

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4806469号
(P4806469)

(45) 発行日 平成23年11月2日(2011.11.2)

(24) 登録日 平成23年8月19日(2011.8.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/28	Z N A
C07K 16/40	(2006.01)	C07K 16/40	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00	1 O 2
G01N 33/574	(2006.01)	G01N 33/574	A
G01N 33/577	(2006.01)	G01N 33/577	B

請求項の数 16 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-522103 (P2010-522103)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月25日 (2008.8.25)
 (65) 公表番号 特表2010-536886 (P2010-536886A)
 (43) 公表日 平成22年12月2日 (2010.12.2)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/074249
 (87) 國際公開番号 WO2009/029591
 (87) 國際公開日 平成21年3月5日 (2009.3.5)
 審査請求日 平成23年1月27日 (2011.1.27)
 (31) 優先権主張番号 11/845,023
 (32) 優先日 平成19年8月24日 (2007.8.24)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-7680

早期審査対象出願

(73) 特許権者 505298467
 ヴァン アンデル リサーチ インスティ
 テュート
 アメリカ合衆国 ミシガン 49503,
 グランド ラピッズ, エヌイー, ボ
 ストゥイック アベニュー 333
 (73) 特許権者 506139369
 フレッド ハッチンソン キャンサー リ
 サーチ センター
 アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル
 フェアビュー アベニュー ノース 1
 100
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ホルマリン固定およびパラフィン包埋された組織においてMetを結合するモノクローナル抗体
および関連する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

American Type Culture Collectionに受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞株により生成されたモノクローナル抗体であつて、cMet肝細胞成長因子受容体(Met)に結合するモノクローナル抗体(Met-特異的mAb)、または該Met-特異的mAbの抗原結合フラグメント。

【請求項2】

配列番号：1のアミノ酸236-239でcMet肝細胞成長因子受容体(Met)に結合する、単離されたMet-特異的モノクローナル抗体(mAb)、または該Met-特異的mAbの抗原結合フラグメント。

10

【請求項3】

(a) 請求項1または2に記載のMet-特異的mAbまたはその抗原結合フラグメント、および

(b) 診断的に許容される担体または賦形剤
を含む組成物。

【請求項4】

前記Met-特異的mAbまたはその抗原結合フラグメントは、検出可能な部分に連結されている、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

(a) 請求項1または2に記載のMet-特異的mAbまたはその抗原結合フラグメント

20

を含む第1容器；(b)該M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントのための担体を含む第2容器；および(c)該M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントを使用して、試料中のM e tを検出または測定するため、あるいはM e t - 関連疾患を診断するための説明書；を含むキット。

【請求項6】

前記M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントが検出可能な部分に連結されている、請求項5に記載のキット。

【請求項7】

前記M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントに特異的であり、そして該M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントに結合する、第2抗体またはその抗原結合フラグメントをさらに含む、請求項5に記載のキット。 10

【請求項8】

前記第2抗体が検出可能な部分で標識される、請求項7に記載のキット。

【請求項9】

対象由来の組織試料または別の生物学的試料中のM e tの存在を検出するための方法であって、

(a)該試料を請求項3に記載の組成物と接触させる工程；および(b)該試料へのM e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントの結合を検出する工程であって、該M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントの結合は、該試料中でのM e tの存在を示す、工程 20

を含む、方法。

【請求項10】

前記試料が、前記接触させる工程(a)の前に、ホルムアルデヒドを用いた処理により固定されている、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

対象における、増加したM e t発現を有する癌の診断を補助する方法であって、

(a)該対象由来の、M e tを発現することが疑われる組織試料または他の生物学的試料を、請求項3に記載の組成物と接触させる工程；

(b)M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントの該試料への結合を、検出または測定し、それによって該試料中のM e tの存在またはレベルを判定する工程；ならびに 30

(c)(b)において判定されたM e tのレベルを、変化したM e t発現を有する疾患有さない健常な対象由来の対応する対照試料におけるM e tのレベルと比較する工程；を含み、ここで

(i)該対照試料におけるM e tの非存在と比較した、工程(b)において判定されたM e tの存在、または

(ii)該対照試料におけるM e tのレベルと比較した、工程(b)において判定されたM e tの増加したレベル

は、増加したM e t発現を有する癌の兆候を示す、方法。

【請求項12】

前記試料が、前記接触させる工程(a)の前に、ホルムアルデヒドを用いた処理により固定されている、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

American Type Culture Collectionに受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞株。

【請求項14】

前記M e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメントが検出可能な部分に連結されている、請求項1または2に記載のM e t - 特異的m A bまたはその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

10

20

30

40

50

前記 M e t - 特異的 m A b またはその抗原結合フラグメントが検出可能な部分に連結されている、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 16】

前記試料が、前記接触させる工程(a)の前に、ホルムアルデヒドを用いた処理により固定されている、請求項 15 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は分子診断および医薬の分野である。

【背景技術】

【0002】

c - M e t 受容体キナーゼは発達および恒常性維持の間の細胞増殖、遊走、分化および分枝形態形成を調節する^{1 - 3}。M e t はまた種々のヒト原発性固形腫瘍およびその転移物の細胞表面上でも発現される(<http://www.vai.org/met/>)。ヒト M e t の細胞外ドメインのアミノ酸配列を配列番号: 1、アミノ酸 25 - 567 にて提供する。その活性化状態では、M e t 受容体が複数のシグナル伝達経路を通して癌細胞の成長、浸潤および転移を制御する⁴。いくつかの癌細胞系では、サイレンシングによる M e t 発現の喪失がアポトーシスを促進し、M e t が生存に必要であることを実証している^{5 - 7}。M e t 活性はキナーゼまたは膜近傍ドメインにおける変異により^{8 - 11}、過剰発現により^{12, 13}、またはそのリガンド、肝細胞成長因子(HGF/SF)への結合により^{14, 15}増大する。リガンド非依存性 M e t 活性化を刺激する、生殖系列における M e t の活性化変異は遺伝性乳頭状腎細胞癌の発達の原因である¹⁰。癌細胞では、変異 M e t アレルの選択的な増幅が全体的な M e t キナーゼ活性をさらに増強する¹⁶。M e t 発現の大きさにより多くの癌型の侵襲性が予測される(<http://www.vai.org/met/>)。M e t タンパク質発現の正確な検出および定量が、M e t 阻害剤に応答する可能性のある癌を同定するために必要であり、そしてかかる分子診断の開発は薬物開発に大きく遅れを取る。

【0003】

c - M e t の高レベル発現は、乳房、胃、子宮頸部、肝細胞ならびに頭頸部を含む多くの癌型における芳しくない予後に関連している^{17 - 22}。卵巣癌のおよそ 25% および神経膠腫の 11% が高レベルの c - M e t を発現する。乳癌では、H e r 2 に非依存性の癌のサブセットにおいて c - M e t 発現が観察されるが、細胞増殖の増大に関連する²³、²⁴。乳管癌では、シンデカン-1、E - カドヘリンおよび c - M e t の同時発現が血管新生およびリンパ脈管新生を増強する²⁵。c - M e t 発現に関連する任意の疾患を本明細書では「M e t - 関連疾患」と称する。しかしながら免疫組織化学研究の信頼性は、たいていの研究で用いられている、c - M e t 受容体における C 末端ペプチドに対して上昇させた抗血清のロット間変動性に鑑みて疑問視されている²⁶。たいていの市販により入手可能な M e t 抗体は信頼できない(またはその信頼性に関して厳密に試験されていない)。c - M e t 発現の増大に加えて、腫瘍微小環境における HGF / SF 濃度の上昇もまた悪性の転帰に関連している。例えば膵臓癌における低酸素性腫瘍間質細胞は HGF 分泌を増大させ、そして膵臓癌進行を加速させる²⁷。

【0004】

操作された c - M e t および HGF 発現を伴う間葉細胞系は高度に転移性であり、そして細胞系における変異体 c - M e t 受容体の発現または c - M e t 遺伝子座の増幅は癌の増殖性、浸潤性および転移性表現型を増大させる^{6, 28 - 30}。野生型 c - M e t は M y c と一緒に乳房の発癌を引き起こす³¹。c - M e t は進行したヒト癌において最も頻繁に遺伝的に変化しているか、またはそうでなければ調節不全になっている受容体チロシンキナーゼ(RTK)の一つであり、そして故に魅力的な処置標的を表す。キナーゼ活性化 c - M e t 変異は孤発性腎、肺、頭頸部、肝細胞癌腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌およびメラノーマにおいて観察される^{13, 32 - 35}。さらに c - M e t 遺伝子

10

20

30

40

50

座の増幅は胃、転移性結腸直腸および食道腺癌^{1 2}、^{1 3}、さらなるM e t 関連疾患において検出されている。癌細胞におけるc - M e t の活性化はV E G F A およびI L - 8 のような血管新生因子の分泌を誘起し、そしてトロンボスponジン - 1、抗血管新生因子の合成を阻害する^{3 6}、^{3 7}。加えて、内皮細胞におけるc - M e t 活性化は血管新生を引き起こす。M e t 活性阻害の細胞毒性効果は、活性化c - M e t を伴う癌においてのみ生じ得るが、抗血管新生効果はさらに頻繁に存在し得る。

【0005】

経口で生理活性のあるc - M e t の小型分子阻害剤（「M e t 阻害薬」）の開発と共に大きな進歩を生じた。これらの阻害剤のうち、P F - 2 3 4 1 0 6 6 はc - M e t および未分化リンパ腫キナーゼ（A L K ）の阻害に関する特異性を実証し、そして5 0 m g / k g / 日の用量でG T L - 1 6 胃癌異種移植片およびN C I - H 4 4 1 N S C L C 異種移植片の退縮に至る^{3 8}。この用量で、c - M e t は完全に阻害され、そして長期間の最大薬物効果が達成される。単腕抗c - M e t 抗体および小型分子キナーゼ阻害剤での前臨床研究⁷、^{3 9}、^{4 0}、ならびに患者における初期臨床研究により種々の癌型に対するc - M e t 阻害剤の有望性、その好ましい薬物動態特性および低い毒性がさらに強調される。故に活性なM e t を枢軸とする癌を処置するために使用する場合、これらの薬物は多くの癌患者にとって実に利益になり得る。しかしながら活性M e t 経路を保有する癌を同定するために利用可能な分子診断手段はない。

【0006】

発現を検出し、そしてキナーゼ阻害剤の処置標的の活性化状態を決定するための分子診断が癌患者の処置を改善するために緊急に必要とされる。細胞表面受容体に結合するか、または細胞に浸透し、そして受容体および非受容体キナーゼを阻害する薬物は臨床において多大な有望性を示すが、ヒト癌における対応する標的の検出は大きな挑戦をもたらす。H e r - 2 / N e u 発現の定量的測定のためのハーセプト（H e r c e p t ）試験は日常的な臨床試料における使用およびF D A 承認のために、長期にわたり、そして厄介な開発を必要とするのに加えて、受容体または非受容体タンパク質キナーゼ発現に関して検証された、利用可能な診断試験はない。これらの診断試薬の開発における困難は、キナーゼの低レベル発現、不安定な活性化状態に起因し、それはタンパク質リン酸化、およびキナーゼ活性を示すたいていのホスホエピトープに対する抗体の芳しくない特異性に依存する。結果的にたいていの受容体チロシンキナーゼ（R T K ）には、患者の癌から最も一般的に得られる組織調製物であるホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E ）組織における発現測定のための検出試薬がない。キナーゼ阻害剤での処置に関する患者の満足は、この群の薬剤の抗新生物活性での成功に極めて重要であることがますます明白になってきている。所定の固体腫瘍型に関して、薬物応答性標的タンパク質を発現する癌の頻度は小さい。故に処置のための患者が注意深く選択されない場合、多くの薬剤がフェーズI I およびフェーズI I I 臨床試験で有効性を実証するのに失敗するであろう。

【0007】

芳しくない試薬選択、F F P E 組織におけるc - M e t 抗体の性能の不十分な検証およびホルマリン固定に対するc - M e t の感受性のために、c - M e t 受容体はF F P E 組織において測定することがとりわけ困難である。臨床における新規c - M e t 阻害剤が有望であるとすると、これらの薬剤から利益を得る可能性のある患者を同定するためにコンパニオン診断が必要とされる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は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 に受託番号P T A - 7 6 8 0 で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体「M e t 4」を含む。本発明はまた該M e t 4 抗体の抗原結合フラグメントまたは誘導体を含む。また本発明はM e t に対する結合に関してM e t 4 と競合する抗M e t 抗体または該抗体のフラグメントもしくは誘導体を含む。さらに本発明はA m e r i c a n

10

20

30

40

50

Type Culture Collectionに受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体の同定的な生物学的特徴を全て有するモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体；Metに特異的なモノクローナル抗体、ここで該抗体の重鎖および／もしくは軽鎖可変領域または該可変領域の抗原結合部位はAmerican Type Culture Collectionに受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体の対応する領域または部位の同定的な生物学的または構造的特徴を全て有する；American Type Culture Collectionに受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合するMetに特異的なモノクローナル抗体（または該抗体の抗原結合フラグメントもしくは誘導体）；配列番号：1で236-242として同定されたアミノ酸を含むポリペプチドに結合するモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合フラグメントもしくは誘導体；および配列番号：1で236-239として同定されたアミノ酸を含むポリペプチドに結合するモノクローナル抗体または該抗体の抗原結合フラグメントもしくは誘導体を含む。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

American Type Culture Collectionに受け入れ番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞株により生成されたモノクローナル抗体または該抗体のフラグメントもしくは誘導体。

10

(項目2)

American Type Culture Collectionに受け入れ番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞株により生成されたモノクローナル抗体である第2抗体とMetに対する結合に関して競合する抗体または該抗体のフラグメントもしくは誘導体。

20

(項目3)

項目1に記載のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体の同定的な生物学的特徴を全て有するモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントもしくは誘導体。

(項目4)

Metに特異的なモノクローナル抗体であって、該抗体の重鎖および／もしくは軽鎖可変領域または該可変領域の抗原結合部位が項目1に記載のモノクローナル抗体の対応する領域または部位の同定的な生物学的または構造的特徴を全て有する、モノクローナル抗体。

30

(項目5)

項目1に記載のモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体または該抗体のフラグメントもしくは誘導体。

(項目6)

配列番号：1でアミノ酸236-242として同定されたアミノ酸からなるポリペプチドに結合する抗体または該抗体のフラグメントもしくは誘導体。

40

(項目7)

配列番号：1でアミノ酸236-239として同定されたアミノ酸からなるポリペプチドに結合する抗体または該抗体のフラグメントもしくは誘導体。

(項目8)

項目1～7から選択されるモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体を含む組成物。

(項目9)

モノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体が検出可能な部分に連結されている項目8に記載の組成物。

(項目10)

(a)項目8に記載の組成物；および(b)担体；を含む診断的に有用な組成物。

(項目11)

50

モノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体が検出可能な部分に連結されている項目
10に記載の組成物。

(項目12)

