性疾患、血管形成性及び免疫性疾患、不適当な、異常な、過剰な及び/又は病理学的脈管化及び/又は血管透過から生じる血管性疾患が含まれる。

#### 【0135】

10

20

30

40

50

ここで使用されるところの「治療」(及び「処置」又は「治療する」などの変形句)は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程中に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病の任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病の進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病の進行を遅らせるため又は疾患又は疾病の進行をゆっくりにするために用いられる。

【0136】

「有効量」又は「治療的有效量」という用語は、哺乳類の疾病や疾患の治療のために有効な薬剤の量に相当する。癌の場合は、有効量の薬剤により、癌細胞の数を減少させ；腫瘍の大きさを小さくし；癌細胞の周辺器官への浸潤を阻害(すなわち、ある程度に遅く、典型的には止める)し；腫瘍の転移を阻害(すなわち、ある程度に遅く、典型的には止める)し；腫瘍の成長をある程度阻害し；VEGF非依存性腫瘍の治療を可能にする；及び/又は疾患に関連する一又は複数の症状をある程度和らげることが可能である。ある程度、薬剤は、成長を妨げ及び/又は現存の癌細胞を殺すことが可能で、細胞分裂停止性及び/又は細胞障害性である。癌治療に対しては、インビボにおける効力は、例えば生存期間、病状の進行時間(TTP)、応答速度(RR)、応答期間、及び/又は生活の質の測定により測定される。大腸腺腫の場合、治療的有效量の薬剤により、例えば、腺腫細胞数の減少；腺腫サイズの減少；腺腫数の減少；腺腫の成長のある程度の阻害；及び/又は本疾患に関係する一又は複数の症状のある程度の軽減しうる。治療の効果と題した節も参照のこと。

10

20

【0137】

「予防的有效量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には必ずではないが、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有效量は治療的有效量よりも少ないであろう。

【0138】

前癌性、良性の、早期または後期の腫瘍の場合、治療有効量の血管新生阻害剤が、癌細胞の数を低下させること；原発性腫瘍のサイズを縮小すること；癌細胞が周辺臓器中に浸潤するのを阻害する(すなわち、ある程度まで緩慢化させ、好ましくは、停止させる)こと；腫瘍の転移を阻害する(すなわち、ある程度まで緩慢化させ、好ましくは、停止させる)こと；腫瘍の成長もしくは腫瘍の進行を阻害するもしくはある程度まで遅延させること；および/または障害と関連がある症状のうちの1つもしくは複数がある程度まで和らげることができる。薬物が、現存する癌細胞の成長を阻止することおよび/または現存する癌細胞を死滅させることができる程度まで、薬物は、細胞分裂抑制性および/または細胞傷害性であり得る。癌療法について、in vivoにおける有効性を、例えば、生存期間、疾患進行(TTP)までの時間、応答率(RR)、応答期間、および/または生活の質を評価することによって測定することができる。また、治療の有効性と題したセクションも参照されたい。

30

【0139】

「低下させるまたは阻害する」とは、参照と比較して、活性、機能および/または量を、減少させるまたは低下させることである。特定の実施形態では、「低下させるまたは阻害する」によって、20%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。別の実施形態では、「低下させるまたは阻害する」によって、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。さらに別の実施形態では、「低下させるまたは阻害する」によって、75%、85%、90%または95%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。低下させるまたは阻害するは、治療を受けている障害の症状、転移の存在もしくはサイズ、原発性腫瘍のサイズ、または血管新生障害における血管のサイズもしくは数を指すことができる。

40

【0140】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節されない細胞増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は記述する。癌の例には、限定するものではないが、カルチ

50

ノーマ、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病又はリンパ性悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより具体的な例には、腎臓又は腎性癌、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肺癌、例として小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、扁平細胞癌(例えば上皮の扁平細胞癌)、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肝癌、膀胱癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃(gastric、stomach)癌、消化管間質腫瘍(GIST)、膵癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、莢膜細胞腫、男化腫瘍、肝細胞癌、非ホジキンリンパ腫を含む血液悪性腫瘍(NHL)、多発性骨髄腫及び急性の血液系悪性腫瘍、子宮内膜ないし子宮カルチノーマ、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛膜癌、唾液腺カルチノーマ、外陰部癌、甲状腺癌、食道カルチノーマ、肝癌、肛門部のカルチノーマ、陰茎カルチノーマ、上咽頭癌、喉頭のカルチノーマ、カボシ肉腫、メラノーマ、皮膚カルチノーマ、シュワン腫、乏突起細胞腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉種、平滑筋肉腫、尿路カルチノーマ、甲状腺カルチノーマ、ウィルムス腫瘍、並びにB細胞リンパ腫(例えば低グレード/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL);小リンパ球性(SL)NHL;中間グレード/濾胞性NHL;中間グレード広汎性NHL;高グレード免疫芽細胞NHL;高グレードリンパ芽球NHL;高グレード小型非分割細胞NHL;巨大腫瘤病変(bulky disease)NHL;マントル細胞リンパ腫;エイズ関連のリンパ腫;及び、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症);慢性リンパ球性白血病(PLL);急性リンパ芽球性白血病(ALL);線毛細胞白血病;慢性骨髄芽球性白血病;及び、移植後のリンパ増殖性疾患(PTLD)、並びに母斑症、浮腫(脳腫瘍と関係しているものなど)及びメイグス症候群と関係している異常な血管性増殖が含まれる。

10

20

## 【0141】

本明細書中で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性のいずれであっても、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖、及びすべての前癌性及び癌性の細胞及び組織を指す。

## 【0142】

治療しようとする新生物障害の例として、これらに限定されないが、本明細書において、用語「癌」および「癌性の」の下に記載するものが挙げられる。本発明のアンタゴニストを用いる治療に適している非新生物の状態として、これらに限定されないが、例えば、望まれないまたは異常な肥大、関節炎、関節リウマチ(RA)、乾癬、乾癬プラーク、サルコイドーシス、アテローム動脈硬化、動脈硬化性プラーク、心筋梗塞由来の浮腫、未熟児網膜症、後水晶体線維増殖症、血管新生緑内障、加齢黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫を含めた、糖尿病性およびその他の増殖性の網膜症、角膜血管新生、角膜移植血管新生、角膜移植片拒絶反応、網膜/脈絡膜血管新生、隅角血管新生(ルベオーシス)、眼球血管新生疾患、血管再狭窄、動静脈形成異常(AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺肥大(グレース病を含む)、角膜およびその他の組織の移植、慢性炎症、肺炎症、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性の肺浸出液(pulmonary effusion)、脳浮腫(例えば、急性脳卒中/閉鎖性の頭部損傷/外傷と関連があるもの)、滑膜の炎症、RAにおけるパンヌス形成、骨化性筋炎、骨形成肥大、骨関節炎(OA)、難治性の腹水、多嚢胞性卵巣疾患、子宮内膜症、第三腔体液病(3rd spacing of fluid disease)(膵炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患)、子宮筋腫、早期分娩、IBD(クローン病および潰瘍性大腸炎)等の慢性炎症、腎臓同種移植片拒絶、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望まれないまたは異常な組織塊の成長(非癌性)、肥満、脂肪組織塊の成長、血友病性関節、肥厚性瘢痕、毛髪の成長阻害、オスラー-ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫後水晶体線維増殖、強皮症、トラコーマ、血管癒着、滑膜炎、皮膚炎、妊娠高血圧腎症、腹水、心膜液貯留(心外膜炎と関連があるもの等)、ならびに胸水貯留が挙げられる。

30

40

## 【0143】

用語「癌療法」は、癌を治療するのに有用な療法を指す。用語「抗新生物組成物」は、少なくとも1つの活性な治療剤、例えば、「抗癌剤」を含む、癌を治療するのに有用な組成物を指す。治療剤(抗癌剤)の例として、これらに限定されるが、例えば、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害剤、放射線療法において使用する薬剤、抗血管新生剤、アポトー

50

シス剤、抗チューブリン剤、毒素および癌を治療するためのその他の薬剤が挙げられ、例えば、抗VEGF中和抗体、VEGFアンタゴニスト、抗HER-2、抗CD20、上皮増殖因子受容体(EGFR)アンタゴニスト(例えば、チロシンキナーゼ阻害剤)、HER1/EGFR阻害剤、エルロチニブ(Tarceva(登録商標))、COX-2阻害剤(例えば、セレコキシブ)、インターフェロン、サイトカイン、(1つもしくは複数の)Erbb2受容体、Erbb3受容体、Erbb4受容体もしくはVEGF受容体のうちの1つもしくは複数に結合するアンタゴニスト(例えば、中和抗体)、血小板由来増殖因子(PDGF)および/または幹細胞因子(SCF)についての受容体チロシンキナーゼの阻害剤(例えば、イマチニブメシレート(Gleevec(登録商標))Novartis)、TRAIL/Apo2、ならびにその他の生理活性物質および有機化学物質等がある。また、それらの組合せも本発明に含まれる。

10

**【0144】**

用語「診断」は、本明細書では、癌の同定等、分子のもしくは病理学的な状況、疾患もしくは状態を同定することを指すため、または特定の治療計画から利益を得ることができる癌患者を同定することを指すために使用する。一実施形態では、診断は、特定の型の腫瘍を同定することを指す。さらに別の実施形態では、診断は、対象のVEGF非依存性腫瘍を同定することを指す。

**【0145】**

用語「予後」は、本明細書では、抗癌療法に由来する、臨床上の利益の可能性を予測することを指すために使用する。

20

**【0146】**

用語「予測」は、本明細書では、患者の特定の抗癌療法に対する応答が有利または不利のいずれかである可能性を指すために使用する。一実施形態では、予測は、それらの応答の程度に関連する。一実施形態では、予測は、治療、例えば、特定の治療剤を用いた治療の後に、疾患の再発なしで特定の期間にわたり患者が生存するもしくは改善するかどうか、および/またはそうした確率に関連する。本発明の予測方法を臨床的に使用して、任意の特定の患者について最も適切な治療のモダリティーを選ぶことによって、治療の決定を下すことができる。本発明の予測方法は、患者が、例えば、所与の治療剤もしくは組合せの投与、外科的介入、ステロイド治療等を含めた、所与の治療投与計画等の治療計画に対して有利に応答する可能性が高いかどうか、または治療投与計画後に、患者が長期に生存する可能性が高いかどうかを予測する場合の貴重なツールである。

30

**【0147】**

患者の応答性を、患者に対する利益を示す任意のエンドポイントを使用して評価することができ、それらのエンドポイントとして、非限定的に、(1)緩慢化および完全な停止を含めた、疾患の進行のある程度までの阻害；(2)病変サイズの縮小；(3)疾患細胞が隣接する周辺の臓器および/もしくは組織中に浸潤するのを阻害する(すなわち、低下させる、緩慢化させるもしくは完全に停止させる)こと；(4)疾患が広がるのを阻害する(すなわち、低下させる、緩慢化させるもしくは完全に停止させる)こと；(5)障害と関連がある1つもしくは複数の症状のある程度まで軽減すること；(6)治療後の、疾患が提示されない長さを延長すること；ならびに/または(8)治療後の所与の時点における死亡率の減少が挙げられる。

40

**【0148】**

種々のエンドポイント、例えば、緩慢化および完全な停止を含めた、疾患の進行のある程度までの阻害；疾患のエピソードおよび/もしくは症状の数の低下；病変サイズの縮小；疾患細胞が隣接する周辺の臓器および/もしくは組織中に浸潤するのを阻害する(すなわち、低下させる、緩慢化させるもしくは完全に停止させる)こと；疾患が広がるのを阻害する(すなわち、低下させる、緩慢化させるもしくは完全に停止させる)こと；疾患病変の退縮もしくは消失をもたらす場合があるが、そうでなければならぬことはない自己免疫応答の減少；障害と関連がある1つもしくは複数の症状のある程度まで軽減すること；治療後の、疾患が提示されない長さ、例えば、進行が見られない生存の長さを延長する

50

こと；全体的な生存の延長；より高い応答率；ならびに／または治療後の所与の時点における死亡率の減少を評価することによって、臨床上の利益を測定することができる。

【0149】

用語「利益」は、広い意味で使用し、任意の望ましい作用を指し、具体的には、本明細書で定義する臨床上の利益を含む。

【0150】

1つまたは複数のさらなる治療剤「と組み合わせた」投与は、同時（同じ時期）の投与および／または任意の順の連続した投与を含む。

【0151】

用語「同時に」は、本明細書では、投与の少なくとも一部が時間的に重なる、2つ以上の治療剤の投与を指すために使用する。したがって、同時の投与は、1つまたは複数の薬剤の投与が、1つまたは複数のその他の薬剤の投与を中断した後も続く場合の投与計画を含む。

10

【0152】

本発明の方法

本発明は、VEGF非依存性腫瘍を検出するための方法および組成物を提供する。本明細書に開示する配列情報から、当技術分野で知られている核酸検出方法と相まって、種々の開示する転写物を検出および比較することが可能になる。開示する方法は、VEGF非依存性腫瘍を有する癌患者を治療するための適切または有効な療法を評価するのに有用であるデータおよび情報を得るための、好都合かつ効率的であり、潜在的に費用効果がある手段もさらに提供する。

20

【0153】

特定の実施形態では、VEGF非依存性腫瘍を検出するため、およびVEGFアンタゴニスト治療に対する腫瘍の感受性または耐性を評価するためのマーカーのセットを本明細書において提供する。例えば、マーカーのセットは、1つまたは複数、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、10個以上または全セットの分子を含むことができる。特定の実施形態では、分子は、発現が変化している核酸、発現および／もしくは活性が変化しているタンパク質をコードする核酸、または発現および／もしくは活性が変化しているタンパク質である。核酸および／またはタンパク質の発現レベルが変化している遺伝子として、これらに限定されないが、IL-1、PLGF、HGF、IL-6、LIF、S100A8、S100A9、PDGFC、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、VEGFR1およびVEGFR2が挙げられる。

30

【0154】

URVIPおよびDRVIPの調節物質、またはURVINAおよびDRVINAがコードするタンパク質の調節物質は、これらのタンパク質の活性を調節する分子、例えば、アゴニストおよびアンタゴニストである。用語「アゴニスト」を、本発明のタンパク質のペプチドおよび非ペプチド性類似体、ならびに本発明のそのようなタンパク質に特異的に結合する抗体を指すために使用するが、これらの抗体は、アゴニストシグナルを発生させる能力がある抗体に限るものとする。用語「アゴニスト」を、タンパク質の生物学的な役割に照らして定義する。用語「アンタゴニスト」を、本発明のタンパク質の生物学的活性を阻害する能力を有する分子を指すために使用する。アンタゴニストは、例えば、タンパク質の活性の阻害によって評価することができる。

40

【0155】

既知配列についてのデータベースエントリー、またはチップの製造元が提供する配列情報を使用すれば、配列を、当業者によく知られている技法を使用して、（発現する場合には）検出し、測定することができる。遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル／量を、これらに限定されないが、mRNA、cDNA、タンパク質、タンパク質断片および／または遺伝子のコピー数を含めた、当技術分野で知られている任意の適切な判断基準に基づいて決定することができる。

50

## 【0156】

試料中の種々の遺伝子またはバイオマーカーの発現を、いくつかの方法によって解析することができ、それらの方法は、その多くが当技術分野では知られており、当業者によって理解されており、これらに限定されないが、免疫組織化学的解析および/またはウエスタンブロット解析、免疫沈降、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFA、蛍光活性化細胞分取(FACS)等、(例えば、タンパク質の発現レベルを調べるための)定量的な血液に基づいたアッセイ(例えば、血清ELISA)、生化学的酵素活性アッセイ、*in situ*ハイブリダイゼーション、mRNAのノーザン解析および/またはPCR解析、ならびに遺伝子および/または組織のアレイ解析によって実施することができる多種多様なアッセイのうちいずれか1つが挙げられる。遺伝子および遺伝子産物の状況を評価するための典型的なプロトコルを、例えば、Ausubelら編、1995、*Current Protocols In Molecular Biology*、Units 2 (Northern Blotting)、4 (Southern Blotting)、15 (Immunoblotting)および18 (PCR Analysis)に見出すことができる。また、Rules Based MedicineまたはMeso Scale Discovery (MSD)から入手可能なもの等のマルチプレックス化したイムノアッセイも使用することができる。

10

## 【0157】

特定の実施形態では、試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量が、参照試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量よりも多い場合には、試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現/量が、参照試料中の発現/量と比較して増加している。同様に、試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量が、参照試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現レベル/量よりも少ない場合には、試料中の遺伝子またはバイオマーカーの発現/量が、参照試料中の発現/量と比較して減少している。

20

## 【0158】

特定の実施形態では、参照試料は、1つまたは複数の遺伝子(例えば、URVINA分子、DRVINA分子、RVIP分子および/またはDRVIP分子)を含み、それらの遺伝子について、比較パラメータ、例えば、VEGFアンタゴニストに対して感受性である腫瘍が知られている。

30

## 【0159】

特定の実施形態では、試料を、アッセイしたRNAまたはタンパク質の量の差および使用したRNA試料またはタンパク質試料の質の変動についても、アッセイの試行間の変動についても正規化する。そのような正規化を、GAPDHまたはアクチン等のよく知られているハウスキーピング遺伝子を含めた、特定の正規化する遺伝子の発現を測定し、組み込むことによって達成することができる。あるいは、正規化は、アッセイした遺伝子の全てまたはそれらの大型のサブセットのシグナルの平均または中央値に基づくこともできる(大域的正規化のアプローチ)。各遺伝子について、患者の腫瘍のmRNAまたはタンパク質の、測定し、正規化した量を、参照セット中に見出された量と比較する。各患者の試験した腫瘍ごとのそれぞれのmRNAまたはタンパク質について正規化した発現レベルを、参照セット中で測定した発現レベルのパーセントとして表すことができる。解析しようとする、特定の患者の試料中で測定した発現レベルが、この範囲内の何らかのパーセントを示すであろう。これは、当技術分野でよく知られている方法によって決定することができる。

40

## 【0160】

特定の実施形態では、遺伝子の相対的な発現レベルを、以下に従って決定する。

試料1中で決定したCtについては、遺伝子1<sub>試料1</sub>の相対的な発現 =  $2^{\text{exp}(\text{Ct}_{\text{ハウスキーピング遺伝子}} - \text{Ct}_{\text{遺伝子1}})}$

参照RNA中で決定したCtについては、遺伝子1<sub>参照RNA</sub>の相対的な発現 =  $2^{\text{exp}(\text{Ct}_{\text{ハウスキーピング遺伝子}} - \text{Ct}_{\text{遺伝子1}})}$

遺伝子1<sub>試料1</sub>の正規化した相対的な発現 = (遺伝子1<sub>試料1</sub>の相対的な発現 / 遺伝子1

50

参照RNAの相対的な発現)

【0161】

Ctは、閾値サイクルである。Ctは、反応内で発生した蛍光が閾値ラインと交差するサイクル数である。

【0162】

全ての実験を、種々の組織供給源に由来するRNAの包括的なミックスである参照RNA(例えば、参照RNA#636538、Clontech、Mountain View、CA製)に対して正規化する。同一の参照RNAを、各qRT-PCRの試行中に含めて、異なる実験試行間の結果の比較を可能にする。

【0163】

特定の実施形態では、試験試料中のURVINA分子を、そのmRNAの発現レベルが、参照試料と比べて、参照試料中の対応するURVINA分子のmRNAの発現レベルから約1.5倍以上増加している場合、mRNAの発現レベルが変化しているとみなすことができる。一実施形態では、mRNAの発現レベルの増加は約50%である。

【0164】

特定の実施形態では、試験試料中のDRVINA分子を、そのmRNAの発現レベルが、参照試料と比べて、参照試料中の対応するDRVINA分子の遺伝子の発現レベルから約20%以上減少している場合、mRNAの発現レベルが変化しているとみなすことができる。一実施形態では、mRNAの発現レベルの減少は約30%である。さらに別の実施形態では、mRNAの発現レベルの減少は約40%である。

【0165】

特定の実施形態では、試験試料中のURVIP分子を、そのタンパク質の発現レベルが、参照試料と比べて、参照試料中の対応するURVIP分子のタンパク質の発現レベルから約20%以上増加している場合、タンパク質の発現レベルが変化しているとみなすことができる。一実施形態では、タンパク質の発現レベルの増加は約30%である。さらに別の実施形態では、タンパク質の発現レベルの増加は約40%である。

【0166】

特定の実施形態では、試験試料中のDRVIP分子を、そのタンパク質の発現レベルが、参照試料と比べて、参照試料中の対応するURVIP分子のタンパク質の発現レベルから約25%以上減少している場合、タンパク質の発現レベルが変化しているとみなすことができる。一実施形態では、タンパク質の発現レベルの減少は約30%である。一実施形態では、タンパク質の発現レベルの減少は約40%である。一実施形態では、タンパク質の発現レベルの減少は約50%である。

【0167】

特定の実施形態では、参照試料は、生物学的試料、例えば、腫瘍細胞に可能な限り類似する組織型から得る。いくつかの実施形態では、参照試料は、生物学的試料と同じ対象、例えば、生物学的試料の起源の領域に近接する領域、または対象がVEGFアンタゴニスト治療に対して感受性であった時点から得る。本発明の一実施形態では、参照試料は、複数の生体試料から得る。例えば、参照試料は、それについて、腫瘍がVEGFアンタゴニストを用いた治療に対して感受性であったことが知られている以前に試験した試料からの発現パターンのデータベースであり得る。

【0168】

標的の遺伝子またはバイオマーカーを含む試料を、当技術分野でよく知られており、目的の癌の特定の型および場所に適している方法によって得ることができる。定義のセクションを参照されたい。例えば、癌性病変の試料を、切除、気管支鏡検査、細針による吸引もしくは気管支の刷毛による採取によってか、または痰、胸膜液もしくは血液から得ることができる。遺伝子または遺伝子産物を、癌もしくは腫瘍の組織、または尿、痰、血清もしくは血漿等のその他の生体試料から検出することができる。癌性試料中の標的の遺伝子または遺伝子産物の検出について上記で論じた同じ技法を、その他の生体試料に適用することができる。癌細胞が、癌病変から剥げ落ち、そのような生体試料中に出現する場合は

10

20

30

40

50

ある。そのような生体試料をスクリーニングすることによって、これらの癌について、簡便な早期診断を達成することができる。さらに、療法の進展を、そのような生体試料を標的の遺伝子または遺伝子産物について試験することによってより容易にモニターすることもできる。

