

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-200947

(P2017-200947A)

(43) 公開日 平成29年11月9日(2017.11.9)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------------|-------------|
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | 2 G 0 4 5 |
| A 6 1 P 35/04 (2006.01) | A 6 1 P 35/04 | 4 B 0 6 4 |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 2 1 | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 P 9/14 (2006.01) | A 6 1 P 9/14 | 4 C 0 8 4 |
| A 6 1 P 31/12 (2006.01) | A 6 1 P 31/12 | 4 C 0 8 5 |

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 46 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|--------------|----------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2017-143622 (P2017-143622) | (71) 出願人 | 512112644 |
| (22) 出願日 | 平成29年7月25日 (2017.7.25) | | エアープリオ セラピューティクス インコーポレイテッド |
| (62) 分割の表示 | 特願2017-130652 (P2017-130652) の分割 | | アメリカ合衆国 オハイオ 45242, シンシナティ, カーバー ロード 9987, 스위트 420 |
| 原出願日 | 平成24年10月15日 (2012.10.15) | (74) 代理人 | 100078282 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/546,748 | | 弁理士 山本 秀策 |
| (32) 優先日 | 平成23年10月13日 (2011.10.13) | (74) 代理人 | 100113413 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 森下 夏樹 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/546,697 | (72) 発明者 | ケヴィン ピーターズ |
| (32) 優先日 | 平成23年10月13日 (2011.10.13) | | アメリカ合衆国 オハイオ 45243, シンシナティ, マイアミ ロード 6100 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管漏出症候群および癌を治療する方法

(57) 【要約】

【課題】血管漏出症候群および癌を治療する方法を提供すること。

【解決手段】本開示は、血管漏出症候群の患者を治療する方法を提供し、該方法は、患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。本開示は、血管漏出を治療する方法を提供し、ここで治療される患者は炎症性疾患または状態、外傷、ショック、成人呼吸促進症候群、急性肺損傷または敗血症に苦しみ、該方法は、該患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本願明細書に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2011年10月13日に出願された米国仮特許出願第61/546,748号、および2011年10月13日に出願された米国仮特許出願第61/546,697号の優先権を主張する。米国仮特許出願第61/546,748号および米国仮特許出願第61/546,697号の全容を参照により本明細書に組み込む。

10

【0002】

電子提出資料の参照による組込

全容を参照により組み込まれるのは、本明細書と共に同時に提出され、次のように特定されるコンピューター可読配列表である：92KBのASCII（テキスト）ファイル1件、ファイル名「233106-331560_Seq_Listing_ST25」、2012年10月15日午前11時52分作成。

【0003】

HPTP 阻害剤の投与により、癌を治療し、転移と血管漏出症候群を予防する方法。

【背景技術】

20

【0004】

血管漏出症候群（VLS）は、低血圧、末梢性浮腫および低アルブミン血症により特徴付けられる。VLSは、病気、特に病原体とりわけウイルスおよび細菌による病気の副作用として生じ得る。血管漏出は、治癒過程を複雑化し、それ自体がある特定の治療の直接の結果であり得る。例えば、悪性腎癌患者には、免疫系を高めるのを助けるためにインターロイキン-2（IL-2）が与えられる。しかし、この治療は、多くの患者において、重度のVLSが発症するせいで治療の全過程が実施され得るずっと前に中止されねばならない。VLSは、ヒトに投与され得るIL-2の用量を制限し、場合によっては、治療効果が最大になる前に治療休止を要する。

【0005】

30

VLSは、体液とタンパク質の血管外遊出を伴う血管透過性の増加により特徴づけられ、間質浮腫と臓器不全をもたらす。VLSの症状には、体液貯留、体重増加、末梢性浮腫、胸水と心嚢液貯留、腹水、全身浮腫、および重度の場合は肺および心血管不全の徴候が含まれる。症状は患者によって大きく異なり、原因はよくわかっていない。内皮細胞の修飾または損傷は血管漏出において重要であると考えられている。内皮細胞（EC）損傷の原因は複雑であり、ECおよび白血球の活性化または損傷、サイトカインと炎症メディエーターの放出、細胞-細胞間および細胞-基質間接着および細胞骨格機能の改変が関与し得る。

【0006】

40

癌の最も恐ろしい態様の1つは、広がること、すなわち転移する能力である。癌細胞は最初、互いに集まり1以上の腫瘍を形成していることが見出される。原発腫瘍の形成後、癌細胞は原発腫瘍から分離する能力を得て体内の他の部位に移動することがある。肝臓に侵入し腫瘍を形成する肺癌細胞は、肺癌細胞のままである。したがって、1つの特定の形態の癌が転移する傾向は、癌の種類を含む多くの要因によるが、細胞がいつに転移のプロセスを開始するかの全体的なプロセスはまだ完全に解明されていない。

【0007】

もし1個の局在性腫瘍が転移する機会を有する前に発見されれば、患者の予後の生存率は高い。これは、腫瘍が放射線または化学療法により有効に切除または破壊され得るからである。従って、腫瘍の増殖と腫瘍細胞の転移の間には差があり、必ずしも前者が後者をもたらすわけではない。しかし、転移した癌は、それが体中に拡がっている度合いのせい

50

で治癒が難しい。

【0008】

転移するためには、癌細胞はその腫瘍から離れて循環系またはリンパ系のいずれかに侵入しなければならない。次いで遊離細胞は自らが定着する新しい場所に運ばれる。体には、細胞がもとの位置から離れた後は生存できないようにする自然の安全対策があるが、一部の癌細胞はこれらの安全対策を打ち負かす能力をもつ。したがって、もし転移が止められるか大幅に軽減されれば、癌の程度が決定され、次いで治療され得る。このように、腫瘍が切除されているかまたは放射線/化学療法が使用されている癌治療のフォローアップ治療は、患者の抗転移剤治療になる。癌細胞の転移を予防する方法は長く必要とされている。

10

【0009】

原発腫瘍の増殖も、治療の課題である。もし原発腫瘍の増殖が放置されれば、原発腫瘍は、原発部位および近隣組織において器官の機能に有害作用を及ぼすサイズにまで増殖し得る。原発腫瘍の転移はまた、原発腫瘍の増殖が制御されていないと余計に生じやすい。腫瘍増殖を遅延または予防する方法が必要とされている。

【0010】

患者は、抗ウイルスおよび抗菌感染の過程の間に、初感染の結果として誘導される血管漏出を生じ得る。ウイルスまたは細菌感染による血管漏出を予防する方法と、1以上の病原体に感染したヒトまたは他の哺乳動物の生存率を高める方法を提供することが長く必要とされている。さらに、ある特定の抗癌剤または他の抗癌治療による血管漏出を予防して、抗癌剤の投与または抗癌治療がヒトまたは他の哺乳動物に長期の処置または治療期間与えられるようにする方法が長く必要とされている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本開示は、血管漏出症候群の患者を治療する方法を提供し、該方法は、患者に有効量の
- E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。

【0012】

患者に有効量の H - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩および1以上の薬剂的に許容可能な賦形剤を含む組成物を投与することを含む、血管漏出症候群の患者を治療する方法も提供する。

30

【0013】

本開示は、血管漏出を治療する方法を提供し、ここで治療される患者は炎症性疾患または状態、外傷、ショック、成人呼吸促迫症候群、急性肺損傷または敗血症に苦しみ、該方法は、該患者に有効量の
- E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。

【0014】

本開示はまた、血管漏出を治療する方法を提供し、ここで治療される患者は炎症性疾患または状態、外傷、ショック、成人呼吸促迫症候群、急性肺損傷または敗血症に苦しみ、該方法は、該患者に有効量の
- E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩および1以上の薬剂的に許容可能な賦形剤を含む組成物を投与することを含む。

40

【0015】

本開示が提供する別の方法は、血管漏出症候群の患者の治療過程を決定する方法であって、以下を含む：

a) 患者に有効量の H P T P - E C D 結合剤を含む組成物を投与すること； b) 治療過程の間、該患者において存在するアンジオポエチン - 2 のレベルをモニタリングすること；および c) アンジオポエチン - 2 レベルが正常範囲に戻ったら治療を中止すること。

【0016】

本開示が提供するさらなる1つの方法は、患者の癌を治療する方法であって、該方法は

50

、患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。

【 0 0 1 7 】

本開示が提供するさらなる 1 つの方法は、患者の癌を治療する方法であって、該方法は、患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩および薬剂的に許容可能な賦形剤を含む組成物を投与することを含む。

【 0 0 1 8 】

本開示が提供するさらに別の方法は、癌患者における転移を予防する方法であって、該方法は、患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することによる。

【 0 0 1 9 】

本開示が提供するさらに別の方法は、癌患者における転移を予防する方法であって、該方法は、患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩および薬剂的に許容可能な賦形剤を含む組成物を投与することによる。

【 0 0 2 0 】

本開示の方法では、H P T P - E C D 結合剤は、限定ではなく、H P T P の細胞外部分に結合する抗体、タンパク質、ペプチド、アプタマー、ペプチボディー、アドネクチンまたは核酸を含む。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

血管漏出症候群の患者を治療する方法であって、前記患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む、方法。

(項目 2)

前記組成物が 1 以上の薬剂的に許容可能な賦形剤をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記患者が炎症性疾患または状態、外傷、ショック、成人呼吸促迫症候群、急性肺損傷または敗血症に苦しんでいる、項目 1 または項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記患者が炎症性疾患または状態に苦しんでいる、項目 1 または項目 2 に記載の方法。

(項目 5)

前記患者が癌治療を受けている、項目 1 または項目 2 に記載の方法。

(項目 6)

前記癌が、腎細胞癌、悪性黒色腫、髄芽腫、上衣腫、乏突起膠腫 (o g l i o d e n d r o g l i o m a)、毛様細胞星状細胞腫、びまん性星状細胞腫、未分化星状細胞腫または膠芽腫である、項目 5 に記載の方法。

(項目 7)

血管系を安定化させることを必要とする患者の血管系を安定化させる方法であって、前記患者に有効量の - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む、方法。

(項目 8)

前記組成物が 1 以上の薬剂的に許容可能な賦形剤をさらに含む、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記 H P T P - E C D 結合剤が、前記患者に I L - 2 での治療の開始前またはその間に投与される、項目 7 または項目 8 に記載の方法。

(項目 1 0)

前記 H P T P - E C D 結合剤が、前記患者に癌治療の開始前またはその間に投与される、項目 7 または項目 8 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記癌が、腎細胞癌または悪性黒色腫、髄芽腫、上衣腫、乏突起膠腫 (o g l i o d e n d r o g l i o m a)、毛様細胞星状細胞腫、びまん性星状細胞腫、未分化星状細胞腫

10

20

30

40

50

または膠芽腫である、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記癌治療が前記患者に有効量の IL - 2 を投与することを含む、項目 10 または項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記患者が病原体に感染している、項目 7 または項目 8 に記載の方法。

(項目 14)

前記病原体が細菌、ウイルス、酵母、真菌または原生生物である、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記患者に有効量の抗菌剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤またはそれらの組合せを投与することをさらに含む、項目 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 16)