(a) 項目1に記載の抗体、フラグメントまたは誘導体を含む第1容器；(b) 担体を含む第2容器；および(c) Metを検出、診断、予後診断またはMet阻害薬を評価するために抗体を使用するための説明書；を含むキット。

(項目13)

前記モノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体が検出可能な部分に連結されている項目12に記載のキット。

(項目14)

10

前記第1容器からのモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体に結合する第2のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体をさらに含む項目12に記載のキット。

(項目15)

前記第2抗体が検出可能な部分に連結されている項目14に記載のキット。

(項目16)

さらにMet阻害薬を含む項目12に記載のキット。

(項目17)

(a) Metを発現することが疑われる組織または試料を提供すること；(b) 項目8に記載の組成物を提供すること；(c) 該組織または試料を項目8に記載の組成物と接触させること；および(d) 該組織または試料中のMetの存在を検出すること；の工程を含むMetを発現することが疑われる組織または生物学的試料中のMetの存在を検出するための方法。

20

(項目18)

前記組織または生物学的試料がホルムアルデヒドの溶液中で固定されている項目17に記載の方法。

(項目19)

30

(a) Met関連疾患を有するかまたは有することが疑われる患者から組織または生物学的試料入手すること；(b) 項目8に記載の組成物を提供すること；(c) 該組織または生物学的試料を項目8に記載の組成物と接触させること；(d) 該組織または試料中のMetの発現レベルを決定すること；および(e) 該発現レベルを適当な対照と比較すること；の工程を含む、該患者におけるMet関連疾患を診断または予後診断する方法。

(項目20)

前記組織または生物学的試料がホルムアルデヒドの溶液中で固定されている項目19に記載の方法。

(項目21)

前記Met関連疾患が癌である項目19に記載の方法。

(項目22)

前記Met関連疾患が卵巣癌である項目21に記載の方法。

(項目23)

40

(a) Met関連の癌を有する患者から第1組織試料入手すること；(b) Met阻害薬で患者を処置すること；(c) 該患者から処置後組織入手すること；(d) 項目8に記載の組成物を提供すること；(e) 該第1組織または生物学的試料および該処置後組織または試料の各々を項目8に記載の組成物と接触させること；(f) 該第1組織または生物学的試料および該処置後組織または試料の各々におけるMetの発現レベルを決定すること；ならびに(g) 該第1組織または生物学的試料のMet発現レベルを該処置後組織または試料のMet発現レベルと比較して該Met阻害薬の有効性を決定すること；の工程を含む、Met阻害薬の有効性を決定するための方法。

(項目24)

前記第1組織または生物学的試料および前記処置後組織または試料の各々がホルムアルデヒドの溶液中で固定されている項目23に記載の方法。

50

(項目 25)

American Type Culture Collectionに受け入れ番号 P
TA - 7680で寄託されたハイブリドーマ細胞株。

(項目 26)

ホルムアルデヒド溶液で処理されている抗原に結合する抗体を同定する方法であって、抗原を提供すること；該抗原をホルムアルデヒド溶液で処理すること；該処理された抗原を抗体、そのフラグメントまたは誘導体と接触させること；および該抗体を試験して該抗体が該処理された抗原に結合するかどうかを決定すること；の工程を含む、方法。

(項目 27)

前記ホルムアルデヒド溶液がホルマリンである項目 26 に記載の方法。

10

【0009】

別の発明は先行の段落にて記載されたモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体のいずれかを含んでなる組成物を含む。この組成物のモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体を検出可能な部分に連結させることができる。

【0010】

さらに本発明は先行の段落の組成物を伴う診断的に有用な組成物；および診断的に許容される担体または賦形剤を含む。またこの組成物と共にモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体を検出可能な部分に連結させることができる。

【0011】

さらなる発明は：(a) American Type Culture Collectionに受託番号 PTA - 7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体を伴う第1容器；(b) 診断的に、または医薬的に許容される担体または賦形剤を伴う第2容器；および(c) Metを検出、診断、予後診断またはMet阻害薬を評価するために抗体を使用するための説明書；を有するキットを含む。このキットを用いてモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体を検出可能な部分に連結させることができる。またこのキットは第2モノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体を含むことができ；その第2モノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体は第1容器からのモノクローナル抗体、フラグメントまたは誘導体に結合し、そして第2抗体を検出可能な部分で標識できる。さらにこれはまたMet阻害薬を含むこともできる。

20

【0012】

本発明はまたいくつかの方法を含む。第1はMetを発現することが疑われる組織または生物学的試料中のMetの存在を検出するための方法であり、(a) Metを発現することが疑われる組織または試料を提供すること；(b) 本明細書に記載される本発明の組成物を提供すること；(c) 組織または試料をこの組成物と接触させること；および(d) 組織または試料中のMetの存在を検出すること；の工程を含んでなる。第2は：(a) Met関連疾患を有するかまたは有することが疑われる患者から組織または生物学的試料を入手すること；(b) 本明細書に記載される本発明の組成物を提供すること；(c) 組織または生物学的試料をこの組成物と接触させること；(d) 組織または試料中のMetの発現レベルを決定すること；および(e) 発現レベルを適当な対照と比較すること；の工程を含んでなる、該患者におけるMet関連疾患を診断または予後診断する方法である。Met関連疾患は癌でよく、そして癌は卵巣癌でよい、最後は：(a) Met関連の癌を有する患者から第1組織試料を入手すること；(b) Met阻害薬で患者を処置すること；(c) 患者から処置後組織入手すること；(d) 本明細書に記載される本発明の組成物を提供すること；(e) 第1組織または生物学的試料および処置後組織または試料の各々をこの組成物と接触させること；(f) 第1組織または生物学的試料および処置後組織または試料の各々におけるMetの発現レベルを決定すること；ならびに(g) 第1組織または生物学的試料のMet発現レベルを処置後組織または試料のMet発現レベルと比較して該Met阻害薬の有効性を決定すること；の工程を含んでなる、Met阻害薬の有効性を決定するための方法である。これらの方法の各々において、組織または生物学

40

50

的試料もしくは複数の試料はホルマリン固定されていてよい。

【0013】

別の発明はAmerican Type Culture Collectionに受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系を含む。

【0014】

本発明のこれらのおよびその他の特色、利点および目的は以下の明細書、請求の範囲および添付の図面を参照することにより当業者によりさらに理解され、そして認められよう。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】Met 4の特異性を示す。図1Aおよび1BはMet 4(パネルA)またはC28(パネルB)で染色されたFFPE組織ブロックの切片を示す。Met発現は基底上皮細胞(長い矢軸で閉じた矢尻)、内皮細胞(閉じた矢尻、矢軸なし)において、および分泌細胞の側底膜(長い矢、および開いた矢尻)において特異的に生じる。図1Cから1FはMet 4およびC28での免疫蛍光染色を示す。胃癌MKN45細胞(Met陽性)およびNIH3T3細胞(Met陰性)を同時培養し、そしてホルマリンで固定した。図1CはMet 4を示し；図1Dは明視野(Brightfield)を示し；図1EはMet C28を示し；そして図1Fは図1Cおよび1Eの重ね合わせである。

【図2】Met 4エピトープを特徴付けするウェスタンプロットである。Met陽性IGROV1またはMet陰性A2780卵巣癌細胞の細胞ライゼート中のタンパク質をウェスタンプロッティングした。ニトロセルロース膜を10%ホルマリンで処理するか、抗原回復溶液(retrieval solution)中で煮沸するか、または双方の処理に逐次的に供する。処理した膜をMet 4でプローピングし、そして化学発光を用いて展開した。LC：負荷対照。

【図3A】ホルマリン固定卵巣癌細胞系におけるMet 4およびMet C-28反応性を比較する。図3AはMet C-28でプローピングした卵巣癌細胞系のウェスタンプロットである。LC：負荷対照。観察されたタンパク質発現に応じたRNA発現結果を図6に示す。図3Bは卵巣癌細胞系からのFFPE細胞ペレットのC28およびMet 4での免疫組織化学染色を示す。茶色は陽性Met受容体発現を示す。注目すべきことに、全ての細胞系がMet C-28で染色される。対照的にMet 4反応性はウェスタンプロットで測定されたMet発現と相関する。図3Cはウェスタンプロットのシグナル強度とIHC測定値との間の相関性を示す。ウェスタンプロットを3D4モノクローナル抗体(Zymed)でプローピングし、そしてLICORシステムを用いてc-Met発現を定量した。1:500希釈(4 μg/ml)のMet 4でIHCを実施した。ピアソン相関係数は0.602である。

【図3B】ホルマリン固定卵巣癌細胞系におけるMet 4およびMet C-28反応性を比較する。図3AはMet C-28でプローピングした卵巣癌細胞系のウェスタンプロットである。LC：負荷対照。観察されたタンパク質発現に応じたRNA発現結果を図6に示す。図3Bは卵巣癌細胞系からのFFPE細胞ペレットのC28およびMet 4での免疫組織化学染色を示す。茶色は陽性Met受容体発現を示す。注目すべきことに、全ての細胞系がMet C-28で染色される。対照的にMet 4反応性はウェスタンプロットで測定されたMet発現と相関する。図3Cはウェスタンプロットのシグナル強度とIHC測定値との間の相関性を示す。ウェスタンプロットを3D4モノクローナル抗体(Zymed)でプローピングし、そしてLICORシステムを用いてc-Met発現を定量した。1:500希釈(4 μg/ml)のMet 4でIHCを実施した。ピアソン相関係数は0.602である。

【図3C】ホルマリン固定卵巣癌細胞系におけるMet 4およびMet C-28反応性を比較する。図3AはMet C-28でプローピングした卵巣癌細胞系のウェスタンプロットである。LC：負荷対照。観察されたタンパク質発現に応じたRNA発現結果を図6に示す。図3Bは卵巣癌細胞系からのFFPE細胞ペレットのC28およびMet 4で

10

20

30

40

50

の免疫組織化学染色を示す。茶色は陽性 Met 受容体発現を示す。注目すべきことに、全ての細胞系が Met C - 28 で染色される。対照的に Met 4 反応性はウェスタンプロットで測定された Met 発現と相關する。図 3C はウェスタンプロットのシグナル強度と IHC 測定値との間の相関性を示す。ウェスタンプロットを 3D4 モノクローナル抗体 (Zymed) でプローピングし、そして LICOR システムを用いて c-Met 発現を定量した。1 : 500 希釀 (4 μg / ml) の Met 4 で IHC を実施した。ピアソン相関係数は 0.602 である。

【図 4】ホルマリン固定細胞系における Met 4 結合の特異性を示す。図 4A は Met C - 28 でプローピングした卵巣癌細胞系のウェスタンプロットである。 - チューブリンを負荷対照として用いる。図 4B は Met 4 での FFPPE 細胞ペレットの免疫組織化学染色を示す。茶色は陽性 Met 受容体発現を示す。U118 : 神経膠芽腫、SW1783 : 神経膠芽腫、U373 : 神経膠芽腫、NIH3T3 : マウス線維芽細胞、DBTRG : 神経膠芽腫、U87 : 神経膠芽腫、S114 : HGF/SF および Met 23 に関するヒト遺伝子でトランスフェクトされた NIH3T3 細胞、MCF7 : 乳癌。

【図 5】卵巣癌および神経膠芽腫における Met 4 反応性を示す。卵巣癌の切片 (図 5A) または神経膠芽腫組織マイクロアレイ (図 5B) を Met 4 で染色した。400 倍の拡大率で画像を撮影した。前立腺組織の陰性および陽性対照を各染色に含め、そして図 3B (右下パネル) に示す。組織染色の要旨を表 2 および 3 に示す。

【図 6】卵巣癌細胞系における Met RNA 発現を示すプロットである。卵巣癌細胞系から RNA を単離した。Met キナーゼドメイン内のフラグメントを逆転写された RNA から增幅し、32 サイクル増幅し、そしてアガロースゲル上で可視化した。

【図 7】ファージディスプレイペプチドライブラーでのパニングを示す。

【図 8】Met 4 のエピトープをマッピングするための手順のフローダイアグラムである。

【図 9】野生型 M13 と比較したファージディスプレイ 12 ライブラーから回収された Met 4 特異的ファージクローンの ELISA からの OD 450 nm 値を示す棒グラフである。

【図 10A】ペプチド 1 および 2 の存在下の Met 4 および RA4E の競合 ELISA を示す。図 10A は連続希釈されたペプチド 1 の存在下の Met 4 (1 : 10000) ELISA を示す (モル比 Met 4 の 10 から 320 倍)。

【図 10B】ペプチド 1 および 2 の存在下の Met 4 および RA4E の競合 ELISA を示す。図 10B はペプチド 1 および 2 の存在下の Met 4 ELISA を示す。

【図 10C】ペプチド 1 および 2 の存在下の Met 4 および RA4E の競合 ELISA を示す。図 10C はペプチド 1 および 2 の存在下の RA4E ELISA を示す。

【図 11】MKN45 および NIH3T3 細胞上の Met 4 および RA4E の免疫蛍光染色を示す。図 11A : 赤、Met 4 ; および 緑、C28。図 11B : 赤、Met 4 ; 緑、RA4E。図 11C : 赤、Met 4 + ペプチド 1 ; 緑、RA4E + ペプチド 1。

【発明を実施するための形態】

【0016】

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明の好ましい実施態様は以下の具体的な実施態様の詳細な記載ならびに本明細書後記に含まれる実施例および配列表を参照することによりさらに容易に理解され得る。

【0017】

本出願で参照される全ての参考文献、特許、特許公報、論文およびデータベースは、各々があたかも具体的におよび個々に出典明示により本明細書の一部とされるように、その全てにおいて出典明示により本明細書の一部とされる。

【0018】

別に特記されない場合、本明細書にて使用される全ての技術的および科学的用語は本発明が属する分野の当業者により一般的に理解される意味を有する。

【0019】

10

20

30

40

50

任意の適当な方法（例えばBerzofskyら、「Antibody - Antigen Interaction」、Fundamental Immunology、Paul, WE編、Raven Press New York、ニューヨーク州（1984）、Kuby、Jams Immunology、WH Freeman and Company New York、ニューヨーク州（1992）およびそこに記載される方法）を用いて抗原に関する抗体の「親和性」または「結合力」を実験的に決定することができる。特定の抗体 - 抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件下（例えば塩濃度、pH）で測定された場合に異なり得る。故に親和性およびその他の抗原結合パラメーター（例えばK_{sub>D}、IC₅₀）の測定値は好ましくは抗体および抗原の標準化された溶液および標準化されたバッファーで作成される。

10

【0020】

本明細書で使用される際には「生物学的試料」なる用語は、血液、血清、血漿、リンパ、尿、唾液、涙液、脳脊髄液、乳、羊水、胆汁、腹水、膿汁等のような、正常または疾患患者の身体から誘導される器官または組織抽出物および任意の液体またはその他の材料を意味する。

【0021】

「担体」なる用語はそれと共に化合物が投与される希釈剤、アジュvant、賦形剤またはビヒクルを指す。かかる担体は落花生油、大豆油、鉱物油、ゴマ油等のような石油、動物、野菜または合成起源のものを含む水および油のような滅菌液体でよい。水または生理食塩水ならびに水性デキストロースおよびグリセロール溶液が担体として用いられるのが好ましい。