【0169】

組織標本を癌細胞について濃縮する手段が、当技術分野では知られている。例えば、組織を、パラフィン切片またはクリオスタット切片から単離することができる。また、癌細胞を、正常細胞から、フローサイトメトリーまたはレーザーキャプチャー法によって分離することもできる。癌細胞を正常細胞から分離するためのこれらおよびその他の技法が、当技術分野ではよく知られている。癌組織に多くの正常細胞が混入している場合、サインの遺伝子またはタンパク質の発現プロファイルの検出はより困難になる恐れがあるが、混入および/または擬陽性/擬陰性の結果を最小限に留めるための技法が知られており、それらの技法のうちのいくつかを、本明細書において以下に記載する。また、例えば、目的の癌細胞とは関連があるが、対応する正常細胞とは関連がないこと、またはその逆のことが知られているバイオマーカーの存在について、試料を評価することもできる。

10

【0170】

特定の実施態様では、試料中のタンパク質の発現を免疫組織化学法(「IHC」)技及び染色プロトコルを用いて検査する。組織切片の免疫組織化学的染色は、試料中のタンパク質の存在を評価ないしは検出するための確実な方法であることが示されている。免疫組織化学法技術は、抗体を用いて、一般的には色素生産性方法又は蛍光性方法によって、インサイツで細胞性抗原を探索して視覚化する。

20

【0171】

前記組織試料は従来の方法によって固定(すなわち保存)されてもよい(例として、“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology,” 3<sup>rd</sup> edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照)。当分野の技術者は、組織学的染色ないしは他の分析に供する試料の目的に応じて固定液を選択することは理解するところであろう。また、当分野の技術者は、組織試料の大きさ及び用いる固定液に応じて固定の長さを決定することも理解するであろう。実施例では、中性緩衝ホルマリン、ブアン固定液又はパラホルムアルデヒドを用いて試料を固定してもよい。

30

【0172】

通常、まず試料を固定し、次いで段階的に増加させたアルコールによって、脱水し、パラフィン又は他の切片溶液に浸透させて包埋し、組織試料を切断できるようにする。別法として、組織を切断して、得られた切片を固定してもよい。例として、従来の方法によって、組織試料を包埋して、パラフィンで処理してもよい(例として、上掲の“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”を参照)。使用されうるパラフィンの例として、Paraplast、Broloid及びTissuemayがあるが、これらに限定するものではない。組織試料を包埋すると、試料をマイクローム等によって、切断してもよい(例として、上掲の“Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology”を参照)。この手順の例として、切片はおよそ3ミクロンからおよそ5ミクロンの範囲の厚さでよい。切断すると、いくつかの標準的な方法によって、切片をスライドに付着させてもよい。スライド接着剤の例として、シラン、ゼラチン、ポリ L リジンなどがあるが、これに限定されるものではない。例として、パラフィン包埋切片は、正に荷電したスライド及び/又はポリ L リジンでコートしたスライドに付着させてもよい。

40

【0173】

包埋材料としてパラフィンを用いた場合、組織切片は通常、脱パラフィン化して、水に

50

再水和させる。組織切片は、いくつかの従来の標準的な方法によって、脱パラフィン化してもよい。例えば、キシレン及び段階的に減少するアルコールを用いてもよい(例として、上掲の"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology"を参照)。別法として、H e m o - D e 7 (CMS, Houston, Texas)などの市販の脱パラフィン化非有機薬剤が用いられてもよい。

【 0 1 7 4 】

特定の実施形態では、試料の調整の後に、組織切片をIHCを用いて分析してもよい。IHCは、形態学的染色及び/又は蛍光発光インサイツハイブリダイゼーションなどの付加的な技術と組み合わせて行ってもよい。IHCの直接アッセイ及び間接アッセイの2つの一般的な方法が有用である。第一のアッセイでは、標的抗原(例えばG a l N a c - T 1 4)に対する抗体の結合は、直接的に測定される。この直接アッセイは、更なる抗体相互作用を必要とせず可視化されうる酵素標識一次抗体又は蛍光タグ付加一次抗体などの標識された試薬を用いる。代表的な間接アッセイでは、コンジュゲートしていない一次抗体が抗原と結合し、次いで標識された二次抗体が一次抗体と結合する。二次抗体が酵素標識にコンジュゲートする場合、抗原を視覚化させるために色素生産性基質ないしは蛍光発生基質が加えられる。二次抗体の中には一次抗体上の異なるエピトープと反応するものもあるので、シグナルの増幅が起こる。

一般的に、免疫組織化学に使用する一次及び/又は二次抗体は、検出可能な成分にて標識されるであろう。通常、以下の種類に分類できる多くの標識が利用可能である：

【 0 1 7 5 】

(a)ラジオアイソトープ、例えば<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H及び<sup>131</sup>I。抗体は例えばImmunology, Volumes 1 and 2, Coligen 等, 編集 Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて放射性同位体にて標識することができ、放射能はシンチレーション計測器を用いて測定することができる。

(b)コロイド金粒子

(c)希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、テキサスレッド、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコクリセリン(phycocrytherin)、フィコシアニン又はSPECTRUM ORANGE7及びSPECTRUM GREEN7などの市販の蛍光体及び/又は上記の何れか一ないしは複数の誘導体を含むが、これらに限定されるものではない蛍光標識。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光は、蛍光計を用いて定量化することができる。

(d)様々な酵素基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号にはこの概説がある。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学発光計測器を用いて)か、又はエネルギーを蛍光アクセプターに与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ;米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP O)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivanら., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:

10

20

30

40

50

147-166 (1981)に記載されている。

【 0 1 7 6 】

酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：

(i)基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(H R P O)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆体(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(O P D)又は3,3',5,5'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(T M B))を酸化する；

(ii)色素生産性基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(A P)；及び

(iii)色素生産性基質(例えばp-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質(例えば、4-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)-D-ガラクトシダーゼ)を有する-D-ガラクトシダーゼ(-D-G a l)。

10

【 0 1 7 7 】

多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第4,275,149号及び4,318,980を参照。標識は、抗体と間接的にコンジュゲートされることがある。これを行うための様々な技術は当分野の技術者に公知である。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな4つの分類のうちの何れかはアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、抗体と標識を間

20

【 0 1 7 8 】

上記の試料調製手順以外に、I H C 前、I H C の間又はI H C 後に組織切片の更なる処置が所望されてもよい。例えば、クエン酸塩バッファ中で組織サンプルを加熱するなどのエピトープ検索方法が実施されてもよい(例として、Leong 等 Appl. Immunohistochem. 4 (3): 201 (1996)を参照)。

【 0 1 7 9 】

場合によって行うブロック処置の後に、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原と結合するような好適な条件下と十分な時間、組織切片を一次抗体に曝露させる。これを達成するための好適な条件は慣例的な実験によって決定できる。試料に対する抗体の結合の範囲は、上記の検出可能な標識の何れか一つを用いて決定される。ある実施態様では、標識は、3,3'-ジアミノベンジジクロモゲンなどの色素生産性基質の化学変化を触媒する酵素標識(例えばH R P O)である。ある実施態様では、酵素標識は、一次抗体(例えば、一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である)に特異的に結合する抗体にコンジュゲートさせる。

30

【 0 1 8 0 】

したがって、調製される検査材料はマウントしてカバーガラスをかけてもよい。その後、例えば顕微鏡を使用してスライドの評価を行い、当分野で通常用いられる染色強度判定基準を用いてもよい。染色強度判定基準は以下の通りに評価してもよい：

40

表 1

染色パターン	スコア
細胞内で染色は観察されない	0
10%より多くの細胞内でかすかに／わずかに認識できる染色が検出される	1+
10%より多くの細胞内で弱い～中程度の染色が観察される	2+
10%より多くの細胞内で中程度～強い染色が観察される	3+

10

## 【0181】

ある実施態様では、1+又はそれ以上の染色パターンスコアは、兆候及び／又は前兆である。特定の実施態様では、IHCアッセイの2+又はそれ以上の染色パターンスコアは、兆候及び／又は前兆である。他の実施態様では腫瘍又は結腸腺腫由来の細胞及び／又は組織はIHCを使用して検査され、染色は、一般に（試料に存在しうる間質又は周辺組織を対照として）腫瘍細胞及び／又は組織で決定又は測定される。

## 【0182】

別法では、試料を、抗体-バイオマーカー複合体が形成するために十分な条件下で該バイオマーカーに特異的な抗体と接触させ、次いで該複合体を検出してもよい。バイオマーカーの存在は、多くの方法、血漿又は血清を含む多種多様な組織及び試料でアッセイするためのウエスタンブロッティング及びELISA手順によって、検出してもよい。このようなアッセイ様式を用いた広範囲にわたるイムノアッセイ技術は利用可能である。米国特許第4,016,043号、同第4,424,279号及び同第4,018,653号参照。これらには、単一の部位及び2-部位の両方、あるいは非競合型の「サンドイッチ」アッセイ、並びに従来の競合的結合アッセイが含まれる。また、これらのアッセイには、標的バイオマーカーに対する標識抗体の直接結合が含まれる。

20

## 【0183】

サンドイッチアッセイは最も有用なものの一つで、一般的に用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイ技術には多くのバリエーションあり、そのすべては本発明により包含されることを目的とする。簡潔には、代表的な最近のアッセイでは、非標識抗体を固体基板上に固定して、試験する試料を結合した分子に接触させる。抗体-抗原複合体が形成されるくらいの適当な期間インキュベートした後、検出可能なシグナルを産生できるレポーター分子で標識した、抗原特異的な第二抗体を添加して、更なる抗体-抗原-標識抗体の複合体が形成されるために十分な時間インキュベートする。反応しなかった材料を洗い流し、レポーター分子により産生されるシグナルを観察することによって抗原の存在を決定する。結果は、可視的なシグナルを単純に観察したものであれば質的なものであり、バイオマーカーを既知量含有するコントロール試料と比較したものであれば量的なものである。

30

## 【0184】

前記のアッセイへのバリエーションには、試料及び標識抗体の両方を結合した抗体に同時に添加する同時アッセイなどがある。これらの技術は当分野の技術者には公知であり、多少のバリエーションが加えられることは容易に明らかであろう。代表的な近年のサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーに対して特異性を有する第一抗体は固形表面に共有結合するか受動的に結合する。固形表面は一般的にガラス又はポリマーであり、最も一般的に用いられるポリマーはセルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル又はポリプロピレンである。固形支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートの皿、又はイムノアッセイを行うために適切な他の任意の表面の形態でもあってもよい。結合方法は従来技術において周知であり、一般に、架橋性共有結合又は物理的な吸着から成り、ポリマー-抗体複合体は試験試料の調整において洗浄される。次いで、試験される試料の分割量を固相複合体に添加し、抗体中に存在する任意のサブユニットが結

40

50

合するために十分な時間(例えば、より便利であるならば2~40分又は前夜)と適切な条件(例えば室温から40℃、例えば25℃から32℃の間)下でインキュベートする。インキュベーションの後、抗体サブユニット固相を洗浄して、乾燥させ、一部のバイオマーカーに特異的な二次抗体とともにインキュベートする。二次抗体は、分子マーカーへの二次抗体の結合を表すために用いられるレポーター分子に結合させる。

【0185】

別法では、試料中の標的バイオマーカーを固定して、その後レポーター分子にて標識しているか又は標識していない特異的抗体に固定された標的を曝すことを伴う。標的の量及びレポーター分子シグナルの強度に応じて、結合した標的は、抗体で直接標識することによって、検出可能でありうる。あるいは、一次抗体に特異的な二次標識抗体を標的-一次抗体複合体に曝して、標的-一次抗体-二次抗体の三位複合体を形成させる。複合体は、レポーター分子により発されるシグナルにより検出される。本明細書中で用いられる「レポーター分子」は、その化学的性質によって、抗原と結合した抗体を検出するための分析して同定可能となるシグナルを提供する分子を意味する。この種のアッセイにおいて、最も一般的に用いられるレポーター分子は、酵素、蛍光体又は分子を含有する放射性核種(すなわち放射性同位体)及び化学発光分子である。

10

【0186】

酵素イムノアッセイの場合、一般にグルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸塩によって、酵素を二次抗体にコンジュゲートさせる。しかしながら、容易に認識されるように、技術者に容易に利用可能である多種多様な異なるコンジュゲート技術が存在する。一般的に用いられる酵素には、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ-中でもガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼなどがある。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的に、対応する酵素による加水分解の際に生じる検出可能な色の変化で選択する。適切な酵素の例として、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどがある。また、上記の色素生産性基質よりも蛍光性産物を産生する蛍光性基質を用いることができる。すべての例において、酵素標識抗体を一次抗体-分子マーカー複合体に加えて、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。次いで、適当な基質を含有する溶液を抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は二次抗体と結合した酵素と反応して、通常は分光測定法による量的なものでもある定性的な可視化シグナルを生じ、試料中に存在するバイオマーカーの量を表す。あるいは、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光性化合物を、抗体の結合能を変化させることなく抗体に化学的に結合させてもよい。特定の波長の光を照射することにより活性化されると、蛍光色素標識抗体はその光エネルギーを吸収し、それによりその分子において励起状態が誘発され、続いて光学顕微鏡を用いて目視で検出可能な特徴的な色で光が放射される。EIAでは、蛍光標識抗体は、一次抗体-分子マーカー複合体に結合できる。結合していない試薬を洗い落とした後に、残りの三位複合体を適当な波長の光に曝すと、対象の分子マーカーの存在を示す蛍光発光が観察される。免疫蛍光法及びEIA技術は何れも、当分野で非常に確立されたものである。しかしながら、放射性同位体、化学発光性分子又は生物発光性分子などの他のレポーター分子も用いられてもよい。

20

30

【0187】

また、上記の技術が、1又は複数の標的遺伝子の発現を検出するために用いられうることも包含される。

40

【0188】

本発明の方法は、組織又は細胞試料中の1又は複数の標的遺伝子のmRNAの存在及び/又は発現を調べる手順を更に含む。細胞中のmRNAの評価方法は公知であり、例えば、相補的DNAプローブを用いたハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、S100A9、S100A9、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、VEGFR1、VEGFR2、PDGFC、IL-1、PLGF、HGF、IL-6及びLIFを含むがこれには限定されない、標識した1又は複数の標的遺伝子のリボプローブを用いたインサイツハイブリダイゼーション、ノーザンブロット及び関連した技術)及び様々な核酸増幅アッセイ(例えば、1又は複数の標的遺伝子に特異的な相補的プライマーを用いたRT-PC

50

R及び、他の増幅型の検査法、例えば枝分れDNA、SISBA、TMAなど)が含まれる。

【0189】

哺乳動物の組織又は細胞試料は、例えばノーザン、ドットプロット又はPCR分析を用いて、mRNAについて都合よくアッセイすることができる。例えば、定量的PCRアッセイなどのRT-PCRアッセイは公知技術である。本発明の例示的实施態様では、生体試料中の標的mRNAの検出方法は、少なくとも一のプライマーを用いて逆転写によって、試料からcDNAを生成し、標的cDNAを増幅するために、cDNAを増幅して、標的ポリヌクレオチドをセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いて産生し、そして、増幅された標的cDNAの存在を検出することを含む。加えて、このような方法は、生体試料中の標的mRNAのレベルを決定し得る一ないし複数の工程(例えば、アクチンファミリーメンバーなどの「ハウスキーピング」遺伝子の比較のコントロールmRNA配列と該レベルを同時に検討すること)を含んでもよい。場合によって、増幅された標的cDNAの配列を決定してもよい。

10

【0190】

本発明の任意の方法には、マイクロアレイ技術によって、組織又は細胞試料中のmRNA、例えば標的mRNAを調べるか又は検出する手順が含まれる。核酸マイクロアレイを用いて、試験及びコントロールの組織試料から得た試験及びコントロールのmRNA試料を逆転写させて、cDNAプローブを生成するために標識する。次いで、プローブを、固形支持体に固定した核酸のアレイにハイブリダイズさせる。アレイの配列及び各々のメンバーの位置がわかるように、アレイを設定する。例えば、その発現がVEGF非依存性腫瘍の検出と相関する遺伝子の選別を、固形支持体上に配列してもよい。特定のアレイメンバーと標識プローブとのハイブリダイゼーションは、プローブが由来する試料がその遺伝子を発現することを示す。疾患組織の差次的遺伝子発現分析は、貴重な情報を提供する。マイクロアレイ技術は、単一の実験で何千もの遺伝子のmRNA発現性質を評価するために、核酸ハイブリダイゼーション技術及び演算技術を利用する。(2001年10月11日公開の国際公開公報01/75166を参照、(例えば米国特許第5,700,637号、同第5,445,934号及び同第5,807,522号、Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996))、アレイ製作の考察のためにはCheung, V.G.等, Nature Genetics 21(Suppl): 15-19 (1999)を参照)。DNAマイクロアレイは、ガラス又は他の基質上で染色されるか直接合成される遺伝子断片を含有する微小なアレイである。何千もの遺伝子は、通常単一のアレイ上に現れる。代表的なマイクロアレイ実験は以下の工程を伴う：1) 試料から単離したRNAからの蛍光性標識標的の調製、2) マイクロアレイへの標識した標的のハイブリダイゼーション、3) 洗浄、染色及びアレイのスキャニング、4) 走査画像の分析、そして5) 遺伝子発現性質の生成。一般に、DNAマイクロアレイには2つの主要な種類、cDNAから調製されたPCR産物を含有する遺伝子発現アレイ及びオリゴヌクレオチドアレイ(通常25~70mer)が用いられる。アレイを形成する際に、オリゴヌクレオチドは、事前に作製して表面にスポットしても、(インサイツで)表面上で直接合成してもよい。

20

30

【0191】

Affymetrix GeneChip(登録商標)システムは、ガラス表面上でオリゴヌクレオチドを直接合成することにより製造されるアレイを含んでなる市販のマイクロアレイシステムである。プローブ/遺伝子アレイ：オリゴヌクレオチド(通常25mer)は、半導体ベースのフォトリソグラフィと固相化学合成技術との組合せによって、ガラスウェーハ上へ直接合成される。各々のアレイは最高400,000の異なるオリゴを含有し、各々のオリゴは何百万ものコピーで存在する。オリゴヌクレオチドプローブがアレイ上の既知の位置で合成されるので、ハイブリダイゼーションのパターン及びシグナル強度は、Affymetrix Microarray Suiteソフトウェアによる遺伝子同一性と相対的な発現レベルに置き換えて解釈できる。各々の遺伝子は、一連の異なるオリゴヌクレオチドプローブによって、アレイ上に表される。各々のプローブ対は、完

40

50

全一致のオリゴヌクレオチドと、不一致のオリゴヌクレオチドからなる。完全一致プローブは、特定の遺伝子に対して完全に相補的な配列を有するため、遺伝子の発現を測定する。不一致プローブは、中心塩基位置での単一塩基置換によって、完全一致プローブとは異なり、標的遺伝子転写物の結合を妨げる。これによって、完全一致オリゴを決定するシグナルの一因となるバックグラウンド及び非特異的ハイブリダイゼーションを決定できる。Microarray Suiteソフトウェアは、完全一致プローブのハイブリダイゼーション強度から不完全一致プローブのハイブリダイゼーション強度を減算して、それぞれのプローブセットの絶対値又は特異的強度の値を決定する。プローブは、Genbank及び他のヌクレオチド貯蔵所の当時の情報に基づいて選択される。この配列は遺伝子の3'末端の特定の領域を認識すると思われる。GeneChipハイブリダイゼーションオープン(「回転式(rotisserie)」オープン)を用いて、一度に最高64アレイのハイブリダイゼーションを行う。fluidics stationでは、プローブアレイの洗浄と染色が行われる。これは完全に自動化しており、4つのモジュールを含有しており、その各々のモジュールが一つのプローブアレイを保持している。各々のモジュールは、事前にプログラム化されたfluidicsプロトコルを用いたMicroarray Suiteソフトウェアにより個々に制御される。スキャナは、プローブアレイ結合した標識cRNAにより発される蛍光強度を測定する共焦点レーザー蛍光発光スキャナである。Microarray Suiteソフトウェアを有するコンピュータワークステーションがfluidics stationとスキャナを制御する。Microarray Suiteソフトウェアは、プローブアレイについて事前にプログラム化したハイブリダイゼーション、洗浄及び染色プロトコルを用いてfluidics stationを8つまで制御できる。また、ソフトウェアは、ハイブリダイゼーション強度データを得て、適切なアルゴリズムを使用して各々の遺伝子の存在/非存在情報に変換する。最後に、ソフトウェアは、比較分析によって、遺伝子発現における実験間の変化を検出して、テキストファイルに出力する。このファイルは更なるデータ分析のために他のソフトウェアプログラムに用いることができる。

10

20

#### 【0192】

また、組織又は細胞試料中の選択された遺伝子又はバイオマーカーの発現は、機能的なアッセイ又は活性に基づくアッセイにより検査されてもよい。例えば、バイオマーカーが酵素ならば、組織又は細胞試料中の所定の酵素活性の存在を決定又は検出するために公知技術のアッセイを行ってもよい。

30

#### 【0193】

治療上の使用

本発明に従って、調節物質、例えば、URVIPのアンタゴニストおよび/またはURVINAがコードするタンパク質のアンタゴニスト(集散的に「本発明のアンタゴニスト」)を、VEGF非依存性腫瘍の癌細胞または腫瘍の成長を阻害する場合に使用することを企図する。本発明の特定の実施形態では、調節物質、例えば、DRVIPのアゴニストおよび/またはDRVINAがコードするタンパク質のアゴニスト(集散的に「本発明のアゴニスト」)を使用して、VEGF非依存性腫瘍の癌細胞または腫瘍の成長を阻害する。また、本発明に従って、本発明のアンタゴニストを使用して、腫瘍の転移を阻害することができることも企図する。特定の実施形態では、1つまたは複数の調節物質を使用して、種々の新生物または非新生物の状態を治療することができる。特定の実施形態では、VEGFアンタゴニストを、本発明のアンタゴニストおよび/または本発明のアゴニストと共に投与して、VEGF非依存性腫瘍の癌細胞または腫瘍の成長を阻害することができる。また、本明細書の併用療法と題するセクションも参照されたい。別の実施形態では、VEGFアンタゴニストと組み合わせた1つまたは複数の抗癌剤を、本発明のアンタゴニストおよび/または本発明のアゴニストと共に投与して、VEGF非依存性腫瘍の癌細胞または腫瘍の成長を阻害することができる。

40

#### 【0194】

特定の実施形態では、本発明のアンタゴニストは、c-Metアンタゴニストである。

50

特定の実施形態では、本発明の方法において有用な c - M e t アントゴニストは、c - M e t に特異的に結合するポリペプチド、抗 c - M e t 抗体、c - M e t の小型分子、c - M e t に特異的に結合する受容体分子および誘導体、ならびに融合タンパク質を含む。また、c - M e t アントゴニストは、c - M e t ポリペプチドのアントゴニスト作用を有する変異体、c - M e t および H G F に対する R N A アプタマーおよびペプチボディ ( p e p t i b o d y ) も含む。また、本発明の方法において有用な c - M e t アントゴニストとして、抗 H G F 抗体、抗 H G F ポリペプチド、H G F に特異的に結合する c - M e t の受容体分子および誘導体も含む。これらのそれぞれの例を、以下に記載する。

