

(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 I

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C O 7 K 16/40 (2006.01)

C O 7 K 16/40

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574 A

G O 1 N 33/577 (2006.01)

G O 1 N 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) 国際出願番号 PCT/US2008/074249
 (87) 国際公開番号 W02009/029591
 (87) 国際公開日 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
 ストウィック 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Me t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って、cMe t肝細胞成長因子受容体(Me t)に結合するモノクローナル抗体(Me t-特異的mAb)、または該Me t-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cMe t肝細胞成長因子受容体(Me t)に結合する、単離されたMe t-特異的モノクローナル抗体(mAb)、または該Me t-特異的mAbの抗原結合フラグメント。

【請求項3】

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

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、工程を含む、方法。

20

【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 発現を有する疾患を有さない健全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；を含む、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。

40

【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】

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】

10

【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 (H G F / S F) 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。

20

【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 H G F / S F 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 H G F 分

30

40

【0004】

操作された c - M e t および H G F 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改変されているか、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 (R T K) の 1 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 (N S C L C)、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

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、そしてトロンプスポンジン - 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。所定の固形腫瘍型に関して、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。

10

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。

20

(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。

(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Met抗体Met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。

(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。

40

(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) Me t を検出、診断、予後診断または Me t 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)

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 Me t 阻害薬を含む項目 12 に記載のキット。

(項目 17)

(a) Me t 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 Me t の存在を検出すること；の工程を含む Me t 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 Me t の存在を検出するための方法。

(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)

(a) Me 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組織または生物学的試料を入手すること；(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 Me t 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 Me t 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 Me t 関連疾患が癌である項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

前記 Me t 関連疾患が卵巣癌である項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

(a) Me t 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) Me t 阻害薬で患者を処置すること；(c) 該患者から処置後組織を入手すること；(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 Me t 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 Me t 発現レベルを該処置後組織または試料の Me t 発現レベルと比較して該 Me t 阻害薬の有効性を決定すること；の工程を含む、Me t 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。

10

20

30

40

50

(項目25)

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。

(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を入手すること；(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

30

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1 A および 1 B は Met 4 (パネル A) または C 2 8 (パネル B) で染色された F F P E 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1 C から 1 F は Met 4 および C 2 8 での免疫蛍光染色を示す。胃癌 M K N 4 5 細胞 (Met 陽性) および N I H 3 T 3 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1 C は Met 4 を示し ; 図1 D は明視野 (B r i g h t f i e l d) を示し ; 図1 E は Met C 2 8 を示し ; そして図1 F は図1 C および 1 E 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ブロットである。Met 陽性 I G R O V 1 または Met 陰性 A 2 7 8 0 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ブロットティングした。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 (r e t r i e v a l s o l u t i o n) 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 でプロービングし、そして化学発光を用いて展開した。LC : 負荷対照。

【図3 A】ホルマリン固定卵巣癌細胞系における Met 4 および Met C - 2 8 反応性を比較する。図3 A は Met C - 2 8 でプロービングした卵巣癌細胞系のウェスタンブロットである。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3 B は卵巣癌細胞系からの F F P E 細胞ペレットの C 2 8 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 - 2 8 で染色される。対照的に Met 4 反応性はウェスタンブロットで測定された Met 発現と相関する。図3 C はウェスタンブロットのシグナル強度と I H C 測定値との間の相関性を示す。ウェスタンブロットを 3 D 4 モノクローナル抗体 (Z y m e d) でプロービングし、そして L I C O R システムを用いて c - Met 発現を定量した。1 : 500 希釈 (4 μ g / m l) の Met 4 で I H C を実施した。ピアソン相関係数は 0 . 602 である。

【図3 B】ホルマリン固定卵巣癌細胞系における Met 4 および Met C - 2 8 反応性を比較する。図3 A は Met C - 2 8 でプロービングした卵巣癌細胞系のウェスタンブロットである。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3 B は卵巣癌細胞系からの F F P E 細胞ペレットの C 2 8 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 - 2 8 で染色される。対照的に Met 4 反応性はウェスタンブロットで測定された Met 発現と相関する。図3 C はウェスタンブロットのシグナル強度と I H C 測定値との間の相関性を示す。ウェスタンブロットを 3 D 4 モノクローナル抗体 (Z y m e d) でプロービングし、そして L I C O R システムを用いて c - Met 発現を定量した。1 : 500 希釈 (4 μ g / m l) の Met 4 で I H C を実施した。ピアソン相関係数は 0 . 602 である。

【図3 C】ホルマリン固定卵巣癌細胞系における Met 4 および Met C - 2 8 反応性を比較する。図3 A は Met C - 2 8 でプロービングした卵巣癌細胞系のウェスタンブロットである。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3 B は卵巣癌細胞系からの F F P E 細胞ペレットの C 2 8 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ブロットで測定されたMet発現と相関する。図3Cはウェスタンブ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。ウェスタンブロットを3D4モノクローナル抗体(Zymed)でプロービングし、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でプロービングした卵巢癌細胞系のウェスタンブロットである。 - チューブリンを負荷対照として用いる。図4BはMet 4でのFFPE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】卵巢癌および神経膠芽腫におけるMet 4反応性を示す。卵巢癌の切片(図5A)または神経膠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】卵巢癌細胞系におけるMet RNA発現を示すブロットである。卵巢癌細胞系から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から増幅し、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リ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ライブラリーから回収されたMet 4特異的ファージクローンのELISAからのOD450 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】