20

【0022】

「細胞」なる用語はその通常の生物学的意味で用いられ、そして多細胞生物全体を指すものではない。例えば細胞はインビトロで例えば細胞培養におけるものでよい。細胞は原核生物性（例えば細菌細胞）または真核生物性（例えば哺乳動物または植物細胞）でよい。

【0023】

「誘導体」とは、アミノ酸残基置換、欠失または付加の導入により改変されている親タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列を含んでなるタンパク質またはポリペプチド（例えば抗体）のいずれかを指す。誘導体タンパク質またはポリペプチドは親ポリペプチドと類似のまたは同一の機能を保有する。

30

【0024】

「検出可能な部分」なる語句は、本明細書にて使用される際には本明細書に記載されるかまたは当業者に公知の手順またはモダリティによりエキソビオまたはインビトロで撮像および/または検出できる部分を指す。本明細書にて使用される際には検出可能な部分を直接的または間接的に本発明のMet4抗体に、抗Met4抗体、結合フラグメントまたはその誘導体に連結することができる。

【0025】

「診断用に標識された」なる用語は本発明の抗体、抗Met4抗体、結合フラグメントまたはその誘導体がそれに付着している診断用に検出可能な標識を有することを意味する。

40

【0026】

「ホルムアルデヒド」とは式CH₂Oを有する有機化学物質を意味する。ホルムアルデヒドは水溶性である。「ホルマリン」とはホルムアルデヒドの水溶液を意味する。

【0027】

「フラグメント」とは親タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも4アミノ酸残基（好ましくは少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100

50

アミノ酸残基、少なくとも 125 アミノ酸残基または少なくとも 150 アミノ酸残基) のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質またはポリペプチドのいずれかを指す。抗体の「抗原結合フラグメント」なる用語に包含される結合フラグメントの実例には、([]) F a b フラグメント、V L、V H、C L および C H 1 ドメインからなる 1 値フラグメント、(n) F (a b ') 2 フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド橋により連結された 2 つの F a b フラグメントを含んでなる 2 値フラグメント、(i n) V H および C H 1 ドメインからなる F d フラグメント、([] v) 抗体の単腕の V L および V H ドメインからなる F v フラグメント、(v) V H ドメインからなる d A b フラグメント (Wardら、Nature 341 : 544 - 46 (1989))、ならびに (v []) 単離された相補性決定領域 (C D R) ラクダ抗体が含まれ、そしてラクダ抗体を使用することもできる。かかる抗体は、例えば本明細書に記載されるたった 1 つの可変ドメインからの C D R を含むことができる。さらに F v フラグメント、V L および V H の 2 つのドメインは別個の遺伝子によりコードされるが、組換法を用いて V L および V H 領域が組み合わされて 1 値分子を形成する一本鎖タンパク質として作成することを可能にする合成リンカーによりそれらを結合させることができる (一本鎖 F v (s c F v) として公知、例えば Birdら、Science 242 : 423 - 26 (1988) 、 Hustonら、Proc Natl Acad Sci USA 85 : 5879 - 83 (1988) 参照)。かかる一本鎖抗体はまた抗体の「抗原結合フラグメント」なる用語に包含されるとも意図される。これらの抗体フラグメントは当業者に公知の従来の技術を用いて得られ、そしてフラグメントをインタクトな抗体と同じ様式で機能に関して評価する。

10

【 0028 】

「検出可能な部分に連結された」タンパク質または抗体は、タンパク質または抗体に結合している標識または検出可能な部分の存在を検出することによりタンパク質または抗体の存在を検出できるように、共有結合で、リンカーにより、またはイオン、ファンデルワールスもしくは水素結合により標識に結合しているものである。

【 0029 】

「モノクローナル抗体または m A b 」は本明細書にて使用される際には、単一の B リンパ球クローニングの生成物である抗体の、全体的でない場合、実質的に均一な集団の一部である抗体を指す。m A b は当分野において周知であり、そして従来の方法を用いて作成される ; 例えば Kohler および Milstein、Nature 256 : 495 - 497 (1975) ; 米国特許第 4376110 号 ; Harlow, E. ら、Antibodies : A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州 (1988) ; Monoclonal Antibodies and Hybridomas : A New Dimension in Biological Analyses、Plenum Press、ニューヨーク、ニューヨーク州 (1980) ; H. Zola ら、Monoclonal Hybridoma Antibodies : Techniques and Applications、CRC Press (1982) 参照。m A b を組換えにより、および例えば米国特許第 4816567 号に従って生成できる。

30

【 0030 】

「スクリーニング」または「診断」とは、患者 (臨床試験の参加者を含む) を診断、予後診断、モニタリング、特徴付け、選択すること、および特定の障害もしくは臨床事象の危険があるかもしくはそれを有している患者、または特定の治療的処置に応答する可能性が最も高いものを同定すること、または特定の治療的処置に対する患者の応答を評価もしくはモニタリングすることを指す。

40

【 0031 】

「小型分子」とは 3 キロダルトン (k D a) 未満、および好ましくは 15 キロダルトン未満、およびさらに好ましくは約 1 キロダルトン未満の分子量を有する組成物を指す。小型分子は核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド擬似物質、炭水化物、脂質またはその

50

他の有機(炭素含有)もしくは無機分子でよい。当業者には認められるように、本記載に基づいて、本発明のアッセイのいずれかを用いて化学的および/または生物学的混合物、しばしば真菌、細菌または藻類抽出物の大規模なライブラリーをスクリーニングできる。

【0032】

「対象」または「患者」とは、症状、障害または疾患のための処置を必要とする哺乳動物、好ましくはヒトを指す。

【0033】

「腫瘍細胞」なる用語はインビオ、エキソビオおよび組織培養のいずれかにおける、新しい遺伝材料の取り込みを伴う必要のない自然発生的な、または誘導された表現型変化を有する癌性、前癌性または形質転換された細胞を指す。形質転換ウイルスでの感染および新しいゲノム核酸の組み込み、または外因性核酸の取り込みから形質転換を生じることができると、自然発生的に、または発癌性物質に暴露し、それにより内因性遺伝子を変異することに続いて生じることもできる。「腫瘍」には少なくとも1つの腫瘍細胞が含まれる。

【0034】

以下の記載では、免疫学、細胞生物学および分子生物学の分野の当業者に公知の種々の方法論を参照する。参考されるかかる公知の方法論を説明する出版物およびその他の資料を、あたかも全体が説明されるかのように、その全てにおいて出典明示により本明細書の一部とする。免疫学の一般的な原理を説明する標準的な参考研究には、A. K. Abbasら、Cellular and Molecular Immunology(第4版)、W.B. Saunders Co.、フィラデルフィア(2000); C.A. Janewayら、Immunobiology. The Immune System in Health and Disease(第4版)、Garland Publishing Co.、ニューヨーク(1999); Roitt, I.ら、Immunology(最新版)、C.V. Mosby Co.、セントルイス、ミズーリ州(1999); Klein, J.、Immunology、Blackwell Scientific Publications, Inc.、ケンブリッジ、マサチューセッツ州(1990)が含まれる。

【0035】

抗体は免疫グロブリン(Ig)分子としても公知のポリペプチドであり、それは具体的な抗原またはエピトープに対して結合特異性を呈する。ここでの「抗体」なる用語の使用は広く、従来のインタクトな4鎖Ig分子(IgG、IgAおよびIgE抗体の特徴)を超えて広がる。抗体はポリクローナル抗体(例えば分画または未分画免疫血清)またはmAb(以下を参照)の形態で生じ得る。1を超える抗原特異性を伴うIg分子(例えば2つの異なる抗体からの抗原結合領域または鎖を結合させることにより形成された二重特異性抗体)もまた含まれる。抗体は典型的には具体的な抗原に対して結合特異性を呈するポリペプチドである。天然のIg分子は典型的にはヘテロ四量体糖タンパク質であり、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖から構成され、各L鎖は1つの鎖間ジスルフィド結合によりH鎖に連結されている。さらなるジスルフィド連結は2つのH鎖を架橋する。各HおよびL鎖は規則的な間隔の鎖内ジスルフィド結合を有する。各H鎖および各L鎖のN末端には可変(V)ドメインまたは領域(V_HおよびV_L)が含まれる。V_HドメインのC末端側は多くの定常(C)ドメイン(C_H)であり; L鎖はそのC末端で单一のCドメインのみを有する(C_Lと称される)。特定のアミノ酸残基がV_HドメインとV_Lドメインの間でインターフェースを形成する。脊椎動物L鎖はそのCドメインのアミノ酸配列に基づいて、アイソタイプ、およびとも称される2つの区別される型の1つに割り当てられる。そのCHドメインの配列に依存して、Igは各々、μ、γ、およびδと称されるそのH鎖により同定される異なるクラス:IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgD; のメンバーである。いくつかのサブクラスまたはアイソタイプもまた公知であり、例えばIgGアイソタイプ、IgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄(各々1、2、3および4として公知のH鎖を含んでなる)またはIgAアイソ

10

20

40

50

タイプ、 IgA_1 および IgA_2 (各々 H 鎖 a_1 および a_2 を含んでなる)。

【0036】

抗体分子のドメインまたは領域を記載するために用いられる場合、「可変」なる用語は様々な抗体間で異なり、そして抗体の抗原特異性に寄与するアミノ酸配列を指す。可変性が V 領域にわたって一様に分布されるが、典型的には 3 つの特定の領域でより大きい配列は相補性決定領域 (CDR) または超可変領域と称され、 VH および VL ドメインに存在する。 V ドメインのさらに高度に保存された部分はフレームワーク (FR) 領域と称される。各 VH および VL ドメインは、典型的には主としてシート立体配置をとる、3 つの CDR に結合する 4 つの FR 領域を含んでなり、それはシート構造を接続し、そして場合によってはシート構造の一部を形成するループを形成する。各鎖における CDR は FR 領域により極接近して維持され、そしてその他の鎖からの CDR を伴い、抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、米国国立衛生研究所、ベセスダ、メリーランド州 (1987))。CDM は直接抗原結合に関与しないが、オプソニン作用、補体結合および抗体依存性細胞毒性のような種々のエフェクター機能を呈する。

【0037】

抗体の定義には全て当分野において周知の Fab 、 Fab' 、 $F(ab')、 Fv または $sCFv$ フラグメントを含む Ig 分子の抗原結合フラグメントもまた含まれる。 Fab および $F(ab')_2$ フラグメントはインタクトな抗体の Fc フラグメントを欠如し、循環からより迅速に消え、そしてインタクトな抗体よりも非特異的組織結合が低いかもしれない (Wahl ら、J. Nucl. Med. 24 : 316 - 325 (1983))。 Fab フラグメントおよび单一の抗原結合部位のみを有する 1 個抗体のその他の形態は、特にインビボで抗体の Met 損傷細胞への内部移行または Met の活性化およびその後のシグナル伝達経路を回避するかまたは制限するのが好ましい場合、その他の公知の利点を有する。$

【0038】

Fab 、 $F(ab')_2$ 、 Fv および $sCFv$ フラグメントまたは本発明において有用な抗体の形態を、インタクトな抗体と同じ様式で Met タンパク質を検出、定量または単離するために、および Met 発現腫瘍の診断または治療のために使用することができる。従来のフラグメントを典型的にはパパイン (Fab フラグメントのために) またはペプシン ($F(ab')_2$ フラグメントのために) のような酵素を使用してタンパク質分解性切断により生成する。 Fv フラグメントは Hochman, J. ら、Biochemistry 12 : 1130 - 1135 (1973); Sharon, J., ら、Biochemistry 15 : 1591 - 1594 (1976) に記載される。 $sCFv$ ポリペプチドは目的の Ig からの超可変領域を含み、そして天然の Ig の抗原結合部位を再創成するが、インタクトな Ig のほんのわずかな大きさである (Skerra, A. ら、Science 240 : 1038 - 1041 (1988); Pluckthun, A. ら、Methods Enzymol. 178 : 497 - 515 (1989); Winter, G. ら、Nature 349 : 293 - 299 (1991); Bird ら、Science 242 : 423 (1988); Huston ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 5879 (1988); 米国特許第 4704692 号、第 4853871 号、第 4946778 号、第 5260203 号、第 5455030 号)。異なる特異性の抗体からの 1 を超える抗原結合抗体フラグメントを組み合わせることにより形成されたダイアボディーおよび多重特異性抗体もまた抗体として含まれる。

【0039】

本発明は Met の細胞外ドメインにおけるエピトープに結合する「 $Met4$ 」と称される抗体に関する。以下の実施例 7 に記載されるように、エピトープはヒト Met タンパク質のアミノ酸残基 236 - 242 のポリペプチド $DVLPEFR$ (配列番号 : 1、表 5 参照) であるか、またはさらに具体的にはエピトープは配列番号 : 1 のアミノ酸残基 236

- 239 のポリペプチド D V L P (表 5) である。

【0040】

重要なことに、Met 4 はホルマリン処理 Met に結合し、そしてホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織における変性 Met の発現を正確に定量することができる。すなわち Met 4 は診断および予後診断用組織調製物において有用である。1つの実施態様では、Met 4 抗体は Met 組織薬のためのコンパニオン診断用である。さらに Met 4 の Met 発現細胞の表面との反応性のために、Met 4 はまたインビボ分子撮像適用において有用である。

【0041】

Met 4 モノクローナル抗体は、ブダペスト条約に基づく国際寄託として、2006年6月29日にAmerican Type Culture Collection (ATCC) に受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成される。 ATCC の住所は 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209 である。FFPE 前立腺組織におけるスクリーニングアッセイ、ならびに前立腺上皮および内皮細胞の特定の亜集団における c-Met の確立された特異的発現に基づいて Met 4 ハイブリドーマを単離した (図 1A および B)。このスクリーニング研究法は FFPE 組織において c-Met と反応性がある抗 Met 抗体入手するための機会を大きく増大させた。

【0042】

本発明はまた American Type Culture Collection に受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体と競合する抗 Met 抗体、またはその抗体のフラグメントもしくは誘導体をも含む。本明細書にて使用される際には「American Type Culture Collection に受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体と競合する」なる語句は American Type Culture Collection に受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体と同じエピトープを認識する任意のモノクローナルまたはポリクローナル抗体 (例えばマウス、ウサギまたはその他の生物により生成されたかどうか) を意味する。かかる抗 Met 抗体、そのフラグメントまたは誘導体がそのように競合するかどうかを、競合 ELSA のような生物学的アッセイ法により実証することができる。例えば Met タンパク質に結合する Met 4 を間接的 ELSA により測定することができる。すなわち反応系に添加されたより高濃度の Met 4 は通常、定量的に高い OD (光学密度) 値を生じる。ウサギポリクローナル抗 Met 抗体を異なるモル比の Met 4 と混合し、そして OD 値が低下する場合、それは、ウサギ抗体が American Type Culture Collection に受託番号PTA-7680で寄託されたハイブリドーマ細胞系により生成されたモノクローナル抗体と競合することを意味する (以下の実施例 7 参照)。