**【 0 1 9 5 】**

本発明の方法において有用である抗 c - M e t 抗体は、c - M e t に十分な親和性および特異性で結合し、c - M e t の活性を低下させるまたは阻害することができる任意の抗体を含む。選択された抗体は通常、c - M e t に対して十分に強力な結合親和性を有する。例えば、抗体は、ヒト c - M e t に、1 0 0 n M ~ 1 p M の間の K d 値で結合することができる。例えば、表面プラズモン共鳴に基づいたアッセイ ( P C T 出願公開第 W O 2 0 0 5 / 0 1 2 3 5 9 号に記載されている B I A c o r e アッセイ等 ) ; 酵素結合免疫吸着定量法 ( E L I S A ) ; および競合アッセイ ( 例えば、R I A ) によって、抗体の親和性を決定することができる。一実施形態では、本発明の抗 c - M e t 抗体は、V E G F 非依存性腫瘍の治療を含めて、c - M e t / H G F 活性が関与する疾患または状態を標的とし、それを妨げる場合の治療剤として使用することができる。また、抗体に対して、その他の生物学的活性アッセイ、例えば、治療剤としてのその有効性を評価するためのアッセイを行うこともできる。そのようなアッセイが、当技術分野では知られており、それらのアッセイは、抗体の標的抗原および意図する用途によって異なる。

**【 0 1 9 6 】**

抗 c - M e t 抗体が、当技術分野で知られている ( 例えば、M a r t e n s , T r a ( 2 0 0 6 ) C l i n C a n c e r R e s 1 2 ( 2 0 P t 1 ) : 6 1 4 4 ; U S 6 , 4 6 8 , 5 2 9 ; W O 2 0 0 6 / 0 1 5 3 7 1 ; W O 2 0 0 7 / 0 6 3 8 1 6 を参照されたい ) 。

**【 0 1 9 7 】**

他の実施形態では、抗 c - M e t 抗体は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n 受託番号 A T C C H B - 1 1 8 9 4 ( ハイブリドーマ 1 A 3 . 3 . 1 3 ) または H B - 1 1 8 9 5 ( ハイブリドーマ 5 D 5 . 1 1 . 6 ) の下に寄託されているハイブリドーマ細胞系が産生するモノクローナル抗体である。他の実施形態では、抗体は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n 受託番号 A T C C H B - 1 1 8 9 4 ( ハイブリドーマ 1 A 3 . 3 . 1 3 ) または H B - 1 1 8 9 5 ( ハイブリドーマ 5 D 5 . 1 1 . 6 ) の下に寄託されているハイブリドーマ細胞系が産生するモノクローナル抗体の C D R 配列のうちの 1 つまたは複数を含む。

**【 0 1 9 8 】**

他の実施形態では、本発明の c - M e t 抗体は、c - M e t S e m a ドメインまたはその変異体の少なくとも一部に特異的に結合する。一実施形態では、本発明のアントゴニスト抗体は、L D A Q T ( 例えば、c - M e t 、配列番号 2 4 の残基 2 6 9 ~ 2 7 3 ) 、L T E K R K K R S ( 例えば、c - M e t 、配列番号 2 4 の残基 3 0 0 ~ 3 0 8 ) 、K P D S A E P M ( 例えば、c - M e t 、配列番号 2 4 の残基 3 5 0 ~ 3 5 7 ) 、および N V R C L Q H F ( 例えば、c - M e t 、配列番号 2 4 の残基 3 8 1 ~ 3 8 8 ) からなる群から選択される配列のうちの少なくとも 1 つの一部または全部によって形成される立体構造エピトープに特異的に結合する。一実施形態では、本発明のアントゴニスト抗体は、配列 L D A Q T 、L T E K R K K R S 、K P D S A E P M および / または N V R C L Q H F に対して少なくとも 5 0 % 、6 0 % 、7 0 % 、8 0 % 、9 0 % 、9 5 % 、9 8 % の配列同一性または配列類似性を有するアミノ酸配列に特異的に結合する。

**【 0 1 9 9 】**

抗 H G F 抗体が、当技術分野ではよく知られている。例えば、K i m K J r a C l i

10

20

30

40

50

n Cancer Res. (2006) 12(4): 1292~8; WO2007/115049を参照されたい。

【0200】

C-Met受容体分子またはHGFに特異的に結合するその断片を、本発明の方法において使用して、例えば、HGFタンパク質に結合させ、それを捕捉し、それによって、HGFがシグナル伝達するのを阻止することができる。特定の実施形態では、c-Met受容体分子またはそのHGF結合断片は、可溶性の形態をとる。いくつかの実施形態では、受容体の可溶性の形態は、HGFに結合し、それによって、HGFが標的細胞の表面上に存在するその自然の受容体に結合するのを阻止することによって、c-Metタンパク質の生物学的活性に対して阻害作用を発揮する。また、c-Met受容体融合タンパク質も含まれ、それらの例を以下に記載する。

10

【0201】

本発明の可溶性のc-Met受容体タンパク質またはキメラc-Met受容体タンパク質は、細胞表面に膜貫通ドメインを介して固定されていないc-Met受容体タンパク質を含む。したがって、キメラ受容体タンパク質を含めた、c-Met受容体の可溶性の形態は、HGFに結合し、それを不活性化することができる一方で、膜貫通ドメインを含まず、したがって、一般に、c-Met分子を発現する細胞の細胞膜と関わりになることがない。例えば、Kong-Beltran、Mら、Cancer Cell (2004) 6(1): 75~84を参照されたい。

【0202】

c-Metに特異的に結合し、c-Metの活性化を遮断するかまたは低下させ、それによって、c-Metがシグナル伝達するのを阻止するHGF分子またはその断片を、本発明の方法において使用することができる。

20

【0203】

アプタマーは、HGFポリペプチド等の標的分子に特異的に結合する三次構造を形成する核酸分子である。アプタマーの生成および治療上の使用は、当技術分野では十分に確立されている。例えば、米国特許第5,475,096号を参照されたい。HGFアプタマーは、ペグ化された改変オリゴヌクレオチドであり、これは、このオリゴヌクレオチドが細胞外HGFに結合するのを可能にする三次元立体構造をとる。アプタマーに関する追加の情報を、米国特許出願公開第20060148748号に見出すことができる。

30

【0204】

ペプチボディは、免疫グロブリン分子の断片または一部をコードするアミノ酸配列に連結するペプチド配列である。これに限定されないが、ファージディスプレイ技術を含めた、特異的な結合について、任意の方法によって選択されたランダムな配列から、ポリペプチドを得ることができる。特定の実施形態では、選択されたポリペプチドを、免疫グロブリンのFc部分をコードするアミノ酸配列に連結することができる。また、HGFまたはc-Metに特異的に結合および拮抗するペプチボディも、本発明の方法において有用である。

【0205】

C-Metアンタゴニストは、小型分子、例として、c-Met阻害剤として記載され、(US5,792,783; US5,834,504; US5,880,141; US6,297,238; US6,599,902; US6,790,852; US2003/0125370; US2004/0242603; US2004/0198750; US2004/0110758; US2005/0009845; US2005/0009840; US2005/0245547; US2005/0148574; US2005/0101650; US2005/0075340; US2006/0009453; US2006/0009493; WO98/007695; WO2003/000660; WO2003/087026; WO2003/097641; WO2004/076412; WO2005/004808; WO2005/121125; WO2005/030140; WO2005/070891; WO2005/080393; WO2006/0

40

50

14325 ; WO2006/021886 ; WO2006/021881、WO2007/103308に)報告されている化合物を含む。PHA-665752は、小型分子であり、ATPと競合する、c-Metの触媒活性の活性部位阻害剤であり、細胞の成長、細胞の運動性、浸潤等の表現型、および多様な腫瘍細胞の形態を阻害する(Maら(2005)Clin. Cancer Res. 11:2312~2319 ; Christensenら(2003)Cancer Res. 63:7345~7355)。

#### 【0206】

##### 併用療法

上記のように、本発明は、VEGFアンタゴニストが他の療法と組み合わせられて投与される併用療法を提供する。例えば、ある実施態様において、VEGFアンタゴニストは、VEGFアンタゴニスト治療に耐性がある腫瘍のようなVEGF非依存性腫瘍を治療するために本発明のアンタゴニスト又は異なる薬剤(及び/又は本発明のアゴニスト)と組み合わせられて投与される。ある実施態様では、付加的な薬剤、例えば抗癌剤ないし療法、抗血管新生剤、又は抗血管形成剤が、様々な腫瘍性又は非腫瘍性の症状を治療するために、VEGFアンタゴニスト及び異なるアンタゴニストと組み合わせられて投与される。一実施態様では、腫瘍性又は非腫瘍性の症状は、VEGFアンタゴニスト治療に耐性がある異常ないしは望ましくない血管形成に関連する病的状態に特徴がある。本発明のアンタゴニストは、同じ組成物中で又は別々の組成物として、これらの目的のために有効である他の薬剤と組み合わせ、又は連続的に、同じないしは異なる投与経路を使用して、投与される。あるいは又はさらに、本発明の複数のアンタゴニスト、薬剤及び/又はアゴニストが投与される。

10

20

#### 【0207】

ある実施態様では、2以上の組成物の投与の間には数分から数日、数週から数か月の範囲の間隔がありうる。例えば、VEGFアンタゴニストがまず投与され、その後本発明の異なるアンタゴニストないしは薬剤が投与されてもよい。しかしながら、同時投与又は本発明の異なるアンタゴニストないしは薬剤の第一投与も考慮される。

#### 【0208】

VEGFアンタゴニストと組み合わせられて投与される治療薬の有効量は医師又は獣医の裁量である。治療される症状を最大限管理するために用量投与及び調整がなされる。用量は、さらに、使用される治療薬の種類及び治療される特定の患者などの因子に依存するであろう。VEGFアンタゴニストの好適な用量は現在用いられているものであり、VEGFアンタゴニスト及び本発明の異なるアンタゴニストの組合せ作用(相乗作用)のために低くてもよい。ある実施態様では、阻害薬の組合せは単一の阻害薬の有効性を増強する。「増強」なる用語は、その一般的又は認可された用量での治療薬の有効性の改善を指す。本明細書中の「製薬的組成物」と題した項目も参照されたい。

30

#### 【0209】

癌との関連の抗血管新生療法は、腫瘍増殖を支える栄養分の供給に必要な腫瘍血管の発達を阻害することを目的とした癌治療方略である。ある実施態様において、血管新生が原発性腫瘍増殖と転移の療法に伴うので、本発明によって提供される抗血管新生療法は、原発部位での腫瘍の新生物性増殖の阻害と二次部位での腫瘍の転移の予防が可能であり、ゆえに他の療法によって腫瘍の攻撃がなされる。本発明の一実施態様では、抗癌剤又は膠癌療法は抗血管新生剤である。他の実施態様では、抗癌剤は化学療法剤である。

40

#### 【0210】

多くの抗血管新生剤が同定されており、当分野で公知であり、本明細書中に挙げるもの、例えば定義の項目に挙げるもの、例えばCarmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000) ; Ferrara等, Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004) ; 及びSato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)に挙げるものなどがある。また、米国特許公開第20030055006号を参照。ある実施態様では、本発明のアンタゴニストは、抗VEGF中和抗体(又は断片)及び/又は他のVEGFアンタゴニストないしはVEGFレセプターアンタゴニスト、例として、限定するものではないが、例えば、可溶性VEGFレセプ

50

ター(例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ニューロピリン(例えば、NRP1、NRP2))断片、VEGFないしはVEGFRを遮断することができるアプタマー、中和抗VEGFR抗体、VEGFRチロシンキナーゼ(RTK)の低分子量インヒビター、VEGFのアンチセンス方略、VEGFないしはVEGFレセプターに対するリボザイム、VEGFのアンタゴニスト変異体、及びこれらのいずれかの組み合わせと組み合わせられて用いられる。あるいは又はさらに、2つ以上の血管新生インヒビターは、場合によってVEGFアンタゴニストと本発明の他の薬剤に加えて患者に同時に投与されてもよい。ある実施態様では、一又は複数の更なる治療薬、例えば抗癌剤は、本発明の薬剤、VEGFアンタゴニスト及び/又は抗血管新生剤と組み合わせられて投与されてもよい。

#### 【0211】

本発明のある態様では、本発明のアンタゴニストによる併用腫瘍療法に有用な他の治療剤には、他の癌療法(例えば、外科的治療、放射線処置(例えば、放射活性物質の照射又は投与を伴う)、化学療法、本明細書中に挙げる抗癌剤及び当分野で公知の抗癌剤、又はこれらの組み合わせ)が含まれる。あるいは又はさらに、本明細書中に開示した同じ又は2以上の異なる抗原を結合する2以上の抗体が患者に同時に投与されてもよい。また、患者に一又は複数のサイトカインを投与することが有益であることもある。

#### 【0212】

##### 化学療法剤

ある態様では、本発明は、有効量のVEGFのアンタゴニスト及び本発明のアンタゴニストと一又は複数の化学療法剤を、癌に罹りやすい患者又は癌と診断された患者に投与することによって、VEGF非依存性腫瘍増殖又は癌細胞の増殖を遮断する又は低減する方法を提供する。様々な化学療法剤が本発明の併用治療方法で用いられてもよい。考慮する化学療法剤の例示的及び非限定的リストを本明細書中の「定義」の項目に示す。

#### 【0213】

当業者によって理解されるように、化学療法剤の適切な用量は、一般的に、化学療法剤が単独ないしは他の化学療法剤と組み合わせられて投与される臨床治療に既に用いられる用量の程度であろう。用量の変更はおそらく治療する症状に応じて行うであろう。治療を行う医師は、個々の被検体ごとに適当な用量を決定することが可能であろう。

#### 【0214】

##### 再発性腫瘍増殖

また、本発明は、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を阻害するか又は予防するための方法及び組成物を提供する。再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖は、一又は複数の現在利用可能な治療法(例えば、癌治療、例として化学療法、放射線療法、外科治療、ホルモン療法及び/又は生物学的療法/免疫療法、抗VEGF抗体療法、特に特定の癌のための標準的な治療投薬計画)を施されている患者ないしはこれらによって治療された患者が臨床的に治療に不十分であるか、又は患者がこのような治療からもはやいかなる有用な効果を得ておらず更なる有効な治療を求める場合の症状を表すために用いられる。本明細書中で用いるように、この表現も「非応答性/再発性の」患者の症状を指すものであり、例えば、副作用に苦しむ治療に応答する患者、耐性を生じる患者、治療に応答しない患者、治療に満足に応答しない患者などを表す。様々な実施態様では、癌は、癌細胞の数が有意に低減しなかった、又は増加した、又は腫瘍の大きさが有意に減少しなかった、又は大きくなった、又は癌細胞のサイズないしは数に何らかの減少が生じなかった、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖である。癌細胞が再発性腫瘍増殖であるか再発性癌細胞増殖であるかの決定は、文脈上で「再発」又は「難治性」又は「非応答性」の当分野で容認される意味を用いて、癌細胞に対する治療の有効性をアッセイするための当分野で公知の任意の方法によってインピットロないしはインピボでなされる。抗VEGF治療に耐性のあるVEGF非依存性腫瘍は再発性腫瘍増殖の一例である。

#### 【0215】

本発明は、一又は複数の本発明のアンタゴニストを投与して、被検体の再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を遮断又は低減することによって、被検体の再発性腫瘍増殖又は再

10

20

30

40

50

発性癌細胞増殖を遮断又は低減する方法を提供する。ある実施態様では、アンタゴニストは癌治療剤に続いて投与されてもよい。ある実施態様では、本発明のアンタゴニストは癌療法、例えば化学療法と同時に投与される。あるいは又はさらに、アンタゴニスト療法は他の癌療法と交互に行い、いずれの順序でも実施可能である。また、本発明は、癌を有する傾向にある患者の癌の発症や再発を予防するために一又は複数の阻害性抗体を投与するための方法も包含する。通常、被検体は、癌療法を施されたか同時に施されている。一実施態様では、癌療法は、抗血管新生剤、例えばVEGFアンタゴニストによる治療である。抗血管新生剤は当分野で公知のものや本明細書中の定義の項目に見られるものなどがある。一実施態様では、抗血管新生剤は、抗VEGF中和抗体ないしは断片(例えば、ヒト化A4.6.1、アバスチン(登録商標)(Genentech, South San Francisco, CA)、Y0317、M4、G6、B20、2C3など)である。例として、米国特許第6582959号、同第6884879号、同第6703020号、国際公開第98/45332号、同第96/30046号、同第94/10202号、欧州特許第0666868号B1、米国公開特許第20030206899号、同第20030190317号、同第20030203409号、同第20050112126号、Popkov等, Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)、及び国際公開第2005012359号を参照。更なる薬剤は、再発性腫瘍増殖又は再発性癌細胞増殖を遮断又は低減するために、VEGFアンタゴニスト及び本発明のアンタゴニスト/アゴニストと組み合わせる投与することができる。例として本明細書中の「併用療法」と題する項目を参照のこと。

10

## 【0216】

20

一実施態様では、本発明のアンタゴニスト、又はURVIP又はURVINAにコードされるタンパク質の発現を減らす他の療法が投与され、ある生物学的(例えば、抗VEGF抗体であるアンタゴニスト)、ホルモン、放射線及び化学療法剤に対する癌細胞の耐性又は感受性の低下を逆転させ、それによって癌細胞を、癌を治療ないしは管理する、例えば転移を予防するために投与されうる一又は複数のこれら薬剤に再感作させる。

## 【0217】

## 抗体

特定の実施態様において、本発明の抗体には、本発明のタンパク質の抗体、及び本発明のタンパク質の抗体の抗体断片が含まれる。本発明のポリペプチド又はタンパク質には、限定するものではないが、VEGF、IL-1、PLGF、HGF、IL-6、LIF、S100A8、S100A9及びURVINA及びDRVINAにコードされるタンパク質が含まれる。ある実施態様において、本発明のタンパク質はVEGF非依存性腫瘍に由来し、例えばIL-1、PLGF、HGF、S100A8、S100A9、IL-6及びLIFを含む。

30

## 【0218】

ある態様では、本発明のポリペプチドないしタンパク質は、VEGF、IL-1、PLGF、HGF、S100A8、S100A9、IL-6、LIF又はc-Metを含む。ある実施態様において、本発明の抗体はURVIP及びDRVIPの抗体、及びURVINA又はDRVINAにコードされるタンパク質の抗体を含む。

40

## 【0219】

さらに、本発明の抗体には、抗血管形成剤又は血管形成インヒビターである抗体、抗癌剤である抗体又は本明細書中に記載の他の抗体が含まれる。例示的な抗体には、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、断片、多特異性、ヘテロコンジュゲート、多価性、エフェクト機能などの抗体が含まれる。

## 【0220】

## ポリクローナル抗体

本発明の抗体はポリクローナル抗体を含みうる。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に公知である。例えば本発明の抗体に対するポリクローナル抗体は、関連する抗原とアジュバントを一又は複数回皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生される。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホー

50

ルリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介する抱合)、N-ヒドロキスクシンイミド(リジン残基を介する抱合)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、 $\text{SOCl}_2$ 、又はR及びR<sup>1</sup>が異なるアルキル基であるR<sup>1</sup>N=C=N Rへ、関連する抗原をコンジュゲートさせるために有用である。

#### 【0221】

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 $\mu\text{g}$ 又は5 $\mu\text{g}$ (それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、本発明の分子、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。典型的には、動物を、同じ抗原であるが異なるタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なる架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートにより追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

10

#### 【0222】

モノクローナル抗体

本明細書中に記載の抗原に対するモノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495(1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作成することができる。

20

#### 【0223】

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスター又はマカクザルを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生する、又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次いで、リンパ球をポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いて骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

30

#### 【0224】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髄腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を典型的には含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

#### 【0225】

典型的な骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、HAT培地などの培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髄腫株化細胞は、マウス骨髄腫ライン、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックビル、メリーランド、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髄腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁、(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

40

50

## 【0226】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、例えばIL-1、PLGF、HGF、PDGFC、IL-6、LIF、S100A8、S100A9、c-Met、URVIP又はDRVIP、又は血管新生分子に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。このような技術及びアッセイは当分野で公知である。

## 【0227】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって測定することができる。

10

所望の特異性、親和性、及び/又は活性な抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

## 【0228】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的なイムノグロブリン精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。また、モノクローナル抗体は、米国特許第4816567号に記載のもののような組み換えDNA法によって作製されうる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、常法を用いて(例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外ではイムノグロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体の組み換え産生を以下に詳細に記載する。

20

30

## 【0229】

他の実施態様では、抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marks等, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

40

## 【0230】

また、DNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン(C<sub>H</sub>及びC<sub>L</sub>)のコード配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第4816567号; Morrison等, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾することができる。

## 【0231】

典型的には、前記の非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の変域ドメインが置換されて、抗原に

50

対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0232】

ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗体はヒト化抗体又はヒト抗体を含みうる。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的にウィンター(Winter)及び共同研究者 [ Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, *Science*, 239:1534-1536 (1988) ] の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

10

【0233】

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク(FR)として受け入れる(Sims等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

20

【0234】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、典型的な方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

30

【0235】

あるいは、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域( $J_H$ )遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生がおこる。Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggeman等, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 及びDuchosal等 *Nature* 355:258 (1992)を参照されたい。また、ヒト抗体はファージディスプレイライブラリからも得られる(Hoogenboom等, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan等 *Nature Biotech* 14:309 (1996))。

40

【0236】

50

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む当分野で公知の様々な技術を用いて産生することができる(Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、フレーム単位で、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択に基づいても、結果としてこれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択が成される。よって、このファージはB細胞のいくつかの特性を模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)を参照せよ。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。例えば、Clackson等, *Nature*, 352:624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、例えばMarks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991)、又はGriffith等, *EMBO J.* 12:725-734(1993)に記載の技術に基本的に従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。また、Cole等及びBoerner等の技術はヒトモノクローナル抗体の調製に有用である(Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner等, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991))。また、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により産生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