任意の適当な方法（例えば Berzofsky ら、「Antibody - Antigen Interactions」、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、アジュバント、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ピボ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 Met 4 抗体に、抗 Met 4 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 Met 4 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 CH_2O 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価フラグメント、(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価フラグメント、(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(W a r d ら、N a t u r e 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、組換え法を用いてV L および V H 領域が組み合わされて1価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B i r d ら、S c i e n c e 242:423-26(1988)、H u s t o n ら、P r o c N a t l A c a d S c i U S A 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。

【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リンパ球クローン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K o h l e r およびM i l s t e i n、N a t u r e 256:495-497(1975)；米国特許第4376110号；H a r l o w , E . ら、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、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、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1988)；M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d H y b r i d o m a s : A N e w D i m e n s i o n i n B i o l o g i c a l A n a l y s e s、P l e n u m P r e s s、ニューヨーク、ニューヨーク州(1980)；H . Z o l a ら、M o n o c l o n a l H y b r i d o m a A n t i b o d i e s : T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s、C R C P r e s s (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。

【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。

【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

10

20

30

40

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」なる用語はインビボ、エキソビボ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が、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でもある。「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。参照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пит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末端で単一の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C_Hドメインの配列に依存して、Igは各々、μ、δ、ε、およびκ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

タイプ、IgA₁ および IgA₂ (各々H鎖a1および 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))。Cドメイン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。

10

【0037】

抗体の定義には全て当分野において周知のFab、Fab'、F(ab')₂、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単一の抗原結合部位のみを有する1価抗体のその他の形態は、特にインビボで抗体のMet担持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。

20

【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. USA 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。

30

40

【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

50

- 239のポリペプチドDVL 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(F F P E)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 Blve., Manassas, VA, 20110-2209である。F F P E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F F P E組織においてc-Metと反応性がある抗Met抗体を入手するための機会を大きく増大させた。

10

【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ELISA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ELISA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、定量的により高い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)。

20

30

【0043】

抗体、そのフラグメントおよび誘導体はF F P E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およびウェスタンブ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F F P Eにおけるc-Met発現レベルを定量する($\text{OD} = 0.602$)(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。

40

【0044】

F F P E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

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。ウェスタンブ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 組織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ブロットによる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)。

【0045】

M e t 4 はM e t 受容体タンパク質の細胞外25から567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236から242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236から239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ブロット後の変性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。

【0046】

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75%から65%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。

【0047】

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IVで3 / 18に、そしてグレードIIで1 / 18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 / 11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 / 28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c - M e t 発現が10%高いことが観察された以前の研究とは異なる

⁵⁴。高い c - M e t 発現に寄与するメカニズムおよび卵巣癌における c - M e t 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 - M e t R N A 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 - M e t タンパク質の高発現が c - M e t 遺伝子の増幅、c - M e t 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 - M e t 過剰発現の関連性および M e t 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 - M e t 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 M e t 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 Z o l a、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : A M a n u a l o f T e c h n i q u e s、C R C P r e s s , I n c .、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 M e t 4 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 M e t 4 抗体に (または抗 M e t 4 抗体に) 連結させることにより、組織または試料中の M e t 4 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 M e t 4 抗体と (および、検出可能な部分が代わりに抗 M e t 4 抗体に連結されている場合は抗 M e t 4 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实例には、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 (P E T) 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、P E T 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 H a u g l a n d、H a n d b o o k o f F l u o r e s c e n t P r o b e s a n d R e s e a r c h C h e m i c a l s (第6版)、M o l e c u l a r P r o b e s、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 O r e g o n G r e e n (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、R h o d a m i n e G r e e n (商標) および R h o d o l G r e e n (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 R h o d a m i n e G r e e n (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

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。事例には、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】

別の研究法では、蛍光生成物、例えばフルオレサミン、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】

$^{152}\text{Eu}^{+3}$ 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ト基を使用して、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 NH_2 含有抗体を容易に修飾することができる。

【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もできる。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、テロマトリック (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。

【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】

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

10

20

30

40

50

ASE IMMUNOASSAY、CRC Press、ボッカートン(1991)；Voller, A.ら、Bull. WHO 53:55-65(1976)；Voller, A.ら、J. Clin. Pathol. 31:507-520(1978)；Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523(1981)；Maggio, E. (編)、Enzyme Immunoassay、CRC Press、ボッカートン(1980)、Ishikawa, E.ら(編)、Enzyme Immunoassay、Kagaku Shoin、東京(1981)；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、リンゴ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

【0058】

抗Met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

【0059】

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。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3969287号；第3691016号；第4195128号；第4247642号；第4229537号；および第4330440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。

30

【0060】

その他の修飾にはグルタミルおよびアスパラギン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. Creighton、Proteins: Structure and Molecular Properties、W. H. Freeman & Co., サンフランシスコ(1983))、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

【0061】

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(Asp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SerまたはThrに付着；もしかしたら5-ヒドロキシProまたは5-ヒドロキシLys)されている。トリペプチドAsp-Z-Ser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