【0043】

抗体、そのフラグメントおよび誘導体は FFPE 組織における c-Met 発現の測定に有用である。Met 4 は c-Met に関する独特の特異性を実証し、そして Met 4 IHC およびウェスタンプロットティングシグナルの比較により評価されるように良好な精度で FFPE における c-Met 発現 レベルを定量する (= 0.602) (図 3)。同じ日、異なる日および Met 4 の 2 つの別個のロットを比較する場合に、Met 4 染色は反復染色で再現性があった。

【0044】

FFPE 組織における c-Met 発現に関するたいていの研究は Santa Cruz からの抗 Met C-28 ポリクローナル抗体の種々のロットを用いる。AQUA (商標) テクノロジーを用いて 3 つのモノクローナル抗体および C-28 の 2 つの別個のロットを含む市販の c-Met 抗体の系統的な比較により、乳癌組織マイクロアレイ研究におい

10

20

30

40

50

て予測された量の変動性よりも大きいことが明確に実証された^{2 6}。抗体の1つであるD O - 2 4 (U p s t a t e) はc - M e t の細胞外ドメインに結合するが、その他のものは細胞内エピトープを認識する。ウェスタンプロットで全ての抗体がM e t 受容体に結合するという事実にかかわらず、その組織反応性は同じ患者の乳癌試料間で一貫しなかった。C h e m i c o n からのM A B 3 7 2 9 およびC 2 8 の単一のロットを比較した場合、最も一貫した結果が得られた。M A B 3 7 2 9 は良好な再現性を保有し、そして隣接するT M A スライド上の同じ細胞系からのコアに関して相関係数が0 . 9 4 であった。C 2 8 の2つの異なるロットを比較した場合、かなりのロット間変動性が留意され、それはC - 2 8 の臨床利用性および比較によるその他のc - M e t 抗体を評価するその利用性を危うくする。それ故に現在のところF F P E 細胞調製物における新規c - M e t 反応性抗体の試験のための「究極の判断基準」はない。しかしながらウェスタンプロッティングによるc - M e t の定量をI H C 染色による定量と比較することにより、F F P E 細胞ペレットにおいてM e t 4 が検証されている(図3 C)。

【0 0 4 5】

M e t 4 はM e t 受容体タンパク質の細胞外2 5 から5 6 7 アミノ酸におけるエピトープと反応する^{4 1}。さらに具体的には、M e t 4 はM e t の細胞外2 3 6 から2 4 2 アミノ酸におけるエピトープと反応する。なおさらに具体的には、M e t 4 はM e t の細胞外2 3 6 から2 3 9 アミノ酸におけるエピトープと反応する(実施例6)。M e t 4 結合部位はS D S 試料バッファー中での煮沸による変性に感受性があるが、熱回復またはホルマリン固定のいずれかにより再確立される(図2)。同じ熱回復がホルマリン固定組織で正常に用いられ、そして抗体反応性を大いに改善する^{5 0}。煮沸はホルマリン架橋により作成された結合を加水分解し、そしてまたタンパク質のリフォールディングを引き起こす。ホルマリン固定および熱回復の双方はウェスタンプロッティング後の変性M e t 受容体タンパク質内のM e t 4 結合部位を再確立するのに有効であった。測定値を患者の処置決定に適用する場合、アッセイの信頼性はとりわけ重要である。それ故に細胞ペレットを使用してM e t 4 I H C アッセイのアッセイ内およびアッセイ間の変動性を、決定した。恐らく細胞ペレット中の細胞材料は単一の細胞型からなるので、組織切片におけるものよりもさらに均質である。しかしながら同じ組織ブロック内の隣接する切片から得られた細胞ペレットからのスライド間で有意な形態学的差異が観察された。この変動性はアッセイ内およびアッセイ間比較のC V % を増大させた。

【0 0 4 6】

c - M e t の細胞質ドメインに結合するいくつかのM e t 抗体は核エピトープと反応する。最近の研究により、M e t 細胞質ドメインを切断し、そして核に転位置させることができることが実証される^{5 1}。しかしながらM e t 核フラグメントの生物学的機能、そのキナーゼ活性および標的、ならびに核M e t 発現の広い臨床的関連性は不明確である。乳癌T M A の切片においてM A B 3 7 2 9 抗体を用いて測定されるM e t の核発現は5年生存の7 5 % から6 5 % への低下に関連した^{2 6}。バイオマーカーとしてのその役割を評価するためにc - M e t 核発現のさらなる研究が必要とされる。

【0 0 4 7】

体細胞遺伝子変異または過剰発現によるc - M e t 活性化は特定の癌型において明らかに観察されているが、それらは原発性卵巣癌または神経膠腫において稀であるようである。二重微小染色体におけるc - M e t 遺伝子の重複によるc - M e t の過剰発現は神経膠腫グレードI V で3 / 1 8 に、そしてグレードI I で1 / 1 8 に留意された^{5 2}。異なるコホートでは、c - M e t 遺伝子増幅が神経膠腫の3 / 1 1 で生じた^{5 3}。本明細書の実施例で実証されるように、神経膠腫T M A の分析でグレードの高い神経膠腫においてc - M e t 発現の増大が確認された。しかしながら予想外にも、神経膠腫の腫瘍脈管構造における内皮細胞は必ずしもc - M e t 発現を実証しなかった。神経膠腫とは対照的に、全ての卵巣癌がc - M e t を発現し、そして7 / 2 8 が高いc - M e t 発現を実証した。この観察は、類内膜性卵巣癌におけるc - M e t 過剰発現が少なく、そしてその他の組織学的サブタイプわたりてc - M e t 発現が1 0 % 高いことが観察された以前の研究とは異なる

^{5 4}。高いc-Met発現に寄与するメカニズムおよび卵巣癌におけるc-Metの活性化状態は未知である。この研究に関する細胞系パネルにおけるc-Met RNAおよびタンパク質発現の比較は芳しくない相関性を示した。卵巣癌細胞系では、c-Metタンパク質の高発現がc-Met遺伝子の増幅、c-Metタンパク質の転写または翻訳後の保持の増大のために生じるかどうかは明らかではない。卵巣癌におけるc-Met過剰発現の関連性およびMet阻害薬の治療的有効性に対するその関係性は、処置応答およびc-Met発現レベルを比較する臨床研究においてきっと評価されるであろう。

【0048】

本発明または生物学的試料中の腫瘍細胞のようなMetを発現することが疑われる細胞を検出するための方法にも関する。競合結合アッセイ、直接または間接サンドイッチアッセイおよび異種または同種相で行われる免疫沈殿アッセイのような当分野において公知の種々のイムノアッセイ技術を用いることができる。例えばZola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、CRC Press, Inc.、147-158頁(1987)参照。直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生成する検出可能な標識で、この様式で用いられる抗体を検出可能に標識できる。当業者はMet4抗体のための適当な検出薬または標識を容易に作成することができる。検出可能な部分をMet4抗体に(または抗Met4抗体に)連結させることにより、組織または試料中のMet4抗体を検出することができる。組織または試料を、検出可能に標識されたMet4抗体と(および、検出可能な部分が代わりに抗Met4抗体に連結されている場合は抗Met4抗体と)接触させ、そして組織または試料中の検出可能な部分の存在を検出する。

【0049】

当業者に公知の多くの様々な標識および標識する方法が存在する。本発明において使用することができる標識の型の実例には、放射性同位元素、常磁性同位元素および陽電子放出断層撮影(PET)により撮像できる化合物が含まれる。本発明において使用される抗体に結合するためのその他の適当な標識は当業者に公知であるか、または日常的な実験により、そのように確認することができるであろう。診断用に標識された(例えば放射標識された)抗体が有効である。

【0050】

診断のために適当な検出可能な標識には放射活性、蛍光、蛍光発生性、発色性またはその他の化学的標識が含まれる。ガンマカウンター、シンチレーションカウンター、PETスキャニングまたはオートラジオグラフィーにより簡便に検出される有用な放射標識には、³H、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵Sおよび¹⁴Cが含まれる。加えて¹³¹Iは有用な治療用同位元素である(以下を参照)。

【0051】

一般的な蛍光標識には、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒドおよびフルオレサミンが含まれる。ダンシル基のようなフルオロフォアは蛍光を発するために特定の波長の光により励起しなければならない。例えばHaugland、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(第6版)、Molecular Probes、ユージーン、オレゴン州(1996)参照。イソチオシアナート、スクシンイミジルエステルまたはジクロロトリアジニル反応基を使用してフルオレセイン、フルオレセイン誘導体およびOregon Green(商標)のようなフルオレセイン様分子、ならびにその誘導体、Rhodamine Green(商標)およびRhodol Green(商標)をアミン基に結合させる。同様にマレイミド、ヨードアセトアミドおよびアジリジン反応基を使用してフルオロフォアをチオールに結合させることができる。基本的に窒素上に置換基を有するRhodamine Green(商標)誘導体である長波長ローダミン類は中でも最も光安定性のある公知の蛍光標識試薬である。そのスペクトルは4と10の間のpHの変化により影響を受けず、多くの生物学的適用のためにフルオレセイン類に優る重要な利点である。この群には、テト

10

20

30

40

50

ラメチルローダミン類、X - ローダミン類およびTexas Red(商標)誘導体が含まれる。本発明によるペプチドを誘導体化するためのその他の好ましいフルオロフォアは紫外光により励起されるものである。実例には、カスケードブルー、クマリン誘導体、ナフタレン類(ダンシルクロリドはそのメンバーである)、ピレン類およびピリジルオキサゾール誘導体が含まれる。最近記載されている2つの関連する無機材料:例えば硫酸カドミウムを含んでなる半導体ナノ結晶(Bruchez, M.ら、Science 281: 2013 - 2016 (1998))および量子ドット、例えば硫化亜鉛キャッピングされたセレン化カドミウム(Chan, W. C. W.ら、Science 281: 2016 - 2018 (1998))もまた標識として含まれる。

【0052】

10

別の研究法では、蛍光生成物、例えばフルオレサン、o - フタルジアルデヒドのようなジアルデヒド、ナフタレン - 2 , 3 - ジカルボキシラートおよびアントラセン - 2 , 3 - ジカルボキシラートを生じる試薬と抗体のアミノ基を反応させる。7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾール(NBD)誘導体は、塩化物およびフッ化物の双方共に、アミンを修飾して蛍光生成物を生じるのに有用である。

【0053】

¹⁵² Eu + またはランタニドシリーズのその他のもののような蛍光発光金属を使用して検出のために抗体を標識することもできる。ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)のような金属キレーティング基を使用して、これらの金属をペプチドに付着させることができる。無水物形態のDTPAはNH₂含有抗体を容易に修飾することができる。

20

【0054】

抗体をリン光性または化学発光性化合物に結合させることにより、抗体を検出可能にすることができる。次いで化学反応の経過中に生じる発光の存在を検出することにより、化学発光タグ化ペプチドの存在を決定する。特定の有用な化学発光物質の実例はルミノール、イソルミノール、テロマティック(theromatic)アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびシュウ酸エステルである。同様にペプチドを標識するために生物発光化合物を使用できる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を増大させる生物学的系において見出される化学発光の1つの型である。発光の存在を検出することにより生物発光タンパク質の存在を決定する。標識の目的のために重要な生物発光化合物はルシフェリン、ルシフェラーゼおよびエクオリンである。

30

【0055】

さらに別の実施態様では、高い減衰係数を有する発色団を有するかまたはそれをもたらす発色化合物に基づく比色検出を用いる。

【0056】

対象から組織学的標本を取り出し、そして標識を検出するためにそれを適切な条件下で顕微鏡により試験することにより、標識抗体のインサイチュ検出を達成できる。かかるインサイチュ検出を達成するために多様な組織学的方法(例えば染色手順)のいずれかを修飾できることは当業者に容易に受け入れられよう。

【0057】

40

抗体を標識するための1つの方式はそれを酵素に連結させ、そしてそれを酵素イムノアッセイ(EIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)において使用することによる。かかるアッセイは:Butler, J. E.、「The Behavior of Antigens and Antibodies Immobilized on a Solid Phase」(第11章)、STRUCTURE OF ANTIGENS 1巻(Van Regenmortel, M.、CRC Press、ボッカラートン(1992)、209 - 259頁; Butler, J. E.、「ELISA」(第29章)、van Oss, C. J. ら(編)、IMMUNOCHEMISTRY、Marcel Dekker, Inc.、ニューヨーク(1994)759 - 803頁、Butler, J. E. (編)、IMMUNOCHEMISTRY OF SOLID-PH

50

A S E I M M U N O A S S A Y 、 C R C P r e s s 、 ボッカラートン (1 9 9 1) ; V o l l e r , A . ら、 B u l l . W H O 5 3 : 5 5 - 6 5 (1 9 7 6) ; V o l l e r , A . ら、 J . C l i n . P a t h o l . 3 1 : 5 0 7 - 5 2 0 (1 9 7 8) ; B u t l e r , J . E . 、 M e t h . E n z y m o l . 7 3 : 4 8 2 - 5 2 3 (1 9 8 1) ; M a g g i o , E . (編) 、 E n z y m e I m m u n o a s s a y 、 C R C P r e s s 、 ボッカラートン (1 9 8 0) 、 I s h i k a w a , E . ら (編) 、 E n z y m e I m m u n o a s s a y 、 K a g a k u S h o i n 、 東京 (1 9 8 1) ; においてさらに詳記される。今度は、後にその基質に暴露されるときにこの酵素は例えば分光光度分析、蛍光分析により、または視覚的手段により検出できる化学的部分を生成するためのような様式で基質と反応する。この目的のために一般的に使用される酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、グルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、リノ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 - V - ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、 - グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 - ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコアミラーゼおよびアセチルコリンエステラーゼが含まれる。
10

【 0 0 5 8 】

抗 M e t 抗体の共有結合を含む化学的修飾は本発明の範囲内である。ターゲティングされたアミノ酸残基を、選択された側鎖または N もしくは C 末端残基と反応することが可能である有機誘導体化剤と反応させることにより、修飾の 1 つの型を分子に導入する。
20

【 0 0 5 9 】

二機能性薬剤での誘導体化は、抗体（またはフラグメントもしくは誘導体）を精製法（以下に記載）において使用するための水不溶性支持体マトリックスまたは表面に架橋するのに有用である。一般的に使用される架橋剤には、例えば 1 , 1 - ビス (ジアゾ - アセチル) - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば 4 - アジドサリチル酸とのエステル、3 , 3 ' - ジチオビス (スクシンイミジルプロピオナート) のようなジスクシンイミジルエステルおよびビス - N - マレイミド - 1 , 8 - オクタンのような二機能性マレイミドを含むホモ二機能性イミドエステルが含まれる。メチル - 3 - [(p - アジドフェニル) ジチオ] プロピオイミダートのような誘導体化剤は、光を照射された場合に架橋することができる光活性化可能な中間体を創成する。
30 臭化シアン活性化された炭水化物のような反応性水不溶性マトリックスならびに米国特許第 3 9 6 9 2 8 7 号；第 3 6 9 1 0 1 6 号；第 4 1 9 5 1 2 8 号；第 4 2 4 7 6 4 2 号；第 4 2 2 9 5 3 7 号；および第 4 3 3 0 4 4 0 号に記載される反応性基質をタンパク質固定において使用する。