血管漏出症候群患者を治療する過程を決定する方法であって、

- a) 患者に有効量の - ECD 結合剤を含む組成物を投与すること；
- b) 治療過程の間、前記患者において存在するアンジオポエチン - 2 のレベルをモニタリングすること；および
- c) 前記アンジオポエチン - 2 レベルが正常範囲内に戻ったら治療を中止すること、を含む方法。

(項目 17)

患者における癌を治療する方法であって、患者に有効量の特異的結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む、方法。

(項目 18)

前記組成物が 1 以上の薬剤的に許容可能な賦形剤をさらに含む、項目 17 に記載の方法。

(項目 19)

患者に有効量の特異的結合剤またはその許容可能な塩を含む組成物を投与することにより、癌患者における転移を予防する方法。

(項目 20)

前記組成物が 1 以上の薬剤的に許容可能な賦形剤をさらに含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 21)

1 以上の化学療法剤の投与をさらに含む、項目 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

前記化学療法剤が、タキソール、IL - 2、ゲムシタピン、エルロチニブ、ドキシル、イリノテカンおよびペバシズマブから選択される、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

癌が、腎細胞癌または悪性黒色腫、髄芽腫、上衣腫、乏突起膠腫 (ogliodendroglioma)、毛様細胞星状細胞腫、びまん性星状細胞腫、未分化星状細胞腫または膠芽腫である、項目 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 24)

前記 HPTP - ECD 結合剤が、HPTP の細胞外部分に結合する抗体、タンパク質、ペプチド、アプタマー、ペプチボディー、アドネクチンまたは核酸である、項目 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

(項目 25)

前記 HPTP - ECD 結合剤が、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体またはその抗原結合断片である、項目 1 ~ 23 のいずれかに記載の方法。

(項目 26)

前記 HPTP - ECD 結合剤が、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である

10

20

30

40

50

、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

前記 H P T P - E C D 結合剤が、ハイブリドーマ細胞株 A T C C 番号 P T A - 7 6 8 0 により産生されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、項目 26 に記載の方法。

(項目 28)

前記 H P T P - E C D 結合剤が、ハイブリドーマ細胞株 A T C C 番号 P T A - 7 6 8 0 により産生された前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片と同じまたは実質的に同じ生物学的特徴を有する抗体である、項目 24 に記載の方法。

(項目 29)

前記 H P T P - E C D 結合剤が抗原結合断片であり、前記抗原結合断片は F (a b ')₂、F a b、F a b の二量体、F v、F v の二量体、または s c F v の二量体である、項目 25 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 30)

前記 H P T P - E C D 結合剤が抗原結合断片であり、前記抗原結合断片は F (a b ')₂、F a b の二量体、F v の二量体、または s c F v の二量体である、項目 25 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

前記抗原結合断片が F a b、F v または s c F v である、項目 25 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 32)

前記 H P T P - E C D 結合剤が、タンパク質、ペプチド、アプタマー、ペプチボディー、アドネクチンまたは核酸である、項目 24 に記載の方法。

(項目 33)

前記患者に投与される前記 H P T P - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩の用量が、前記患者の体重により約 0 . 0 1 m g / k g ~ 約 5 0 0 m g / k g である、項目 1 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

(項目 34)

前記患者に投与される前記 H P T P - E C D 結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩の用量が、前記患者の体重により約 0 . 1 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g である、項目 1 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

30

(項目 35)

前記用量が、1日1回、毎週3回、毎週2回、毎週1回、毎月3回、毎月2回、毎月1回、または隔月に1回投与される、項目 33 または項目 34 に記載の方法。

(項目 36)

前記 H P T P - E C D 結合剤がビヒクルに結合されている、項目 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 37)

前記ビヒクルが P E G である、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

前記 H P T P - E C D 結合剤が眼内注射により投与される、項目 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 39)

前記 H P T P - E C D 結合剤が皮下注射により投与される、項目 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 40)

前記 H P T P - E C D 結合剤が静脈内注射により投与される、項目 1 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0021】

50

【図1】モノクローナル抗体 R 1 5 E 6 は内皮細胞上の内在性 H P T P を認識する。(パネル A) 内皮細胞溶解物は対照抗体(レーン 1)、R 1 5 E 6(レーン 2)、または抗 T i e 2 抗体と抗 V E G F R 2 抗体の混合物(レーン 3)を用いて免疫沈降される。免疫沈降物は、S D S - P A G E で分離され、P V D F 膜に転写され、R 1 5 E 6、抗 T i e 2 および抗 V E G F R 2 抗体の混合物を用いてウエスタンブロットにより検出される。H P T P と一致する 1 つの主要な高分子量バンドが R 1 5 E 6(レーン 2)では見られるが、対照抗体(レーン 1)または抗 T i e 2 および抗 V E G F R 2 混合物(レーン 3)では見られない。(パネル B) 内皮細胞を R 1 5 E 6(白色ピーク)または 1 次抗体なしの対照(黒色ピーク)を用いる F A C S 分析に供する。強力な蛍光シフトは、R 1 5 E 6 が無傷の内皮細胞の表面で H P T P に結合することを示す。

10

【図2】モノクローナル抗体 R 1 5 E 6 が H U V E C における T i e 2 受容体活性化を増大させる。T i e 2 活性化は、実施例 4 に記載するように、ヒト内皮細胞において測定される。R 1 5 E 6 は、基礎のおよび A n g 1 に誘導される活性化の両方を用量依存的に増大させる。

【図3】眼のレーザー処置後 1 4 日目の、1 μ g または 2 μ g の抗 V E - P T P 細胞外ドメイン抗体の硝子体内注射により片眼を処置され、もう一方の眼にビヒクルで同様の処置をされた、C 5 7 B L / 6 マウスにおける脈絡膜血管新生の平均面積のグラフ表示である。

【図4】マウスを 7 5 % の酸素雰囲気中に P 5 ~ P 1 2 まで閉じ込め、大気に戻したとき P 1 2 に抗 V E - P T P 細胞外ドメイン抗体の硝子体内注射をした後の、P 1 7 日目の C 5 7 B L / 6 マウスの網膜血管新生の平均面積(mm^2)を示す。

20

【図5】ビヒクルまたは 2 μ g の抗 V E - P T P 細胞外ドメイン抗体の硝子体内注射後の酸素誘発網膜症モデルにおけるマウス網膜の代表的な蛍光顕微鏡写真を示す。

【図6】マウスを 7 5 % の酸素雰囲気中に P 5 ~ P 1 2 まで閉じ込め、P 1 2 に大気に戻し、1 m g / k g の抗 V E - P T P 細胞外ドメイン抗体を P 1 2、1 4 および 1 6 日目に皮下投与した後の、P 1 7 日目の C 5 7 B L / 6 マウスの網膜血管新生平均面積(mm^2)を示す。

【図7】マウスを 7 5 % の酸素雰囲気中に P 5 ~ P 1 2 まで閉じ込め、P 1 2 に大気に戻し、2 m g / k g の抗 V E - P T P 細胞外ドメイン抗体を P 1 2、1 4 および 1 6 日目に皮下投与した後の、P 1 7 日目の C 5 7 B L / 6 マウスの網膜血管新生平均面積(mm^2)を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0022】

一般的な定義

この明細書およびそれに続く特許請求の範囲において、いくつかの用語が参照されるが、それらは以下の意味を有すると定義される。

【0023】

「H P T P - E C D 結合剤」と「特異的結合剤」という用語は本明細書では交換可能に使用され、H P T P の T i e 2 デホスホリラーゼ活性を阻害する、H P T P の細胞外部分並びに本明細書で定義されるその変異体および誘導体に特異的に結合する分子を指す。

40

【0024】

「剤 (a g e n t)」は、ここでは特に断らない限り「H P T P 結合剤」を指す。

【0025】

「H P T P - E C D を特異的に結合する」は、本発明の特異的結合剤が H P T P の細胞外ドメインのエピトープを認識し、他の関連および/または非関連分子に対するよりも高い親和性でそれに結合する能力を指す。特異的結合剤は、タンパク質および/または巨大分子の複雑な混合物において優先的に H P T P に結合する。特異的結合剤は、好ましくは H P T P に対し選択的である。「選択的」とは、剤が、他の分子に対し全く不活性であるということではなく、他の関連および/または非関連分子に対するよりも H P T

50

P に対しはるかに大きい活性を有するという意味である。例えば、選択的剤は、他の関連または非関連分子に対するよりも HPTP に対し 10 倍、100 倍または 1000 倍の選択性を示しうる。

【0026】

「抗 HPTP - ECD 抗体」という用語は、HPTP の細胞外ドメインに結合する抗体または抗体断片を指す。抗 HPTP - ECD 抗体は、本明細書で定義されるような種類の HPTP - ECD 結合剤である。

【0027】

「VE - PTP」という用語は、HPTP のマウスオソログを指す。

【0028】

全てのパーセンテージ、比率および割合は、本明細書では、特に断らない限り、重量による。全ての温度は特に断らない限り摂氏 () である。

【0029】

ここでは範囲は 1 つの特定の値から別の特定の値まで、両端の値を含んで表され得る。例えば、「1 mg ~ 50 mg」の範囲には 1 mg と 50 mg の特定の値が含まれる。「約」という先行詞は値が近似値であることを意味する。例えば、「約 1 mg ~ 約 50 mg」の範囲とは、値が近似値であることを意味する。さらに、このような範囲が示される場合、「1 mg ~ 50 mg」の範囲が含まれる。範囲の両端の値は、互いの関係において、および互いに独立して有意味であることがさらに理解されよう。例えば、「1 mg ~ 50 mg」の範囲は「30 mg ~ 40 mg」の範囲を含む。

【0030】

ここでは、「併用で」という用語は 2 つ以上の予防薬および / または治療薬の使用を指す。「併用で」という用語の使用は、予防薬および / または治療薬が患者に投与される順番を限定するものではない。第 1 の予防薬または治療薬は、疾病を有したか、有するか、またはそれに感染しやすい患者への第 2 の予防薬または治療薬の前に (例えば、1 分、5 分、15 分、30 分、45 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、1 週、2 週、3 週、4 週、5 週、6 週、8 週、または 12 週前)、それと同時に、またはその後で (例えば、1 分、5 分、15 分、30 分、45 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、1 週、2 週、3 週、4 週、5 週、6 週、8 週または 12 週後) に投与され得る。予防薬または治療薬は、本開示の剤が他の剤と共に作用でき、別の方法で投与されるよりも高い利益がもたらされるような順番で、かつ間隔内に、患者に投与される。任意追加の予防薬または治療薬を他の追加の予防薬または治療薬と一緒にあらゆる順番で投与してよい。

【0031】

「有効量」とは、治療される患者の症状を寛解または予防するか、または生存期間を延長する効果のある活性剤またはその併用の量を意味する。有効量は、当技術分野で既知の、治療されるヒトまたは動物の疾患状態、年齢、性別および体重などの要因により変わり得る。本明細書では実施例の中で特定の投与レジメンを記載する場合があるが、当業者であれば、投与レジメンは、最適の治療反応を得るために変更され得ることを理解しよう。例えば、用量を何回かに分けて毎日投与してもよいし、治療状況の緊急事態によっては比例的に減量してもよい。さらに、本開示の組成物は、治療量を得るために必要に応じた頻度で投与してよい。治療上有効な量は、当業者であれば、特に本明細書における詳細な開示に鑑み決定する能力が十分ある。