【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る。

【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M e t 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M e t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、M e t 4抗体はいくつかの型の腫瘍においてM e t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M e t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M e t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。

10

【0068】

本発明はまた、患者の細胞におけるM e t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、M e t阻害薬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M e t阻害薬およびM e t 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M e t 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M e t発現レベルを決定し、そして患者におけるM e t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M e tが阻害または根絶されているかどうかを決定する。

20

【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 - M e tに関するM e t 4の特異性、c - M e t定量の精度およびM e t 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(F F P E)細胞ペレットにおいて評価した。M e t 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 - M e t発現を測定した。具体的には、22細胞系においてF F P E細胞ペレットの免疫組織化学分析からのM e t 4シグナルはc - M e t発現のウェスタンブロット測定値と相関した($r = 0.603$)。M e t 4とは対照的に、S a n t a C r u zからのC - 28抗体はc - M e tを発現しない細胞系のF F P E細胞ペレットと反応した。反復するM e t 4染色アッセイの技術的な信頼性はアッセイ内でC V % = 37%およびアッセイ間でC V % = 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M e t 4で陽性染色され、そして25%でM e t 4シグナルが高かった。神経膠腫の63%の癌細胞においてM e t 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M e t 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F F P E組織においてM e t 4抗体は正確におよび再現性よくc - M e t発現を測定したため)、M e t 4抗体は臨床の局面で組織または生物学的試料中のc - M e t発現定量に有用である。

30

40

【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:

V a n A n d e l I n s t i t u t eのD r . E r i c X uの研究室で組換えタンパク質M e t 25 - 567Hを調製した。M e t 25 - 567H構築物(配列番号: 1、25 - 567位置のアミノ酸)および精製M e t 928タンパク質はC a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g yのD r . E r m a n n o G h e r a d iの研究室からのものである⁴¹。組換え融合タンパク質M e t - I g GをR & D s y s

50

t e m s (ミネアポリス、ミネソタ州) から購入した。

【 0 0 7 2 】

B A L B / 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 (S D S 試料バッファー中で煮沸) M e t 2 5 - 5 6 7 H 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、M e t 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 M K N 4 5 (M e t 陽性) および N I H 3 T 3 (M e t 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 P 3 X 6 3 A F 8 / 6 5 3 骨髓腫細胞と融合させた。E L I S A および免疫蛍光染色によりハイブリドーマ細胞を M e t に対する反応性に関してスクリーニングした。

10

【 0 0 7 3 】

1 0 個の 9 6 ウェルプレートにコーティングバッファ (0 . 2 M N a 2 C O 3 / N a H C O 3 , p H 9 . 6 ; 5 0 μ l / ウェル) 中 2 μ g / m l M e t 2 5 - 5 6 7 H で、4 で一晩コーティングした。次いでプレートを 1 % B S A 含有 P B S (2 0 0 μ l / ウェル) で、4 で一晩遮断した。ハイブリドーマ上澄 5 0 μ l を室温 (R T) で 1 . 5 時間ウェルに添加した。プレートを洗浄バッファ (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を伴う P B S) 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 I g G (S i g m a) を 1 : 2 0 0 0 希釈で、室温で 1 . 5 時間添加した (5 0 μ l / ウェル) 。洗浄バッファで 4 回洗浄した後、ホスファターゼ基質 C P - ニトロフェニルリン酸 (K i r k e g a a r d & P e r r y L a b o r a t o r i e s) を 3 0 分間添加し、そして 4 0 5 n m で吸光度を測定した。M e t 2 5 - 5 6 7 H と強い反応性 (O D 値は 2 . 0 より大きい) を有する全部で 3 4 個のハイブリドーマを選択し、そして E L I S A により M e t 9 2 8 に関して試験し、そしてそれらのうちの 1 4 個が陽性であった。M e t 2 5 - 5 6 7 H および M e t 9 2 8 の双方と反応する 1 4 個のクローンを E L I S A により M e t - I g G に対して試験した。7 個のクローンが 3 つの M e t 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

【 0 0 7 4 】

M K N 4 5 および N I H 3 T 3 細胞を混合し、そして 1 0 個の 9 6 ウェルプレートに蒔き、そして 3 7 で一晩培養した。細胞を洗浄し、そして翌日 1 0 % ホルマリンで固定した。7 個のクローンからのハイブリドーマ上澄 5 0 μ l を、固定された細胞が入ったウェルに 3 7 で 1 . 5 時間添加した。プレートを洗浄バッファ (0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 を伴う P B S) 中で 2 回洗浄し、そして 1 : 1 0 0 希釈のローダミンレッド抱合ヤギ抗マウス I g G (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b) を 3 7 で 1 . 5 時間添加した (3 0 μ l / ウェル) 。洗浄バッファ中で 2 回洗浄した後、細胞を蛍光顕微鏡下で試験した。5 個のクローンを陽性で見出し、そして取り、そして増殖させた。これらの 5 個のクローンに以前の融合からの 3 個のクローン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。クローン 8 G 6 (M e t 4 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 M e t タンパク質に対する E L I S A により検証された。パ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 アフィニティーカラムを使用して F P L C により精製した。