【 0 0 6 0 】

その他の修飾にはグルタミニルおよびアスパラギニル残基の各々対応するグルタミルおよびアスパルチル残基への脱アミド化、プロリンおよびリジンの水酸化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニンおよびヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化（例えば T . E . C r e i g h t o n 、 P r o t e i n s : S t r u c t u r e a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s 、 W . H . F r e e m a n & C o . 、サンフランシスコ (1 9 8 3) ）、N 末端アミンのアセチル化、ならびに任意の C 末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。残基の修飾された形態は本発明の範囲内に入る。
40

【 0 0 6 1 】

ポリペプチドの天然のグリコシル化パターンが改変されている抗体もまた本明細書に含まれる。これは天然のポリペプチド鎖に存在しない 1 つもしくはそれより多い炭水化物部分の欠失および / または 1 つもしくはそれより多いグリコシル化部位の付加を意味する。タンパク質グリコシル化は典型的には N 連結 (A s p 側鎖に付着) または O 連結 (ヒドロキシアミノ酸、最も一般的には S e r または T h r に付着；もしかしたら 5 - ヒドロキシ P r o または 5 - ヒドロキシ L y s) されている。トリペプチド A s p - Z - S e r およ
50

び A s p - Z - T h r (ここで Z は任意のアミノ酸であるが P r o ではない) は A s p 側鎖に対する炭水化物部分の酵素的付着のための認識配列である。これらの配列のいずれかの存在は潜在的な N - グリコシル化部位を創成する。O 連結されたグリコシル化は通常 N - アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの結合を伴う。1つまたはそれより多い前記されたトリペプチド配列 (N 連結グリコシル化部位のために) を含むように天然のアミノ酸配列を改変すること、または1つもしくはそれより多いセリンもしくはスレオニンの付加もしくはそれによる置換 (O 連結グリコシル化部位のために) によりポリペプチドへのグリコシル化部位の付加を達成できる。DNA レベルでの変化を通して、例えば望ましいアミノ酸をコードするコドンを作成するために予め選択された塩基で I g ポリペプチド鎖をコードする DNA を変異させることによりアミノ酸配列を改変できる。
10 例えば米国特許第 5 3 6 4 9 3 4 号参照。

【0062】

グリコシドのポリペプチドへの化学的または酵素的結合を用いることもできる。用いられる結合に依存して、(複数の) 糖を (a) アルギニンおよび H i s ; (b) 遊離カルボキシル基 ; (c) 遊離スルフヒドリル基、例えば C y s のもの ; (d) 遊離ヒドロキシル基、例えばセリン、T h r もしくはヒドロキシ P r o のもの ; (e) 芳香族残基、例えば P h e 、 T y r もしくは T r p のもの ; または (f) G l n のアミド基 ; に付着させることができる。これらの方法は第 W O 8 7 / 0 5 3 3 0 号 (1987年9月11日) および A p l i n ら、C R C C r i t . R e v . B i o c h e m . 2 5 9 - 3 0 6 (1981) に記載される。
20

【0063】

既存の炭水化物部分の除去を化学的もしくは酵素的に、または(前記されたような) コドンの変異置換により達成できる。例えばポリペプチドをトリフルオロメタンスルホン酸、または連結糖 (N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン) 以外のたいていのまたは全ての糖を切断する均等な化合物に暴露するが、ポリペプチドはインタクトなままで残すことにより化学的脱グリコシル化を達成する。H a k i m u d d i n ら、A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 5 9 : 5 2 (1987) ; E d g e ら、A n a l . B i o c h e m . 1 1 8 : 1 3 1 (1981) 参照。ポリペプチドからの炭水化物部分の酵素的切断のために多くのエンドおよびエキソグリコシダーゼのいずれかが使用される (T h o t a k u r a ら、M e t h . E n z y m o l . 1 3 8 : 3 5 0 (1987))。
30

【0064】

潜在的なグリコシル化部位でのグリコシル化を N - グリコシド連結の形成を遮断するツニカマイシンの使用により防御できる (D u s k i n ら、J B i o l C h e m . 2 5 7 : 3 1 0 5 (1982))。

【0065】

本抗体の化学的修飾の別の型は、米国特許第 4 6 4 0 8 3 5 号；第 4 4 9 6 6 8 9 号；第 4 3 0 1 1 4 4 号；第 4 6 7 0 4 1 7 号；第 4 7 9 1 1 9 2 号；および第 4 1 7 9 3 3 7 号ならびに第 W O 9 3 / 0 0 1 0 9 号に記載される様式の、ポリエチレングリコール (P E G)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンのような多くの様々な非タンパク質性ポリマーのいずれか1つに対する結合を含んでなる。
40

【0066】

抗体ならびに担体および / または賦形剤を含む組成物において本発明の抗体を使用することができます。

【0067】

別の態様では、本発明は癌、例えば卵巣癌のような M e t 関連疾患を診断または予後診断する方法に関する。方法は M e t 関連疾患を有するかまたは有することが疑われる患者からの組織または生物学的試料と共に、M e t 4 抗体またはかかる抗体のフラグメントもしくは誘導体を利用する。方法はまた M e t 関連疾患を有するかまたは有することが疑われる患者からの組織または生物学的試料と共に、M e t との結合に関して M e t 4 と競合
50

する抗体、またはそのフラグメントもしくは誘導体を使用できる。抗Met 4 抗体、競合抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体を検出可能な部分に連結する。患者からの組織または試料中の検出可能な部分の存在を検出し、そして組織または試料中のMet 4 発現レベルを決定し、そして適当な対照と比較する。以下の実施例では、Met 4 抗体はいくつかの型の腫瘍においてMet 4 の検出に有用であることが示される。以下の実施例で提示されたデータに基づいて、当業者はMet 4 の発現に関する比較の参照点として適当な対照を容易に設定することができる。1つの適当な対照は、癌を有していないか、または特定の型の癌を有していない多数の患者の発現レベルの中央値または代表値である。対照としてMet 4 発現の中央値または代表値レベルを確立するために、多くの患者を使用するほど、診断決定はより正確になる。好ましくは少なくとも25人、50人または100人の患者を使用して発現の対照レベルを確立する。

【0068】

本発明はまた、患者の細胞におけるMet 4 が阻害または根絶されているかどうかを決定することにより、Met 4 阻害癌処置の有効性をモニタリングまたは評価するための方法を含む。方法は検出可能な部分に連結されたMet 4 阻害薬およびMet 4 またはそのフラグメントもしくは誘導体を投与されている患者の組織または生物学的試料と共にMet 4 抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体を利用する。組織または試料中の検出可能な部分の存在を検出し、そして組織または試料中のMet 4 発現レベルを決定し、そして患者におけるMet 4 の前処置または初期処置レベルと比較して、患者の細胞におけるMet 4 が阻害または根絶されているかどうかを決定する。

【0069】

ここで本発明を一般的に記載してきたが、例証のために提供され、そして特記しない場合、本発明の限定を意図するものではない以下の実施例を参照することにより、同一物がさらに容易に理解されよう。

【実施例】

【0070】

c-Met に関するMet 4 の特異性、c-Met 定量の精度およびMet 4 染色アッセイの信頼性をホルマリン固定およびパラフィン包埋(FFPE)細胞ペレットにおいて評価した。Met 4 を使用して卵巣癌および神経膠腫の臨床組織試料のコホートにおけるc-Met 発現を測定した。具体的には、22細胞系においてFFPE細胞ペレットの免疫組織化学分析からのMet 4 シグナルはc-Met 発現のウェスタンプロット測定値と相関した($r = 0.603$)。Met 4 とは対照的に、Santa CruzからのC-28抗体はc-Met を発現しない細胞系のFFPE細胞ペレットと反応した。反復するMet 4 染色アッセイの技術的な信頼性はアッセイ内でCV% = 37%およびアッセイ間でCV% = 21%になった。漿液性、類内膜性および明細胞組織学的サブタイプの卵巣癌はMet 4 で陽性染色され、そして25%でMet 4 シグナルが高かった。神経膠腫の63%の癌細胞においてMet 4 染色は陽性であったが、神経膠腫腫瘍脈管構造におけるMet 4 染色発現はたいていの症例で陰性であった。これらの結果に基づいて(すなわちFFPE組織においてMet 4 抗体は正確におよび再現性よくc-Met 発現を測定したため)、Met 4 抗体は臨床の局面で組織または生物学的試料中のc-Met 発現定量に有用である。

【0071】

実施例1

実施例1-5に関する材料および方法

モノクローナル抗体作成および検証:

Van Andel InstituteのDr. Eric Xuの研究室で組換えタンパク質Met 25-567Hを調製した。Met 25-567H構築物(配列番号: 1、25-567位置のアミノ酸)および精製Met 928タンパク質はCambridge Antibody TechnologyのDr. Ermanno Gherardiの研究室からのものである^{4, 1}。組換え融合タンパク質Met-IgGをR&D sys

10

20

30

40

50

tems (ミネアポリス、ミネソタ州) から購入した。

【0072】

BALB/cマウスに完全フロイントアジュバント中天然および変性 (SDS試料バッファー中で煮沸) Met 25-567Hを腹腔内注射し、続いて不完全フロイントアジュバントをさらに2回注射することにより、Metに対するマウスモノクローナル抗体を生成した。1か月後、アジュバントを伴わずに腹腔内および静脈内に最終注射を行った。ホルマリン固定MKN45 (Met陽性) およびNIH3T3 (Met陰性) 細胞での間接的な免疫蛍光により免疫マウスからのポリクローナル抗血清を試験した。標準的な技術を用いて最終注射の後4日に、脾臓細胞をP3X63AF8/653骨髄腫細胞と融合させた。ELISAおよび免疫蛍光染色によりハイブリドーマ細胞をMetに対する反応性に10
関してスクリーニングした。

【0073】

10個の96ウェルプレートをコーティングバッファー (0.2M Na₂CO₃/NaHCO₃、pH 9.6; 50 μl/ウェル) 中2 μg/ml Met 25-567Hで、4で一晩コーティングした。次いでプレートを1%BSA含有PBS (200 μl/ウェル) で、4で一晩遮断した。ハイブリドーマ上澄50 μlを室温 (RT) で1.5時間ウェルに添加した。プレートを洗浄バッファー (0.05%Tween-20を伴うPBS) 中で2回洗浄し、そしてアルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗マウスIgG (Sigma) を1:2000希釈で、室温で1.5時間添加した (50 μl/ウェル)。洗浄バッファーで4回洗浄した後、ホスファターゼ基質CP-ニトロフェニルリン酸 (Kirkegaard & Perry Laboratories) を30分間添加し、そして405nmで吸光度を測定した。Met 25-567Hと強い反応性 (OD値は2.0より大きい) を有する全部で34個のハイブリドーマを選択し、そしてELISAによりMet 928に関して試験し、そしてそれらのうちの14個が陽性であった。Met 25-567HおよびMet 928の双方と反応する14個のクローニングをELISAによりMet-IgGに対して試験した。7個のクローニングが3つのMetタンパク質全てに対して陽性であることが見出され、そして免疫蛍光染色により試験された。
20

【0074】

MKN45およびNIH3T3細胞を混合し、そして10個の96ウェルプレートに蒔き、そして37で一晩培養した。細胞を洗浄し、そして翌日10%ホルマリンで固定した。7個のクローニングからのハイブリドーマ上澄50 μlを、固定された細胞が入ったウェルに37で1.5時間添加した。プレートを洗浄バッファー (0.05%Tween-20を伴うPBS) 中で2回洗浄し、そして1:100希釈のローダミンレッド抱合ヤギ抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch Lab) を37で1.5時間添加した (30 μl/ウェル)。洗浄バッファー中で2回洗浄した後、細胞を蛍光顕微鏡下で試験した。5個のクローニングを陽性と見出し、そして取り、そして増殖させた。これらの5個のクローニングに以前の融合からの3個のクローニングを加えたものの上澄を、ホルマリン固定正常ヒト前立腺組織切片で、免疫組織化学により検証した。クローニング8G6 (Met4と称される) が最も強いシグナルを生じ、2回サブクローニングを行い、そして3つの組換えMetタンパク質に対するELISAにより検証された。バイオリアクターを使用してモノクローナル抗体を生成し、そしてプロテインGアフィニティカラムを使用してFPLCにより精製した。
30
40

【0075】

免疫組織化学

細胞ペレット：NIH3T3、S114 (HGF/SFおよびMetに関するヒト遺伝子でトランスフェクトされたNIH3T3細胞) 23、SK-LMS-1/HGF (ヒトMetおよびヒトHGF/SFに関するヒト平滑筋肉腫細胞系オートクリン) 24、SW-1783、U118、U87、U373、DBTRG (ヒト脳神経膠芽腫)、MCF-7 (乳癌)、ES-2、CaOV3、OV-90、SKOV3、TOV-112Dおよび50

TOV - 21G (卵巣腺癌) 細胞を ATCC から入手し、そしてその培地規格に従って培養した。1847、2780、OVCAR10、OVCAR5、OVCAR3、PEO-1細胞系(卵巣腺癌)を Pacific Ovarian Cancer Research Consortium (シアトル、ワシントン州) から入手した。2008をDr. George Coucios (ペンシルバニア大学) から入手した。細胞層を10%中性緩衝ホルマリン中で固定し、削り取り、そして Histogel (Richard-Allan Scientific) に包埋した。Histogelペレットを大きな患者組織に関するものと同じ設定を用いて加工し、そしてパラフィンに包埋した。

【0076】

ヒト組織：卵巣癌のホルマリン固定およびパラフィン包埋切片を Pacific Ovarian Cancer Research Consortium から IRB 承認プロトコールの下で入手した。神経膠腫からの組織マイクロアレイを Cybrid (フレデリック、メリーランド州) から購入した。Black and Decker 野菜用スチーマー中標的回復溶液 (pH 9) (DAKO、デンマーク) で 20 分間抗原回復を実施した。スライドを Dako オートステイナーに装着した。以下のインキュベーションを全てオートステイナー上で室温で実施した：内因性ペルオキシダーゼ活性を 3% 過酸化水素で 8 分間遮断し；次いで Dako 血清不含タンパク質遮断を使用するタンパク質遮断工程を 10 分間で完了した。モノクローナルマウス抗ヒト Met 4 抗体を Tris バッファー / 1% BSA 中、TMA スライドの染色のために 1 : 150 で、および細胞ペレットの染色のために 1 : 500 で希釈した。Santa Cruz 抗 Met 4 ポリクローナル抗体を 1 : 300 で希釈した。アイソタイプ対照のために精製マウス IgG を希釈して Met 4 濃度に合わせた。ビオチン化抗マウスまたは抗ウサギ IgG (Vector Labs) 二次抗体を 1 : 200 で希釈し、そして 30 分間適用した。次いでペルオキシダーゼ抱合ストレプトアビシン (Jackson ImmunoResearch) を 1 : 2000 で 30 分間使用した。最後に Dako 液体 DAB + 発色基質系を 7 分間適用した。スライドを Dako 自動ヘマトキシリソで 2 分間対比染色し、脱水し、そしてカバーガラスを載せた。