#### 【0237】

##### 抗体断片

また、抗体断片も本発明に包含される。抗体断片を産生するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、無傷の抗体のタンパク分解性消化によって誘導された(例えば、Morimoto等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennan等, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接産生することができる。例えば、抗体断片は、上で論じた抗体ファージライブラリから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合させてF(ab')<sub>2</sub>断片を形成することができる(Carter等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチでは、F(ab')<sub>2</sub>断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片を生成するための他の方法は、当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択する抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。国際公開93/16185号; 米国特許第5571894号; 及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びscFvは、定常領域を欠く無傷の連結部位を有する唯一の種である; 従って、インビボで使用している間の減少した非特異的結合に適している。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ又はカルボキシ末端のどちらかで、エフェクタータンパク質の融合体が生成されるように構成されてもよい。上掲のAntibody Engineering, Borrebaeck編を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。そのような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。

#### 【0238】

##### 多重特異性抗体(例えば二重特異性)

また、本発明の抗体には、例えば、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する多重特異性抗体が含まれる。このような分子は通常2つの抗原を結合するだけであるが(すなわち二重特異性抗体、BsAb)、本明細書中で用いられる場合には三重特異性抗体などの更なる特異性を有する抗体がこの表現に包含される。BsAbの例には、腫瘍細胞抗原に対する一アームと細胞障害トリガー分子に対するもう一つのアームを有するもの、例えば抗FcRI/抗CD15、抗p185<sup>HER2</sup>/FcRIII(CD16)

、抗CD3 / 抗悪性B細胞(1D10)、抗CD3 / 抗p185<sup>HER2</sup>、抗CD3 / 抗p97、抗CD3 / 抗腎臓細胞カルチノーマ、抗CD3 / 抗OVCA R-3、抗CD3 / L-D1(抗大腸カルチノーマ)、抗CD3 / 抗メラニン細胞刺激ホルモン類似体、抗EGFレセプター / 抗CD3、抗CD3 / 抗CAMA1、抗CD3 / 抗CD19、抗CD3 / MoV18、抗神経細胞付着分子(NCAM) / 抗CD3、抗葉酸剤結合タンパク質(FBP) / 抗CD3、抗パンカルチノーマ結合抗原(AMOC-31) / 抗CD3；腫瘍抗原に特異的に結合する一アームと毒素に結合する一アームを有するBsAb、例として抗サポリン / 抗Id-1、抗CD22 / 抗サポリン、抗CD7 / 抗サポリン、抗CD38 / 抗サポリン、抗CEA / 抗リシンA鎖、抗インターフェロン-(IFN-) / 抗ハイブリドーマイディオタイプ、抗CEA / 抗ピンカルカロイド；酵素活性化プロドラッグを転換するためのBsAb、例として抗CD30 / 抗アルカリホスファターゼ(マイトマイシンアルコールへのマイトマイシンリン酸塩プロドラッグの変換を触媒する)；線維素溶解剤として用いられるBsAb、例として抗フィブリン / 抗組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、抗フィブリン / 抗ウロキナーゼタイププラスミノゲン活性化因子(uPA)；細胞表面レセプターに免疫複合体をターゲティングするためのBsAb、例として抗低密度リポタンパク質(LDL) / 抗Fcレセプター(例えばFcRI、FcRII又はFcRIII)；感染症の治療に用いるためのBsAb、例として、抗CD3 / 抗単純ヘルペスウイルス(HSV)、抗T細胞レセプター：CD3複合体 / 抗インフルエンザ、抗FcR / 抗HIV；インビトロ又はインビボで腫瘍を検出するためのBsAb、例えば抗CEA / 抗EOTUBE、抗CEA / 抗DPTA、抗p185HER2 / 抗ハプテン；ワクチンのアジュバントとしてのBsAb；そして、診断用ツールとしてのBsAb、例として抗ウサギIgG / 抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP) / 抗ホルモン、抗ソマトスタチン / 抗物質P、抗HRP / 抗FITC、抗CEA / 抗 $\alpha$ -ガラクトシダーゼが含まれる。三重特異性抗体の例には、抗CD3 / 抗CD4 / 抗CD37、抗CD3 / 抗CD5 / 抗CD37及び抗CD3 / 抗CD8 / 抗CD37が含まれる。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えばF(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)として調製されてもよい。

#### 【0239】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。完全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millstein等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公開第93/08829号及びTrauneker等, EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

#### 【0240】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、CH2及びCH3領域を含むイムノグロブリン重鎖定常ドメインである。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される3つのポリペプチド鎖の等しくない比率が抗体の最適な収率をもたらす態様において、3つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな(フレキシビリティ)が与えられる。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率があまり影響がないときは、2又は3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

#### 【0241】

この手法の一実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアー

10

20

30

40

50

ムハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

#### 【0242】

国際公開第96/27011号に記載された他の手法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができ、好適な界面は抗体の定常ドメインのC<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

#### 【0243】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)は無傷の抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')<sub>2</sub>断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤、亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再変換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

#### 【0244】

最近の進歩により、大腸菌からのF a b'-S H断片の直接の回収が容易になり、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')<sub>2</sub>分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒトT細胞、及びE r b B 2レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。

#### 【0245】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生成されている。Kostelny等, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なる抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生成に対して使用することができる。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を結合してなる。従って、一つの断片のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは他の断片の相補的V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v(s F v)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)を参照されたい。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 4 6 】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

## 【 0 2 4 7 】

## ヘテロコンジュゲート抗体

二重特異性抗体には、本発明の抗体である架橋された又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体のうちの1つは、アビジンに結合し、他方はビオチンに結合しうる。このような抗体は、例えば、望ましくない細胞に免疫系細胞をターゲティングすること(米国特許第4676980号)、そしてH I V感染の治療のため(国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及び欧州特許第03089号)が考えられている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋結合方法を用いて作られてもよい。好適な架橋剤は当分野で公知であり、多くの架橋技術とともに、米国特許第4676980号に開示されている。

10

## 【 0 2 4 8 】

## 多価抗体

本発明の抗体には多価抗体が含まれる。多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(I g Mクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインはF c領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はF c領域と、F c領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はV D 1-(X 1)<sub>n</sub>-V D 2-(X 2)<sub>n</sub>-F cを有し、ここでV D 1は第1の可変ドメインであり、V D 2は第2の可変ドメインであり、F cはF c領域のポリペプチド鎖の一つであり、X 1及びX 2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：V H-C H 1-柔軟なリンカー-V H-C H 1-F c領域鎖；又はV H-C H 1-V H-C H 1-F c領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはC Lドメインを更に有する。

20

30

## 【 0 2 4 9 】

## エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌を治療する際の抗体の有効性を向上させることは望ましい。例えば、システイン残基をF c領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞障害性(A D C C)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのF c領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びA D C C能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5 7 3 9 2 7 7号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、I g G分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるI g G分子(例え

40

50

ば、 $IgG_1$ 、 $IgG_2$ 、 $IgG_3$  又は  $IgG_4$  ) の Fc 領域のエピトープを意味する。

【0250】

イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性剤、あるいは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)とコンジュゲートしている本明細書中に記載の抗体を含むイムノコンジュゲートに関する。例には、限定するものではないが  $Bi^{212}$ 、 $I^{131}$ 、 $In^{131}$ 、 $Y^{90}$ 、及び  $Re^{186}$  が含まれる。

【0251】

このようなイムノコンジュゲートの生成に有用な化学療法薬は上記した。例えば、BCNU、ストレプトゾシン、ピンクリスチン、5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)など(本明細書中の「化学療法薬」の定義も参照のこと)が本発明の抗体ないしその断片にコンジュゲートされうる。

10

【0252】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体ないしその断片を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、限定するものではないが  $At^{211}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$ 、 $Sm^{153}$ 、 $Bi^{212}$ 、 $P^{32}$ 、 $Pb^{212}$ 、 $In^{111}$  及び  $Lu$  の放射性同位体などが含まれる。コンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば  $Tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、MRIとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

20

【0253】

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば  $Tc^{99m}$  又は  $I^{123}$ 、 $Re^{186}$ 、 $Re^{188}$  及び  $In^{111}$  は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、例として「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

30

【0254】

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)プロテイン(PAPI、PAPI I 及び PAPI-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

40

【0255】

抗体と細胞障害性剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHC

50

L)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害性剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(C hari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

10

## 【0256】

別法として、抗VEGF及び/又は本発明の抗体の抗たんぱく質と細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

20

## 【0257】

ある実施態様において、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

## 【0258】

## メイタンシン及びメイタンシノイド

本発明は、一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている本発明の抗体を提供する。メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号;同4248870号;同4256746号;同4260608号;同4265814号;同4294757号;同4307016号;同4308268号;同4308269号;同4309428号;同4313946号;同4315929号;同4317821号;同4322348号;同4331598号;同4361650号;同4364866号;同4424219号;同4450254号;同4362663号;及び同4371533号に開示されている。

30

## 【0259】

本発明の抗体は、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子にコンジュゲートすることができる。1分子の毒素/抗体は、ネイキッド抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。一実施態様では、メイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

40

50

## 【0260】

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235B1号、及びChari等、Cancer Research, 52:127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

## 【0261】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。典型的なカップリング剤には、ジスルフィド結合を提供するためのN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)(Carlsson等、Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

10

20

## 【0262】

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

## 【0263】

## カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、一又は複数のカリケアマイシン分子とコンジュゲートした本発明の抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 $1^I$ 、 $2^I$ 、 $3^I$ 、N-アセチル- $1^I$ 、PSAG及び $1^I$ (Hinman等、Cancer Research, 53:3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58:2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

30

40

## 【0264】

## 他の抗体修飾

本明細書において抗体の他の修飾が意図される。例えば、抗体は、様々な非タンパク質性ポリマーの一つ、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、ポリエチレングリコール及びポリプロピレングリコールのコポリマーに連結されうる。また、抗体は、例えば、コアセルベーション技術によって又は界面重合法(例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポ

50

リ-(メチルメタキレート)マイクロカプセル)によって調製されるマイクロカプセルに、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)に、又はマイクロエマルジョンに内包されうる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示される。

#### 【0265】

##### リポソーム及びナノ粒子

本発明のポリペプチドはリポソームとして処方することができる。例えば本発明の抗体はイムノリポソームとして処方することができる。抗体を含有するリポソームは、例えば Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。一般的に、製剤とリポソームの使用は当業者に公知である。

#### 【0266】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤(ドキソルビジンなど)はリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

#### 【0267】

##### 他の用途

本発明の抗体は様々な有用性を有している。例えば、本発明の抗体は、癌の検出(例えば耐性腫瘍を検出する際)のために特定の細胞、組織又は血清におけるタンパク質の発現を検出するための診断用アッセイなどに用いられうる。一実施態様では、抗体は、本明細書中に記載の方法による治療のための患者集団を選別するため、例えばGr1、好中球エラスターゼ、MCP-1、MIP-1、URCGP、DRCGP、URRTP及びDRRTPの発現が変更している患者を検出するために用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウィッチアッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp.147-158]等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識される。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S又は<sup>125</sup>I等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位を抱合させるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunter等, Nature 144:945(1962); David等, Biochemistry, 13:1014(1974); Pain等, J. Immunol. Meth., 40:219(1981); 及びNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407(1982)に記載された方法が含まれる。

#### 【0268】

また、本発明の抗体は、組換え細胞培地又は天然の供給源からの本発明のタンパク質ないしタンパク質の断片の親和性精製に利用できる。この方法において、たんぱく質に対する抗体を、当分野でよく知られた方法を用いてSephadex樹脂又は濾紙等の適した支持体に固定化する。次いで、固定化した抗体をタンパク質を含む試料と接触させて精製し、その後、固定化した抗体と結合したタンパク質以外の試料中の実質的には全ての物質を取り除きうる適した溶媒で、支持体を洗浄する。最後に、支持体を抗体からタンパク質を引き離

10

20

30

40

50

しうる他の適した溶媒で洗浄する。

【0269】

本発明のポリペプチドに対する共有的修飾

本発明のポリペプチド、例えば本発明のタンパク質、本発明のタンパク質の抗体、ポリペプチドアンタゴニスト断片、融合分子(例えば免疫融合分子)などの共有結合による修飾は本発明の範囲内に包含される。それらは、適当であれば、化学合成により、又は抗体の酵素的又はポリペプチドの化学的切断によりなされうる。他の種類のポリペプチドの共有的修飾は、選択される側鎖又はN末端ないしはC末端残基と反応可能な有機誘導体化剤とポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を反応させることによって、又は、修飾アミノ酸ないしは非天然のアミノ酸を発達するポリペプチド鎖に組み込むことによって、分子内に

10

【0270】

最も一般的には、システニル残基は、 $\alpha$ -ハロアセタート(及び対応するアミン)、例えば、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドと反応し、カルボキシメチル又はカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイン残基もまたプロモトリフルオロアセトン； $\alpha$ -ブromo- $\beta$ -(5-イミドゾイル)プロピオン酸；クロロアセチルホスフェート；N-アルキルマレイミド類；3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド；メチル-2-ピリジルジスルフィド；p-クロロ水銀安息香酸；2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール；又はクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

20

【0271】

ヒスチジル残基は、pH 5.5 - 7.0 でジエチルピロカルボナートとの反応によって誘導体化されるが、この薬剤はヒスチジル側鎖に対して比較的特異的である。パラ-ブromoフェナシルプロミドもまた有用である；この反応は、典型的にはpH 6.0 で0.1 Mのカコジル酸ナトリウム中で行われる。

【0272】

リジニル及びアミノ末端残基はコハク酸又は他のカルボン酸無水物と反応させられる。これらの試薬を用いた誘導体形成は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。 $\alpha$ -アミノ含有残基を誘導体化する他の適当な試薬には、イミドエステル、例えば、メチルピコリンイミデート、リン酸ピリドキサル、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2,4-ペンタンジオン、及びグリオキシレートを用いたトランスアミナーゼにより触媒される反応である。

30

【0273】

アルギニル残基は一あるいは幾つかの従来試薬との反応によって修飾され、とりわけ、フェニルグリオキサール、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン及びニンヒドリンがある。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpK<sub>a</sub>のために反応がアルカリ性条件下で行われることを必要とする。更に、これらの試薬はリジンの基並びにアルギニン $\alpha$ -アミノ基と反応しうる。

【0274】

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物又はテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基内へのスペクトル標識の導入に特に興味をもって、なされる。最も一般的には、N-アセチルイミジゾールとテトラニトロメタンを使用して、それぞれがO-アセチルチロシル種と3-ニトロ誘導体を形成する。チロシル残基はラジオイムノアッセイでの使用のための標識化タンパク質を調製するために<sup>125</sup>I又は<sup>131</sup>Iを用いてヨウ素化される。

40

【0275】

カルボキシル側基(アスパルチル又はグルタミル)がカルボジイミド(R-N=C=N-R')(ここで、RとR'は異なったアルキル基である)、例えば、1-シクロヘキシル-3-(2-ホルホリニル-4-エチル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(4-アゾニア-4,4-ジメチル

50

ペンチル)カルボジイミドとの反応によって選択的に修飾される。更に、アスパルチル及びグルタミン残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミン残基へ変換される。

【0276】

グルタミン及びアスパラギン残基は、それぞれ対応するグルタミン及びアスパルチル残基へしばしば脱アミド化される。これらの残基は中性又は塩基性条件下で脱アミド化される。これらの残基の脱アミド化形態は本発明の範囲内に入る。

【0277】

その他の修飾には、プロリンとリジンのヒドロキシル化、セリン又はスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の  $\alpha$ -アミノ基のメチル化(T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 79-86頁 (1983))、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。

10

【0278】

他のタイプの共有修飾は本発明のポリペプチドに対してグリコシドを化学的又は酵素的にカップリングさせることを含む。これらの手順は、それらがN-又はO-結合グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞中でのポリペプチドの生産を必要としない点で有利である。用いられるカップリング態様に応じて、糖(類)は、(a)アルギニンとヒスチジンに、(b)遊離のカルボキシル基に、(c)遊離のスルフヒドリル基、例えばシステインのものに、(d)セリン、スレオニン又はヒドロキシプロリンのもののような遊離のヒドロキシル基に、(e)フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンのような芳香族残基、又は(f)グルタミンのアミド基に結合させることができる。これらの方法は1987年9月11日公開の国際公開第87/05330号並びにAplin及びWriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306頁 (1981)に記載されている。

20

【0279】

本発明のポリペプチドに存在するあらゆる炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的になすことができる。化学的脱グリコシル化には、ポリペプチドを化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は等価化合物に暴露することを必要とする。この処理により、ポリペプチドをインタクトなままにしながら、結合糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除く殆どの又は全ての糖の切断が生じる。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin等, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)により、及びEdge等, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981)により記載されている。例えば抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura等, *Meth. Enzymol.* 138:350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成できる。

30

【0280】

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

40

【0281】

ベクター、宿主細胞及び組換え法

ポリペプチドは容易に得られる材料と技術を使用して組換え的に製造することができる。

【0282】

ポリペプチド、例えばタンパク質の抗体、例えば抗IL-1又は抗PlGF、の組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター内に挿入される。本発明のポリペプチドをコードするDNAは、従来の手順を用いて容易に単離して配列決定される。例えば、モノクローナル抗体をコードするDNAは、例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異

50

的に結合可能であるオリゴヌクレオチドプローブを用いて単離し、配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には一般に、限定するものではないが、シグナル配列、複製起点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終末配列の一又は複数が含まれる。

#### 【0283】

##### シグナル配列成分

本発明のポリペプチドは直接的に組換え手法によって生産されるだけでなく、典型的にはシグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても産生される。典型的に選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。天然ポリペプチドシグナル配列を認識せずプロセッシングしない原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、 $1\text{ p p}$ あるいは熱安定なエンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母の分泌に関しては、天然シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属(*Saccharomyces*)及びクイベロマイシス(*Kluyveromyces*) 因子リーダーを含む)、又は酸ホスファターゼリーダー、白体(*C.albicans*)グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第90/13646号に記載されているシグナルにより置換されうる。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。

10

20

#### 【0284】

このような前駆体領域のDNAは、本発明のポリペプチドをコードするDNAに読み枠を一致させて結合される。

#### 【0285】

##### 複製開始点成分

発現及びクローニングベクターは共に一又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、この配列はクローニングベクターにおいて、宿主染色体DNAとは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。そのような配列は様々な細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、 $2\mu$ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である(SV40開始点が典型的には初期プロモーターを有しているため用いられる)。

30

#### 【0286】

##### 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含みうる。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばパシラス菌に対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。

40

#### 【0287】

選択技術の一例においては、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換されるこれらの細胞は、抗薬物性を付与し、選択療法を生存するタンパク質を生産する。このような優性選択の例としては、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸又はハイグロマイシンが使用される。

#### 【0288】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することのできるもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチ

50

オネイン I 及び II、典型的には、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等である。

【0289】

例えば、DHFR 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、DHFR の競合的アンタゴニストであるメトトリキセート (Mtx) を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型 DHFR を用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 株化細胞である。

【0290】

あるいは、本発明のポリペプチドをコードする DNA 配列、野生型 DHFR タンパク質、及びアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ (APH) のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞 (特に、内在性 DHFR を含む野生型宿主) は、カナマイシン、ネオマイシンあるいは G418 のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地における細胞増殖により選択することができる。米国特許第 4965199 号を参照。

【0291】

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミド YRp7 に存在する trp1 遺伝子である (Stinchcomb 等, Nature, 282:39(1979))。trp1 遺伝子は、例えば、ATCC 第 44076 号あるいは PEP4-1 のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。酵母宿主細胞ゲノムに trp1 破壊が存在することは、トリプトファンの不存在下における成長による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2 欠陥酵母株 (ATCC 20622 あるいは 38626) は、Leu2 遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

【0292】

また、1.6 μm の円形プラスミド pKD1 由来のベクターは、クルイヴェロマイシス (Kluyveromyces) 酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え子ウシのキモシンの大量生産のための発現系が K.ラクティス (lactis) に対して報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株からの、組換えによる成熟したヒト血清アルブミンを分泌する安定した複数コピー発現ベクターも開示されている。Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

【0293】

プロモーター成分

通常、発現及びクローニングベクターは、宿主生体により認識され、本発明のポリペプチドをコードする核酸に作用可能に結合するプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、phoA プロモーター、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えば tac プロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するプロモーターもまた本発明のポリペプチドをコードする DNA と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ (S.D.) 配列を有する。

【0294】

真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。事実上、全ての真核生物の遺伝子は、転写開始部位からおよそ 25 ないし 30 塩基上流に位置する AT 富化領域を有する。多数の遺伝子の転写開始位置から 70 ないし 80 塩基上流に見出される他の配列は、N が任意のヌクレオチドである CNC A A T 領域である。大部分の真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A 尾部の付加に対するシグナルである A A T A A A 配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

【0295】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ

10

20

30

40

50

、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

【0296】

他の酵母プロモーターは、成長条件によって転写が制御される更なる利点を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母の発現に用いられる好適なベクターとプロモーターは欧州特許第73657号に更に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に好適に用いられる。

10

【0297】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの本発明のポリペプチドの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及び典型的にはサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、ヒートショックプロモーターによって、提供されるこのようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

20

【0298】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主でDNAを発現する系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変更例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞におけるヒトインターフェロンcDNAの発現について、Reyes等、Nature, 297:598-601(1982)を参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

30

【0299】

エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物による本発明のポリペプチドをコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。哺乳動物の遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、-フェトプロテイン及びインスリン)。典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製開始点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物のプロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297:17-18(1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされ得るが、典型的にはプロモーターから5'位に位置している。

40

【0300】

転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、本発明のポリペプチドをコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域

50

である。国際公開第 9 4 / 1 1 0 2 6 号とそこに開示した発現ベクターを参照されたい。

#### 【 0 3 0 1 】

##### 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクターに本発明のポリペプチドをコードする DNA をクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンズ及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及び B . リチエフォルミス(Licheniformis)(例えば、1989年4月12日に公開された DD 2 6 6 7 1 0 に開示されたパシリ・リチエニフォルミス 4 1 P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。典型的には大腸菌クローニング宿主は大腸菌 2 9 4 (A T C C 3 1 4 4 6)であるが、他の大腸菌 B、大腸菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1 5 3 7)及び大腸菌 W 3 1 1 0 (A T C C 2 7 3 2 5)のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

10

#### 【 0 3 0 2 】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、本発明のポリペプチドをコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能で、ここで使用でき、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ；クルイペロマイセス宿主、例えば K . ラクティス、K . フラギリス(A T C C 1 2 4 2 4)、K . ブルガリカス(A T C C 1 6 0 4 5)、K . ウィッケラミイ(A T C C 2 4 1 7 8)、K . ワルチイ(A T C C 5 6 5 0 0)、K . ドロソフィラルム(A T C C 3 6 9 0 6)、K . サーモトレランス、及び K . マルキシアナス；ヤローウィア(欧州特許第 4 0 2 2 2 6 号)；ピチア・パストリス(欧州特許第 1 8 3 0 7 0 号)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア(欧州特許第 2 4 4 2 3 4 号)；アカパンカビ；シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセス・オキシデンタリス；及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリポクラジウム、及びコウジカビ属(Aspergillus)宿主、例えば偽巢性コウジ菌(A. nidulans)及びクロカビ(A. niger)が使用できる。