30

40

【 0 0 7 5 】

免疫組織化学

細胞ペレット : N I H 3 T 3 、 S 1 1 4 (H G F / S F および M e t に関するヒト遺伝子でトランスフェクトされた N I H 3 T 3 細胞) 2 3 、 S K - L M S - 1 / H G F (ヒト M e t およびヒト H G F / S F に関するヒト平滑筋肉腫細胞系オートクリン) 2 4 、 S W - 1 7 8 3 、 U 1 1 8 、 U 8 7 、 U 3 7 3 、 D B T R G (ヒト脳神経膠芽腫) 、 M C F - 7 (乳癌) 、 E S - 2 、 C a O V 3 、 O V - 9 0 、 S K O V 3 、 T O V - 1 1 2 D 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 Coucos (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Cybrdi (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 (pH9) (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Met4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Met4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結合ストレプトアビジン (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自動ヘマトキシリンで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⁴²。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】

ウェスタンブロット分析

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⁴³。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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 (50mg) を4-15%グラジエントSDS-PAGE上で分離し、そしてImmobilon (商標) - P PVDf (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ブ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 (pH9) 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、Met4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

で使用するか、またはAlexaFluor680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

CRI Nuanceカメラシステム(www.cri-inc.com)を使用してMet4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。420nmと720nmの間で20nm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(RidderおよびCalvard⁴⁴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⁴⁵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Met4染色に関する閾値を設定した。陰性対照細胞系(A2780、OVCA8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⁴⁶。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Met4細胞のパーセントを決定した。

【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。

【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。

【0083】

ホルマリン固定およびパラフィン包埋(FFPE)組織における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

10

20

30

40

50

c h i v a l) 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) 。

【 0 0 8 4 】

【 表 1 】

表 1 : M e t 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	H A T 培地生存		960
M e t 2 5 - 5 6 7 H に対する E L I S A	960	M e t 2 5 - 5 6 7 H に対する E L I S A 陽性		34
M e t 9 2 8 に対する E L I S A	34	M e t 2 5 - 5 6 7 H および M e t 9 2 8 双方に対する E L I S A 陽性		14
M e t - I g G に対する E L I S A	14	3つのタンパク質 : M e t 2 5 - 5 6 7 H 、 M e t 9 2 8 および M e t - I g G に対する E L I S A 陽性		7
M K N 4 5 / N I H 3 T 3 ホルマリン固定細胞における I F 染色	7	M K N 4 5 細胞	N I H 3 T 3 細胞	5
前立腺切片における I H C	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 (I n t e n s e s t r o m a l c e l l s)	3 / 8 M e t 4 は最も強い特異的染色を生じた

前立腺における M e t 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 1 A 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 M e t

4 と称した。M e t 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 1 A、挿入）。10%ホルマリン中で固定された M e t 反応性 M K N 4 5 細胞および非反応性 N I H 3 T 3 細胞の染色同時培養物を染色することにより M e t 4 をさらに検証した。免疫蛍光染色は M K N 4 5 細胞の膜に沿って特異的に観察され、そして C - 2 8 (S a n t a C r u z) の免疫反応性と一致する（図 1 C - F ）。

【 0 0 8 5 】

実施例 3

ホルマリン固定細胞における c - M e t との反応性に関する M e t 4 の特異性

M e t 4 の M e t 受容体タンパク質との反応性を確認するために、ウェスタンブロットを M e t 4 でプロービングした。組織におけるホルマリン固定の再現条件により、ウェスタンブロット膜を 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 - M e t を発現する I G R O V 1 卵巣癌細胞において、M e t 4 は変性 M e t 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 - M e t に対する M e t 4 結合を増大させ、そして 140 k D a の c - M e t バンドを表した（図 2）。M e t 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 M e t 受容体陰性 A 2 7 8 0 細胞系においても現れた。免疫蛍光およびウェスタンブロッティング結果により、M e t 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 M e t 上の特異的エピトープに結合することが実証される。

【 0 0 8 6 】

ホルマリン固定細胞調製物における M e t 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。M e t 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 - M e t タンパク質を発現する。A 2 7 8 0、O V C A R 1 0 および T O V - 1 1 2 D は M e t R N A またはタンパク質を発現せず（図 3 A および図 6）、そして I G R O V 1 および O V C A R 5 細胞は M e t を高度に発現する。ホルマリン固定調製物における M e t 4 および M e t C - 2 8 の特異性を対応するウェスタンブ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 M e t 4 または C - 2 8 M e t 抗体のいずれかで染色した。C - 2 8 M e t は全ての細胞系と無差別的に反応したが、M e t 4 はウェスタンブロットおよび P C R 分析で M e t 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 3 B）。ホルマリン固定組織における M e t 4 の反応性が c - M e t 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、I H C 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ブロットにおいて検出された c - M e t の量と比較した。細胞ペレット調製物中の H i s t o g e l の凝集塊に起因する異常値を除去した後、I H C と W B との間のピアソン相関係数は $s = 0.602$ であった（図 3 C）。

【 0 0 8 7 】

種々の非卵巣細胞系において M e t 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、M e t 4 が c - M e t 発現ヒト細胞と反応するが、c - M e t 陽性マウス細胞または c - M e t 陰性ヒト細胞とは反応しないことが確認された。