【0077】

記載されるように免疫組織化学的に染色された切片のスコア化を行った⁴⁻²。簡単には、陽性細胞のパーセンテージを染色強度で乗じることにより累積スコアを誘導した。累積スコアを 0 から 3 のカテゴリーに分けて、そして組織学的サブタイプ(卵巣癌)または腫瘍グレード(神経膠腫)により群分けした。

【0078】

ウェスタンプロット分析

サブコンフルエントの細胞を記載されるようなプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤 (Roche) バッファーを補充した RIPA 中で溶解した⁴⁻³。Bradford アッセイを使用して細胞系からのタンパク質ライゼートを測定した。同じ日に 0 から 12 μg / ml の範囲にわたる BSA 標準を使用して試料を測定した。試料 1 - 2 ml が標準曲線の直線範囲内に測定値を提供するように試料を希釈した。試料 (50 mg) を 4 - 15% グラジエント SDS-PAGE 上で分離し、そして Immobilon (商標) - PPVDF (Millipore、ビルリカ、マサチューセッツ州) またはニトロセルロース転写膜 (Bio-Rad、ハーキュリーズ、カリフォルニア州) に移した。ホルマリン固定ウェスタンプロットのための膜を 2% 中性緩衝ホルマリン Z-fix (Anatech Ltd.、バトルクリーク、ミシガン州) 中で 20 分間固定し、そして PBS 中で洗浄した。Black and Decker 野菜用スチーマー中標的回復溶液 (pH 9) で 20 分間抗原回復を実施した。膜を 5% 乳遮断バッファーで室温で遮断し、そして 5% BSA 中 1 : 250 希釈でウサギ抗ヒト Met 4 ポリクローナル抗体 C-28 と共に室温で 1.5 時間、または 1 : 1000 希釈で一晩インキュベートした；これに代えて、Met 4 を 1 : 1000 で一晩、および Zymed マウス抗 cMet クローン : 3D4 を 1 : 500 で使用した。ロバ抗ウサギ IgG - HRP (Amersham) を 1 : 5000 50

で使用するか、またはAlexa Fluor 680 ヤギ抗マウス IgG (Molecular Probes) を1:10000で使用した。化学発光試薬 (Pierce) またはOdyssey (登録商標) 赤外線撮像システム (LI-COR Biosciences、リンカーン、ネブラスカ州) によりタンパク質バンドを検出した。700 nmチャンネルを用いて5.0の強度でOdyssey (登録商標) 赤外線撮像システムで画像をスキャンした。ImageQuant TLソフトウェアで1Dゲル分析を用いてMet特異的バンドのシグナル強度を測定した。「ローリングボール」手段を用いてバックグラウンドを減じた。

【0079】

IHC染色細胞ペレットのデジタル画像分析

10

CRI Nuanceカメラシステム (www.cri-inc.com) を使用してMet 4で染色した細胞ペレットのスライドをスペクトル的に撮像した。各スライドから6-10個の画像を収集した。420 nmと720 nmの間で20 nm増で発光を測定した。得られた画像キューブを光学密度単位に変換し、そして対照標本から推定されるスペクトルを使用して、数学的に分解された (unmixed) その個々のDABおよびヘマトキシリン構成要素にし、そしてスペクトルライブラリーに保存した。DAB染色は対比を増大させるための擬似カラーの赤であった。ヘマトキシリンは擬似カラーの青であり、そして定量のために画像を擬似蛍光様式に変換した。

【0080】

次いで平均DAB光学密度およびバックグラウンドを超えるピクセル数を同定した (RidlerおよびCalvard^{4,4}の自動閾値化アルゴリズムを使用して決定されるように) 我々の研究室により開発されたソフトウェアでスペクトル的に分解された (unmixed) 画像を定量した。そのヘマトキシリン光学密度がバックグラウンドを超えるピクセルで連結成分アルゴリズム^{4,5}を使用して、核を計数することにより細胞数を同定した (ヘマトキシリン対比染色により同定されるように)。自動高域閾値フィルタを使用した後、核の全数を決定した。171強度単位の強度閾値フィルタ値を使用して陽性Met 4染色に関する閾値を設定した。陰性対照細胞系 (A2780、OVCAR10およびTOV-112D) を使用し、そして陽性ピクセル数を0.1%まで制限してこの閾値パラメーターを定義した。これはPPA統計に類似する^{4,6}。次いでこれらの計数を用いて各試料ペレットに関する陽性Met 4細胞のパーセントを決定した。

20

【0081】

統計分析

Microsoft (著作権) Excelソフトウェアを使用してピアソンの相関係数を計算した。

30

【0082】

実施例2

ホルマリン固定組織におけるc-Metの定量のための抗c-Metモノクローナル抗体の開発

たいていのインビトロおよび免疫組織化学研究においてMet発現を測定するために使用されている、Santa Cruzからのポリクローナル抗体であるC-28の制約は、我々がホルマリン固定組織における分子撮像および免疫組織化学を含む臨床適用のための患者の癌におけるc-Metタンパク質発現の測定のためのモノクローナル抗体 (mAb) を開発することの同義付けとなった。Met受容体の細胞外ドメインと反応するc-Met抗体は細胞表面上のc-Met発現の存在量を評価するための最も直接的な測定を提供するので、これを入手するために免疫原を設計した。得られたmAbはC-28のロット間変動性およびMet細胞質ドメインに結合する抗体で観察される核反応性を克服する。

40

【0083】

ホルマリン固定およびパラフィン包埋 (FFPE) 細胞におけるMet受容体に特異的に結合するモノクローナル抗体を同定するための最終スクリーニングとして、保存 (ar

50

chival) 前立腺組織の切片をハイブリドーマ上澄で染色した(表1)。

【0084】

【表1】

表1: Met 4ハイブリドーマの単離のための選択方法

	ハイブリドーマ	陽性選択基準	陰性選択基準	次のスクリーニングのための陽性ハイブリドーマクローン
脾細胞融合	脾臓の半分	HAT培地生存		960
Met 25-567 Hに対するELISA	960	Met 25-567 Hに対するELISA陽性		34
Met 928に対するELISA	34	Met 25-567 HおよびMet 928双方に対するELISA陽性		14
Met-IgGに対するELISA	14	3つのタンパク質: Met 25-567 H、Met 928およびMet-IgGに対するELISA陽性		7
MKN45/NIH3T3ホルマリン固定細胞におけるIF染色	7	MKN45細胞	NIH3T3細胞	5
前立腺切片におけるIHC	8 (これらのうちの3つは以前の融合からのものであった)	基底上皮細胞 内皮細胞 形質細胞	分泌細胞 細胞外マトリックス 強染間質細胞 (Intense stromal cells)	3/8 Met 4は最も強い特異的染色を生じた

10

20

30

40

前立腺におけるMet受容体発現の明確な細胞下のパターンに基づいて⁴⁻⁷、⁴⁻⁸、基底上皮細胞、萎縮管腔上皮細胞⁴⁻⁹および内皮細胞と反応し、そして分泌内皮細胞の基底管腔細胞膜を描写するモノクローナル抗体を選択した(図1AおよびB)。核タンパク質、分泌細胞における細胞質タンパク質に、または前立腺間質におけるタンパク質に散在的に結合する抗体を排除した。最も強力でそして特異的なシグナルを提供する抗体をMet

50

4と称した。Met 4は基底上皮細胞の細胞質および管腔上皮細胞の細胞膜と反応する(図1A、挿入)。10%ホルマリン中で固定されたMet反応性MKN45細胞および非反応性NIH3T3細胞の染色同時培養物を染色することによりMet 4をさらに検証した。免疫蛍光染色はMKN45細胞の膜に沿って特異的に観察され、そしてC-28(Santa Cruz)の免疫反応性と一致する(図1C-F)。

【0085】

実施例3

ホルマリン固定細胞におけるc-Metとの反応性に関するMet 4の特異性

Met 4のMet受容体タンパク質との反応性を確認するために、ウェスタンプロットをMet 4でプローピングした。組織におけるホルマリン固定の再現条件により、ウェスタンプロット膜を10%ホルマリンで処理し、そして組織切片に適用していたのと同じ型の抗原回復を行った。多量のc-Metを発現するIGROV1卵巣癌細胞において、Met 4は変性Met受容体タンパク質と反応しなかった。ホルマリン固定または抗原回復バッファー中の膜の煮沸はc-Metに対するMet 4結合を増大させ、そして140kDaのc-Metバンドを表した(図2)。Met 4は低分子量バンドと非特異的に反応し、そのうちのいくつかはMet受容体陰性A2780細胞系においても現れた。免疫蛍光およびウェスタンプロッティング結果により、Met 4が変性に感受性があり、そしてホルマリン固定または抗原回復により再確立されるMet上の特異的エピトープに結合することが実証される。

【0086】

ホルマリン固定細胞調製物におけるMet 4の特異性をさらに検証するために、細胞系のパネルを分析した。Met発現レベルに基づいて細胞系を選択した。第1のパネルは14個の卵巣癌細胞系からなった。これらの細胞系は不定量のc-Metタンパク質を発現する。A2780、OVCA R10およびTOV-112DはMet RNAまたはタンパク質を発現せず(図3Aおよび図6)、そしてIGROV1およびOVCA R5細胞はMetを高度に発現する。ホルマリン固定調製物におけるMet 4およびMet C-28の特異性を対応するウェスタンプロット結果と比較するために、各細胞系の細胞ペレットをヒト組織と正確に同じ方式で加工した。スライド上の細胞ペレットの平行切片をMet 4またはC-28 Met抗体のいずれかで染色した。C-28 Metは全ての細胞系と無差別的に反応したが、Met 4はウェスタンプロットおよびPCR分析でMet発現に関して陽性であったこれらの系のみを染色した(図3B)。ホルマリン固定組織におけるMet 4の反応性がc-Metタンパク質の発現のレベルと比例するかどうかを決定するために、IHC染色切片からの染色強度のデジタル測定値をウェスタンプロットにおいて検出されたc-Metの量と比較した。細胞ペレット調製物中のHistogelの凝集塊に起因する異常値を除去した後、IHCとWBとの間のピアソン相関係数はs=0.602であった(図3C)。

【0087】

種々の非卵巣細胞系においてMet 4の特異性をさらに試験し、そのほとんどが神経膠芽腫細胞系(図4)であり、そしてその結果により、Met 4がc-Met発現ヒト細胞と反応するが、c-Met陽性マウス細胞またはc-Met陰性ヒト細胞とは反応しないことが確認された。

【0088】

実施例4

Met 4免疫組織化学測定の再現性

結果により、新規Met 4抗体はFFPE細胞調製物においてc-Metと特異的に結合することが実証されるので、中間のレベルのc-Metを発現するTOV21D細胞における染色の再現性を試験した。アッセイ再現性は臨床試験のための抗体の開発において重要な因子である。同じ日の反復染色(アッセイ内変動性)および異なる3日間に染色したスライド(アッセイ間変動性)の間でMet 4染色強度の一貫性をFFPE細胞ペレットにおいて分析した。加えて、Met 4抗体の2つの別個のロットからの染色結果を比較

10

20

30

40

50

した。ハイブリドーマ培養培地から別個に調製された精製抗体の2つのロットは $s = 0.75$ の相関係数を表した。アッセイ内およびアッセイ間変動性は生物学的および技術的(アッセイ)変動性の構成要素からなり、それをこの分析において分けることはできなかつた。異なる日の細胞ペレットにおいて TOV21D 細胞間で Met4 の染色強度に影響する有意な形態学的差異が観察された。結果的にアッセイ内変動性に関して % CV は 39% であった。別個の3日間に実施した Met4 アッセイの変動性(アッセイ間変動性)は % CV = 21% であった。アッセイ間変動性を日変動性の代表値から計算し、そしてアッセイ内変動性よりも小さかった。

【0089】

実施例 5

10

卵巣癌および神経膠腫における Met4 発現

保存(archival) FFPE 組織における Met4 の特異性を評価するために、卵巣癌組織の切片および神経膠腫の TMA を分析した。Met4 は卵巣癌細胞、内皮細胞、卵巣間質および形質細胞における細胞の集団に関して高い染色特異性を保有する。核染色は観察されなかつた(図 5A)。卵巣癌の組織学的サブタイプには、漿液性、類内膜性および明細胞が含まれるが、粘液性癌は含まれず、そして全ての癌は FIGO ステージ I II - IV であった。29 個全ての卵巣癌が Met4 反応性を示した(表 2)。

【0090】

【表 2】

表 2 : 卵巣癌における Met4 反応性

20

スコア	頻度 (pts)	パーセンテージ	組織学的サブタイプ		
			漿液性 (% S)	類内膜 (% EM)	明細胞 (% CC)
0					
1	9	30	3 (23%)	4 (36%)	2 (40%)
2	12	45	6 (46%)	5 (45%)	1 (25%)
3	7	25	4 (31%)	2 (18%)	1 (25%)

30

卵巣癌の切片を Met4 で染色する。全体のスコアはカテゴリー スケール 0 - 3 の切片の染色強度代表値を表す(S - 漿液性乳頭癌、EM - 類内膜癌、CC - 明細胞癌)。

【0091】

卵巣癌のサブタイプにわたる Met4 染色強度において統計的に有意差は観察されなかつた。最も侵襲性のサブタイプであると考えられる明細胞癌はその他の組織学的サブタイプよりも大きな反応性を実証しなかつた。

【0092】

40

脳腫瘍における Met4 の特異性および c-Met の発現を評価するために、神経膠腫の組織アレイを染色した。組織マイクロアレイは 3 検体ずつのコアで 18 個の神経膠腫を表示した。加えて正常な脳組織の 3 例があつた(表 3、図 5B)。

【0093】

【表3】

表3：神経膠腫のM e t 4 反応性（54コア）

スコア	頻度 (コア)	パーセント (コア)	頻度 (患者)	パーセント (患者)
0	21	34	5	37
1	22	35	7	36
2	13	21	3	16
3	6	10	3	11
合計	62	100	18	100

3検体ずつのコアで18個の神経膠腫の組織マイクロアレイをM e t 4 抗体で染色した。相対染色強度を陽性細胞のパーセンテージで乗じることによりM e t 4 反応性を評価する。全体のスコアをカテゴリー スケール0から3で表現する。

【0094】

ニューロンおよび反応性アストロサイトはM e t 4 で強く染色されたが、オリゴデンドロサイトはM e t 染色を示さなかった。驚くべきことに、腫瘍脈管構造の内皮細胞を含む内皮細胞はM e t 陽性で変動した。18個の神経膠腫のうちの5個はM e t 陰性であり、そして3/18個は強く染色された。3個全てが高いグレードの神経膠腫であった。要するに、神経膠腫の70%がc-M e t を発現し、そしてc-M e t 発現レベルは腫瘍グレードと共に増大した。