【0032】

ここでは、「阻害する」または「阻害している」という用語は、統計的に有意かつ測定可能な活性の低下、好ましくは、対照に対し少なくとも約 10 % の低下、より好ましくは約 50 % 以上の低下、さらに好ましくは約 80 % 以上の低下を指す。

【0033】

ここでは、「増加させる」または「増加する」という用語は、統計的に有意かつ測定可

10

20

30

40

50

能な活性の増加、好ましくは、対照に対し少なくとも約10%の増加、より好ましくは約50%以上の増加、さらに好ましくは約80%以上の増加を指す。

【0034】

「HPTPベータ」または「HPTP」はここでは交換可能に使用され、ヒトタンパク質チロシンホスファターゼベータの略語である。

【0035】

ここでは、「対象」とは個体を意味する。したがって、「対象」は、飼われる動物（例えばネコ、イヌなど）、家畜（例えばウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど）およびトリを含み得る。「患者」も、霊長類またはヒトなどの哺乳動物を含み得る。ここでは「対象」と「患者」は交換可能に使用される。好ましくは、対象はヒトである。

10

【0036】

「低下させる（reduce）」または「低下する」または「低下」などの変化形は、ある事象または特徴（例えば血管漏出）を低下させることを意味する。これは、典型的には何らかの標準または期待値との関係において、言い換えれば相対的であるが、必ずしも標準または相対値に言及する必要はないことが理解される。

【0037】

「治療」、「治療している」「治療する」などの用語は、宿主の疾患または疾病を緩和する、および/または疾患（例えば血管漏出）関連の特定の特徵または事象を軽減する、阻害する、または除去するなどの所望の薬理学的および/または生理学的効果を得ることを指す。したがって、「治療」という用語には、特に宿主がその疾患にかかる素因を有するがまだその疾患とは診断されていない場合に宿主における疾病の発症を予防すること；その疾病を阻害すること；および/またはその疾病を軽減または逆転することを含む。本発明の方法は疾病予防に関するが、「予防」という用語は、疾患状態が完全に妨害されていることは要しない。むしろ、ここでは、予防という用語は、本発明のHPTP-EC D結合剤の投与が疾患発症前に生じ得るように、疾病にかかりやすい集団を同定する当業者の能力を指す。この用語は疾患状態の完全回避は含意しない。

20

【0038】

ここでは「癌治療」という用語は、限定ではなく化学療法および放射線療法を含む当技術分野で既知の任意の癌治療を意味する。

30

【0039】

ここでは「癌治療」という用語は、限定ではなく化学療法および放射線療法を含む当技術分野で既知の任意の癌治療を意味する。

【0040】

本明細書の説明と特許請求の範囲を通して、「含む」という用語および「含んでいる」「含む（三人称）」などの変化形は、限定ではなく含むことを意味し、例えば他の添加剤、成分、整数またはステップを除外する意図はない。

【0041】

本明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形の「a」、「an」および「the」は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数形の指示物を包含する。したがって、例えば、「（単数形の）組成物」への言及は、そのような組成物の2以上の混合物を含む。

40

【0042】

「所望の」または「所望により」とは、その後ろに記載された事象又は状況が発生することもしないこともでき、および、該記載は事象又は状況が発生する場合と発生しない場合を含む。

【0043】

「HPTPを特異的に結合する」は、本発明の剤がHPTPの細胞外ドメインのエピトープを認識し、他の関連および/または非関連分子に対するよりも高い親和性でそれに結合する能力を指す。剤は、好ましくはHPTPに対し選択的である。「特異的」と

50

は、剤が、他の分子に対し全く不活性であるということではなく、他の関連および/または非関連分子に対するよりも H P T P に対しはるかに大きい活性を有するという意味である。例えば、選択的剤は、他の関連または非関連分子に対するよりも H P T P に対し 10 倍、100 倍または 1000 倍の選択性を示しうる。

【0044】

「エピトープ」という用語は、剤の抗原結合領域の 1 つ以上において剤に認識され結合される能力のある任意の分子の任意の部分を指す。エピトープは通常、アミノ酸、糖、脂質、ホスホリルまたはスルホニルなどの異なる表面基からなり、ある特定の実施形態では、特異的な 3 次元構造特徴および/または特異的な電荷特徴を有し得る。本明細書ではエピトープは立体構造でも直線型でもよい。

10

【0045】

「ペプチボディー」は、少なくとも 1 つのペプチドに付着した抗体 F c ドメインを含む分子である。ペプチボディーの生産は一般に国際公開第 2002/24782 号に記載されている。

【0046】

「断片」は剤の一部を指す。断片は、剤の望ましい生物学的活性を保持し得、剤自体と見なされ得る。例えば、アミノ末端および/またはカルボキシ末端および/または内部アミノ酸残基が欠失している切断されたタンパク質は、そのタンパク質の断片であり、イムノグロブリン分子の F a b は該イムノグロブリンの断片である。そのような断片は、直接的な結合（例えばペプチドまたはジスルフィド結合）により、またはリンカーにより、別の分子に結合され得る。

20

【0047】

「タンパク質」はここではペプチドとポリペプチドと交換可能に使用される。

【0048】

本発明のペプチドは、限定ではなく、約 3 ~ 約 75 のアミノ酸、または約 5 ~ 約 50 のアミノ酸、または約 10 ~ 約 25 のアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む。ペプチドは、天然または人工的なアミノ酸配列であり得る。

【0049】

本発明のタンパク質は、当技術分野では周知の、例えば標準的直接的ペプチド合成法を使用して、例えば固相合成により得てよい。遺伝子シーケンスが既知であるか推定できる場合は、そのタンパク質は標準的な組換え法により生産され得る。タンパク質は当業者に知られる様々な方法で単離または精製され得る。標準的な精製法は、塩を用いての沈殿、電気泳動、クロマトグラフィー法などを含む。

30

【0050】

「誘導體」は、挿入、欠失または置換変異体とは異なる何らかの方法で化学的に修飾されている結合剤を含む。例えば、結合剤がタンパク質である場合、カルボキシル末端は N H₂ などのアミノ基でキャップされ得る。

【0051】

いくつかの実施形態では、1 以上の分子は互いに結合して剤を形成する。例えば抗体断片はリンカーにより結合され得る。一般に、リンカーは主として空間として働くのでその化学構造は重要ではない。ある実施形態では、リンカーは、ペプチド結合により互いに結合するアミノ酸できている。別の実施形態では、リンカーは、非立体的障害 C₁ ~ C₆ アルキル基などの非ペプチドリinker である。別の実施形態では、リンカーは、PEG リンカーである。リンカーは、分子上の多くの場所に挿入され得ることをさらに理解されたい。

40

【0052】

剤の変異体が本発明の範囲に含まれる。「変異体（単数）」または「変異体（複数）」は、本明細書では非変異体剤のタンパク質またはヌクレオチド配列と実質的に同じタンパク質またはヌクレオチド配列を有し、非変異体剤と同様の活性を有する剤を意味する。タンパク質またはヌクレオチド配列は、本発明が包含する変異体を生じる、置換、欠失、切

50

断、挿入および他の修飾を含むあらゆる方法で改変され得る。そのような操作方法は、当技術分野では周知である。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (およびアップデート版) Ausubel et al., Eds (1996), John Wiley and Sons, New York: Methods in Molecular Biology, Vol.182, In Vitro Mutagenesis Protocols, 2nd Edition, Barman Ed. (2002), Humana Press) およびそこに引用される文献を参照されたい。例えば、変異体は、アミノ酸残基が結合剤の既知のアミノ酸配列に挿入、そこから欠失および/またはそこに置換されたペプチドおよびポリペプチドを含む。ある実施形態では、アミノ酸の置換は、変異体の生化学的特性を最小限しか改変しない点において保存的である。他の実施形態では、変異体は、インビボ若しくはインビトロのタンパク質酵素処理、化学修飾、または修飾アミノ酸を用いてのタンパク質合成で達成され得る、全長タンパク質の活性断片、化学修飾タンパク質、親和性若しくはエピトープタグまたは蛍光若しくは他の標識部分を付加されて修飾されたタンパク質であり得る。

10

【0053】

融合タンパク質も本明細書で企図される。当業者は、既知の方法を用いて、天然型とは異なるが有用であり得る、本発明のタンパク質の融合タンパク質を作製できよう。例えば、融合パートナーは、合成部位から別の部位へのタンパク質の転移を共翻訳的または翻訳後に指令するシグナル(またはリーダー)ポリペプチド配列であり得る(例えば酵母因子リーダー)。あるいは、それは本発明のタンパク質の精製または同定を促進するために付加され得る(例えば、ポリHis、Flagペプチドまたは蛍光タンパク質)。

20

【0054】

標準的な技法が組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、および組織培養と形質転換(例えば電気穿孔、リポフェクション)に使用され得る。酵素反応および精製技法が製造者または業者の仕様書に従って、または当技術分野で一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように、実行される。技法と手順は、一般に、当技術分野で公知の一般的な方法に従い、本明細書全体で引用され論じられる様々な一般的小およびより具体的な参照物において記載されるように、実施される。特に断らない限り、本明細書に記載される分析化学、合成有機化学および医薬化学と関連して使用される命名法およびそれらの実験手順および技法は当技術分野で既知であり一般的に使用されているものである。標準的技法は、化学合成、化学分析、医薬調製、製剤および送達、および患者治療に使用され得る。

30

【0055】

配列表

| | |
|-------|---|
| 配列番号1 | 全長ヒト HPTP β ヌクレオチド配列(X54131) |
| 配列番号2 | 全長ヒト HPTP β アミノ酸配列(P23467) |
| 配列番号3 | (His) ₆ Gly タグを有するヒト HPTP β の細胞外部分 |
| 配列番号4 | ヒト HPTP β の細胞外部分 |
| 配列番号5 | 全長マウス VE-PTPヌクレオチド配列(AY07755) |
| 配列番号6 | 全長マウス VE-PTPアミノ酸配列(AAL75813) |
| 配列番号7 | マウス VE-PTP細胞外部分のアミノ酸配列 |

40

【0056】

HPTP - ECD 結合剤

本発明において有用な剤には、限定ではなく、HPTP の細胞外部分に特異的に結合し、少なくとも1つのHPTP のホスファターゼ活性を阻害する抗体、タンパク質、ダルピンズ(darpins)、ペプチド、アプタマー、アドネクチン、ペプチドボディまたは核酸が含まれる。本明細書では「ホスファターゼ活性」は、酵素活性および生物学的活性を

50

含み、生物学的活性はT i e 2リン酸化を評価して測定される。

【0057】

本発明において有用な剤は、以下をさらに含む：H P T P の細胞外部分に結合する抗体またはそれらの抗原結合断片であって、抗体またはその抗原結合断片は少なくとも1つのH P T P 活性を阻害する。これらの剤は、モノクローナルおよびポリクローナル抗体を含む。剤は、抗体の断片であってもよく、ここで断片は重鎖および軽鎖可変領域を含み、または断片はF (a b ')₂であり、または断片はF a b、F v、s c F vの二量体または三量体、または抗体由来のジアボディ、トリアボディまたはテトラボディである。