【 0 0 8 8 】

実施例 4

M e t 4 免疫組織化学測定の実現性

結果により、新規 M e t 4 抗体は F F P E 細胞調製物において c - M e t 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 - M e t を発現する T O V 2 1 D 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 M e t 4 染色強度の一貫性を F F P E 細胞ペレットにおいて分析した。加えて、M e t 4 抗体の 2 つの別個のロットからの染色結果を比較

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った。異なる日の細胞ペレットにおいて T O V 2 1 D 細胞間で M e t 4 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 % C V は 39 % であった。別個の3日間に実施した M e t 4 アッセイの変動性（アッセイ間変動性）は % C V = 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。

【 0 0 8 9 】

実施例 5

卵巣癌および神経膠腫における M e t 4 発現

保存 (a r c h i v a l) F F P E 組織における M e t 4 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 T M A を分析した。M e t 4 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った（図 5 A）。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 F I G O ステージ I I I - I V であった。29 個全ての卵巣癌が M e t 4 反応性を示した（表 2）。

【 0 0 9 0 】

【表 2】

表 2：卵巣癌における M e t 4 反応性

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%)

卵巣癌の切片を M e t 4 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、E M - 類内膜癌、C C - 明細胞癌）。

【 0 0 9 1 】

卵巣癌のサブタイプにわたる M e t 4 染色強度において統計的に有意差は観察されなかった。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った。

【 0 0 9 2 】

脳腫瘍における M e t 4 の特異性および c - M e t 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 例があった（表 3、図 5 B）。

【 0 0 9 3 】

【表 3】

表 3：神経膠腫のMet 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 Met 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 Met 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 Met 4 で強く染色されたが、オリゴデンドロサイトは Met 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 Met 陽性で変動した。18 個の神経膠腫のうちの 5 個は Met 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 - Met を発現し、そして c - Met 発現レベルは腫瘍グレードと共に増大した。

【0095】

実施例 6Met 4 のエピトープのマッピング材料および方法

Met 4 を PBS 中 2.0 mg / ml の濃度で調製した。Ph. D. - 12 および Ph. D. - 7 ファージディスプレイペプチドライブラリーを New England Biolabs ファージディスプレイペプチドライブラリーキットから入手した。- 96 g III シークエンシングプライマーおよび宿主株 E. coli ER2738 もまたこのキットから入手した。その他の全ての溶液を SIGMA の化学物質を用いて調製した。

【0096】

図 8 は Met 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リーを、Met 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リー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 DNA 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リーキットに従って M13 ファージディスプレイライブラリーを使用してバイオパニングを実施した。60 x 15 mm ペトリ皿を 100 µg / ml Met 4 抗体でコーティングし、そしてプレートをおよそ 1 x 10¹¹ pfu の M13 ペプチドライブラリーに暴露する種々の工程が含まれた。未結合ファージを TBS 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 HCl および BSA 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 Met 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。

【 0 0 9 8 】

ファージ増幅および沈殿のために、1 : 1 0 0 希釈の E R 2 7 3 8 培養物を感染および増幅に使用した。ファージを 2 0 % ポリエチレングリコール、2 . 5 M N a C l で沈殿させた。数回の結合 / 増幅サイクルを通して M e t 4 抗体に特異的なファージを取り出した。表 4 は、P h . D . - 1 2 ライブラリーからの最初のインプットおよび M e t 4 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 p f u で示す。

【 0 0 9 9 】

【 表 4 】

表 4 :

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 D N A 配列に相当する各ファージクローンを確実にした。

【 0 1 0 0 】

以下の方法に従って M 1 3 コロニーの E L I S A を実施した : M e t 4 抗体を個々の M 1 3 ペプチドディスプレイクローンに暴露した。1 % 乳バッファー中 1 : 5 0 0 0 希釈の H R P 抱合抗 M 1 3 抗体を二次抗体として使用した。使用した過酸化物質質を P i e r c e T M B 基質キットから入手した。K C 4 P C プログラムを使用してプレートを 4 5 0 n m で読んだ。図 9 は野生型 M 1 3 と比較したファージディスプレイ 1 2 ライブラリーから回収された M e t 4 特異的ファージクローンの E L I S A からの O D 4 5 0 n m 値を示す棒グラフである。

【 0 1 0 1 】

以下のように M 1 3 から s s D N A を単離した : E L I S A から最高の吸光度の読みを有する 8 個の M 1 3 ファージクローンを選択し、そして Q I A G E N による Q I A p r e p M 1 3 ハンドブックからの Q I A p r e p S p i n M 1 3 プロトコルを使用してその s s D N A 分子を単離した。

【 0 1 0 2 】

超特異的ファージクローンの D N A シークエンシングによりエピトープを特徴付けした。D N A シークエンシング以下のように実施した : 各 M 1 3 クローンから単離された D N A 2 . 0 μ l を P C R 管中 2 8 g I I I シークエンシングプライマー 1 . 0 μ l と組み合わせた。試料を P C R に提示し、そしてシークエンシングを実施した。S i m プログラムを使用して、シークエンシングされた M e t 4 特異的 M 1 3 ペプチド (ファージディスプレイ 1 2 ペプチドライブラリーから) をヒト M e t 細胞外 H G F / S F 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。

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

【表 5】

表 5 :

DWDPSYRHRPPS
SPCVDWGPHRAC
TPPNSVDILPSR
AHGPFDDLPELH
AWSDWSPSSRQT
SMWDFEPSSRPR
TIRPDWSPALRA

10

Me t タンパク質 ²³³SYIDVLPEFRDSYP²⁴⁶

Me t 4 のエピトープ :