【0095】

実施例6M e t 4 のエピトープのマッピング材料および方法

M e t 4 をP B S 中2.0 mg / ml の濃度で調製した。P h . D . - 1 2 およびP h . D . - 7 ファージディスプレイペプチドライブラーイをNew England Biolabs ファージディスプレイペプチドライブラーイキットから入手した。-96 g I I I シークエンシングプライマーおよび宿主株E . c o l i E R 2 7 3 8 もまたこのキットから入手した。その他の全ての溶液をS I G M A の化学物質を用いて調製した。

【0096】

図8はM e t 4 エピトープをマッピングするために使用した方法を示す。最初に各々異なるペプチド配列を表示するファージのライブラーイを、M e t 4 抗体でコーティングしたプレートに暴露する。図7はファージディスプレイペプチドライブラーイでのバイオパニングを示す。ファージディスプレイは無作為ペプチド配列とこれらの配列をコードするD N Aとの間の連結の存在を可能にする。バイオパニングは、ファージディスプレイされたペプチドを標的分子（酵素、抗体等）でコーティングされた表面に暴露する選択技術である。

【0097】

New England Biolabs ファージディスプレイペプチドライブラーイキットに従ってM 1 3 ファージディスプレイライブラーイを使用してバイオパニングを実施した。60×15 mmペトリ皿を100 μg / ml M e t 4 抗体でコーティングし、そしてプレートをおよそ1×10⁻¹¹ p f u のM 1 3 ペプチドライブラーイに暴露する種々の工程が含まれた。未結合ファージをT B S T で洗い流し、そして特異的に結合したファージを10%グリシンH C l およびB S A で溶出した。以下にさらに詳記されるように溶出されたファージを増幅し；その過程を全部で3-4ラウンド繰り返し；そして最後にM e t 4 抗体に関して陽性の個々のクローンを単離し、そしてシークエンシングした。

10

20

30

40

50

【0098】

ファージ増幅および沈殿のために、1：100希釈のER2738培養物を感染および増幅に使用した。ファージを20%ポリエチレングリコール、2.5M NaClで沈殿させた。数回の結合／増幅サイクルを通してMet4抗体に特異的なファージを取り出した。表4は、Ph.D.-12ライブラリーからの最初のインプットおよびMet4に対するパニングの各ラウンドに続くアウトプットに関するファージ数をpfuで示す。

【0099】

【表4】

表4：

10

ファージインプット	パニングの第1ラウンドから溶出されたファージ	パニングの第2ラウンドから溶出されたファージ	パニングの第3ラウンドから溶出されたファージ
1x10 ¹¹ pfu	1.5 x 10 ⁴ pfu	6.0 x 10 ⁴ pfu	1.1 x 10 ⁸ pfu
回収%	0.000015%	0.00006%	1.1%
富化倍数	1.00	4X	73333X

最終ファージ単離体の力価決定および増幅を実施して、単一のDNA配列に相当する各ファージクローニングを確実にした。

20

【0100】

以下の方法に従ってM13コロニーのELISAを実施した：Met4抗体を個々のM13ペプチドディスプレイクローニングに暴露した。1%乳バッファー中1：5000希釈のHRP抱合抗M13抗体を二次抗体として使用した。使用した過酸化物基質をPierce TMB基質キットから入手した。KC4-PCプログラムを使用してプレートを450nmで読んだ。図9は野生型M13と比較したファージディスプレイ12ライブラリーから回収されたMet4特異的ファージクローニングのELISAからのOD450nm値を示す棒グラフである。

【0101】

以下のようにM13からssDNAを単離した：ELISAから最高の吸光度の読みを有する8個のM13ファージクローニングを選択し、そしてQIAGENによるQIAprep M13ハンドブックからのQIAprep Spin M13プロトコールを使用してそのssDNA分子を単離した。

30

【0102】

超特異的ファージクローニングのDNAシークエンシングによりエピトープを特徴付けした。DNAシークエンシング以下のように実施した：各M13クローニングから単離されたDNA 2.0 μlをPCR管中28gIIIシークエンシングプライマー-1.0 μlと組み合わせた。試料をPCRに提示し、そしてシークエンシングを実施した。Simプログラムを使用して、シークエンシングされたMet4特異的M13ペプチド（ファージディスプレイ12ペプチドライブラリーから）をヒトMet細胞外HGF/SF結合ドメイン配列と比較した。アミノ酸配列間の類似性を表5にて太字で示す。

40

【0103】

【表5】

表5：

DWDPSYRHRPPS	
SPCVDWGPHRAC	
TPPNSVDILPSR	
AHGPF <small>D</small> HLP <small>E</small> LH	
AWSDWSPSSRQT	
SMWDFEPSSRPR	10
TIRPDWSPALRA	
M e t タンパク質 $^{233}\text{SYIDVLPEFRDSYP}^{246}$	

M e t 4 のエピトープ：

D N A 配列分析をヒトM e t タンパク質上の（配列番号：1の）アミノ酸残基236 - 242のエピトープD V L P E F R（表5参照）に、またはさらに具体的にはヒトM e t タンパク質上の（配列番号：1の）アミノ酸残基236 - 239のエピトープD V L P（表5参照）にマッピングした。

【0104】

実施例7

20

R A 4 E ウサギ抗M e t 抗体はM e t 4 のエピトープに結合する

ヒトM e t アミノ酸残基233 - 246からのペプチドS Y I D V L P E F R D S Y P（ペプチド1）およびM e t アミノ酸478 - 491からの別のペプチドN F L L D S H P V S P E V I（ペプチド2）をGenemed Synthesis, Inc.により合成した。ペプチド1をK L Hタンパク質に抱合させた。Pacific ImmunoLOGY CorpによりS Y I D V L P E F R D S Y P - K L Hに対してウサギポリ血清（polysera）が作成された。ポリクローナル抗体（「R A 4 E」と称される）を、ペプチド1を抱合させたアフィニティーカラムを通して精製した。

【0105】

R A 4 E 抗M e t 抗体はM e t 4 と競合する

30

ウサギ抗M e t 抗体R A 4 Eを競合E L I S Aにより特徴付けした。競合E L I S Aでは、96ウェルプレートを1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のM e t 25 - 567タンパク質でコーティングした。M e t 4 およびR A 4 Eを連続希釈のペプチド1およびペプチド2と混合し、そして混合物をM e t コーティングプレート上で室温で1.5時間インキュベートした。洗浄後抗マウスまたは抗ウサギA P 抱合体を1 : 2000希釈でプレートに添加した。展開させた後、E L I S Aリーダーにより405nmで光学密度値を測定した。ペプチド1は用量依存的な様式でM e t タンパク質に対するM e t 4 およびR A 4 E 双方の結合を遮断したが（図10A - C）が、ペプチド2は結合に影響を及ぼさなかった。

【0106】

M K N 4 5 およびN I H 3 T 3 細胞におけるM e t 4 およびR A 4 E の免疫蛍光染色

40

ウサギ抗M e t 抗体R A 4 Eを免疫蛍光染色によりさらに特徴付けした。M K N 4 5 およびN I H 3 T 3 細胞を8チャンバースライドにおいて37℃で一晩同時培養した。次いで細胞をP B Sで洗浄し、そして10%ホルマリンで固定した。固定細胞をM e t 4 およびR A 4 E（各々8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）と共に4℃で一晩インキュベートした。C 2 8（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を陽性対照として使用した。洗浄後、抗マウスローダミンレッドおよび抗ウサギF I T C 抱合体を細胞に添加し、そしてスライドを室温（R T）で1.5時間インキュベートした。核をD A P Iで染色した。M e t 4 およびR A 4 EはM e t 発現M K N 4 5 細胞において共存することが見出されたが、M e t 陰性N I H 3 T 3 細胞においては見出されなかった（図11A - C）。R A 4 EはM e t 4 に類似して10%ホルマリンで固定されたM e t 陽性M K N 4 5 細胞を染色したので、R A 4 EはM e t 4 に類似する特

50

性を有するはずである。すなわちこのデータにより、R A 4 E はM e t 4 同様、免疫組織化学染色によるホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）組織切片に関する臨床診断に使用できることが示唆される。

【 0 1 0 7 】

前記の記載は好ましい（複数の）実施態様の記載にすぎないと考えられる。当業者および本発明を作成または使用するものは本発明の修飾に気づくであろう。それ故に図面にて示された、および前記で記載された（複数の）実施態様は単なる例証目的のためであり、そして均等論を含む特許法の原理に従って解釈されるような請求の範囲により定義される本発明の範囲を限定することを意図するものではないことは理解される。

（参考文献）

10

【 0 1 0 8 】

【化1】

1. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: Met, metastasis, motility and more, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4:915-925
2. Shu W, Guttentag S, Wang Z, Andl T, Ballard P, Lu MM, Piccolo S, Birchmeier W, Whitsett JA, Millar SE, Morrisey EE: Wnt/beta-catenin signaling acts upstream of N-myc, BMP4, and FGF signaling to regulate proximal-distal patterning in the lung, *Dev Biol* 2005, 283:226-239
3. Rosario M, Birchmeier W: How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase, *Trends Cell Biol* 2003, 13:328-335 10
4. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF: Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins, *Oncogene* 2000, 19:5582-5589
5. Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, Vande Woude GF: RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival, *Cancer Res* 2004, 64:7962-7970
6. Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE, Gibbs JB, Pan BS: Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival, *Cancer Res* 2007, 67:2081-2088 20
7. Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, Christensen JG, Salgia R: Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer, *Cancer Res* 2005, 65:1479-1488
8. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, Park M: Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein, *Mol Cell* 2001, 8:995-1004 30
9. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R: c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition, *Cancer Metastasis Rev* 2003, 22:309-325
10. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B: Germline and somatic mutations in the

【0109】

【化2】

tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas, Nat Genet 1997, 16:68-73

11. Jeffers M, Schmidt L, Nakaigawa N, Webb CP, Weirich G, Kishida T, Zbar B, Vande Woude GF: Activating mutations for the met tyrosine kinase receptor in human cancer, Proc Natl Acad Sci U S A 1997, 94:11445-11450

12. Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Brett S, Bottardi S, Giordano S, et al.: Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer, Clin Cancer Res 1995, 1:147-154

13. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E: Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer, Biochem Biophys Res Commun 1992, 189:227-232

14. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, Narsimhan RP, Hartmann G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, et al.: Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor, Embo J 1991, 10:2867-2878

15. Rosen EM, Knesel J, Goldberg ID: Scatter factor and its relationship to hepatocyte growth factor and met, Cell Growth Differ 1991, 2:603-607

16. Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky IA, Linehan WM, Zbar B, Weirich G: Trisomy 7-harbouring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas, Nat Genet 1998, 20:66-69

17. Kang JY, Dolled-Filhart M, Ocal IT, Singh B, Lin CY, Dickson RB, Rimm DL, Camp RL: Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer, Cancer Res 2003, 63:1101-1105

18. Tsarfaty I, Alvord WG, Resau JH, Altstock RT, Lidereau R, Bieche I, Bertrand F, Horev J, Klabansky RL, Keydar I, Vande Woude GF: Alteration of Met protooncogene product expression and prognosis in breast carcinomas, Anal Quant Cytol Histol 1999, 21:397-408

19. Huang TJ, Wang JY, Lin SR, Lian ST, Hsieh JS: Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features, Acta Oncol 2001, 40:638-643

【0 1 1 0】

【化3】

20. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Coccia E, Capogreco M, Colella G, Leonardi R, Campisi G, Carinci F: Effect of c-Met expression on survival in head and neck squamous cell carcinoma, *Tumour Biol* 2006, 27:115-121
21. Baykal C, Ayhan A, Al A, Yuce K, Ayhan A: Overexpression of the c-Met/HGF receptor and its prognostic significance in uterine cervix carcinomas, *Gynecol Oncol* 2003, 88:123-129
22. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gomez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgerisson SS: Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype, *J Clin Invest* 2006, 116:1582-1595
23. Tolgay Ocal I, Dolled-Filhart M, D'Aquila TG, Camp RL, Rimm DL: Tissue microarray-based studies of patients with lymph node negative breast carcinoma show that met expression is associated with worse outcome but is not correlated with epidermal growth factor family receptors, *Cancer* 2003, 97:1841-1848
24. Lengyel E, Prechtel D, Resau JH, Gauger K, Welk A, Lindemann K, Salanti G, Richter T, Knudsen B, Vande Woude GF, Harbeck N: C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu, *Int J Cancer* 2005, 113:678-682
25. Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfing P: An expression signature of syndecan-1 (CD138), E-cadherin and c-met is associated with factors of angiogenesis and lymphangiogenesis in ductal breast carcinoma in situ, *Breast Cancer Res* 2007, 9:R8
26. Pozner-Moulis S, Cregger M, Camp RL, Rimm DL: Antibody validation by quantitative analysis of protein expression using expression of Met in breast cancer as a model, *Lab Invest* 2007, 87:251-260
27. Ide T, Kitajima Y, Miyoshi A, Ohtsuka T, Mitsuno M, Ohtaka K, Miyazaki K: The Hypoxic Environment in Tumor-Stromal Cells Accelerates Pancreatic Cancer Progression via the Activation of Paracrine Hepatocyte Growth Factor/c-Met Signaling, *Ann Surg Oncol* 2007,
28. Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF: Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:4731-4735
29. Jeffers M, Fiscella M, Webb CP, Anver M, Koochekpour S, Vande Woude GF: The mutationally activated Met receptor mediates motility and metastasis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:14417-14422

【化4】

30. Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barnettler A, Archibald H, Kim WJ, Okimoto RA, Bell DW, Sgroi DC, Christensen JG, Settleman J, Haber DA: Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752, Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103:2316-2321
31. Welm AL, Kim S, Welm BE, Bishop JM: MET and MYC cooperate in mammary tumorigenesis, Proc Natl Acad Sci U S A 2005, 102:4324-4329 10
32. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salgia R: c-MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions, Cancer Res 2003, 63:6272-6281
33. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffei A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM: Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas, Oncogene 2000, 19:1547-1555
34. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, Schmidt L, Zbar B, Vande Woude GF: A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer, Oncogene 2000, 19:4947-4953 20
35. Puri N, Ahmed S, Janamanchi V, Tretiakova M, Zumba O, Krausz T, Jagadeeswaran R, Salgia R: c-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma, Clin Cancer Res 2007, 13:2246-2253
36. Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF: Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation, Proc Natl Acad Sci U S A 2003, 100:12718-12723
37. Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM: Scatter factor induces blood vessel formation in vivo, Proc Natl Acad Sci U S A 1993, 90:1937-1941 30
38. Zou HY, Li Q, Lee JH, Arango ME, McDonnell SR, Yamazaki S, Koudriakova TB, Alton G, Cui JJ, Kung PP, Nambu MD, Los G, Bender SL, Mroczkowski B, Christensen JG: An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms, Cancer Res 2007, 67:4408-4417
39. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C, Fillbrandt R, Merchant M, Schwall R, Westphal M, Lamszus K: A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo, Clin Cancer Res 2006, 12:6144-6152 40