【0058】

例えば、剤は、限定ではなく、H P T P の細胞外部分に結合する抗体または抗体断片；または具体的にはH P T P のF N 3繰り返し体に結合する抗体、またはより具体的にはH P T P の第1のF N 3繰り返し体に結合する抗体であり得る。

10

【0059】

剤は、その全容が本明細書に組み込まれている米国特許第7,973,142号に記載されるモノクローナル抗体R 1 5 E 6をさらに含む。(抗体の産生に使用され得るマウスハイブリドーマ、B a l b c脾臓細胞(B細胞)は郵便番号20108、米国バージニア州マナサス私書箱1549のアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(ATCC)に2006年5月4日に寄託され、ATCC番号PTA-7580を割り当てられている)(本明細書ではR 1 5 E 6と呼ばれる)R 1 5 E 6と実質的に同じ生物学的特徴を有する抗体；R 1 5 E 6の抗体断片であって、断片は重鎖および軽鎖可変領域を含む；R 1 5 E 6のF (a b ')₂；F a b、F v、s c F vの二量体または三量体；およびR 1 5 E 6由来のジアボディ、トリアボディまたはテトラボディ。

20

【0060】

具体的には、本発明での使用に適する剤は、既知の技法により得られる、単独または他のアミノ酸配列との併用の抗体、抗体断片、その変異体または誘導體である。そのような技法には、限定ではなく、酵素的切断、化学的切断、ペプチド合成または組換えの技法が含まれる。本発明はさらに誘導體剤、例えばペプチボディーを包含する。

【0061】

したがって、H P T P - E C D結合剤の1つの実施形態は抗体であり、別の実施形態はタンパク質であり、さらに別の実施形態はペプチドであり、別の実施形態はダルピンであり、別の実施形態はアプタマーであり、別の実施形態はペプチボディーであり、さらに別の実施形態はアドネクチンであり、別の実施形態は核酸である。いくつかの実施形態では、H P T P - E C D結合剤はモノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗体である。特定の実施形態では、H P T P - E C D結合剤は、H P T P - E C Dに結合できる抗体断片である。好ましくは、H P T P - E C D結合剤は、抗体または抗体断片であり、限定ではなくH P T P の細胞外部分に結合するF (a b ')₂、F a b、F a bの二量体、F v、F vの二量体、s c F v、s c F vの二量体、F a bの二量体、F v、F vの二量体、s c F v、s c F vの二量体、F a bの三量体、F vの三量体、s c F vの三量体、ミニボディ、ジアボディ、トリアボディ、テトラボディ、直鎖状抗体、タンパク質、ペプチド、アプタマー、ペプチボディー、アドネクチンまたは核酸を含む。ある特定の実施形態では、H P T P - E C D結合剤はモノクローナル抗体のF (a b ')₂である。いくつかの実施形態では、H P T P - E C D結合剤は複数のH P T P - E C D結合部位を含み、例えばH P T P - E C D結合剤は無傷の抗体、またはF (a b ')₂、またはF a bの二量体、またはF a bの三量体である。例えば、いくつかの実施形態ではH P T P - E C D結合剤は、同一または別のエピトープで同時に2つのH P T P 分子に結合でき、それによって該2つのH P T P 分子を互いに近接させる。別の実施形態ではH P T P - E C D結合剤は、同一または別のエピトープで同時に3つのH P T P 分子に結合でき、それによって該3つのH P T P 分子を互いに近接させる。別の実施形態では、H P T P - E C D結合剤は、ハイブリドーマ細胞株ATCC番号PTA-7580により産生されたモノクローナル抗体である。さらに別の実施形態では、H P T P -

30

40

50

E C D 結合剤は、ハイブリドーマ細胞株 A T C C 番号 P T A - 7 5 8 0 により産生されたモノクローナル抗体の抗原結合断片である。さらに別の実施形態では、H P T P - E C D 結合剤は、ハイブリドーマ細胞株 A T C C 番号 P T A - 7 5 8 0 により産生されたモノクローナル抗体と同じまたは実質的に同じ生物学的特徴を有する抗体またはその抗原結合断片である。

【0062】

本願に開示の H P T P - E C D 結合剤のどの実施形態も、ビヒクルに共有結合または非共有結合してよい。「ビヒクル」という用語は、剤の生物学的特性に影響を及ぼす分子を指す。例えば、ビヒクルは、剤の劣化を回避および/または半減期、吸収を増加、毒性を低下、免疫原性を低下、または生物学的活性を増加し得る。例示的ビヒクルには、限定ではなく、イムノグロブリンの F c ドメイン；ポリマー、例えば：ポリエチレングリコール (P E G)、ポリリジン、デキストラン；脂質；コレステロール群 (ステロイドなど)；炭水化物、デンドリマー、オリゴ糖またはサルベージ受容体に結合するペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、ビヒクルはポリエチレングリコール (P E G) であり、他の実施形態ではビヒクルはポリリジンであり、さらに別の実施形態ではビヒクルはデキストランであり、さらに他の実施形態ではビヒクルは脂質である。

10

【0063】

それらの全容が本明細書に組み込まれる米国特許第 4 , 6 4 0 , 8 3 5 号、同第 4 , 4 9 6 , 6 8 9 号、同第 4 , 3 0 1 , 1 4 4 号、同第 4 , 6 7 0 , 4 1 7 号、同第 4 , 7 9 1 , 1 9 2 号および同第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号に記載されるような、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレングリコールまたはポリプロピレングリコールなどの水溶性ポリマー付着物 (attachments)。さらに他の当技術分野で既知の有用なポリマーには、モノメトキシ - ポリエチレングリコール、デキストラン、セルロースまたは他の糖質系ポリマー、ポリ (N - ビニルピロリドン) - ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリ酸化プロピレン / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール) およびポリビニルアルコール、並びにこれらのポリマーの混合物が含まれる。特に好ましいのは、ポリエチレングリコール (P E G) サブユニットで共有結合的に修飾されたペプチボディーである。水溶性ポリマーは、特定の位置、例えばペプチボディーのアミノ末端、またはポリペプチドの 1 以上の側鎖にランダムに結合し得る。剤、例えばペプチボディーおよび具体的にはヒト化抗体の治療能力を向上させるための P E G の使用が米国特許第 6 , 1 3 3 , 4 2 6 号に記載されている。本発明はまた、ペプチドおよび/または剤のビヒクル部分 (p o r t i o n) の誘導体化も企図する。そのような誘導体は、剤の溶解性、吸収、生物学的半減期などを改良し得る。部分 (m o i e t i e s) は代わりに剤の任意の望ましくない副作用などを排除または緩和し得る。

20

30

【0064】

「抗体」 (A b) という用語は、本明細書では、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体 (例えば二特異性抗体)、一本鎖抗体、例えば、ラマおよびラクダ由来の抗体、所望の生物学的活性、例えば抗原結合活性を示す限り抗体断片、例えば、可変領域および/または定常領域断片を含む。「イムノグロブリン」 (I g) という用語は、ここでは「抗体」と交換可能に使用される。

40

【0065】

「抗原結合断片」は、本明細書では、H P T P の一部分に結合し少なくとも 1 つの H P T P のホスファターゼ活性を阻害する剤の断片である。

【0066】

基本の 4 本鎖抗体ユニットは、2 本の同一の軽 (L) 鎖と 2 本の同一の重 (H) 鎖で構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である (I g M 抗体は、追加の J 鎖と呼ばれるポリペプチドと共に、5 つの基本ヘテロ四量体ユニットからなるので、1 0 個の抗原結合部位を含むが、分泌された I g A 抗体は重合して、J 鎖と共に塩基性 4 本鎖ユニット 2 ~ 5 つを含む多価の集合を形成し得る)。I g G の場合、4 本鎖ユニットは一般に約 1 5 0 キロダルトン (k D a) である。各 L 鎖は 1 つの H 鎖に 1 つの共有結合的ジスルフィド結合で連

50

結され、2本のH鎖は、H鎖イソタイプによって、互いに1以上のジスルフィド結合で連結されている。各H鎖とL鎖は、規則的な間隔で鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖はN末端に可変ドメイン(V_H)と、それに続いて鎖と鎖のそれぞれは3つの定常ドメイン(C_H)を、 μ イソタイプとイソタイプは4つの C_H ドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン(V_L)と、それに続く定常ドメイン(C_L)を他端に有する。 V_L は V_H と整列し、 C_L は重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})と整列する。特定の amino 酸残基が軽鎖と重鎖可変ドメインの界面を形成すると考えられている。 V_H と V_L の対合は共に1つの抗原結合性部位を形成する。抗体の異なるクラスの構造と特性については、例えばBasic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abbas, Terr and Trisram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, 1994の71ページ第6章を参照されたい。

10

【0067】

どの脊椎動物種由来のL鎖も、定常ドメインのアミノ酸配列によって、明白に区別できるカッパとラムダと呼ばれる2種類のうち1つに割り当てられる。重鎖定常ドメイン(C_H)のアミノ酸配列により、イムノグロブリンは5つの別々のクラスまたはイソタイプに割り当てられ得る。イムノグロブリンには5つのクラス: Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mがあり、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューと命名された重鎖を有する。ガンマとアルファのクラスは、 C_H 配列および機能の比較的マイナーな差に基づいてさらにサブクラスに分けられ、例えば、ヒトは次のサブクラスを発現する: Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1およびIg A 2。

20

【0068】

ラクダ科を構成する、例えばラマ、ラクダおよびヒトコブラクダは、軽鎖が欠失しているうえに C_{H1} ドメインも欠失している独特の種類抗体を有する(Muyldermans, S., Rev. Mol. Biotechnol., 74, 277-302 (2001))。これら重鎖抗体の可変領域は、 V_{HH} または V_{HH} と命名され、機能性イムノグロブリン由来の入手可能な最小(15 kDa)の無傷の抗原結合断片を構成している。

【0069】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定のセグメントの配列が抗体間で大きく異なる事実を指す。 V ドメインは抗原結合を媒介し、特定の抗体の抗原に対する特異性を定める。しかし、可変性は可変ドメインの110個のアミノ酸全長にわたって均等に分布しているわけではない。代わりに、 V 領域は、各9~12アミノ酸長と短い高可変性の「超可変領域」と呼ばれる領域により分離された、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる比較的可変性のない15~30個のアミノ酸の伸長部からなる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、4つのFRを含み、主としてシート構造をとり、該シート構造を接続し場合によっては一部を形成しているループを形成する3つの超可変領域により接続されている。各鎖の超可変領域はFRにより互いに近接近しており、他方の鎖の超可変領域と共に抗体の抗原結合部位の形成に貢献する。定常ドメインは抗体の抗原結合に直接は関与しないが、抗体依存性細胞毒性(ADCC)における抗体の関与など様々なエフェクター機能を呈する。

30

【0070】

「超可変領域」という用語は本明細書では抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は一般に、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基(例えば V_L のだいたい残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)の周り、および V_H のだいたい1~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3)の周り; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))および/または「超可変ループ」由来の残基を含む。

40

【0071】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書では実質的に均質な抗体の母集団から得られた抗体を指し、すなわち、母集団を構成する個々の抗体は、ごく少量で存在し得る