DNA 配列分析をヒト Me 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 DVLPEFR (表 5 参照) に、またはさらに具体的にはヒト Me 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 DVL P (表 5 参照) にマッピングした。

【0104】

実施例 7

20

RA4E ウサギ抗 Me t 抗体は Me t 4 のエピトープに結合する

ヒト Me t アミノ酸残基 233 - 246 からのペプチド SYIDVLPEFRDSYP (ペプチド 1) および Me t アミノ酸 478 - 491 からの別のペプチド NFLLDSPVSP 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 KLH タンパク質に抱合させた。Pacific Immunology Corp により SYIDVLPEFRDSYP - KLH 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 (「RA4E」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】

RA4E 抗 Me t 抗体は Me t 4 と競合する

30

ウサギ抗 Me t 抗体 RA4E を競合 ELISA により特徴付けした。競合 ELISA では、96 ウェルプレートに 1 μg/ml の Me t 25 - 567 タンパク質でコーティングした。Me t 4 および RA4E 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 Me 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 AP 抱合体を 1 : 2000 希釈でプレートに添加した。展開させた後、ELISA リーダーにより 405 nm 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 Me t タンパク質に対する Me t 4 および RA4E 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】

MKN45 および NIH3T3 細胞における Me t 4 および RA4E の免疫蛍光染色

40

ウサギ抗 Me t 抗体 RA4E を免疫蛍光染色によりさらに特徴付けした。MKN45 および NIH3T3 細胞を 8 チャンバースライドにおいて 37 °C で一晩同時培養した。次いで細胞を PBS で洗浄し、そして 10 % ホルマリンで固定した。固定細胞を Me t 4 および RA4E (各々 8 μg/ml) と共に 4 °C で一晩インキュベートした。C28 (20 μg/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 FITC 抱合体を細胞に添加し、そしてスライドを室温 (RT) で 1.5 時間インキュベートした。核を DAPI で染色した。Me t 4 および RA4E は Me t 発現 MKN45 細胞において共存することが見出されたが、Me t 陰性 NIH3T3 細胞においては見出されなかった (図 11A - C)。RA4E は Me t 4 に類似して 10 % ホルマリンで固定された Me t 陽性 MKN45 細胞を染色したので、RA4E は Me 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）

【 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, Morrissey 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

40

【 0 1 0 9 】

【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, Bretti 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

10

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

20

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-harboring 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

30

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

40

【 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, Thorgeirsson 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

10

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

20

25. Gotte M, Kersting C, Radke I, Kiesel L, Wulfig 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

30

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

40

【 0 1 1 1 】

【化 4】

30. Smolen GA, Sordella R, Muir B, Mohapatra G, Barmettler 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
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, Maffè 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
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
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

10

20

30

40

【 0 1 1 2 】

【化 5】

40. Puri N, Khramtsov 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

10

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

20

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

30

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

40

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】

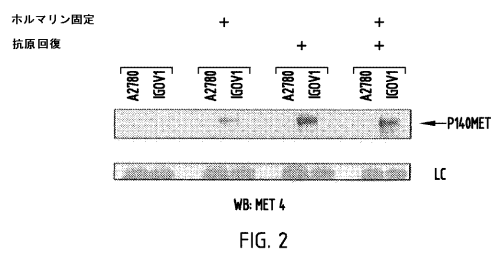
52. Fischer U, Muller HW, Sattler HP, Feiden K, Zang KD, Meese E: Amplification of the MET gene in glioma, *Genes Chromosomes Cancer* 1995, 12:63-65

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

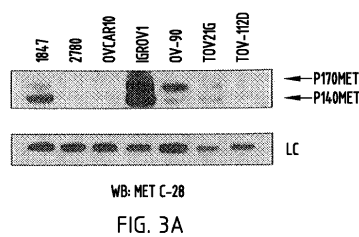
54. Sawada K, Radjabi AR, Shinomiya N, Kistner E, Kenny H, Becker AR, Turkyilmaz MA, Salgia R, Yamada SD, Vande Woude GF, Tretiakova MS, Lengyel E: c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion, *Cancer Res*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