20

#### 【 0 3 0 3 】

本発明のグリコシル化ポリペプチドの発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のパキウロウイルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドプテラ・フルギペルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンピクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、オートグラフィア・カリフォルニカ NPV の L - 1 変異体とボンピクス・モリ NPV の B m - 5 株が公に利用でき、このようなウイルスは本発明においてここに記載したウイルスとして使用でき、特にスポドプテラ・フルギペルダ(Spodoptera frugiperda)細胞のトランスフェクションに使用できる。綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することもできる。

30

40

#### 【 0 3 0 4 】

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になった。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV 4 0 によって形質転換されたサル腎臓 CV 1 株 (C O S - 7, A T C C C R L 1 6 5 1)；ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での成長のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol., 36:59 (1977))；ハムスター乳児腎細胞(BHK, A T C C C C L 1 0)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - D H F R (C H O, Urlaub等, Proc. Natl . Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980))；マウスのセルトリ細胞(TM 4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980))；サルの腎臓細胞(CVI A T C C C C L 7 0)；アフリ

50

カミドリザルの腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2); イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34); バッファローラット肝細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75); ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065); マウス乳房腫瘍 (MMT060562, ATTC CCL 51); TRI細胞 (Mother等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC5細胞; FS4細胞; ヒト肝癌株 (Hep G2) である。

#### 【0305】

宿主細胞は、本発明のポリペプチド生産のための上述した発現又はクローニングベクターで形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適当に修飾された常套的栄養培地で培養する。

10

#### 【0306】

##### 宿主細胞の培養

本発明のポリペプチドを生成するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地、例えばハム (Ham) の F10 (Sigma)、最小必須培地 ((MEM), Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、及びダルベッコの改良イーグル培地 ((DMEM), Sigma) が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430; 国際公開第87/00195; 又は米国特許再発行第30985号

に記載された任意の培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地はいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子 (例えばインスリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類 (例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー (例えば HEPES)、ヌクレオチド (例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質 (例えば、ゲンタマイシン<sup>T M</sup> 薬)、微量元素 (最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)、及びグルコース又は同等のエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について以前から用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

20

#### 【0307】

##### ポリペプチド精製

本発明のポリペプチドないしタンパク質は被検体から採取されうる。組換え技術を用いる場合、本発明のポリペプチドは、細胞内に、細胞膜周辺腔に、又は培地に直接分泌されうる。本発明のポリペプチドは、培養培地又は宿主細胞溶解物から回収されてもよい。膜結合である場合、適切な清浄液 (例えばトリトン-X100) を用いるか、又は酵素の切断によって膜から放出されうる。本発明のポリペプチドの発現に用いられる細胞は、様々な物理的又は化学的手段、例として、凍結-解凍循環、超音波処理、物理的な破壊又は細胞溶解剤によって破壊されうる。

30

#### 【0308】

適切なタンパク質精製手順の例は以下の手順である: イオン交換カラムによる分画; エタノール沈殿; 逆相 HPLC; 二酸化ケイ素によるクロマトグラフィ、ヘパリン SEPHAROSE<sup>T M</sup> によるクロマトグラフィ、陰イオン又陽イオン交換樹脂 (例えばポリアスパラギン酸カラム、DEAEなど) によるクロマトグラフィ; 等電点電気泳動; SDS-PAGE; 硫酸アンモニウム沈殿; 例えば、セファデックス G-75 を用いたゲル濾過; IgG などの混入物を除去するためのプロテイン A セファロースカラム; 及び、本発明のポリペプチドのエピトプタグ付加形態を結合するための金属キレートカラム。タンパク質精製に様々な方法が用いられてもよく、このような方法は当分野で公知であり、例えば Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982) の実施例に記述される。選択される精製工程 (一又は複数) は、例えば、使用する生産プロセス及び生産される本発明の特

40

50

定のポリペプチドの性質に依存するであろう。

【0309】

例えば、細胞から調製されるVEGF組成物は、例えば、ヒドロキシラパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィ、及び典型的な親和性技術であるアフィニティークロマトグラフィを用いて精製されうる。アフィニティリーガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 16571575 (1986))。アフィニティリーガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond AB X<sup>TM</sup>樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば上記のものも回収する抗体に依存して利用可能である。また、大腸菌の周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載しているCarter等, Bio/Technology 10:163-167 (1992)も参照のこと。

10

【0310】

薬剂的組成物

本発明の薬剂の製薬的製剂(例えば、VEGFアンタゴニスト、URVIPアンタゴニスト等)とその組み合わせ及び本発明に関して用いられる本明細書中に記載のものは、所望の純度を持つ抗体と、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980])、凍結乾燥又は水溶液の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及びノ又はTWEEN<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

20

30

【0311】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]に開示されている。

40

【0312】

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することにより容易に達成される。

【0313】

50

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明のポリペプチドを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とエチル-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 DEPOSIT<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体が体内に長時間残ると、37の水分に曝露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。例として、高分子電解質被覆によるカプセルを記載している米国特許第6699501号も参照のこと。

#### 【0314】

さらに、本発明の薬剤(例えばVEGFアンタゴニスト、URVIPアンタゴニスト、化学療法剤又は抗癌剤)が遺伝子治療によって被検体に導入されうることを考慮する。遺伝子治療は、被検体への核酸の投与によって行われる治療を指す。遺伝子治療適用において、例えば欠損した遺伝子の置換のために、遺伝子を細胞に導入して、治療的に有効な遺伝子産物のインビボ合成を達成する。「遺伝子治療」には、永続的な効果が単一の治療によって達成される従来の遺伝子治療と遺伝子治療薬の投与の両方が含まれ、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回の投与又は繰り返し投与を伴う。アンチセンスRNA及びDNAはインビボのある遺伝子の発現を遮断するための治療剤として用いられる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞膜による取り込みに制限されて細胞内濃度が低くなるが、インヒビターとして働く細胞内に移入することができることが既に報告されている(Zamecnik等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986))。オリゴヌクレオチドは、例えば負に荷電するホスホジエステル基を非荷電基に置換することによって修飾して、それらの取り込みを上げることができる。遺伝子治療の方法の一般的な概念については、例として、Goldspiel等 Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan and Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); 及び、May TIBTECH 11:155-215 (1993)を参照。用いられうる組換えDNA技術の当分野で公知の共通の方法は、Ausubel等 eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記述される。

#### 【0315】

核酸を生細胞に導入するために利用可能な様々な技術がある。技術は、核酸がインビトロ又はインビボで意図した宿主の細胞の培養細胞にトランスファーされるかどうかによって異なる。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸のトランスファーに好適な技術には、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などが含まれる。一般に好適なインビボ遺伝子導入技術には、ウイルス(一般的にレトロウイルス)ベクターによる形質移入及び、ウイルスコートタンパク質-リポソーム媒介性形質移入が含まれる(Dzau等, Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993))。例えば、インビボ核酸導入技術には、ウイルスベクター(例えばアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス又は、アデノ関連ウイルス)及び脂質ベースのシステム(遺伝子の脂質媒介トランスファーに有用な

脂質は、例えばDOTMA、DOPE及びDC-Cholである)が含まれる。遺伝子治療にウイルスベクターを使用する例は、Clowes等 J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem等 Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); Grossman and Wilson Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993); Bout等 Human Gene Therapy 5:3-10 (1994); Rosenfeld等 Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld等 Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli等 J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); 及び、Walsh等 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300 (1993)に見られる。

#### 【0316】

ある場合では、標的細胞を標的とする薬剤、例えば細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターのリガンドなどを核酸供給源に供給することが望ましい。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスに關与する細胞表面膜タンパク質と結合するタンパク質は、例えばある種類の細胞に向性があるキャプシドタンパク質又はその断片、細胞周期への内部移行を行うタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし、細胞内半減期を亢進するタンパク質のターゲティングのため及び/又はこれらの取り込みを容易にするために用いられうる。レセプター媒介性エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及び、Wagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)に記載される。遺伝子マーキング及び遺伝子治療プロトコル野概要については、Anderson等, Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

#### 【0317】

##### 用量及び投与

本発明の薬剤(VEGFアンタゴニスト、URVIPアンタゴニスト、化学療法剤又は抗癌剤)は、ヒト患者に、周知の方法、例えば、ボラスとして又は所定時間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、鞘内、経口、局所、又は吸入経路、及び/又は皮下投与などにより投与される。

#### 【0318】

ある実施態様では、本発明の治療はVEGFアンタゴニストとURVIPアンタゴニストのような一又は複数の薬剤及び/又は化学療法剤との併用投与を伴う。一実施態様では、付加的な抗癌剤、例えば、一又は複数の異なる抗血管新生剤、一又は複数の化学療法剤などが存在する。また、本発明は、複数のインヒビター、例えば同じ抗原に対する複数の抗体又は本発明の異なるタンパク質に対する複数の抗体の投与を考慮する。一実施態様では、異なる化学療法剤の混合物が、VEGFアンタゴニスト及び/又は一又は複数のURVIPアンタゴニストと投与される。別の実施態様では、異なる化学療法剤の混合物が、VEGFアンタゴニスト及び/又は一又は複数のURVINAによってコードされるタンパク質の抗体と投与される。併用投与は、別々の製剤又は単一の製薬的製剤による同時投与、及び/又はいずれかの順序での連続投与が含まれる。例えば、VEGFアンタゴニストは、化学療法剤の投与の前、後、交互に行われるか、又はこれらと同時になされうる。一実施態様では、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間がある。

#### 【0319】

疾患の予防又は治療のために、本発明の薬剤の好適な用量は、上記に定義した治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及びインヒビターへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。インヒビターは一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。併用療法投与計画では、本発明の組成物は治療的有効量又は治療的相乗作用量で投与される。本明細書中で用いられるように、治療的有効量は、本発明の組成物の投与及び/又はVEGFアンタゴニスト及び一又は複数の他の治療剤の同時投与により標的とする疾患又は症状が減少又は阻害される量である。薬剤の組み合わせの投与効果は付加的であつてもよい。一実施態様では、投与の結果は相乗効果である。治療的相乗作用量は、特定の疾

10

20

30

40

50

患に関係する状態又は症状を相乗作用的に又は有意に減少ないし除去するために必要な、V E G Fアンタゴニスト及び一又は複数の他の治療剤、例えば化学療法剤又は抗癌剤の量である。

#### 【0320】

疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $50\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\sim 20\text{mg}/\text{kg}$ )のV E G Fアンタゴニスト又は化学療法剤、又は抗癌剤が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。しかしながら他の用量処方がある有用であるかもしれない。典型的には、臨床医は、必要とされる生物学的な効果が生じる用量(一又は複数)が達成されるまで本発明の分子(一又は複数)を投与するであろう。本発明の治療の経過は従来の技術及びアッセイにより用意にモニターされる。

10

#### 【0321】

例えば、血管新生インヒビター、例えばアバスチン(登録商標)(Genentech)などの抗V E G F抗体の調製及び投与計画は製造者の指示に従って用いられても、当業者によって経験的に決定されてもよい。他の例では、このような化学療法剤の調製及び投与計画は製造者の指示に従って用いられても、当業者によって経験的に決定されてもよい。化学療法の調製及び投与計画はChemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載される。

20

#### 【0322】

##### 治療の効果

本発明の治療の有効性は、新生物ないし非新生物疾患を治療する際に共通に用いられる様々なエンドポイントによって決定することができる。例えば、癌治療は、限定するものではないが、腫瘍再発、腫瘍重量ないしサイズの収縮、進行時間、生存期間、進行がない生存、全体の応答速度、応答の継続期間、生活の質、タンパク質の発現及び/又は活性などで評価されてもよい。本明細書に記載の抗血管新生剤は腫瘍の血管をターゲットとするのであって、新生物細胞自体をターゲットとする必要はないので、抗癌剤の特定のクラスを示し、それゆえに薬剤に対する臨床応答の特定の測定と定義を必要とする。例えば、二次元分析において50%より大きい腫瘍の収縮は応答を示す標準のカットオフである。しかし、本発明のインヒビターは原発性腫瘍を収縮することなく転移の拡がりを阻害するか、又は単に腫瘍抑制(tumouristatic)効果を及ぼしうる。したがって、例えば血管新生の血漿又は尿路マーカーの測定及び放射線画像法による応答の測定などの、治療の有効性を決定する手法が用いられうる。

30

#### 【0323】

##### 製造品

本発明の他の実施態様では、上記の病状/疾病の治療又は病状/疾病の診断に有用な材料を含有する製造品が提供される。該製造品は容器、ラベル及びパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等々が含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成されうる。一実施態様では、容器は、症状を治療するのに有効な組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。ある実施態様では、組成物中の少なくとも一つの活性剤はV E G Fモジュレーターである。別の実施態様では、組成物中の少なくとも一つの活性剤はV E G Fモジュレーターであり、少なくとも二つ目の活性剤は本発明のアンタゴニスト及び/又は化学療法剤である。更に別の実施態様では、組成物中の少なくとも一つの活性剤はV E G Fモジュレーターであり、少なくとも二つ目の活性剤は本発明のアゴニスト及び/又は化学療法剤である。容器に添付又は付属するラベルは、組成物が選択した症状の治療に使用されることを示す。さらに製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えばリン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第二の容器を更に具備してもよい。他の実

40

50

施態様では、容器はVEGF非依存性腫瘍を検出するための診断用であるマーカーセットを収容する。特定の実施態様において、組成物内の少なくとも一薬剤は、IL-1、PLGF、HGF、IL-6、LIF、S100A8、S100A9、PDGFC、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、VEGFR1又はVEGFR2を検出するためのマーカーである。容器に添付又は付属するラベルは、組成物がVEGF非依存性腫瘍の診断に使用されることを示す。さらに、本発明の製造品には、更なる活性剤、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

#### 【0324】

本発明の特定の実施態様において、容器、該容器のラベル、及び該容器内に収容される組成物を含むキットが提供される。組成物は、厳密な条件下でURVINA、DRVINA、URVIPおよび/またはDRVIPをコードする核酸を含むが、これに限定されない、1又は複数の遺伝子のポリヌクレオチド配列にハイブリダイズする1又は複数のポリヌクレオチド、少なくとも1種類の哺乳類の細胞において、S100A8、S100A9、Tie-1、Tie-2、CD31、CD34、VEGFR1、VEGFR2、PDGFC、IL-1、PLGF、HGF、IL-6および/またはLIFを含むがこれに限定されない1又は複数の標的遺伝子の存在及び/又は発現されるを評価するために使用できることを示している前記容器のラベルは組成物、更に少なくとも1種類の哺乳類の細胞において1又は複数の標的RNA又はDNAの存在及び/又は発現レベルを評価するために使用されるポリヌクレオチドを含む。キットの他の任意のコンポーネントは、1又は複数のバッファー（例えば、ブロックバッファー、洗浄バッファー、基質バッファーなど）、酵素的標識によって化学的に変えられる基質である基質（例えば、色素原）のような他の試薬、エピトープ回復溶液、コントロール試料（正の及び/又は負の対照）、対照スライドなどが含まれる。

#### 【実施例】

#### 【0325】

本明細書に記載する実施例および実施形態は、例示のためのものにすぎず、それらに照らして、種々の改変形態および変化形態が当業者には提案され、それらは本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるものとするを理解されたい。

#### 【実施例1】

#### 【0326】

乳腺上皮中のVegf-A遺伝子を不活性化しても、正常な乳腺の発達は破壊されないVEGFの生物学的な重要性を、とりわけ乳腺の上皮コンパートメントにおいて調べるために、第3エクソンにloxP組換え部位が隣接するコンディショナルなVegf-A対立遺伝子をもつマウス(VEGF loxP+/+) (Gerber HPら、VEGF is required for growth and survival in neonatal mice、Development 1999、126:1149~1159)を、Creリコンビナーゼを、マウス乳房腫瘍ウイルス末端反復配列プロモーター/エンハンサーエレメントの転写制御下で発現するトランスジェニックマウス(MMTV-Cre) (Wagner KUら、Cre-mediated gene deletion in the mammary gland、Nucleic Acids Res 1997、25:4323~4330、Wagner KUら、Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice、Transgenic Res 2001、10:545~553)と交配して、VEGF座位においてヘテロ接合型(一方の対立遺伝子はVEGF loxPであり、他方の対立遺伝子はVEGF WTである)であり、MMTV-Cre導入遺伝子を担持するマウスを作出した。これらのマウスをホモ接合型のVEGF loxPマウスとさらに交配して、MMTV-Cre導入遺伝子ももち、乳腺上皮中の両方のVEGF対立遺伝子においてエクソン

3 が欠失しているホモ接合型の VEGF loxP マウス (本明細書では epiVEGF - / - と呼ぶ) を得た。生存可能かつ健常な epiVEGF - / - マウスは、同腹仔の対照動物 (本明細書では VEGF + / + と呼ぶ) と身体的に区別できず、予想されたメンデル比で生まれた (データ未公開)。

#### 【0327】

60 mg / kg ケタミンおよび 10 mg / kg キシラジンを含有する溶液の腹腔内注射を使用して、マウスに麻酔を施した。鼠径部 (第 4 位) 乳腺を解体し、あらかじめ浄化した superfrost (登録商標) plus microslide (VWR、West Chester、PA) 上に広げ、カルノア固定液 (6 部の 100% エタノール、3 部のクロロホルム、1 部の氷酢酸) 中で一晚固定した。試料を、段階的に濃度の異なるエタノール (70%、50%、30% および 10%) を通して 15 分間 2 回濯ぎ、最後に蒸留水中で 5 分間濯いだ。試料を Carmine Alum (500 ml の水中、1 g のカーミン (Sigma-Aldrich、St Louis、MO)、2.5 g の硫酸アルミニウムカリウム (Sigma-Aldrich、St Louis、MO)) 中で一晚染色した。試料を、段階的濃度のエタノール (70%、95%、100%) リンスを使用して脱水し、キシレン中に 30 分間または腺から脂肪組織が十分に浄化されるまで浸漬した。PermOUNT を使用してスライドに試料を載せ、カバーガラスで覆った。Image Pro-Express ソフトウェア (Media Cybernetics、Inc Bethesda、MD) を使用して、全載をデジタル写真撮影した。全載の解析は、8 週齢の同腹仔マウスを用いて実施した。

10

20

#### 【0328】

8 週齢の未交尾の雌マウスから鼠径部乳腺を取り出し、その全載の調製物から、epiVEGF - / - 乳腺において、乳腺の発達には特徴的な管の分枝した伸長を伴い、これは、VEGF + / + 対照乳腺の伸長に類似することが明らかになった (図 1A、1B)。同様に、8 週齢 epiVEGF - / - 乳腺のヘマトキシリンおよびエオシンで染色した切片においても、VEGF + / + 乳腺と比べて、肉眼的な組織学的変化は見出されなかった (データ未公開)。これらの結果から、上皮細胞由来 VEGF は未交尾マウスにおける正常な乳腺の発達に必須ではないことが示唆されている。

#### 【実施例 2】

#### 【0329】

上皮由来 VEGF が喪失すると、PyMT 腫瘍の発症が遅延する

乳腺上皮における腫瘍形成を促すために、ポリオマウイルスミドル T 抗原 (PyMT) を MMTV-LTR プロモーターの転写調節下で発現するトランスジェニックマウス (Guy CTら、Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease、Mol Cell Biol 1992、12:954~961) を epiVEGF - / - マウスと交配して、PyMT.epiVEGF - / - 動物を作出した。

30

40

#### 【0330】

MMTV-LTR の制御下で PyMT 腫瘍性タンパク質を発現するトランスジェニックマウス系統 (MMTV-PyMT) を使用して、乳腺上皮における腫瘍形成を推進した (Guy CTら、Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease、Mol Cell Biol 1992、12:954~961)。MMTV-Cre 導入遺伝子に加えて、MMTV-PyMT 導入遺伝子を導入するために、VEGF loxP および VEGF WT についてヘテロ接合型である雌マウスを、雄の MMTV-PyMT トランスジェニックマウスと交配して、MMTV-Cre 導入遺伝子および MMTV-PyMT 導入遺伝子の発現に加えて、VEGF loxP およ

50

び VEGF WT についてヘテロ接合型のマウスを作出した。次いで、MMTV - Cre 導入遺伝子および MMTV - PyMT 導入遺伝子と並んで、VEGF loxP 対立遺伝子および VEGF WT 対立遺伝子についてヘテロ接合型の雄マウスを、雌のホモ接合型 VEGF loxP マウスと交配して、MMTV - Cre 導入遺伝子および MMTV - PyMT 導入遺伝子の両方を担持するホモ接合型 VEGF loxP マウスを得た。ホモ接合型 VEGF loxP マウスまたは Cre および PyMT も発現するホモ接合型 VEGF loxP マウスを、FVB/N バックグラウンド上で 5 世代戻し交配してから、交雑させて、MMTV - Cre 導入遺伝子および MMTV - PyMT 導入遺伝子を発現するホモ接合型 VEGF loxP マウス（本明細書では PyMT . epi VEGF - / - と呼ぶ）、ならびに PyMT 導入遺伝子および WT VEGF を発現するホモ接合型 VEGF loxP マウス（本明細書では PyMT . VEGF + / + と呼ぶ）を作出し、後者を、

10

全ての実験についての対照動物として使用した。別段の記載がない限り、雌マウスを全ての研究において使用した。腫瘍の形成および成長を、4 週齢から開始して毎週モニターし、触診可能な腫瘍の体積を、ノギスによる測定によって決定した。マウス 1 匹当たりの累積腫瘍数を、個々のマウスについて、1 週当たりの腫瘍小結節の数を加算することによって決定した。腫瘍体積は、式： $L \times W \times W / 2 = \text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)}$ （ $L = \text{mm}$  で示す長径（長さ）； $W = \text{mm}$  で示す短径（幅））を使用して計算した（Blaskovich

20

MAら、（2000）Design of GFB-111, a platelet-derived growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice. Nat Biotechnol 18:1065~1070）。マウス 1 匹当たりの累積腫瘍体積は、個々のマウスについて各腫瘍小結節の体積を加算することによって決定した。指定の時点でマウスから腫瘍を取り出し、重量測定した。

#### 【0331】

腫瘍の潜時が、PyMT . epi VEGF - / - 乳腺において PyMT . VEGF + / + 乳腺の潜時と比べて増加した。より具体的には、50% のマウスにおいて、少なくとも単一の触診可能な PyMT . VEGF + / + 腫瘍を検出するのに 10 週が必要であり、一方、PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍について  $12.3 \pm 0.51$  週が必要であった（ $P$  値 = 0.003）（図 2A）。触診可能な腫瘍の検出に続いて、全てのマウスを週 1