50

可能な天然の突然変異を除き同一である。異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体の調製とは対照的に、各モノクローナル抗体は単一のエピトープすなわち単一の抗原決定基に対する。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体に汚染されることなく合成され得るという点が利点である。「モノクローナル」という修飾語は、何らかの特定の方法で抗体を産生することを要するとみなしてはならない。例えば、本発明で有用なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法で調製してもよいし、細菌、真核生物の動物または植物の細胞において組換えDNA法を用いて作製してもよい（例えば米国特許第4,816,567号を参照）。「モノクローナル抗体」は、ファージ抗体ライブラリから利用可能な技法、例えばClackson et al., Nature, Vol. 352, pp. 624-628 (1991)を利用して単離してもよい。

10

【0072】

モノクローナル抗体は、本明細書では、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種由来の抗体の対応する配列と同一か類似であるか、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属し、鎖（複数可）の残りの部分が別の種由来の抗体の対応する配列と同一か類似であるか、または別の抗体クラスまたはサブクラスに属する「キメラ」抗体、並びに所望の生物学的活性を示す限りそのような抗体の断片を含む（米国特許第4,816,567号およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855 (1984)を参照）。

【0073】

「抗体断片」は、多量体抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合または可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabの二量体および三量体、Fv、scFv、ミニボディ；ジボディ、トリアボディおよびテトラボディ；直鎖状抗体（Hudson et al., Nature Med. 9, 129-134 (2003)を参照）が含まれる。

20

【0074】

「Fv」は最小の抗体断片であり完全な抗原結合部位を含む。この断片は、緊密に非共有結合した1つの重鎖と1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これらの2つのドメインの折り畳みから、アミノ酸残基を抗原結合に寄与して抗体に抗原結合特異性を与える6つの可変ループ（H鎖とL鎖からそれぞれ3つずつ）が出ている。しかし、1個の可変ドメイン（またはある抗原に特異的なCDRを3つだけ含むFvの半分）であっても抗原を認識し結合する能力があるので、Fvの定義に含まれる。

30

【0075】

一本鎖可変断片（scFv）は、イムノグロブリンの重鎖可変領域（V_H）および軽鎖可変領域（V_L）が10～約25アミノ酸長の短いリンカーペプチドで連結された融合タンパク質である。リンカーは通常、溶解性のためのセリンまたはスレオニンのみならず柔軟性のためのグリシンにも富み、V_HのN末端をV_LのC末端と、またはその逆のいずれかを連結できる。このタンパク質は、定常領域の除去とリンカーの導入にもかかわらず、もとのイムノグロブリンの特異性を保持している。

【0076】

二価（divalentまたはbivalent）の一本鎖可変断片（di-scFv、bi-scFv）が2つのscFvを結合することにより設計され得る。このことは、2つのV_Hと2つのV_L領域を有する単一のペプチド鎖を生産しタンデムscFvを得ることにより実施され得る。別の可能性は、2つの可変領域を共に折り畳むには短すぎるリンカーペプチド（約5アミノ酸）を用いてscFvを作製しscFvを二量体化させることである。このタイプはジボディとして知られる。ジボディは、対応するscFvよりも40倍まで低い解離定数を有することが知られ、これは標的に対しはるかに高い親和性を有することを意味する。したがって、ジボディ薬物は他の抗体医薬よりもはるかに低用量で投与でき、インビボではるかに高い特異性で腫瘍を標的化する能力がある。さらに短いリンカー（1または2つのアミノ酸）は、いわゆるトリアボディまたはトリ（トライ）ボディと呼ばれる三量体の形成をもたらす。テトラボディは、標的に対しジボディよりもはるかに高い親和性を示すことが知られ、それが示されている。

40

50

【0077】

「ヒト化抗体」または「ヒト抗体」は、非ヒト種（例えばマウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域の配列を含むが、少なくともV_Hおよび/またはV_L配列の一部分はより「ヒト様」に、すなわちヒト生殖系の可変配列に類似して改変されている抗体を指す。ヒト化抗体の1つのタイプはCDRグラフト化抗体であり、ヒトCDR配列が非ヒトV_HおよびV_L配列に導入されて、対応する非ヒトCDR配列と置き換わっている。キメラ、CDRグラフト化およびヒト化抗体を作製する方法は当業者には既知である（例えば米国特許第4,816,567号および同第5,225,539号を参照）。ヒト抗体を作製する1つの方法ではトランスジェニックマウスなどのトランスジェニック動物を使用する。これらのトランスジェニック動物は、それら自体のゲノムに挿入されたヒト抗体産生ゲノムの相当な部分を含み、動物自体の内在性の抗体産生は抗体産生において不十分にされている。そのようなトランスジェニック動物を作製する方法は、当技術分野では既知である。そのようなトランスジェニック動物は、Xenomouse・RTM・技法を使用して、または「小遺伝子座（minilocus）」法を使用して作製してよい。Xenomice・RTM・を作製する方法は米国特許第6,162,963号、同第6,150,584号、同第6,114,598号および同第6,075,181号に記載されている。「小遺伝子座」方を使用してトランスジェニック動物を作製する方法は、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,625,825号および国際公開第93/12227号に記載されている。

10

【0078】

非ヒト抗体のヒト化は近年ルーチンになり、今や当業者に既知である。例えばXoma社、Aries社、Medarex社、PDL社およびCambridgeAntibody Technologies社などのいくつかの企業がヒト化抗体を作製するサービスを提供している。ヒト化プロトコルは、例えば、KipriyanovandLe Gall, Molecular Biotechnol., Vol. 26, pp. 39-60 (2004), Humana Press, Totowa, N.J.; Lo, Methods Mol. Biol., Vol. 248, pp. 135-159 (2004), Humana Press, Totowa, N.J.; Wu et al., J. Mol. Biol., 294, pp. 151-162 (1999)などの技術文献に広く記載されている。

20

【0079】

ある特定の実施形態では、本発明において有用な抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株において発現され得る。特定の抗体をコードする配列を、例えばポリヌクレオチドをウイルス（またはウイルスベクター）内に包み宿主細胞にウイルス（またはベクター）を形質導入する、または米国特許第4,399,216号、同第4,912,040号、同第4,740,461号および同第4,959,455号に例示されるような当技術分野で既知の形質移入手順を含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する既知の方法により、適当な哺乳動物宿主細胞の形質転換に使用してよい。使用される形質転換手順は形質転換される宿主により得る。異種性ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入する方法は当技術分野で既知であり、限定ではなく、デキストラン媒介形質移入、カルシウムリン酸沈殿、ポリブレン媒介形質移入、原形質体融合、電気穿孔、ポリヌクレオチド（複数可）のリポソーム内への封入、核酸と正に帯電した脂質の混合、およびDNAの核への直接的マイクロインジェクションが含まれる。

30

40

【0080】

抗体の重鎖定常領域、重鎖可変領域、軽鎖定常領域または軽鎖可変領域、またはその断片のアミノ酸配列をコードする核酸分子を、所望により適当に組み合わせて、標準的なライゲーション法を用いて適切な発現ベクターに挿入する。抗体重鎖または軽鎖定常領域は、適切な可変領域のC末端に付けられ結合されて発現ベクターにされ得る。ベクターは、典型的には使用する特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは宿主細胞の機構と適合するので遺伝子の増幅および/または遺伝子発現が生じ得る）。発現ベクターの概説については、Methods Enzymol. Vol. 185 (Goeddel, ed.), 1990, Academic Pressを参照されたい。

【0081】

50

特異的結合剤の特定

適切な選択的結合剤は、当技術分野で既知の様々な技法を用いて特定され得る。例えば、候補剤は、HPTP への結合についてスクリーニングされ得、および活性についてスクリーニングされ得る。一般に、候補剤は、最初に結合についてスクリーニングされ、選択的結合を示すものは次いでTie 2のHPTP 媒介脱リン酸化を阻害する能力を決定するスクリーニングに供される。しかし、場合によっては、候補剤は最初にインビトロで活性をスクリーニングされる。

【0082】

結合活性の決定

特異的結合剤の特定に使用される適切なアッセイの選択は、スクリーニングされる候補剤の性質による。当業者であれば、特定の候補剤の適切なアッセイを選択できよう。

10

【0083】

例えば、候補が抗体またはFc部分を有するペプチドである場合、実施例3Bに記載するようなFACS分析により、HPTP を発現する細胞に結合する能力に基づき候補剤が選択できる。細胞は、内在的にHPTP を発現してもよいし、遺伝子操作されてHPTP を発現してもよい。

【0084】

アプタマーなどの他の候補剤については、他の技法が当技術分野で知られている。例えば、HPTP に特異的に結合するアプタマーは、SELEX (試験管内進化法)として知られる、反復回のインビトロの選択を通じて特異的なアプタマーを選択する技法を用いて選択され得る。

20

【0085】

ウエスタンブロットによる阻害剤の活性決定

実施例4に例示されるように、1つの適切なアッセイではHUVECが無血清培地において様々な濃度の候補剤の存在または不存在で培養され、細胞溶解物が調製され、Tie 2抗体を用いて免疫沈降され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離され、PVD膜に転写される。膜に結合した免疫沈降されたタンパク質は次いで連続的ウエスタンブロットに供され、抗ホスホチロシン抗体を用いてTie 2リン酸化を定量化し、次いでTie 2抗体を用いて全Tie 2を定量化する。Tie 2リン酸化は、抗ホスホチロシンシグナルの全Tie 2シグナルに対する比率として表す。抗ホスホチロシンシグナルのレベルのほうが大きいことは、候補剤によりHPTP がより阻害されていることを示す。

30

【0086】

スクリーニングされ得る候補剤は、限定ではなく、植物または動物の抽出物などの天然物を含む既知の剤のライブラリ、タンパク質、限定ではなくランダムペプチドライブラリおよびコンビナトリアルケミストリー由来のD体またはL体アミノ酸でできた分子ライブラリのメンバーを含むペプチド、限定ではなくポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト、一本鎖抗体、Fab、F(ab)₂およびFab発現ライブラリ断片およびそのエピトープ結合断片を含む抗体を含む生物学的活性分子を含む。

【0087】

ここでは「抗体断片」は、限定ではなく、抗体由来のF(ab')₂、Fabの二量体または三量体、Fv、scFvまたはジアボディ、トリアボディまたはテトラボディを含む。

40

【0088】

本願を通して、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示は、技術水準をさらに十分に記載するために、その全容がここで本願に参照により組み込まれる。

【0089】

血管内皮は全血管の内側を覆い、血漿および白血球細胞の血流への出入りを制御する非血栓形成性表面を形成している。無活動性内皮は数か月～数年の速さで代謝回転し、血管新生の活性化後にのみ増殖する。無活動性内皮の欠失は、炎症、粥状動脈硬化症、再狭窄、血管新生および様々なタイプの脈管障害などの状態の一般的な特徴である。

50

【0090】

血管形成および血管新生は、健康な成体では下方制御されており、女性生殖系器官を除き、低酸素症または炎症などの微小環境要因により血管新生が誘発される場合の病理にはほぼ排他的に関連する。これらの血管新生に関連するまたは誘発される病理プロセスは、癌、乾癬、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、血栓症および関節炎および粥状動脈硬化症を含む炎症性疾患などの多様な疾患を含む。しかし、ある特定の 경우에는、不十分な血管新生により、虚血性心疾患や癰疽などの疾患につながり得る。