10

【図 2】



【図 3 A】



【図 3 B】

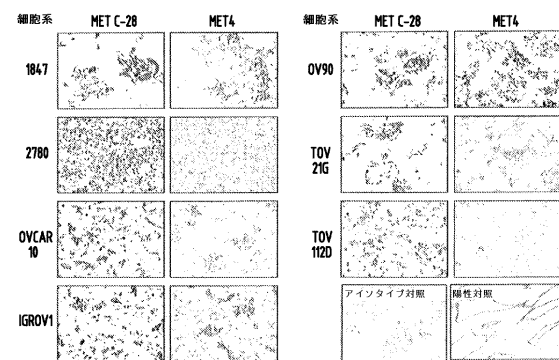


FIG. 3B

【図 3 C】

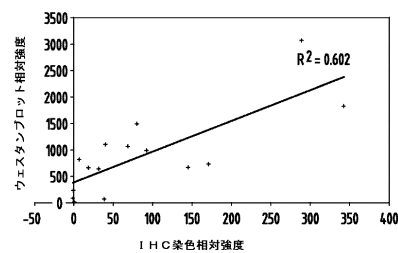


FIG. 3C

【図 4】

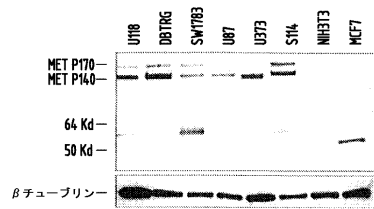


FIG. 4A

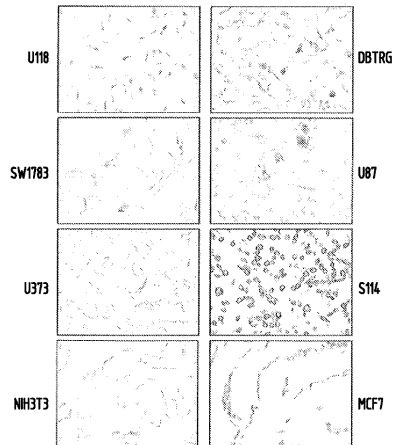


FIG. 4B

【図 5】

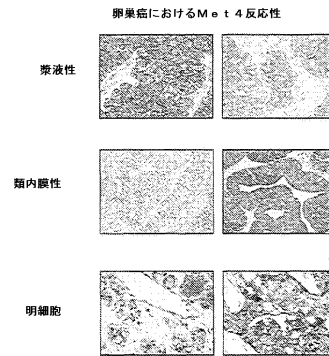


FIG. 5A

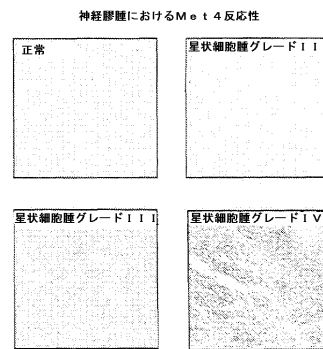


FIG. 5B

【図 6】

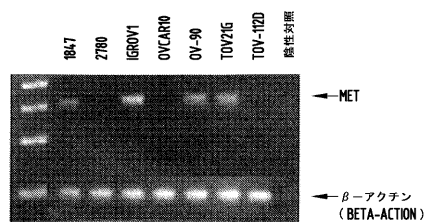


FIG. 6

【図 7】

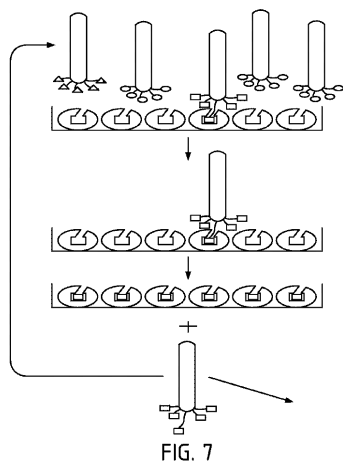


FIG. 7

【図 8】

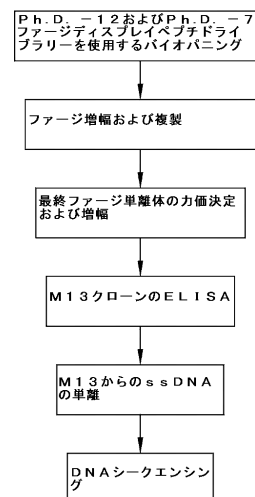


FIG. 8

【図 9】

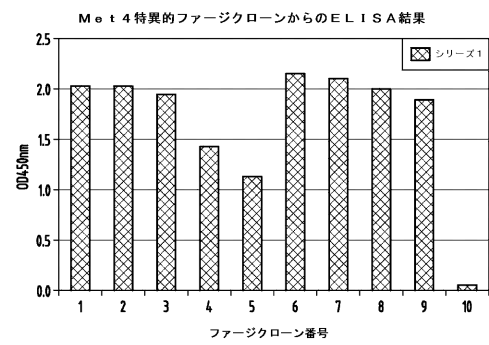


FIG. 9

【図 10C】

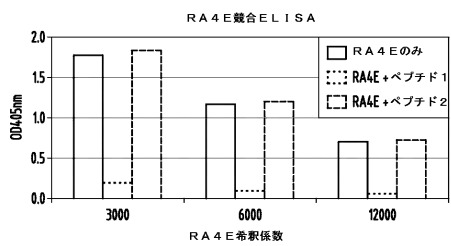


FIG. 10C

【図 10B】

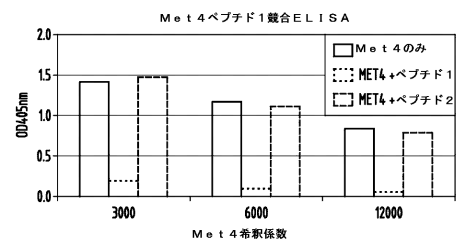


FIG. 10B

【図 1】

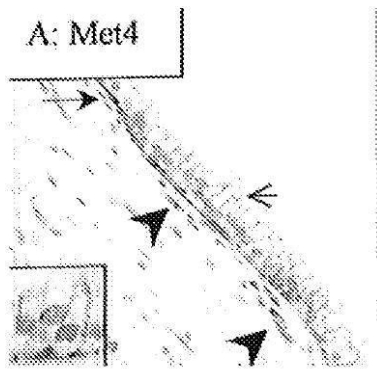


FIG. 1A