30

回モニターして、副乳腺（10 個）内部の追加の触診可能な腫瘍の時期を決定した。それに続く時点でマウス 1 匹当たりの触診可能な腫瘍の累積数の平均は、PyMT . epi VEGF - / - マウスにおいて、PyMT . VEGF + / + 対照動物と比べて有意に少なかった（図 2B）。乳癌のこの遺伝子モデルにおいて、個々の腫瘍成長の変動が大きいので（Vartocovskiら、Accelerated preclinical testing using transplanted tumors from genetically engineered mouse breast cancer models, Clin Cancer Res. 2007 1;13(7):2168~77）、第 8 週から第 17 週まで、各遺伝子型について、マウス 1 匹当たりの累積腫瘍体積の平均を計算し、グラフで示した（図 2C）。第 11 週において、PyMT . VEGF

40

+ / + についての累積腫瘍体積の平均は、約 900 mm<sup>3</sup> であり、一方、PyMT . epi VEGF - / - についての累積腫瘍体積の平均は、100 mm<sup>3</sup> 未満であった（図 2C）。第 17 週において、PyMT . VEGF + / + 対照の動物についての累積腫瘍積載体積の平均は、約 7500 mm<sup>3</sup> であり、一方、PyMT . epi VEGF - / - マウスについての累積腫瘍積載体積の平均は約 3000 mm<sup>3</sup> であった（図 2C）。第 16 週と第 17 週との間に収集した腫瘍からは、PyMT . epi VEGF - / - において、PyMT . VEGF + / + と比べて総腫瘍重量 / マウスの低下が示された（図 2D）。これらの観察から、上皮 VEGF の喪失によって、PyMT 推進性の乳腺腫瘍形成が制限されることが示されている。

#### 【実施例 3】

## 【0332】

腫瘍の血管構造が、PyMT . epi VEGF - / - マウスにおいては減少する

Micro - CT血管造影を利用して、正常な血管構造 ( Garcia - Sanz A  
ら、Three - dimensional micro computed tomogr  
aphy of renal vasculature in rats、Hypert  
ension、1998 ; 31 [ 2 ] : 440 ~ 444 ; Ritiman EL、Mic  
ro - computed tomography of the lungs and  
pulmonary - vascular system、Proc Am Thorac  
Soc . 2005 ; 2 : 477 ~ 480 )、血管新生および動脈新生の種々の動物モデ  
ル ( Kwon HMら Enhanced Coronary Vasa Vasor  
um Neovascularization in Experimental Hy  
percholesterolemia、J . of Clinical Invest .  
1998 ; 101 [ 8 ]、1551 ~ 1556 ; Kwon HMら Percutane  
ous Transmyocardial revascularization in  
duces angiogenesis : A histologic and 3 - di  
mensional micro computed tomography stud  
y、J Korean Med Sci . 1999 ; 14 : 502 ~ 510 ; Duval  
l CLら Quantitative micro computed tomogra  
phy analysis of collateral vessel develo  
pment after ischemic injury、Am J Physiol  
Heart Circ . Physiol . 2004 ; 287 : H302 ~ 310 ) を特  
徴付け、より最近になって、腫瘍の血管構造を研究することに成功を収めている ( Mae  
hara N .、Experimental micro computed tomog  
raphy study of the 3D microangiarchitec  
ture of tumors、Eur Radiol . 2003 ; 13 ( 7 ) : 155  
9 ~ 1565 ; Savai Rら Analysis of tumor vessel  
supply in lewis lung carcinoma in mice  
by fluorescent microsphere distribution  
and imaging of micro - and flat - panel com  
puted tomography、Amer J of Path . 2005 ; 167  
[ 4 ] : 937 ~ 946 ; Shojaei Fら ( 2007 ) Bv8 regulate  
s myeloid cell - dependent tumor angiogene  
sis、Nature 450 : 825 ~ 831 ) 。

## 【0333】

手短に述べると、動物に50  $\mu$  l のヘパリン15 ' の腹腔内注射を投与してから、動物  
を二酸化炭素の吸入により安楽死させた。胸腔を開き、心臓の心尖部内に切開を設け、ポ  
リエチレン製カニューレ ( id 0 . 58 mm、od 0 . 96 mm ) を左心室に通し、  
上行大動脈内に5 - 0絹製縫合糸を用いて固定した。0 . 1 mMニトロプルシドナトリウ  
ム溶液を、6 ml / 分の速度で灌流して、最大の血管拡張状態を得た。市販のクロム酸鉛  
ラテックスであるMICROFIL ( 登録商標 ) ( Flowtech、Carver、M  
A ) を製造元の推奨に従って調製し、2 ml / 分の速度で8 . 5分間灌流した。注入した  
ラテックス混合物の重合を室温で90分間行ってから、腫瘍を解体した。解体した腫瘍を  
、解析まで、10 % 中性緩衝ホルマリン中に浸漬した。腫瘍の画像を、 $\mu$  CT 40 ( SC  
ANCO Medical、Basserdorf、Switzerland ) X線マイ  
クロコンピュータ断層撮影 ( micro - CT ) システムを用いて撮影した。従来の平面  
X線に匹敵する矢状断の探索画像を得て、一連のmicro - CT画像切片の軸方向の獲  
得のための出発点および終点を定義した。軸方向の画像の位置および数を、腫瘍が完全に  
網羅されるように選んだ。腫瘍の画像を、大豆油をバックグラウンドの媒体として用いて  
撮影した。X線チューブを、50 kVのエネルギーレベル、160  $\mu$  Aの電流および30  
0ミリ秒の積分時間で動作することによって、Micro - CTの画像を生成した。軸方

向の画像を、 $16\ \mu\text{m}$ の等方向性分解能で得た。血管網および腫瘍を、一連の画像処理のステップによって抽出した。強度閾値および形態学的フィルター（浸食および拡張）を、容積測定用micro-ct画像データに適用して、血管容積を抽出した。1195 Houndsfield Unit (HU)の閾値を利用して、腫瘍および大豆油のバックグラウンドシグナルから、MICROFIL（登録商標）が充填されている血管を抽出した。-8 HUの強度閾値を適用し、続いて、形態学的フィルターをかけて（浸食および拡張）、ノイズを抑制することによって、バックグラウンドの大豆油から腫瘍体積を抽出した。サブセットの試料について、区分けの目視検査の結果によって、血管および腫瘍の強度閾値を決定した。血管のサイズの推定は、境界シード点および単一シード点を与えられた距離変換の技法を利用する骨格化アルゴリズムに基づいた（Zhou YおよびToga AW、Efficient skeletonization of volumetric objects、IEEE Trans. Visualization and Computer Graphics、1999；5[3]：196~209）。画像解析を、C++で書かれた社内の画像区分けアルゴリズムおよびAVW画像処理ソフトウェアライブラリー（AnalyzeDirect Inc.、Lenexa、KS）を利用するPythonによって実施した。表面の三次元（3D）化を、 $\mu\text{CT}$ データから、画像解析ソフトウェアパッケージであるAnalyze（AnalyzeDirect Inc.、Lenexa、KS）を使用して生み出した。抗VEGF G6.31またはブタクサに対するアイソタイプの対照抗体を、 $5\ \text{mg}/\text{kg}$ 体重で週2回腹腔内注射したPYMT.VEGF loxP+/+マウスにおいて、腫瘍血管構造に対するVEGFの薬理的阻害作用の評価を実施した。

#### 【0334】

サイズを一致させた腫瘍のマイクロコンピュータ断層撮影（ $\mu\text{CT}$ ）血管造影から、PYMT.epiVEGF-/-腫瘍（ $7.94 \pm 1.017\ \text{mm}^3$ 、 $n=16$ ）においては、PYMT.VEGF+/+腫瘍（ $12.31 \pm 7.27\ \text{mm}^3$ 、 $n=30$ 、 $p=0.0032$ ）と比べて、血管容積（VV）の平均が低下することが明らかになった。同様に、血管密度（VV/TV）の平均も、PYMT.epiVEGF-/-腫瘍（ $0.034 \pm 0.0027$ ）において、PYMT.VEGF+/+対照腫瘍（ $0.054 \pm 0.019$ ）と比べて、（37%）低下した（ $P=0.004$ ）。代表的な三次元の最大強度を投影した（MIP）micro-CT血管造影図を示す（図3A、B）。PYMT.epiVEGF-/-腫瘍において見られたのと類似の形で、PYMT.VEGF+/+腫瘍を有するマウスの抗VEGF治療（3回、1週間）により、血管密度も、対照抗体治療マウスと比べて減少した（図3C、3D）。より細かい血管が、PYMT.epiVEGF-/-腫瘍において選択的に喪失し得るかどうかを決定するために、血管半径の観察された範囲にわたり血管容積を評価した。PYMT.epiVEGF-/-腫瘍においては、PYMT.VEGF+/+腫瘍と比べて、全ての血管半径にわたり血管容積の分布が低かった（図3E）。PYMT.epiVEGF-/-腫瘍における血管構造の全体的な減少について補正する、すなわち、総血管容積で割ると、有意な差は見出されなかった（図3F）。したがって、上皮VEGFの喪失によって、腫瘍の血管構造が顕著に減少し、このことは、異なるサイズの血管に広く影響を及ぼすようである。

#### 【実施例4】

#### 【0335】

CD31、CD34、Tie-1およびTie-2の遺伝子発現が、PYMT.epiVEGF-/-マウスにおいては減少する

CD31、CD34、Tie-1およびTie-2の発現の相対レベルを評価するために、我々は、定量的RT-PCRを使用した。

#### 【0336】

全RNAを固形腫瘍から、Trizol Reagent（Invitrogen Corp、Carlsbad、CA）を使用して製造元の指示に従って単離し、続いて、Turbo DNA-free（Ambion、Inc.、Carlsbad、CA）を用

いたデオキシリボヌクレアーゼ処理、25:24:1のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによる精製およびエタノール沈殿を行った。RNAを、リボヌクレアーゼを含有しない水(Ambion, Inc., Carlsbad, CA)中に再懸濁し、-80で保存した。RNA濃度を、分光光度法による吸光度によって決定した。目的の遺伝子の相対レベルを、各遺伝子について設計したTaqManプロブおよびプライマーのセットを使用して決定し、リアルタイムPCRは、ABI 7500 Real Time PCRシステム(Applied Biosystem, Foster City, CA)を使用して実施した。マウスCD31についてのプライマーおよびプロブのセット: 5'-CTC ATT GCG GTG GTT GTC ATT-3'(順方向)、5'-GTT TGG CCT TGG CTT TCC T-3'(逆方向)、および5'-FAM-TGG TCA TCG CCA CCT TAA TAG TTG CAG C-TAMRA-3'(プロブ)。マウスCD34についてのプライマーおよびプロブのセット: 5'-TTG TGA GGA GTT TAA GAA GGA AA-3'(順方向)、5'-AGA CAC TAG CAC CAG CAT CAG-3'(逆方向)、および5'-FAM-AGC CTC CTC CTT TTC ACA CAG TAT TTG-TAMRA-3'(プロブ)。マウスTie-1についてのプライマーおよびプロブのセット: 5'-CCA GGA AGG CCT ACG TGA AC-3'(順方向)、5'-CCT AGG CCT CCT CAG CTG TG-3'(逆方向)、および5'-FAM-TGT TTG AGA ACT TCA CCT ATG CGG GCA-TAMRA-3'(プロブ)。マウスTie-2についてのプライマーおよびプロブのセット: 5'-CAA CAG TGA TGT CTG GTC CTA TGG-3'(順方向)、5'-GCA CGT CAT GCC GCA GTA-3'(逆方向)、および5'-FAM-TGC TCT GGG AGA TTG TTA GCT TAG GAG GCA C-TAMRA-3'(プロブ)。

#### 【0337】

また、RNA試料を、Whole Mouse Genome 430 2.0アレイにも、60rpmに設定した回転式オープン中、45で19時間ハイブリダイズさせた。アレイを、Affymetrix Fluidicsステーションおよびスキャナー中で洗浄し、染色し、走査した。遺伝子セットの解析を、Genentechに独占所有権のあるソフトウェアを使用して実施した。血管新生関連遺伝子の発現を、各腫瘍RNA試料について、ABI 7500 Real Time PCRシステム(Applied Biosystem, Foster City, CA)を使用して、RT2 Profilerマウス血管新生PCRアレイを使用し、製造元(SuperArray Bioscience, Frederick, MD)の指示に従って解析した。

#### 【0338】

これらの結果から、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍は、CD31、CD34、Tie-1およびTie-2のmRNAレベルの減少を示すことが示されている(図11A~D)。

#### 【0339】

RT-PCRによる定量化では、CD31、CD34、Tie-1およびTie-2が、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍においては、PyMT.VEGF+/+腫瘍と比べて有意に低下し、このことは、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍においては、対照と比べて、内皮細胞が全体的に低下していることを示唆している(図11A~D)。

#### 【実施例5】

#### 【0340】

相対的な血流は、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍における血管構造の低下によって、不利な影響を受けていない

血管の機能を評価するために、我々は、腫瘍の灌流の造影超音波画像法を使用した。

#### 【0341】

10

20

30

40

50

灌流画像法：マウスに、1 L / 秒の流速で医学的空気を用いて送達する2%イソフルランを使用して麻酔を施した。麻酔したマウスを、専用の小型の動物保持システム (Visual Sonics Inc., Toronto, ON, カナダ) 上に仰臥位で置いた。体温および心拍数を、手順の残りの間モニターした (THM150, Indus Instruments, Houston, TX, 米国)。腫瘍領域および頸静脈の周囲の体毛を、体毛除去クリーム (Nair, Church & Dwight Co., Princeton, NJ, 米国) を使用して除去した。超音波用造影剤 (Definity (登録商標), Bristol-Meyers Squibb Medical Imaging, Inc. Billerica, MA, 米国) を、頸静脈穿刺を通して、シリンジポンプ (Harvard Apparatus, Holliston, MA, 米国) を使用して、3  $\mu$ l / 分の一定の注入速度で投与した。振動器 (Sonicare, Koninklijke Philips Electronics, Eindhoven, オランダ) を、チューブライン上で使用して、溶液中に微小気泡が定着するのを阻止した。15 L8-Sプローブを使用するAcuson Sequoia C512システム (Siemens Medical Solutions, Malvern, PA, 米国) を、超音波画像法のために使用した。高調波画像法を、以下のパラメータを使用して実施した：P14 MHz、-10 dB、MI 0.21、34  $\mu$ mの軸方向および横方向の分解能、ならびに20フレーム/秒のフレーム速度。超音波プローブを動物に対して垂直に整列させ、腫瘍の中心を決定した。微小気泡を3  $\mu$ l / 分の一定速度で2分間送達して、定常状態を達成した。定常状態の送達を達成した後に、総数250フレームの超音波データを解析のために獲得した。20フレームの定常状態のデータを得た。次いで、微小気泡を、高出力パルス (MI 1.9、および5フレームのバースト期間) を使用して破壊し、微小気泡が視野内に再度流入するのを、追加の230フレームのデータを獲得することによってモニターした。このプロセスを反復して、腫瘍の中心から $\pm$ 1 mmに位置するさらに2つの平面を獲得した。

画像解析：破壊に続き、微小気泡が視野内に再度流入するのを、Weir Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of micro-bubbles administered as a constant venous infusion, Circulation, 1998; 97: 473~483 が記載している指数方程式を使用してモデル化した。

$$(1) y = A(1 - e^{-kt})$$

式中、Aは画像強度を示し、kは速度定数である。破壊直後のフレームを使用して、バックグラウンドノイズの強度を決定し、それを、再流入のデータからピクセルごとに減じた。Aを、各ピクセルについて、微小気泡を破壊する前の定常状態のフレームからのバックグラウンドを補正した強度の平均として推定した。kを、微小気泡を破壊した後の強度の値の自然対数を取り、再流入期間全体にわたり直線に当てはめることによって決定した。次いで、当てはめた値を使用して、各ピクセルの位置におけるk値の地図を生成した。腫瘍を通る相対的な血流fを、Weir Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of micro-bubbles administered as a constant venous infusion, Circulation, 1998; 97: 473~483 が誘導した以下の式を使用して計算した。

$$(2) f = A$$

【0342】

PyMT.epiVEGF-/-腫瘍を、サイズを一致させたPyMT.VEGF+/-腫瘍と比較したが、相対的な血流の有意な差は示されなかった (図4A~C)。したがって、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍における血管構造の低下にもかかわらず、血液の腫瘍への相対的な送達は、不利な影響を受けていないようである。

## 【実施例6】

## 【0343】

VEGFR1が、PyMT乳腺上皮の腫瘍上で発現する

内皮細胞に加えて、ヒトおよびマウスの両方の乳癌に由来する腫瘍の上皮細胞が、VEGF受容体1(VEGFR1)およびVEGF受容体2(VEGFR2)を発現することが示されている(Price DJら、Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. Cell Growth Differ. 2001; 12: 129~35、Wu Yら、Anti-vascular endothelial growth factor receptor-1 antagonist antibody as a therapeutic agent for cancer. Clin Cancer Res. 2006、12: 6573~6584)。

10

## 【0344】

全ての組織を、4%ホルマリン中に固定し、パラフィンに包埋した。5 $\mu$ m厚さの切片を、脱パラフィンし、4 $\mu$ g/mlのプロテイナーゼK中、37 $^{\circ}$ Cで30分間除タンパクし、以前の記載(例えば、Lu L.H.およびGillett, N.A. An optimized protocol for in situ hybridization using PCR generated  $^{33}$ P-labeled riboprobes. Cell Vision. 1994 1: 169~176、Holcombら、FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. EMBO J. 2000 Aug 1; 19(15): 4046~55を参照されたい)に従って、in situハイブリダイゼーションのためにさらに処理した。 $^{33}$ P-UTPで標識したセンスプローブおよびアンチセンスプローブを、切片に、55 $^{\circ}$ Cで一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしなかったプローブを、20 $\mu$ g/mlリボヌクレアーゼA中、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートすることによって除去し、続いて、高い厳密度の洗浄を、0.1 $\times$ SSC中、55 $^{\circ}$ Cで2時間行い、段階的に濃度の異なるエタノールを通して脱水した。スライドを、NBT2 nuclear track emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY)中に浸し、乾燥剤を含有する密閉したプラスチック製のスライドボックス中、4 $^{\circ}$ Cで4週間露光し、現像し、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて対比染色した。以下のプローブ鋳型を、以下に記載するプライマーを使用して、PCRにより増幅した。マウスのVEGFエクソン3、VEGFR1およびVEGFR2についての上部プライマーおよび下部プライマーは、センス転写物およびアンチセンス転写物を生成するために、T7RNAポリメラーゼプロモーターおよびT3RNAポリメラーゼプロモーターをそれぞれコードする、5'末端に付加させた27ヌクレオチドの伸長部分を有した。マウスVEGFエクソン3のPCRプローブ鋳型: NM\_009505のnt202~394に対応する192nt、上部プライマー: 5'-TGATCAAGTTCATGGACGTCTACC-3'、下部プライマー: 5'-ATGGTGATGTTGCTCTCTGACG-3'。マウスVEGFR1のPCRプローブ鋳型: NM\_010228のnt1570~2191に対応する622nt、上部プライマー: 5'-CAAGCCCACCTCTCTATCC-3'、下部プライマー: 5'-CTTCCCTGTGTATATGTTCC-3'。マウスVEGFR2のPCRプローブ鋳型: NM\_010612のnt318~984に対応する667nt、上部プライマー: 5'-GCCTCTGTGGGTTTGA CTG-3'、下部プライマー: 5'-CTCCGGCAGATAGCTCAATTT-3'。

20

30

40

## 【0345】

PyMT.epiVEGF-/-腫瘍と、サイズを一致させたPyMT.VEGF+/+腫瘍との比較。VEGFR1転写物およびVEGFR2転写物についてのin situ

50

uハイブリダイゼーション (ISH) 解析を、同等のサイズの PyMT・VEGF + / + 腫瘍および PyMT・epiVEGF - / - 腫瘍に対して実施した。対照の PyMT・VEGF + / + 腫瘍においては、VEGFR1 mRNA について中等度の発現が観察され (図 5 A)、一方、PyMT・epiVEGF - / - 腫瘍においては、VEGFR1 mRNA の発現は一般に、より弱く、より変動した (図 5 B)。比較的一様な強い VEGFR2 mRNA の発現が PyMT・VEGF + / + 腫瘍においては見出され (図 5 E)、これは、内皮細胞源と一致し、一方、PyMT・epiVEGF - / - 腫瘍においては、VEGFR2 mRNA の発現は一般に、より弱く、より変動した (図 5 F)。

#### 【実施例 7】

##### 【0346】

上皮の VEGF を欠く乳房腫瘍における VEGFR1 および VEGFR2 の遺伝子プロファイリング

定量的リアルタイム PCR 解析から、PyMT・epiVEGF - / - 腫瘍においては、PyMT・VEGF + / + 腫瘍と比較して、VEGFR1 mRNA (図 6 A) および VEGFR2 mRNA (図 6 B) の mRNA の発現が低いことが示されている。

##### 【0347】

全 RNA を、固形腫瘍から、Trizol Reagent (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) を使用して製造元の指示に従って単離し、続いて、Turbo DNA-free (Ambion, Inc., Carlsbad, CA) を用いたデオキシリボヌクレアーゼ処理、25:24:1 のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによる精製およびエタノール沈殿を行った。RNA を、リボヌクレアーゼを含有しない水 (Ambion, Inc., Carlsbad, CA) 中に再懸濁し、-80 で保存した。RNA 濃度を、分光光度法による吸光度によって決定した。目的の遺伝子の相対レベルを、各遺伝子について設計した TaqMan プロブおよびプライマーのセットを使用して決定し、リアルタイム PCR は、ABI 7500 Real Time PCR システム (Applied Biosystem, Foster City, CA) を使用して実施した。マウス VEGFR1 についてのプライマーおよびプロブのセット: 5' - GTC GGC TGC AGT GTG TAA GT - 3' (順方向)、5' - TGC TGT TCT CAT CCG TTT CT - 3' (逆方向)、および 5' - FAM - CAG GCG ATG AGA CAG AGG CTA CCA - TAMRA - 3' (プロブ)。マウス VEGFR2 についてのプライマーおよびプロブのセット: 5' - TGT CAA GTG GCG GTA AAG G - 3' (順方向)、5' - CAC AAA GCT AAA ATA CTG AGG A CT T - 3' (逆方向)、および 5' - FAM - CTG GTG TTC TTC C TC TAT CTC CAC TCC - TAMRA - 3' (プロブ)。