【0091】

無活動性血管内皮は、血漿および細胞が血流路から下の組織に通過するのを制御する緊密なバリアを形成する。内皮細胞は、特定の細胞内構造シグナル伝達複合体に連結される接合型膜貫通タンパク質により互いに接着している。内皮層は休止状態から活性状態に移行することができ、内皮が活性化すると、接着分子が発現する。この内皮活性化は、血管形成、炎症および炎症関連疾患を開始する要件である。

10

【0092】

Tie-2は、内皮分化を制御する内皮細胞に独占的に発現する受容体様チロシンキナーゼである。Tie-2は、刺激性リガンドのアンジオポエチン-1 (Ang-1) に結合しこれにより活性化され、Ang-1は、Tie-2受容体の自己リン酸化を促進し、内皮細胞生存率を促進し基底膜の溶解を回避して血管構造を安定化することになる一連の事象をもたらす。したがって、Tie-2の活性化は、無活動性の無傷の血管内皮を維持することで血管系の漏出を減弱化する方法である。Tie-2活性化は、Tie-2に競合的に結合してTie-2のリン酸化を妨害するAng-1拮抗作用を示すAng-2により阻害される。Ang-2のレベル上昇は、炎症性疾患、とりわけ敗血症、狼瘡、炎症性腸疾患および癌などの転移性疾患と関連があることがわかっている。

20

【0093】

高Ang-2レベルの持続中、内皮には開裂や破断が生じ、血管漏出症候群が引き起こされる。血管漏出症候群は、組織および肺の浮腫などの命にかかわる結果となる。多くの疾患状態にとって、上昇したAng-2レベルは、疾患状態や病状が存在することの明白なマーカーである。疾患状態が解消されると、Ang-1 / Ang-2のバランスが回復し、血管内皮は安定化する。Ang-1とAng-2の正常なバランスが中断されている状態において、本開示の剤は、ヒトタンパク質チロシンホスファターゼ (HPTP) の阻害を通じてリン酸化Tie-2の脱リン酸化を阻害することでTie-2シグナル伝達を増幅することが見出されている。さらに、本開示の剤は、非常に制御されたやり方で量を変えて使用してTie-2シグナル伝達量を増加させることができ、それによってTie-2増幅レベルを決定できる。

30

【0094】

本開示は、血管漏出症候群の患者を治療する方法を提供し、該方法は、患者に有効量の - ECD結合剤またはその薬剂的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。本開示の組成物は、1以上の薬剂的に許容可能な賦形剤も含んでよい。

【0095】

ここでは、HPTP - ECD結合剤を含む組成物が開示され、該組成物は、開示の病状、病気、傷害の治療、治療過程、細胞治療などに有用である。

40

【0096】

1つの実施形態では、方法は、炎症性疾患または状態に苦しむ患者の血管漏出を治療することを含み、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。別の実施形態は、身体外傷に苦しむ患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。1つの特定の実施形態では、外傷は手術外傷である。1つの実施形態では、方法は、ショックに苦しむ患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。

【0097】

50

特定の実施形態は、出血後のショック、外傷後のショックまたは敗血症性ショックを含む。本開示は、成人呼吸促迫症候群の患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することにより、該患者を治療する方法も提供する。別の実施形態は、急性肺傷害に苦しむ患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。癌の転移と細菌およびウイルス感染症は以下に記載する。

【0098】

いくつかの実施形態では、HPTP - ECD結合剤は、予防的に投与され、患者を血管漏出の危険にさらす事象が起きる前に患者の血管系を安定化させる。1つの実施形態では、HPTP - ECD結合剤は、予防的に投与され、手術前に患者の血管系を安定化させる。さらに別の実施形態は、患者における血管漏出症候群を予防する方法であって、化学療法を受ける前に患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を投与する。別の実施形態は、ショックの危険がある患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を投与することを含む。

10

【0099】

本開示のHPTP - ECD結合剤は、ヒトおよび動物における腫瘍の転移を予防、減衰、最小限化、制御および/または減少させるのに使用してよい。本開示のHPTP - ECD結合剤は原発腫瘍の増殖速度の遅滞にも使用できる。したがって、ここに開示する剤は、1以上の薬物または他の薬剤との併用治療の一部として投与できる。併用治療の一部として使用される場合、本開示の剤による転移の低減と原発腫瘍増殖の減少により、患者の治療に使用されている任意の薬剤的または薬物療法がより有効かつ効率的に使用できる。さらに、本開示の剤により転移を制御することで、対象は疾患を1か所集中する大きな能力が与えられる。

20

【0100】

したがって、本開示の1つの実施形態は、患者の癌を治療する方法であって、該方法は、患者に有効量のHPTP - ECD結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。別の実施形態は、癌患者における転移を予防する方法であって、該方法は、患者に有効量のHPTP - ECD結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、癌患者における腫瘍転移を最小限化する方法であって、該方法は、患者に有効量のHPTP - ECD結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。本明細書では、悪性腫瘍の転移を予防するかまたは腫瘍増殖速度を低下させる方法を開示する。したがって、別の実施形態は、悪性腫瘍を有すると診断された患者を治療する方法であり、該方法は、患者に有効量のHPTP - ECD結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。別の実施形態は、悪性腫瘍を有すると診断された患者の転移を予防する方法であり、該方法は、患者に有効量のHPTP - ECD結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、腫瘍を有すると診断された患者の腫瘍増殖速度を低下させる方法であり、該方法は、患者に有効量のHPTP - ECD結合剤またはその薬剤的に許容可能な塩を含む組成物を投与することを含む。

30

40

【0101】

以下は、本開示の方法および組成物により治療され得る癌の非限定的な例である：白血病、例えば、慢性骨髄性白血病；急性リンパ芽球性白血病、急性小児骨髄性白血病；成人急性骨髄性白血病、有毛細胞白血病；リンパ腫、例えば、パーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、中枢神経系リンパ腫；星状細胞腫、例えば、小脳星状細胞腫、小児星状細胞腫、毛様細胞星状細胞腫、びまん性星状細胞腫、未分化星状細胞腫、グリオーム、乏突起膠腫、大脳星状細胞腫視覚路神経膠腫および視床下部神経膠腫、脳幹神経膠腫、視覚路、視床下部神経膠腫、大脳星状細胞腫/悪性神経膠腫；癌、例えば、胸腺腫、胸腺癌、扁平上皮癌、皮膚癌、メルケル細胞癌、副腎皮質癌、副腎皮質癌、基底細胞癌；肉腫、例えば、横紋筋肉腫肉腫、ユーイング肉腫、カボジ肉腫

50

、軟部組織肉腫、子宮肉腫、骨肉腫、骨の悪性線維性組織球腫；虫垂癌；肝外胆管癌；膀胱癌；骨癌；唾液腺癌；脳腫瘍；小児中枢神経系非定型奇形腫様腫瘍／棒状体腫瘍；中枢神経系胚性腫瘍；頭蓋咽頭腫；上衣芽腫；上衣腫；髄芽腫；髄上皮腫；中間分化の松果体実質腫瘍；テント上原始神経外胚葉性腫瘍腫瘍および松果体芽腫；脳および脊髄の腫瘍；乳癌；気管支癌；カルチノイド腫瘍；消化器カルチノイド腫瘍；中枢神経系胚性腫瘍；子宮頸癌；小児脊索腫；慢性骨髄増殖性疾患；結腸癌；結腸直腸癌；頭蓋咽頭腫；性腺外胚細胞腫瘍；精巣胚細胞腫瘍；網膜芽細胞腫；胆嚢癌；胃（gastric/stomach）癌；消化器カルチノイド腫瘍；胃腸間質性腫瘍（g i s t）；頭蓋外胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛腫瘍；膠芽腫；頭部および頸部の癌；肝細胞（肝臓）癌；ランゲルハンス細胞組織球症；下咽頭癌；島細胞腫瘍；腎臓（腎細胞）癌；咽頭癌；口唇および口腔の癌；肝臓癌；非小細胞肺癌；小細胞肺癌；中皮腫；原発不明の転移性扁平上皮頸癌；口腔（mouth）癌；小児多発性内分泌腫瘍症；多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉症；骨髄異形成症候群；多発性骨髄腫；慢性骨髄増殖性疾患；鼻腔および副鼻腔癌；神経芽細胞腫；口腔（oral）癌；中咽頭癌；卵巣癌、例えば、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫瘍、卵巣低悪性腫瘍；膀胱癌；島細胞腫瘍；乳頭腫；甲状腺癌；副甲状腺癌；陰茎癌；食道癌；咽頭癌；鼻咽頭癌；褐色細胞腫；松果体実質腫瘍；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫；前立腺癌；直腸癌；腎細胞（腎臓）癌；腎盂および尿管の癌；セザリー症候群；皮膚癌（非メラノーマ性）；皮膚癌（黒色腫）；眼内黒色腫；悪性黒色腫、小腸癌；転移性扁平上皮頸癌；胃（stomach/gastric）癌；睾丸癌；咽頭癌；腎盂および尿管の移行細胞癌；妊娠性絨毛腫瘍；尿道癌；子宮内膜の子宮癌；陰癌；外陰癌；ワルデンストロームマクログロブリン血症；およびウィルムス腫瘍。

10

20

30

40

50

【0102】

HPTP - ECD 結合剤は、1以上の化学療法剤と併用で投与できる。

【0103】

「化学療法剤」または「化学療法化合物」は、癌治療に有用な化学物質である。本明細書に開示のHPTP - ECD 結合剤と併用で使用され得る化学療法癌治療剤は、限定ではなく、分裂阻害剤（ピンカルカロイド）を含む。これらには、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシンおよびナベルピン（商標）（ピノレルピン - 5' - ノルアナイドロプラスチン）（noranhydroblastine）が含まれる。さらに他の実施形態では、化学療法癌治療剤は、カンプトテシン化合物などのトポイソメラーゼI阻害剤を含む。本明細書では「カンプトテシン化合物」は、カンプトサル（商標）（イリノテカンHCL）、Hy cam tin（商標）（トポテカンHCL）および他のカンプトテシン由来の化合物およびその類似体を含む。本開示の方法と組成物において使用され得る別の化学療法癌治療剤のカテゴリーは、エトポシド、テニポシドおよびミトポドジドなどのポドフィロトキシン誘導体である。本開示は、腫瘍細胞における遺伝子材料をアルキル化する、アルキル化剤として知られる他の化学療法癌治療剤をさらに包含する。これらは、限定ではなく、シスプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、トリメチレンチオホスホルアミド、カルムスチン、ブスルファン、クロランブシル、ベルスチン、ウラシルマスタード、クロマファジン（chlomaphazin）およびダカルバジンを含む。本開示は、化学療法剤としての代謝拮抗剤を包含する。これらのタイプの剤の例は、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサート、メルカプトプリン、アザチオプリム（azathioprine）およびプロカルバジンを含む。本開示の方法と組成物において使用され得る追加のカテゴリーの化学療法癌治療剤は、抗生物質を含む。例として、限定ではなく、ドキシソルピシン、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、マイトマイシンCおよびダウノマイシンが含まれる。これらの化合物の多数のリボソーム製剤が市販されている。本開示は、限定ではなく、抗腫瘍抗体、ダカルバジン、アザチジン、アムサクリン、メルファラン、VM - 26、イホスファミド、タキソールとその誘導体、L - アスパラギナーゼ、ミトキサントロン、IF - 2、ゲムシタピン、エルロチニブ、ドキシル、イリノテカンおよびペバシズマブを含む他の化学療法癌治療剤をさらに包含する。