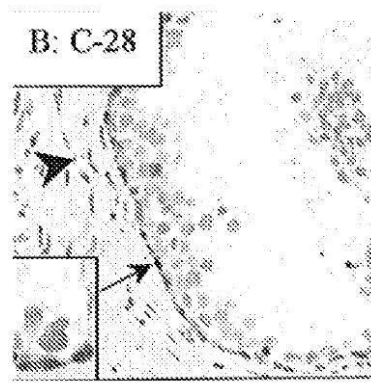


FIG. 1B

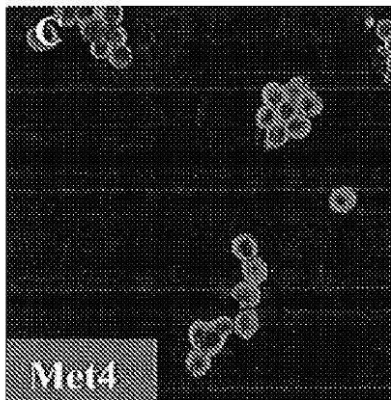


FIG. 1C

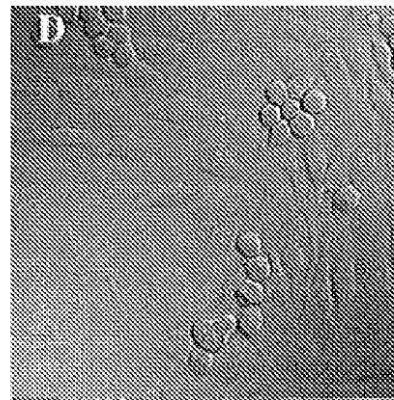


FIG. 1D

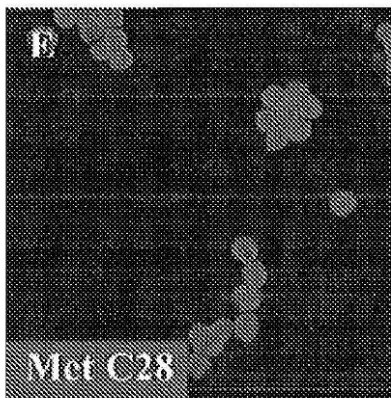


FIG. 1E

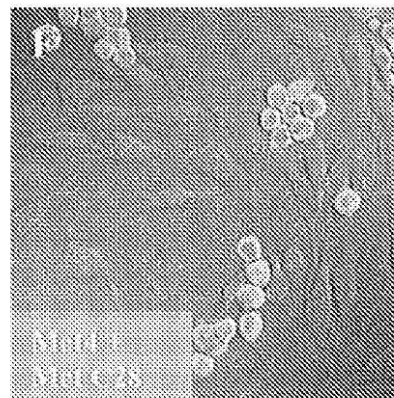


FIG. 1F

【図 10 A】

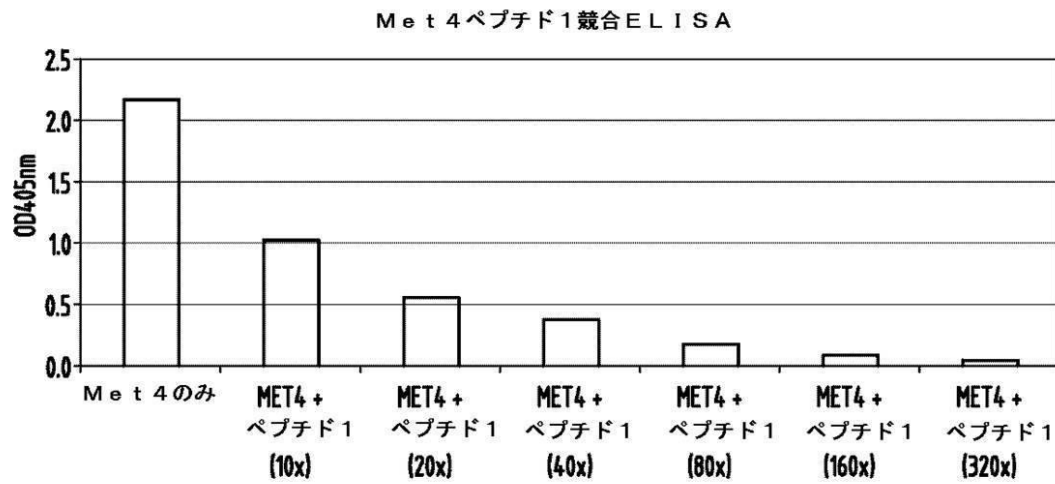


FIG. 10A

【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 4 9 3 0 1, アダ, エヌ.イー., ドニープルック コート
 1 5 8

(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 4 9 3 0 1, アダ, エヌ.イー., バイリー ドライブ 9 4
 5 1

(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 9 8 1 0 5, シアトル, エヌ.イー. 4 1 エスティー スト
 リート 5 1 5 4

(72)発明者 チャオ, ピン スー
 アメリカ合衆国 ミシガン 4 9 5 4 6, グランド ラピッズ, ネットルズワース 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., D B 名)

C12N15/

C07K

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)