##### 【0348】

RNA 試料を、Whole Mouse Genome 430 2.0 アレイに、60 rpm に設定した回転式オープン中、45 で 19 時間ハイブリダイズさせた。アレイを、Affymetrix Fluidics ステーションおよびスキャナー中で洗浄し、染色し、走査した。遺伝子セットの解析を、Genentech に独占所有権のあるソフトウェアを使用して実施した。血管新生関連遺伝子の発現を、各腫瘍 RNA 試料について、ABI 7500 Real Time PCR システム (Applied Biosystem, Foster City, CA) を使用して、RT<sup>2</sup> Profiler マウス血管新生 PCR アレイを使用し、製造元 (SuperArray Bioscience, Frederick, MD) の指示に従って解析した。

##### 【0349】

これらの結果から、PyMT・epiVEGF - / - 腫瘍は、VEGFR1 および VEGFR2 の mRNA レベルの減少を示すことが示されている (図 6 A および B)。

#### 【実施例 8】

##### 【0350】

10

20

30

40

50

PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍中の残余の VEGF は、腫瘍形成にとって重要な意味はもたない

PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍中の VEGF タンパク質レベルは、ELISA によって測定した場合、PyMT . VEGF + / + 腫瘍と比較して約 75% 低下しており (図 7A)、このことは、このモデルにおいては、腫瘍上皮細胞が VEGF の主要な供給源であることを実証している。ヒト癌細胞系の異種移植モデルが、浸潤性の間質細胞が腫瘍の発達および成長に顕著に寄与する場合があることが示されている (Gerber ら、Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. Cancer Res. 2000 Nov 15; 60 (22): 6253~8)。

#### 【0351】

切除した腫瘍を、150mM 塩化ナトリウム、1% Triton X-100、1% デオキシコール酸 - ナトリウム塩、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、50mM Tris-HCl、pH7.5、2mM EDTA を含有する RIPA 緩衝液 (Teknova, Inc., Hollister, CA)、または 2mM EDTA を有する 50mM Tris-HCl、pH7.4 のいずれかの中でホモジナイズした。両方の溶解用緩衝液には、Complete (登録商標) Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche, Indianapolis, IN) を補い、-80

で保存した。総タンパク質含有量を、BCA タンパク質アッセイキットを使用して、製造元 (Pierce, Rockford, IL) の指示に従って決定した。マウス VEGF の ELISA を、以前の記載 (Liang ら、Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF) - blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF, J Biol Chem, 2006 Jan 13; 281 (2): 951~61) に従って実施した。全ての組織を、4% ホルマリン中に固定し、パラフィンに包埋した。5µm 厚さの切片を、脱パラフィンし、4µg/ml のプロテイナーゼ K 中、37 で 30 分間除

タンパクし、以前の記載 (例えば、Lu L. H. および Gillett, N. A. An optimized protocol for in situ hybridization using PCR generated <sup>33</sup>P-labeled riboprobe. Cell Vision. 1994 1: 169~176、Holcomb ら、FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. EMBO J. 2000 Aug 1; 19 (15): 4046~55 を参照されたい) に従って、in situ ハイブリダイゼーションのためにさらに処理した。<sup>33</sup>P-UTP で標識したセンスプローブおよびアンチセンスプローブを、切片に、55 で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしなかったプローブを、20µg/ml リボヌクレアーゼ A 中、37 で 30 分間インキュベートすることによって除去し、続いて、高い厳密度の洗浄を、0.1x SSC 中、55 で 2 時間行い、段階的に濃度の異なるエタノールを通して脱水した。スライドを、NBT2 nuclear track emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY) 中に浸し、乾燥剤を含有する密閉したプラスチック製のスライドボックス中、4 で 4 週間露光し、現像し、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて対比染色した。以下のプローブ鋳型を、以下に記載するプライマーを使用して、PCR により増幅した。マウスの VEGF エクソン 3、VEGFR 1 および VEGFR 2 についての上部プライマーおよび下部プライマーは、センス転写物

およびアンチセンス転写物を生成するために、T7 RNA ポリメラーゼプロモーターお

10

20

30

40

50

よび T3 RNAポリメラーゼプロモーターをそれぞれコードする、5'末端に付加させた27ヌクレオチドの伸長部分を有した。マウス VEGF エクソン3のPCRプローブ鋳型：NM\_009505のnt202~394に対応する192nt、上部プライマー：5'-TGATCAAGTTCATGGACGTCCTACC-3'、下部プライマー：5'-ATGGTGATGTTGCTCTCTGA CG-3'。

#### 【0352】

PyMT乳房腫瘍におけるVEGFの発現の局在化を調べるために、*in situ*ハイブリダイゼーション解析を、同等のサイズの腫瘍に対して、VEGFのエクソン3に特異的なリボプローブを使用して実施した。マウス1匹当たりの累積腫瘍数を、個々マウスについて、1週当たりの腫瘍小結節の数を加算することによって決定した。腫瘍体積を、式： $L \times W \times W / 2 = \text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)}$  ( $L = \text{mm}$ で示す長径(長さ)； $W = \text{mm}$ で示す短径(幅))を使用して計算した(Blaskovich MAら、(2000) Design of GFB-111, a platelet-derived growth factor binding molecule with antiangiogenic and anticancer activity against human tumors in mice. Nat Biotechnol 18:1065~1070)。マウス1匹当たりの累積腫瘍体積を、個々マウスについて、各腫瘍小結節の体積を加算することによって決定した。

10

#### 【0353】

PyMT.VEGF+/+腫瘍においては、VEGFの発現は、腫瘍全体を通して広く分布し、最も高い発現が壊死性領域付近で生じた(図7B)。対照的に、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍においては、VEGFの発現は、壊死性帯域周辺では、著しく弱く、上方制御の証拠を欠いた(図7C)。これらの結果から、平滑筋アクチン染色(データ未公開)と併せて、VEGFの間質における産生の増加または動員が、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍が形成され、成長する機構である可能性は低いことが示唆されている。触診可能な腫瘍の発生(図8A)および累積腫瘍体積の平均(図8B)の有意な遅延が、抗VEGF抗体を用いて治療したPyMT.VEGF+/+マウスにおいて観察された。治療の効果は、PyMT.epiVEGF-/-マウスにおいては見出されなかった。これらの結果から、PyMT.epiVEGF-/-マウスにおいては、腫瘍成長は、これらの腫瘍中に存在する残余のVEGFに依存しないことが示唆されている(図7A~G)。

20

30

#### 【実施例9】

#### 【0354】

上皮のVEGFを欠く乳房腫瘍の遺伝子プロファイリング

PyMT.epiVEGF-/-の腫瘍形成に関する因子の同定を目指して、サイズを一致させたPyMT.VEGF+/+腫瘍およびPyMT.epiVEGF-/-腫瘍の遺伝子発現プロファイリングを、Affymetrixマイクロアレイチップ解析およびSuperArray RT<sup>2</sup> Profilerマウス血管新生PCRアレイを使用して実施した(データ未公開)。候補遺伝子であるPLGF、IL-1、PDGFCならびに走化性因子のS100A8およびS100A9を、定量的RT-PCR解析によっ

40

#### 【0355】

全RNAを固形腫瘍から、Trizol Reagent (Invitrogen Corp、Carlsbad、CA)を使用して製造元の指示に従って単離し、続いて、Turbo DNA-free (Ambion、Inc.、Carlsbad、CA)を用いたデオキシリボヌクレアーゼ処理、25:24:1のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによる精製およびエタノール沈殿を行った。RNAを、リボヌクレアーゼを含有しない水(Ambion、Inc.、Carlsbad、CA)中に再懸濁し、-80で保存した。RNA濃度を、分光光度法による吸光度によって決定した。

#### 【0356】

50

目的の遺伝子の相対レベルを、各遺伝子について設計したTaqManプローブおよびプライマーのセットを使用して決定し、リアルタイムPCRは、ABI 7500 Real Time PCRシステム(Applied Biosystem、Foster City、CA)を使用して実施した。マウスPLGFについてのプライマーおよびプローブのセット：5'-GCA GTA GCC CGT GGA CTT TG-3' (順方向)、5'-GGC TCA CTT CCC GTA GCT GTA-3' (逆方向)、および5'-FAM-TGG GTT GTG TGT CTT C-TAMRA-3' (プローブ)。マウスIL-1についてのプライマーおよびプローブのセット：5'-ACA TTA GGC AGC ACT CTC TAG AAC-3' (順方向)、5'-GTG CAG GCT ATG ACC AAT TC-3' (逆方向)、および5'-FAM-CCC CAC ACG TTG ACA GCT AGG TTC T-TAMRA-3' (プローブ)。マウスS100A8についてのプライマーおよびプローブのセット：5'-TGT CCT CAG TTT GTG CAG AAT ATA AA-3' (順方向)、5'-TCA CCA TCG CAA GGA ACT CC-3' (逆方向)、および5'-FAM-CGA AAA CTT GTT CAG AGA ATT GGA CAT CAA TAG TGA-TAMRA-3' (プローブ)。マウスS100A9についてのプライマーおよびプローブのセット：5'-GGT GGA AGC ACA GTT GGC A-3' (順方向)、5'-GTG TCC AGG TCC TCC ATG ATG-3' (逆方向)、および5'-FAM-TGA AGA AAG AGA AGA GAA ATG AAG CCC TCA TAA ATG-TAMRA-3' (プローブ)。マウスPDGFCについてのプライマーおよびプローブのセット：5'-CTT TAA ACT CTG CTC CAT ACA CTT G-3' (順方向)、5'-CAG ATT AAG CAT TTA CAA GCA ATG-3' (逆方向)、および5'-FAM-TTG CAA TTG CCA AAG AGT ATA ATA AGT GAA CTC C-TAMRA-3' (プローブ)。マウスGAPDHについてのプライマーおよびプローブのセット：5'-GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA-3' (順方向)、5'-CTG TTG CTG TAG CCG TAT TCA-3' (逆方向)、および5'-FAM-TGT CAT ACC AGG AAA TGA GCT TGA CAA AG-TAMRA-3' (プローブ)。マウスアクチンについてのプライマーおよびプローブのセット：5'-AGA TTA CTG CTC TGG CTC CTA-3' (順方向)、5'-CAA AGA AAG GGT GTA AAA CG-3' (逆方向)、および5'-FAM-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT TGC TG-TAMRA-3' (プローブ)。

#### 【0357】

RNA試料をWhole Mouse Genome 430 2.0アレイに、60rpmに設定した回転式オープン中、45で19時間ハイブリダイズさせた。アレイをAffymetrix Fluidicsステーションおよびスキャナー中で洗浄し、染色し、走査した。遺伝子セットの解析を、Genentechに独占所有権のあるソフトウェアを使用して実施した。血管新生関連遺伝子の発現を各腫瘍RNA試料について、ABI 7500 Real Time PCRシステム(Applied Biosystem、Foster City、CA)を使用して、RT<sup>2</sup> Profilerマウス血管新生PCRアレイを使用し、製造元(SuperArray Bioscience、Frederick、MD)の指示に従って解析した。

#### 【0358】

これらの結果から、PyMT.epiVEGF-/-腫瘍は、PLGF(図9A)、IL-1(図9B)、S100A8(図9C)およびS100A9(図9D)のmRNAレベルの増加を示すことが示されている。PyMT.epiVEGF-/-腫瘍においては、PDGFCのmRNAレベル(図9E)は低下している。

#### 【実施例10】

10

20

30

40

50

## 【0359】

上皮の VEGF を欠く乳房腫瘍のタンパク質プロファイリング

PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍中の血管新生因子および炎症性因子のタンパク質発現レベルを調べた。

## 【0360】

増殖因子およびサイトカインについての ELISA アッセイ：切除した腫瘍を、150 mM 塩化ナトリウム、1% Triton X-100、1% デオキシコール酸 - ナトリウム塩、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、50 mM Tris-HCl、pH 7.5、2 mM EDTA を含有する RIPA 緩衝液 (Teknova, Inc., Hollister, CA)、または 2 mM EDTA を有する 50 mM Tris-HCl、pH 7.4 のいずれかの中でホモジナイズした。両方の溶解用緩衝液には、Complete (登録商標) Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche, Indianapolis, IN) を補い、-80 で保存した。総タンパク質含有量を、BCA タンパク質アッセイキットを使用して、製造元 (Pierce, Rockford, IL) の指示に従って決定した。マウス VEGF の ELISA を、以前の記載 (Liang ら、Cross-species vascular endothelial growth factor (VEGF) - blocking antibodies completely inhibit the growth of human tumor xenografts and measure the contribution of stromal VEGF, J Biol Chem、2006 Jan 13; 281(2): 951~61) に従って実施した。IL-1 レベルを、BEADLYTE (登録商標) Mouse Multi-Cytokine Detection System 2 を使用して、LUMINEX (登録商標) 100 (商標) System 上で、製造元 (Upstate USA, Inc., Chicago, IL) の指示に従って決定した。PLGF レベルを、Quantikine Mouse PLGF-2 Immunoassay を使用して、製造元 (R&D Systems, Minneapolis, MN) の指示に従って決定した。

10

20

## 【0361】

mRNA の変化と一致して、PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍の可溶化液は、PyMT . VEGF + / + 腫瘍と比べて、PLGF (図 10A) および IL-1 (図 10B) のタンパク質レベルがより高かった。さらに、肝細胞増殖因子 (HGF) のレベルも、PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍可溶化液中では、対照腫瘍と比べて増加していた (図 10C)。

30

## 【0362】

本明細書によって、当業者であれば本発明を十分に実行することができるものとみなされる。本発明の種々の改変形態が、本明細書において示し、記載するものに加えて、前述の説明から当業者には明らかになり、それらは、添付の特許請求の範囲に属する。本明細書に引用する刊行物、特許および特許出願は全て、全ての目的で、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれている。

40

## 【実施例 11】

## 【0363】

細胞遊走アッセイ

この研究は、PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍の成長および遊走におけるサイトカインおよび増殖因子の役割のさらなる調査を試みる。

## 【0364】

KO . 1、KO . 2、KO . 3 および KO . 4 と呼ぶ初代上皮細胞を、PyMT . epi VEGF - / - 腫瘍から単離した。WT . 1、WT . 2、WT . 3、WT . 4 および WT . 5 と呼ぶ初代上皮細胞を、PyMT . epi VEGF + / + 腫瘍から単離した。WT . c は、PyMT . VEGF + / + . loxP 腫瘍から生み出した細胞系に由来する上皮細胞である。KO . c は、PyMT . VEGF + / + . loxP 腫瘍から生み出した細胞

50

系に由来する上皮細胞であり、VEGFが、*in vitro*において、Cre-リコンビナーゼを発現するアデノウイルス(Adeno-Cre)に感染させることによってノックアウトされていた。上皮特異的Cre-loxP組換えを、抗Creリコンビナーゼ抗体を用いた免疫細胞化学によって確認した。KO.c細胞系においては、VEGFの発現レベルは、ELISAによって検出可能ではなかった。

#### 【0365】

遊走アッセイを、BD Falcon(商標)FluoroBlok(商標)24-Multiwell Insert System、8 $\mu$ mポアサイズ(BD Biosciences、Bedford、MA)を使用して実施した。プレートを、5 $\mu$ g/mlフィブロネクチン(Sigma)を用いて、37 $^{\circ}$ Cで2時間コートした。300 $\mu$ lのアッセイ用培地(0.5%FBS、DMEM/F12)中の細胞を上部チャンバーに添加した。750 $\mu$ lのアッセイ用培地中のHGF40ng/mlを、下部チャンバーに添加し、細胞を、37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートした。下部表面上の細胞をMeOH中に固定し、YO-PRO-1(Molecular Probes、Eugene、Oregon)を用いて染色した。画像を獲得し、ImageExpress Microプラットフォーム(MDS Analytical; Sunnyvale、CA)を使用して解析した。MetamorphのCount Nucleiアプリケーションを使用して、遊走した細胞を同定し、数えた。

10

#### 【0366】

PyMT.epiVEGF+/+マウス由来の原発性腫瘍については、HGFに対する遊走応答の増加の平均は1.8であった。PyMT.epiVEGF-/-マウス由来の原発性腫瘍については、HGFに対する遊走応答の増加の平均は2.5であった。誘導倍率の差は、統計学的に有意( $P < 0.05$ )である。KO.c細胞系およびWT.c細胞系は、上記の原発性腫瘍細胞の場合に類似する、HGFに対する遊走応答の増加を示す。すなわち、KO.c由来の細胞については、WT.c由来の細胞と比べてベースラインの遊走がより低く、HGF処置による遊走の増加倍率がより高い(2.3対1.5)(図12)。

20

#### 【0367】

これらの結果から、VEGFシグナル伝達が奪われた腫瘍細胞は、おそらく、これらの腫瘍細胞が生存、成長および遊走するためにその他の因子に依存しなければならないことから、HGF等のその他の因子に対する応答性が高まることが示されている。したがって、VEGF非依存性である腫瘍は、例えば、HGF-cMet経路を遮断するアンタゴニストを使用する療法に対する感度が高まる。

30

【 図 1 】

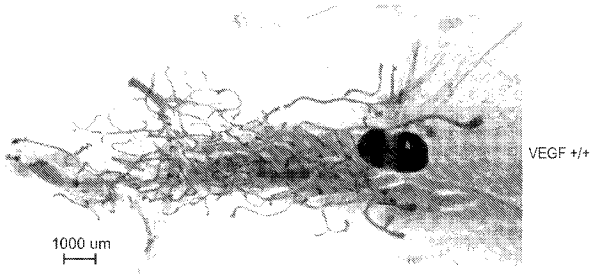


FIG. 1A

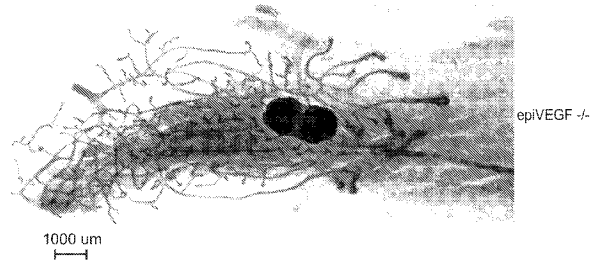


FIG. 1B

【 図 2 A - B 】

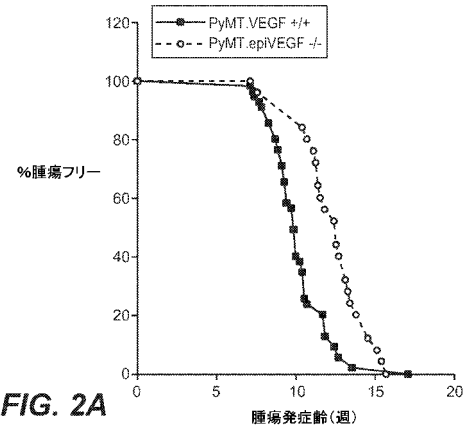


FIG. 2A

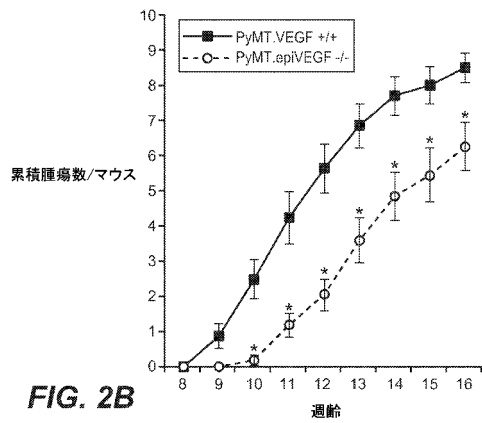


FIG. 2B

【 図 2 C - D 】

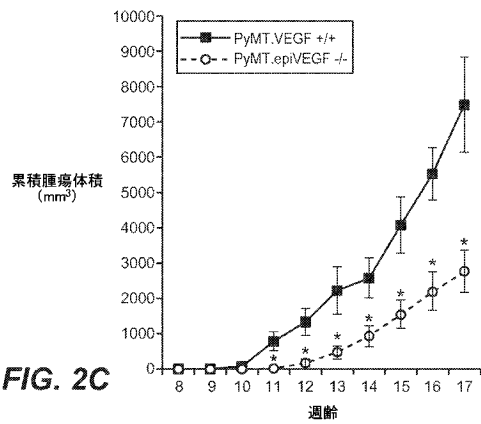
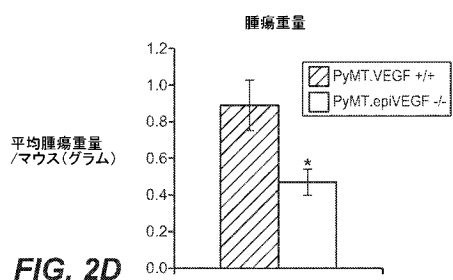
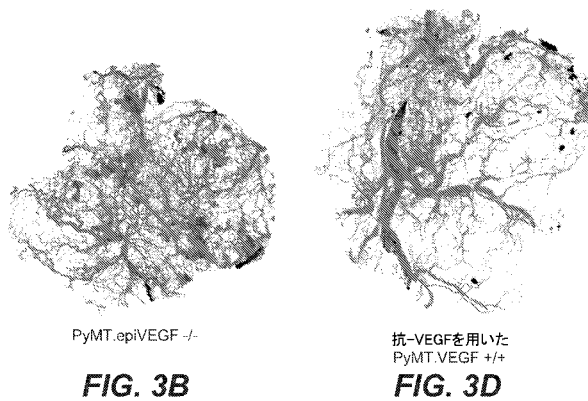
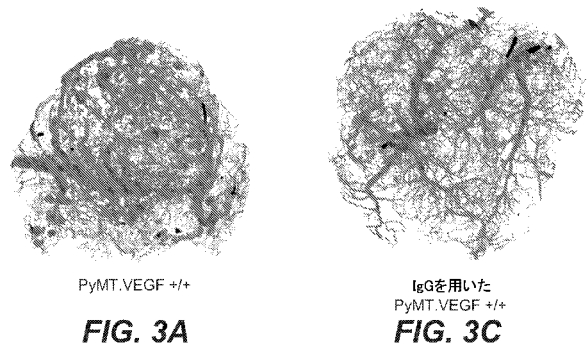