【 0 1 0 4 】

本開示のHPTP - ECD結合剤との併用で使用され得る他の抗癌剤には、限定ではなく以下が含まれる：アシピシン、アクラルピシン、アコダゾール塩酸塩、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アンボマイシン（ambomycin）、酢酸アメタントロン、アミノグルテチミド、アナストロゾール、アントラマイシン、アスペルリン、アザシチジン、アゼテパ、アゾトマイシン、バチマスタット、ベンゾデパ、ピカルタミド、ピサントレン塩酸塩、ビスナフィドジメシラート、ビセレシン、プレオマイシン硫酸塩、プレキナルナトリウム、プロピリミン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド、カルベチマー（carbetimer）、カルボプラチン、カルピシン塩酸塩、カルゼレシン、セデフィンゴール、シロールマイシン（cirolemycin）、クラドリピン、クリスナ
 トールメシレート、シタラピン、ダウノルピシン塩酸塩、デシタピン、デキソルマブラチン、デザグアニン、デザグアニンメシレート、ジアジクオン、ドセタキセル、ドキシソルピシン塩酸塩、ドロキシフェン、クエン酸ドロキシフェン、プロピオン酸ドロモスタノロン、ズアゾマイシン、エダトレキサート、エルフォミチン（eflomithine）塩酸塩、エルサ
 ミトルシン、エンロプラチン、エンプロマート、エピプロビジン、エピルピシン塩酸塩、エルプロゾール、エソルピシン塩酸塩、エストラムスチン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エタニダゾール、リン酸エトボシド、エトプリン、ファドロゾール塩酸塩、ファ
 ザラピン、フェンレチニド、フロクスウリジン、リン酸フルダラピン、フルロシタピン、ホスキドン、ホストリエシンナトリウム、ゲムシタピン塩酸塩、ヒドロキシ尿素、イダル
 ピシン塩酸塩、イルモホシン、インターロイキン2（組換えインターロイキン2すなわち
 rIL2を含む）、インターフェロン - 2a、インターフェロン - 2b、インターフェ
 ロン - n1、インターフェロン - n3、インターフェロン - 1a、インターフェ
 ロン - 1b、イプロプラチン、イリノテカン塩酸塩、ランレオチド酢酸塩、レトロゾー
 ル、酢酸ロイプロリド、リアロゾール塩酸塩、ロメトレキソールナトリウム、ロムスチン
 、ロソキサントロン塩酸塩、マソプロコール、マイタンシン、メクロレタミン塩酸塩、酢
 酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メノガリル、メトトレキサートナトリウム
 、メトプリン、メツレデパ、ミチンドミド、ミトカルシン、ミトクロミン、ミトギリン、
 ミトマルシン（mitomalcin）、ミトスペル（mitosper）、ミトタン、
 ミトキサントロン塩酸塩、ミコフェノール酸、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルマプ
 ラチン、オキシスラン、パクリタキセル、ペガスパルガーゼ、ペリオマイシン、ペンタム
 スチン、ペプロマイシン硫酸塩、ベルホスファミド、ピボプロマン、ピボスルファン、ピ
 ロキサントロン塩酸塩、プリカマイシン、プロメスタン、ポルフィマーナトリウム、ポル
 フィロマイシン、プレドニムスチン、プロカルバジン塩酸塩、ピューロマイシン、ピュー
 ロマイシン塩酸塩、ピラゾフリン、リボプリン、ログレチミド、サフィンゴール、サフィ
 ンゴール塩酸塩、セムスチン、シムトラゼン、スパルホサートナトリウム、スパルソマイ
 シン、スピロゲルマニウム塩酸塩、スピロムスチン、スピロプラチン、ストレプトニグリ
 ン、ストレプトゾシン、スロフェヌル、タリソマイシン、テコガランナトリウム、テガフ
 ール、テロキサントロン塩酸塩、テモボルフィン、テロキシロン、テストラクトン、チア
 ミプリン、チオグアニン、チオテパ、チアゾフリン、チラバザミン、トレミフェンクエン
 酸塩、酢酸トレストロン、リン酸トリシリピン、トリメトレキサート、グルクロン酸トリ
 メトレキサート、トリプトレリン、ツプロゾール塩酸塩、ウレデパ、バプレオチド、ベル
 テボルフィン、ピンブラスチン硫酸塩、ピンクリスチン硫酸塩、ピンデシン硫酸塩、硫酸
 ビネピジン、硫酸ピングリシナート、硫酸ピンロイロシン、酒石酸ピノレルピン、硫酸ピ
 ンロシジン、硫酸ピンゾリジン、ポロゾール、ゼニプラチン、ジノスタチン、ゾルピシン
 塩酸塩。他の抗癌剤は、限定ではなく、以下を含む：20 - epi - 1, 25ジヒドロキ
 シピタミンD3、5 - エチニルウラシル、アピラテロン、アクラルピシン、アシルフルベ
 ン、アデシペノール、アドゼレシン、アルデスロイキン、ALL - TKアンタゴニスト、
 アルトレタミン、アンバムスチン、アミドックス、アミホスチン、アミノレプリン酸、ア
 ムルピシン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホリド、血
 管新生阻害剤、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリックス、抗背側化形態

10

20

30

40

50

形成タンパク質 - 1、抗アンドロゲン薬、前立腺癌、抗エストロゲン剤、抗新生物薬、ア
 フィジコリングリシナート、アポトーシス遺伝子調節物質、アポトーシス調節物質、アプ
 リン酸、ara - CDP - DL - PTBA、アルギニンデアミナーゼ、アスラクリン、ア
 タメスタン、アトリムスチン、アキシナスタチン1、アキシナスタチン2、アキシナスタ
 チン3、アザセトロン、アザトキシチン、アザチロシン、バッカチンIII誘導体、バラノ
 ール、パチマスタット、BCR / ABLアンタゴニスト、ベンゾクロリン、ベンゾイルス
 タウロスポリン、ラクタム誘導体、アレチン、ベタクラマイシンB、ベツリン酸、b
 FGF阻害剤、ピカルタミド、ピサントレン、ピサジリジニルスペルミン (bisaziridiny
 lspermine)、ピスナフィド、ピストラテンA、ピセレシン、プレフラート、プロピリミ
 ン、ブドチタン (budotitane)、ブチオニンスルホキシミン、カルシボトリオール、カル
 ホスチンC、カナリアボックスIL - 2、カペシタピン、カルボキサミド - アミノ - トリ
 アゾール、カルボキシアミドトリアゾール、CaRestM3、CARN700、軟骨由
 来阻害剤、カルゼレシン、カゼインキナーゼ阻害剤 (ICOS)、カスタノスペルミン、
 セクロピンB、セトロレリックス、クロリン (chlorins)、クロロキノキサリンスルホン
 アミド、シカプロスト、cis - ポルフィリン、クラドリピン、クロミフェン類似体、ク
 ロトリマゾール、コリスマイシンA、コリスマイシンB、コンプレタスタチンA4、コン
 プレタスタチン類似体、コナゲニン、克蘭ベシジン816、クリスナトール、クリプト
 フィシン8、クリプトフィシンA誘導体、クラシンA、シクロペンタントラキノ、シク
 ロプラタム (cycloplata)、シベマイシン、シタラピンオクホスファート、細胞溶解因
 子、シトスタチン、ダクリキシマブ (dacliximab)、デシタピン、デヒドロジデムニンB
 、デスロレリン、デキサメタゾン、デキシホスファミド (dexifosfamide)、デクスラゾ
 キサン、デクスベラパミル、ジアジクオン、ジデムニンB、DIDOX、ジエチルノルス
 ペルミン、ジヒドロ - 5 - アザシチジン、ジヒドロタキソール、9 - , ジオキサマイシン
 、ジフェニルスピロムスチン、ドセタキセル、ドコサノール、ドラセトロン、ドキシフル
 リジン、ドロキシフェン、ドロナビノール、デュオカルマイシンSA、エブセレン、エコ
 ムスチン、エデルホシン、エドレコロマブ、エフロルニチン、エレメン、エミテフル、エ
 ピルピシン、エプリステリド、エストラムスチン類似体、エストロゲンアゴニスト、エスト
 ロゲンアンタゴニスト、エタニダゾール、リン酸エトポシド、エキセメスタン、ファド
 ロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナステリド、フラボ
 ピリドール、フレゼラスチン、フルアステロン、フルダラビン、フルオロダウノルニシン
 (fluorodaunorunicin) 塩酸塩、ホルフェニメックス、ホルメスタン、ホストリエシン、
 ホテムスチン、ガドリニウムテキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタピン、ガニレリク
 ス、ゼラチナーゼ阻害剤、ゲムシタピン、グルタチオン阻害剤、ヘブスルファミン、ヘレグ
 リン、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ヒペリシン、イバンドロン酸、イダルピシン、
 イドキシフェン、イドラマントン、イルモホシン、イロマスタット、イミダゾアクリドン
 (imidazoacridones)、イミキモド、免疫賦活ペプチド、インスリン様増殖因子 - 1受容
 体阻害剤、インターフェロンアゴニスト、ヨーベングアン、ヨードドキシソルピシン、イボ
 メアノール、4 - , イロプラクト、イルソグラジン、イソベンガゾール (isobengazole)
 、イソホモハリコンドリ (isohomohalicondrin) B、イタセトロン、ジャスプラキノリ
 ド、カハラリドF、ラメラリン - N三酢酸、ランレオチド、レイナマイシン、レノグラス
 チム、硫酸レンチナン、レプトルスタチン、レトロゾール、白血病阻害因子、白血球 イ
 ンターフェロン、ロイプロリド + エストロゲン + プロゲステロン、リュープロレリン、レ
 バミソール、リアロゾール、直鎖ポリアミン類似体、親油性二糖ペプチド、親油性白金化
 合物、リソクリナミド7、ロバプラチン、ロンブリシン、ロメトレキソール、ロニダミ
 ン、ロソキサントロン、ロバスタチン、ロキソリピン、ルルトテカン、ルテチウムテキサ
 フィリン、リソフィリン (lysofylline)、溶解ペプチド、マイタンシン、マンノスタチ
 ンA、マリマスタット、マソプロコール、マスピン、マトリシン阻害剤、マトリックスメ
 タロプロテアーゼ阻害剤、メノガリル、メルバロン、メテレリン、メチオニナーゼ、メト
 クロプラミド、MIF阻害剤、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミスマ
 ッチ二本鎖RNA、ミトグアゾン、ミトラクトール、マイトマイシン類似体、ミトナフィ