【0 1 1 2】

【化5】

40. Puri N, Khrantsov A, Ahmed S, Nallasura V, Hetzel JT, Jagadeeswaran R, Karczmar G, Salgia R: A selective small molecule inhibitor of c-Met, PHA665752, inhibits tumorigenicity and angiogenesis in mouse lung cancer xenografts, *Cancer Res* 2007, 67:3529-3534
41. Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamele L, Gough J, Bandyopadhyay A, Hartmann G, Butler PJ: Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:12039-12044
42. Chen D, Adenekan B, Chen L, Vaughan ED, Gerald W, Feng Z, Knudsen BS: Syndecan-1 expression in locally invasive and metastatic prostate cancer, *Urology* 2004, 63:402-407
43. Gmyrek GA, Walburg M, Webb CP, Yu H-M, You X, Vaughan ED, Vande Woude GF, Knudsen BS: Normal and Malignant Prostate Epithelial Cells Differ in Their Response to Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor, *Am J Pathol* 2001, 159:579-590
44. Ridler T, Calvard S: Picture thresholding using an iterative selection method., *IEEE Trans on Systems Man and Cybernetics* 1978, SMC 8:630-632
45. Russ JC: The image processing handbook. Edited by Boca Raton, Fla., CRC Press, 2002, 732 p. p
46. Altstock RT, Stein GY, Resau JH, Tsarfaty I: Algorithms for quantitation of protein expression variation in normal versus tumor tissue as a prognostic factor in cancer: Met oncogene expression, and breast cancer as a model, *Cytometry* 2000, 41:155-165
47. Knudsen BS, Gmyrek GA, Inra J, Scherr DS, Vaughan ED, Nanus DM, Kattan MW, Gerald WL, Vande Woude GF: High expression of the Met receptor in prostate cancer metastasis to bone, *Urology* 2002, 60:1113-1117
48. Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, Day ML: Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma, *Am J Pathol* 1995, 147:386-396
49. van Leenders G, van Balken B, Aalders T, Hulsbergen-van de Kaa C, Ruiter D, Schalken J: Intermediate cells in normal and malignant prostate epithelium express c-MET: implications for prostate cancer invasion, *Prostate* 2002, 51:98-107
50. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval techniques: current perspectives, *J Histochem Cytochem* 2001, 49:931-937
51. Pozner-Moulis S, Pappas DJ, Rimm DL: Met, the hepatocyte growth factor receptor, localizes to the nucleus in cells at low density, *Cancer Res* 2006, 66:7976-7982

【0 1 1 3】

【化6】

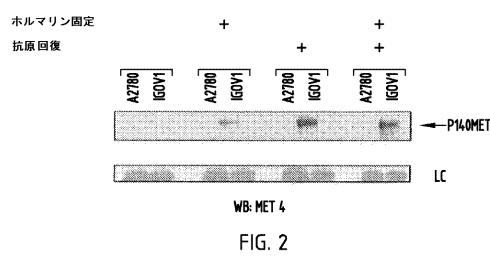
52. Fischer U, Muller HW, Sattler HP, Feiden K, Zang KD, Meese E: Amplification of the MET gene in glioma, Genes Chromosomes Cancer 1995, 12:63-65

53. Moon YW, Weil RJ, Pack SD, Park WS, Pak E, Pham T, Karkera JD, Kim HK, Vortmeyer AO, Fuller BG, Zhuang Z: Missense mutation of the MET gene detected in human glioma, Mod Pathol 2000, 13:973-977

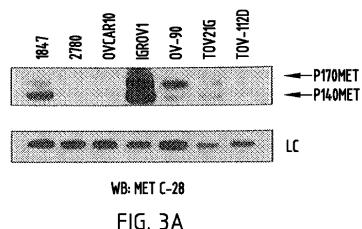
54. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, Turkyilmaz MA, Salgia R, Yamada SD, Vande Woude GF, Tretiakova MS, Lengyel E: c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion, Cancer Res 2007, 67:1670-1679

10

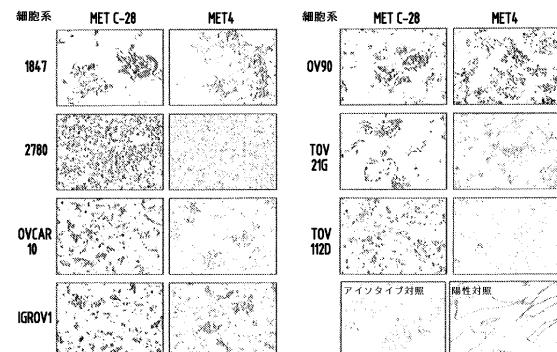
【図2】



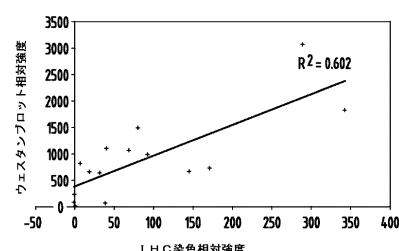
【図3 A】



【図3 B】



【図3 C】



【図4】

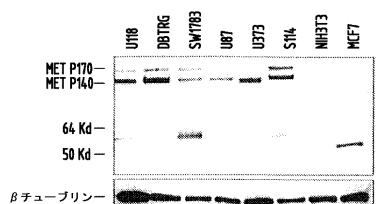


FIG. 4A

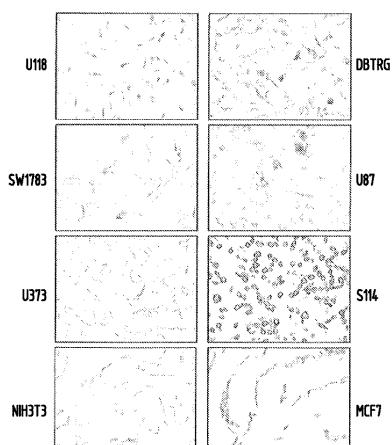


FIG. 4B

【図5】

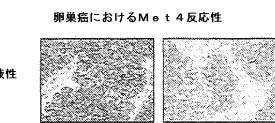


FIG. 5A

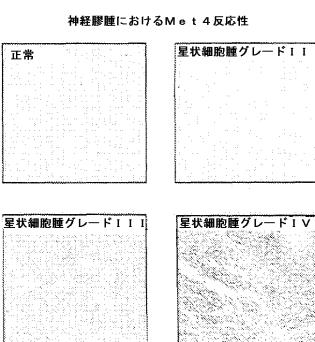


FIG. 5B

【図6】

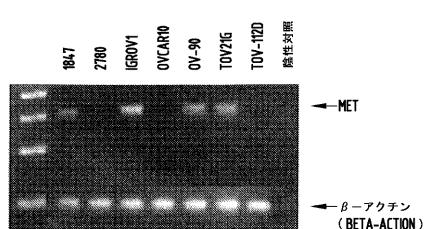


FIG. 6

【図8】

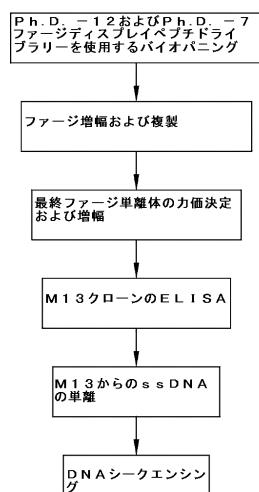


FIG. 8

【図7】

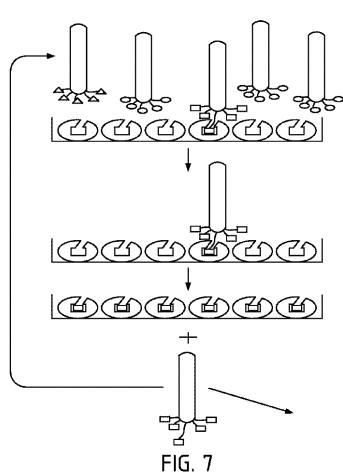


FIG. 7

【図9】

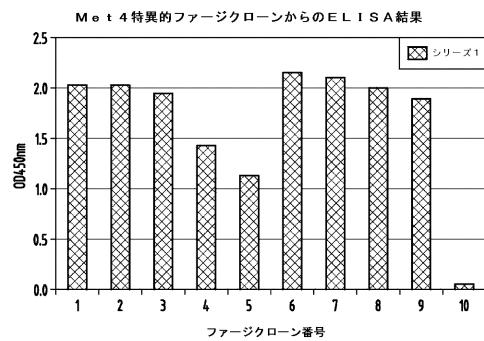


FIG. 9

【図10B】

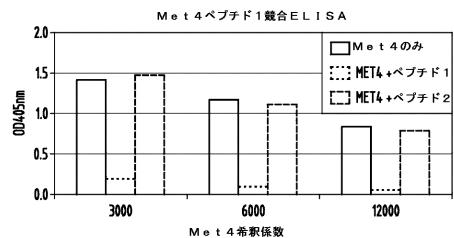


FIG. 10B

【図10C】

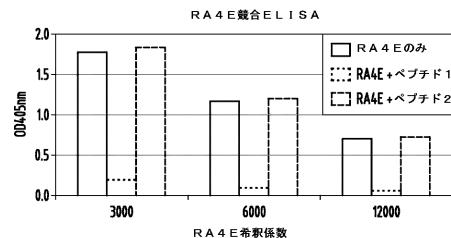


FIG. 10C

【図1】

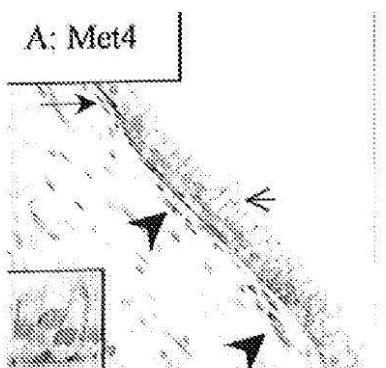


FIG. 1A

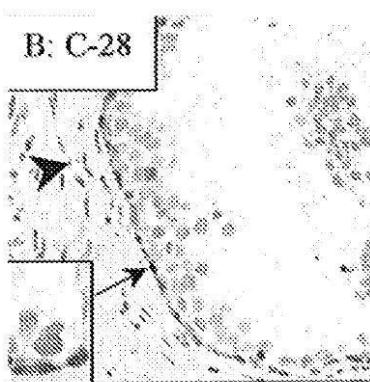


FIG. 1B

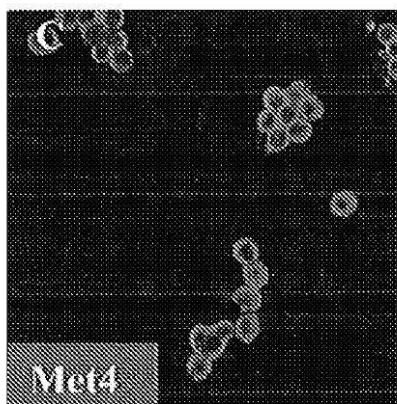


FIG. 1C

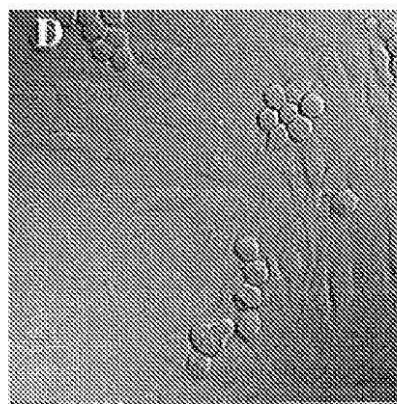


FIG. 1D

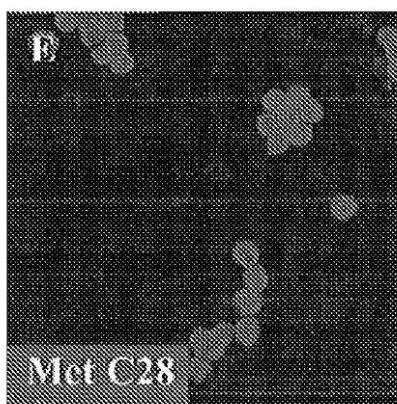


FIG. 1E

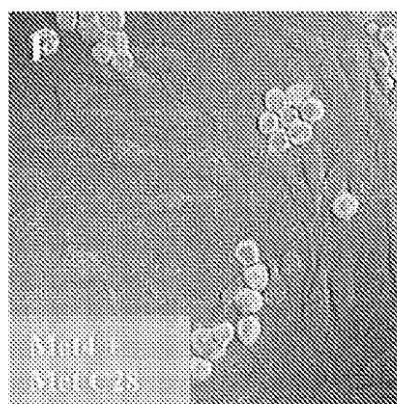


FIG. 1F

【図 10A】

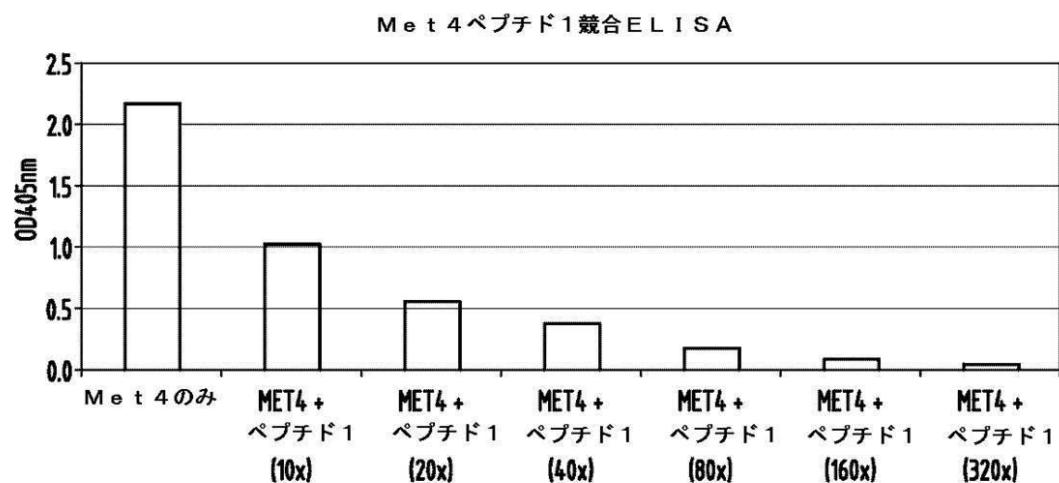


FIG. 10A

【配列表】

0004806469000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/48 (2006.01) G 0 1 N 33/48 R
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 カオ, ボーリヤン

アメリカ合衆国 ミシガン 49301, アダ, エヌ.イー., ドニーブルック コート
158

(72)発明者 バンデ ウォウド, ジョージ エフ.

アメリカ合衆国 ミシガン 49301, アダ, エヌ.イー., バイリー ドライブ 94
51

(72)発明者 クヌードセン, ベアトリス エス.

アメリカ合衆国 ワシントン 98105, シアトル, エヌ.イー. 41エスティー スト
リート 5154

(72)発明者 チャオ, ピン スー

アメリカ合衆国 ミシガン 49546, グランド ラピッズ, ネトルズワース ウェイ 1
2

審査官 小暮 道明

(56)参考文献 Br. J. Cancer, 96(2007.01.29) p.329-335

Steroids, 67(2002) p.799-813

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/

C07K

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)