FIG. 2C



【 図 3 A - D 】



【 図 3 E 】

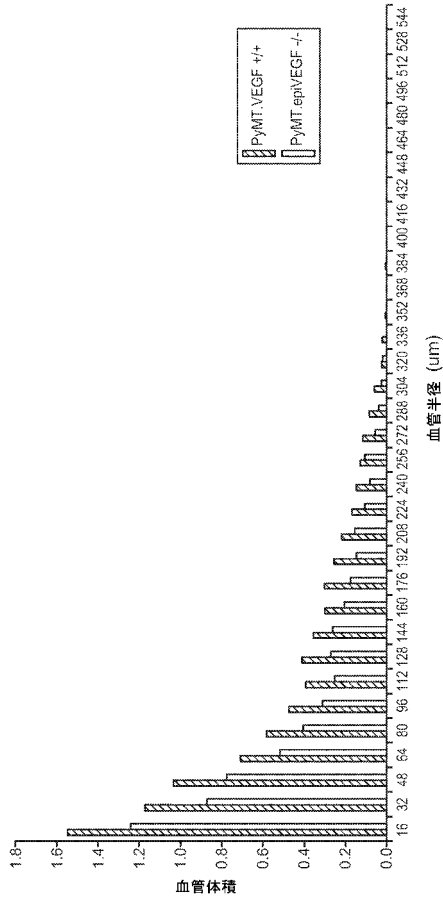


FIG. 3E

【 図 3 F 】

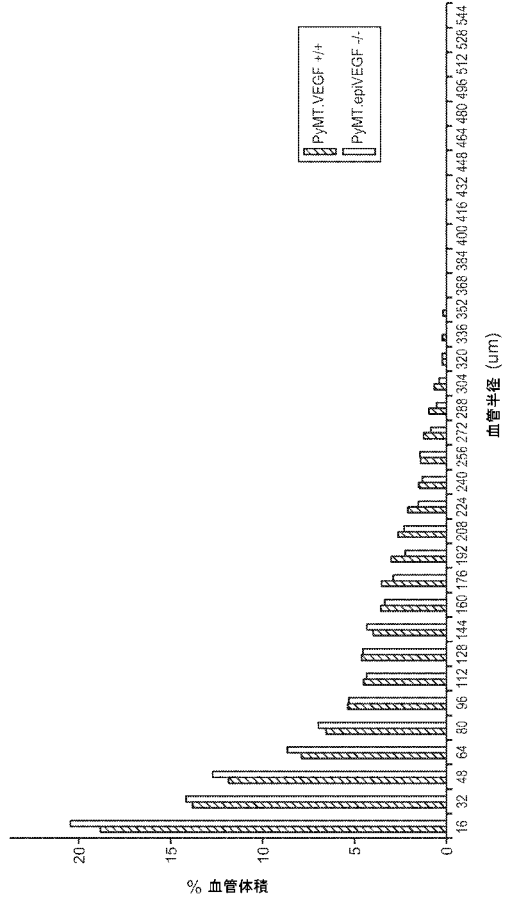


FIG. 3F

【 図 4 A - C 】

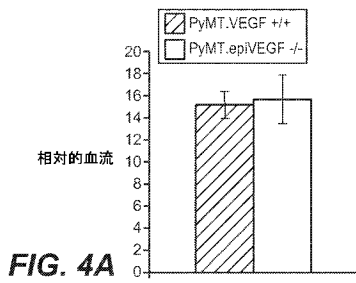
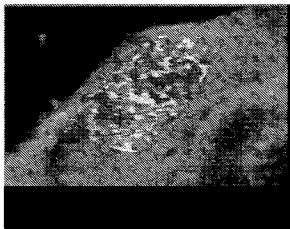
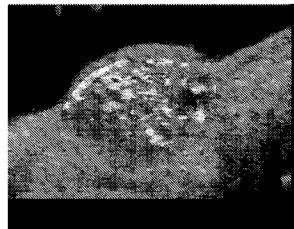


FIG. 4A



PyMT.VEGF +/-  
FIG. 4B



PyMT.epiVEGF -/  
FIG. 4C

【 図 5 A - D 】

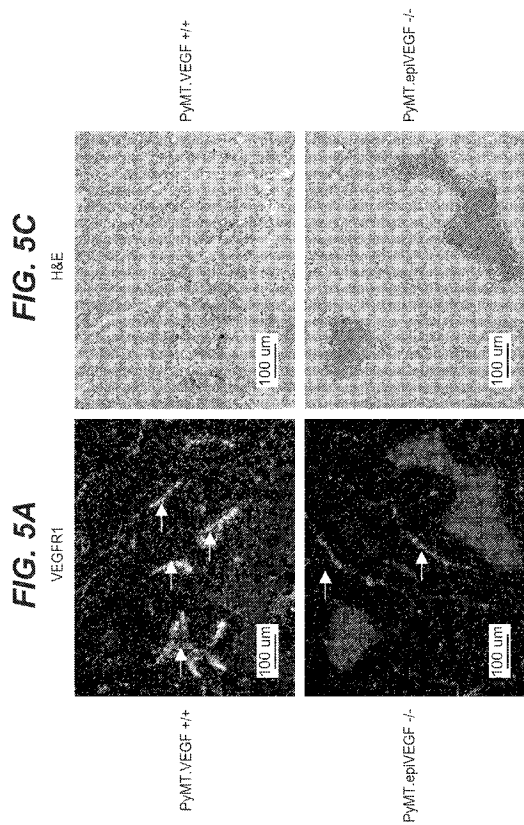


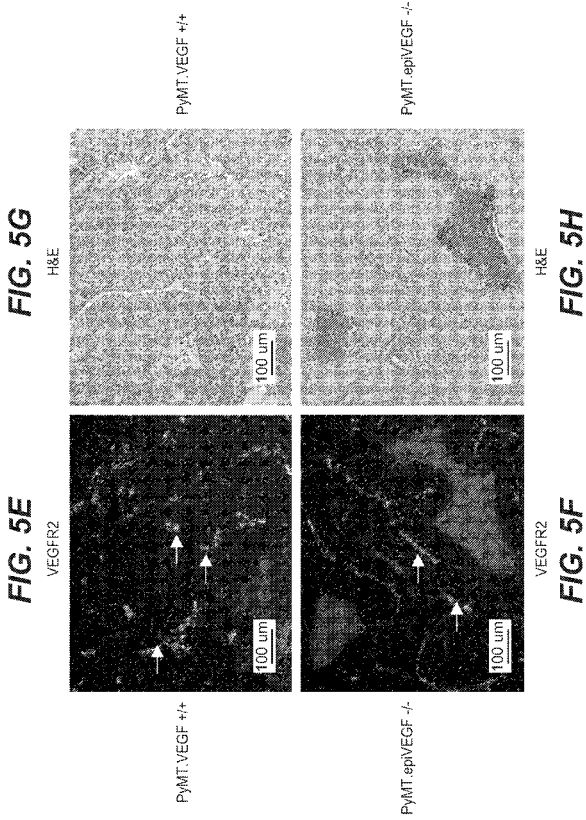
FIG. 5C  
H&E

FIG. 5D  
H&E

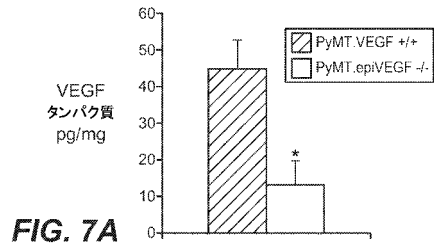
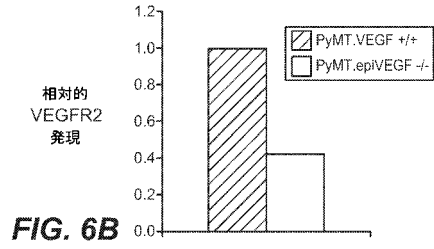
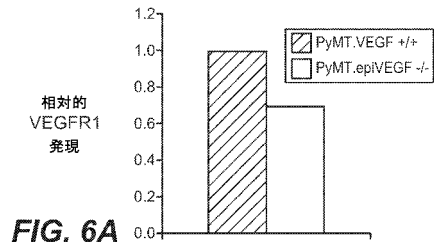
FIG. 5A  
VEGFR1

FIG. 5B  
VEGFR1

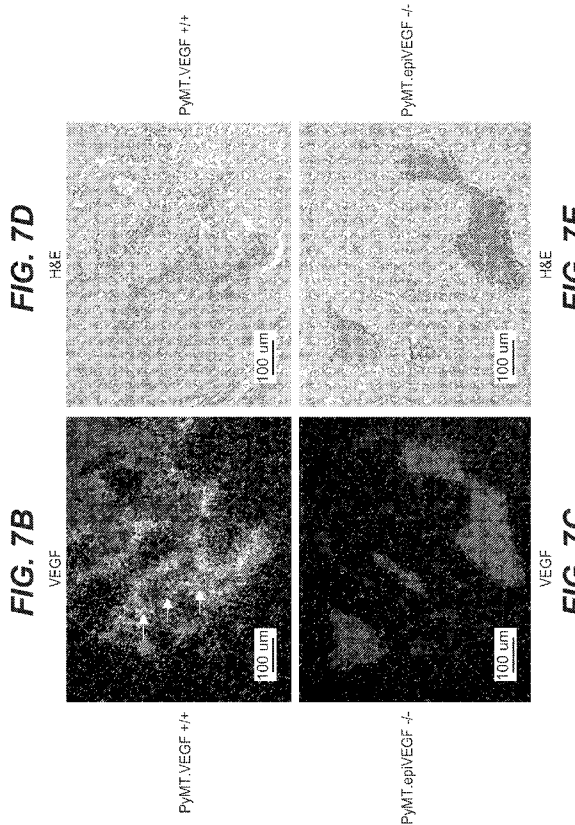
【 図 5 E - H 】



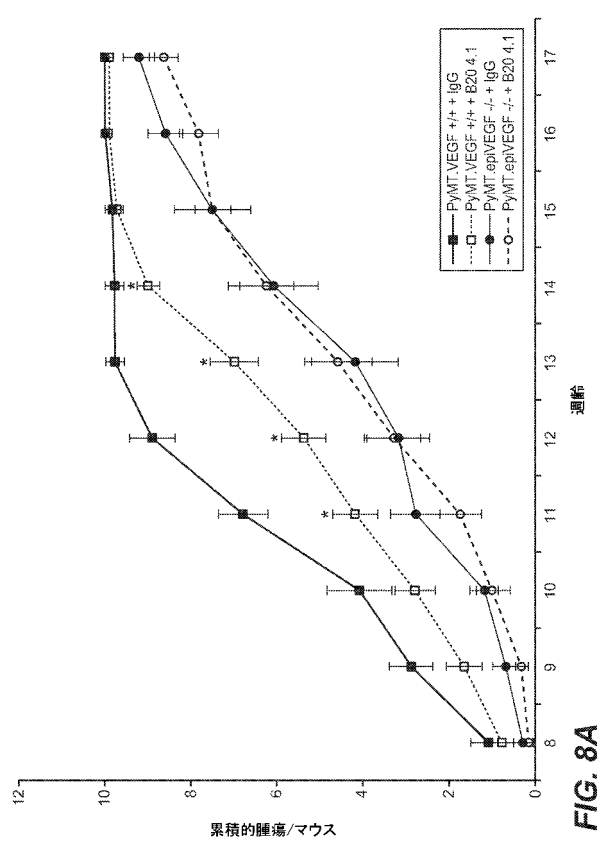
【 図 6 A - 7 A 】



【 図 7 B - E 】



【 図 8 A 】



【 図 8 B 】

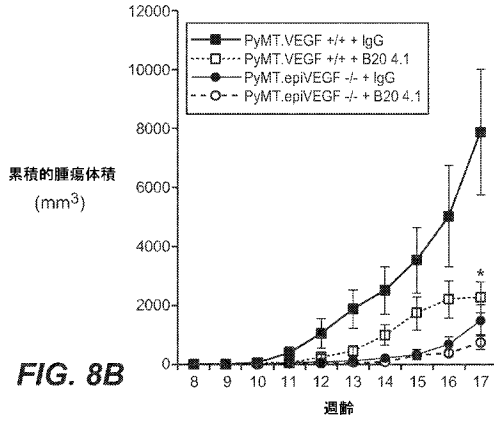


FIG. 8B

【 図 9 A 】

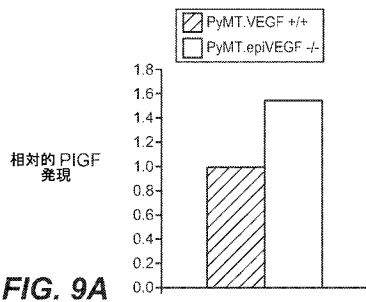


FIG. 9A

【 図 9 B - E 】

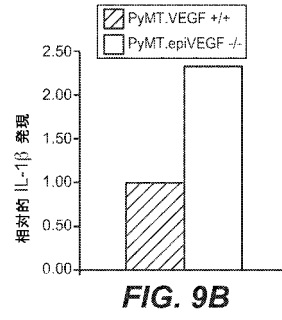


FIG. 9B

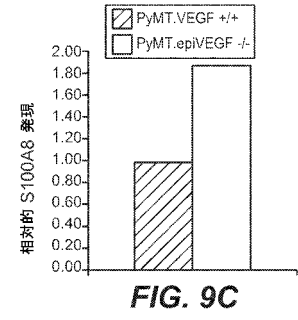


FIG. 9C

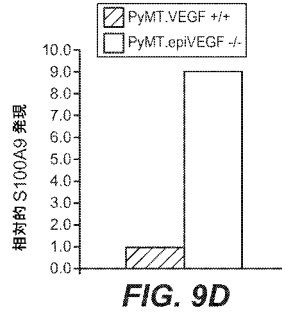


FIG. 9D

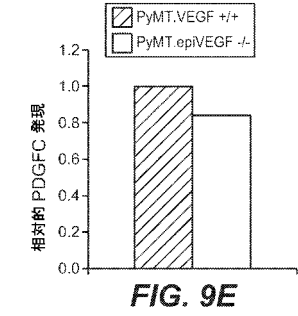


FIG. 9E

【 図 10 A - C 】

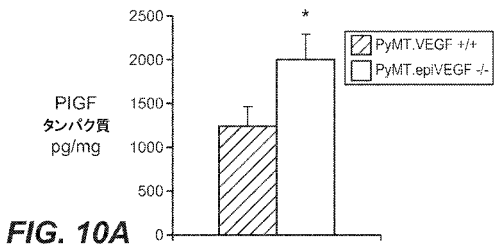


FIG. 10A

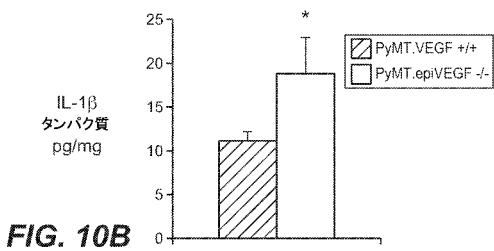


FIG. 10B

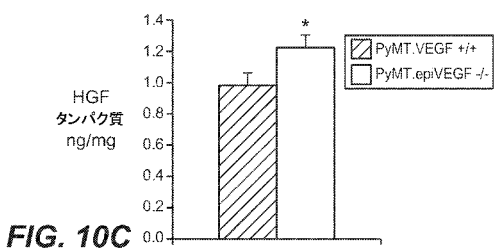


FIG. 10C

【 図 11 A - D 】

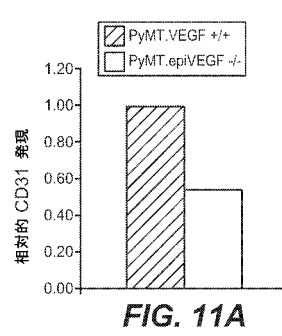


FIG. 11A

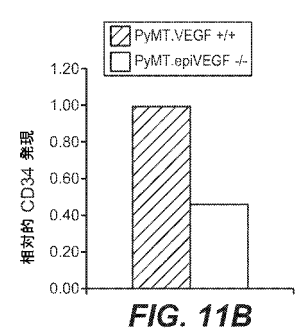


FIG. 11B

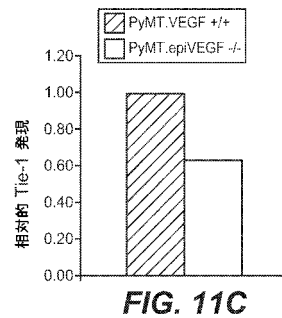


FIG. 11C

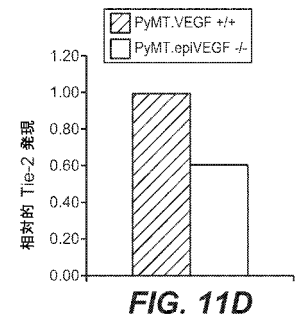


FIG. 11D

【 図 1 2 】

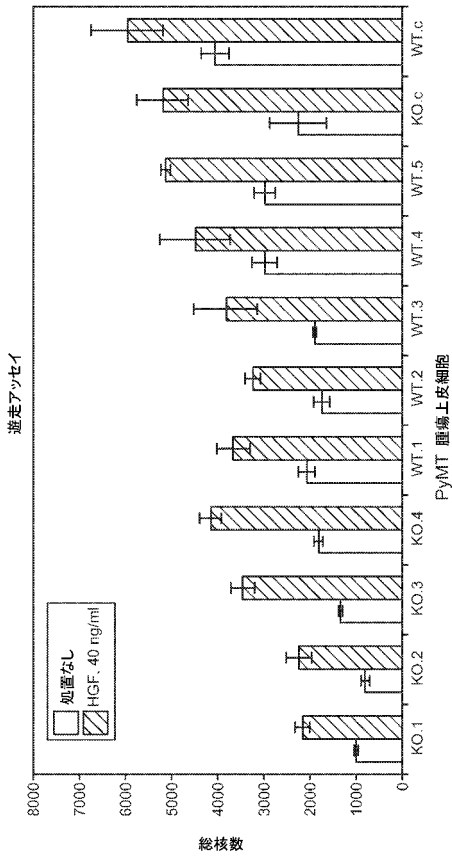


FIG. 12

【 配 列 表 】

201250118800001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2009/055434
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
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, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/115045 A2 (GENENTECH INC [US]; BALDWIN MEGAN [US]; FERRARA NAPOLEONE [US]; GERBER) 11 October 2007 (2007-10-11) paragraphs [0013], [0043], [0044], [0058], [0060] - [0063], [0124], [0131], [0136], [0141], [0149] - [0151], [0157]	1-45
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *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 <b>19 March 2010</b>		Date of mailing of the international search report <b>30/03/2010</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <b>Helliot, Bertrand</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/055434

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2009/055434**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US2009 /055434

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. claims: 1-6, 10-13, 15-38, 42-45(all partially)

- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression levels of one or more genes in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression levels of one or more genes in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject, wherein at least one gene is S100A8.
- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression levels of PIGF, IL-1beta, S100A8, S100A9, Tie-1, Tie-2 and PDGFC genes in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression levels of these genes in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.
- A method of treating a VEGF-independent tumor in a subject comprising administering to the subject an effective amount of S100A8-antagonist.

## 2. claims: 1-6, 10-13, 25-38, 42-45(all partially)

- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression level of S100A9 gene in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression level in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.
- A method of treating a VEGF-independent tumor in a subject comprising administering to the subject an effective amount of S100A9-antagonist.

## 3. claims: 1-4, 6-13, 25-33(all partially)

- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression level of Tie-1 gene in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression level in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.

## 4. claims: 1-4, 6-13, 25-33(all partially)

- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression level of Tie-2 gene in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression level in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.

International Application No. PCT/US2009/055434

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 5. claims: 1-4, 6-7, 10-13, 28-33(all partially)

---  
- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression level of PDGFC gene in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression level in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.  
---

## 6. claims: 14, 41(completely); 1-4, 6, 10-13, 25-38, 42-45(partially)

---  
- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression level of HGF gene in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression level in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.  
- A method of treating a VEGF-independent tumor in a subject comprising administering to the subject an effective amount of HGF-antagonist.  
---

## 7. claims: 39(completely); 15-19, 21-38, 42-45(partially)

---  
- A method of detecting a VEGF-independent tumor in a subject, said method comprising determining expression levels of PIGF, IL-1beta and HGF genes in a test sample obtained from the subject, wherein changes in the expression levels of these genes in the test sample compared to a reference sample indicate the presence of VEGF-independent tumor in the subject.  
- A method of treating a VEGF-independent tumor in a subject comprising administering to the subject an effective amount of PIGF-antagonist or IL-1beta-antagonist.  
---

## 8. claims: 40(completely); 34-38, 42-45(partially)

---  
- A method of treating a VEGF-independent tumor in a subject comprising administering to the subject an effective amount of c-Met-antagonist.  
---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/055434

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007115045 A2	11-10-2007	AR 060228 A1	04-06-2008
		AU 2007233237 A1	11-10-2007
		CA 2647430 A1	11-10-2007
		CL 8762007 A1	08-02-2008
		CN 101448856 A	03-06-2009
		EP 1999151 A2	10-12-2008
		JP 2009531463 T	03-09-2009
		KR 20080106946 A	09-12-2008
		US 2007264193 A1	15-11-2007
		ZA 200807590 A	25-11-2009

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K	16/24	

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

(72) 発明者 フィルヴァロフ, エレン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 2 1, サン フランシスコ, 1 8 番 アヴェニュー  
 5 3 8

(72) 発明者 ウィリス, ブランドン  
 アメリカ合衆国 コロラド 8 0 3 0 4, ブルダール, ユニット ジェイ, ララミー ブール  
 ヴァード 7 5 0

F ターム(参考) 2G045 AA26 DA14  
 4B024 AA01 AA12 BA21 BA56 CA02 CA04 CA09 DA02 HA12 HA15  
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ58 QQ79 QR08 QR32 QR55 QR62 QS25  
 QS33 QS34  
 4C084 AA17 AA20 MA02 NA14 ZB261 ZC751  
 4C085 AA14 BB01 BB17 EE01 EE03  
 4H045 AA11 AA30 CA40 DA01 DA75 EA22 EA51 FA72 FA74

专利名称(译)	针对VEGF非依赖性肿瘤的诊断剂和治疗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2012501188A</a>	公开(公告)日	2012-01-19
申请号	JP2011525256	申请日	2009-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ファーララナポレオン フィルヴァロフエレン ウィリスブランドン		
发明人	ファーララ, ナポレオン フィルヴァロフ, エレン ウィリス, ブランドン		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395 C12N15/09 C07K14/52 C07K16/24		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/50.P G01N33/53.D G01N37/00.102 A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395.N C12N15/00.A C07K14/52 C07K16/24		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/DA14 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ58 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB17 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	61/093161 2008-08-29 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了诊断或鉴定VEGF非依赖性肿瘤的方法和治疗VEGF非依赖性肿瘤的方法。 [选择图]无

染色パターン	スコア
細胞内で染色は観察されない	0
10%より多くの細胞内でかすかに/わずかに認識できる 染色が検出される	1+
10%より多くの細胞内で弱い~中程度の染色が観察される	2+
10%より多くの細胞内で中程度~強い染色が観察される	3+