10

20

30

40

50

ド、ミトトキシソ (mitotoxin) 線維芽細胞増殖因子 - サボリン、モファロテン、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、モノホスホリル脂質 A + ミオバクテリウム (myobacterium) 細胞壁 s k、モビダモール、多剤耐性遺伝子阻害剤、多種腫瘍抑制 1 ベースの治療、マスタード抗癌剤、ミカペルオキシド B、マイコバクテリア細胞壁抽出物、ミリアポロン、N - アセチルジナリン、N - 置換ベンズアミド、ナファレリン、ナグレスティップ (nagrestip)、ナロキソン + ペンタゾシン、ナパビン (napavin)、ナフテルピン、ナルトグラスチム、ネダプラチン、ネモルピシン、ネリドロロン酸、中性エンドペプチターゼ、ニルタミド、ニサマイシン、一酸化窒素調節物質、窒素酸化物抗酸化剤、ニトルリン (nitruillyn)、0 6 - ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン、オリゴヌクレオチド、オナプリストン、オندانセトロン、オندانセトロン、オラシン、経口サイトカイン誘導剤、オルマプラチン、オサテロン、オキサリプラチン、オキサウノマイシン、パクリタキセル、パクリタキセル類似体、パクリタキセル誘導体、パラウアミン、パルミトイルリゾキシソ、パミドロロン酸、パナキシトリオール、パノミフェン、パラバクチン、パゼリプチン、ペガスバルガーゼ、ペルデシン、ペントサンポリ硫酸ナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール、ペルフルブロン、ペルホスファミド、ペリリルアルコール、フェナジノマイシン、フェニル酢酸、ホスファターゼ阻害剤、ピシバニール、ピロカルピン塩酸塩、ピラルピシン、ピリトレキシム、プラセチン (placetin) A、プラセチン B、プラスミノーゲン活性化因子阻害剤、白金錯体、白金化合物、白金 - トリアミン錯体、ボルフィマーナトリウム、ボルフィロマイシン、ブレドニゾン、プロピル bis - アクリドン、プロスタグランジン J 2、プロテアゾーム阻害剤、プロテイン A 系免疫調節物質、タンパク質キナーゼ C 阻害剤、タンパク質キナーゼ C 阻害剤、微細藻類、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ阻害剤、プルプリン、ピラゾロアクリジン、ピリドキシル化ヘモグロビンポリオキシエチレン複合体、raf アンタゴニスト、ラルチトレキシド、ラモセトロン、ras ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、ras 阻害剤、ras - GAP 阻害剤、脱メチル化レテリプチン、レニウム Re 1 8 6 エチドロネート、リゾキシソ、リボザイム、RIE レチナミド、ログレチミド、ロヒツキン (rohitukine)、ロムルチド、ロキニメクス、ルビギノン B 1、ルボキシル、サフィンゴール、サイントピン、SarCNU、サルコフィトール A、サルグラモスチム、Sdi 1 模倣体、セムスチン、老化由来の阻害剤 1、センスオリゴヌクレオチド、シグナル伝達阻害剤、シグナル伝達調節物質、一本鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン、ソブゾキサソ、ナトリウムボロカブテート、フェニルアセテートナトリウム、ソルベロール (solverol)、ソマトメジン結合タンパク質、ソネルミン (sonermin)、スパルホス酸、スピカマイシン D、スピロムスチン、スプレノペンチン、スポンギスタチン 1、スクアラミン、幹細胞阻害剤、肝細胞分割阻害剤、スチピアミド、ストロメラキシソ阻害剤、スルフィノシソ、超活性血管作用性小腸ペプチドアンタゴニスト、スラジスタ (suradista)、スラミン、スウェインソニン、合成グリコサミノグリカン、タリムスチン、タモキシフェンメチオジド、タウロムスチン、タザロテン、テコガランナトリウム、テガフル、テルルアピリリウム (tellurapyrylium)、テロメラゼ阻害剤、テモポルフィン、テモゾロミド、テトラクロロデカオキサイド、テトラゾミン、タリプラスチン、チオコラリン、トロンボポエチン、トロンボポエチン模倣体、チマルファシン (thymalfasin)、サイモポエチン受容体アゴニスト、チモトリナン、甲状腺刺激ホルモン、すずエチルエチオプルプリン、チラパザミン、チタノセン 2 塩化物、トブセンチン、トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳阻害剤、トレチノイン、トリアセチルウリジン、トリシリピン、トリメトレキサート、トリプトレリン、トロピセトロン、ツロステリド、チロシンキナーゼ阻害剤、チロホスチン、UBC 阻害剤、ウベニメクス、尿生殖洞由来成長阻害因子、ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト、バプレオチド、バリオリン B、ベクター系、赤血球遺伝子治療、ベラレソール、ベラミン、ベルジン、ベルテポルフィン、ビンキサルチン (vinxaltine)、ビタキシソ、ボロゾール、ザノテロン、ゼニプラチン、ジラスコルブおよびジノスタチンスチマラー。1 つの実施形態では、抗癌剤は 5 - フルオロウラシルまたはロイコボリンである。

10

20

30

40

50

【0105】

抗血管新生剤も、癌治療において有用である。抗血管新生剤は当業者には周知である。本開示の方法と組成物において適切な抗血管新生剤は、ヒト化およびキメラ抗体、抗VEGFアプタマーおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む抗BEGF抗体を含む。他の既知の血管新生阻害剤は、アンジオスタチン、エンドスタチン、インターフェロン、インターロイキン1（とを含む）インターロイキン12、レチノイン酸およびメタロプロテイナーゼ-1およびメタロプロテイナーゼ-2組織阻害剤（TIMP-1および-2）を含む。抗血管新生活性を有するラゾキサソ、トポイソメラーゼII阻害剤などのトポイソメラーゼを含む低分子も使用できる。

【0106】

本開示の1つの実施形態は、癌と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、癌と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、有効量のHPTP-ECD結合剤を有効量の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP-ECD結合剤と化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

10

【0107】

本開示の1つの実施形態は、癌と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、癌と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、有効量のHPTP-ECD結合剤を有効量の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP-ECD結合剤と化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

20

【0108】

本開示のさらに別の実施形態は、肉腫と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、肉腫と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、有効量のHPTP-ECD結合剤を有効量の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP-ECD結合剤と化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

30

【0109】

本開示のさらに別の実施形態は、肉腫と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、肉腫と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、有効量のHPTP-ECD結合剤を有効量の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP-ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

【0110】

本開示のさらに別の実施形態は、膵癌と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、膵癌と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、有効量のHPTP-ECD結合剤を有効量の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP-ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

40

【0111】

本開示のさらに別の実施形態は、膵癌と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、膵癌と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、有効量のHPTP-ECD結合剤を有効量

50

の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

【0112】

いくつかの実施形態では、膀胱癌治療に使用される化学療法剤は、ゲムシタピンまたは5-フルオロウラシル(flourouracil)またはシスプラチンまたはカペシタピンまたはオキサリプラチンまたはマイトマイシンまたはそれらの任意の組合せである。

【0113】

本開示のさらに別の実施形態は、悪性黒色腫と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、転移性黒色腫と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、有効量のHPTP - ECD結合剤を有効量の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

10

【0114】

本開示のさらに別の実施形態は、悪性黒色腫と診断された患者における転移を予防または軽減する治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、転移性黒色腫と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、有効量のHPTP - ECD結合剤を有効量の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。

20

【0115】

いくつかの実施形態では、黒色腫の治療に使用される化学療法剤は、シスプラチンまたはビンブラスチンまたはダカルバジンまたはそれらの任意の組合せである。

【0116】

さらに別の実施形態は、乳癌と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、乳癌と診断された患者を治療する方法であって、該方法は、有効量のHPTP - ECD結合剤を有効量の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。さらに別の実施形態は、乳癌と診断された患者における転移を予防または軽減する治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。さらに別の実施形態は、乳癌と診断された患者における転移を予防または軽減する方法であって、該方法は、有効量のHPTP - ECD結合剤を有効量の1以上の化学療法剤と併用で含む組成物を該患者に投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と1以上の化学療法剤は一緒に投与されるか、または任意の順序で投与される。いくつかの実施形態では、乳癌治療に使用される化学療法剤は、タキソールまたはタキソールの類似体である。

30

【0117】

特定の実施形態では、HPTP - ECD結合剤はIL - 2と併用で投与される。

40

【0118】

IL - 2誘発性血管漏出：転移性癌の治療

免疫療法は、癌治療の1つの方法である。身体そのものの免疫系の上方制御は免疫療法の1つの態様である。多くの免疫系シグナル伝達分子の1つにインターロイキン - 2(IL - 2)があり、細菌感染に対する身体の自然な反応と、異物(非自己)と自己を区別するのに役立つ。高用量のインターロイキン - 2は、転移性腎細胞癌および転移性黒色腫の患者に関するFDAの承認済み治療である。この治療を受けた対象の23%だけが腫瘍応答を示すことが報告されているが、この応答の持続期間は10年を超え得る(EliasL. et al., "A literature analysis of prognostic factors for response and quality of res

50

ponse of patients with renal cell carcinoma to interleukin-2-based therapy." *Oncology*, (2001), Vol. 61, pp. 91-101)。したがって、IL-2治療は治癒の可能性を提供する唯一の利用可能な治療である。

【0119】

Gallagher (Gallagher, D.C. et al., "Angiopoietin 2 Is a Potential Mediator of High-Dose Interleukin 2-Induced Vascular Leak" *Clin. Cancer Res.*, (2007), Vol. 13, No. 7, pp. 2115-2120) は、上昇したアンジオポエチン-2のレベルが高用量のIL-2で治療された患者に見出されることを報告し、Tie-2シグナル伝達のAng-2遮断を克服すれば、この治療法の副作用である血管漏出症候群の治療になり得ることを示唆している。

10

【0120】

IL-2は内皮細胞活性化をもたらすが適切なバリア機能が欠失することが知られている。高用量のIL-2免疫療法の間、Tie-2シグナル伝達の増幅は、Tie-2の刺激が内皮細胞の安定性を促進するので、血管漏出の減弱につながる。したがって、Tie-2シグナル伝達を増幅し得る剤を投与することで、血管安定性が増加し得、高IL-2用量の副作用は緩和される。本開示のHPTP-ECD結合剤は、低アンジオポエチン-1濃度の条件下で、またはIL-2治療の患者におけるように高濃度のアンジオポエチン-2が存在する場合にTie-2シグナル伝達を増幅し得る。

【0121】

Ang-2レベルに影響を及ぼすことなくTie-2シグナル伝達を増幅することにより、上昇したレベルのAng-2の潜在的な病理マーカーとしての使用が保持される。例えば、敗血症などの炎症性疾患患者は通常はTie-2のAng-1刺激を抑制する作用のある上昇したAng-2レベルを有する。この上昇したAng-2は、血管漏出の症状である浮腫をもたらす。本発明の方法は、Ang-2レベルに影響を及ぼすことなくTie-2シグナル伝達を増幅することにより、疾患進行と消散の尺度としてAng-2レベルを使用する能力を保持しながら、血管漏出に付随する症状を緩和する方法を提供する。

20

【0122】

このIL-2治療を受ける患者の65%もが、VLSにより治療を中断または中止せざるを得ない。インターロイキン-2(IL-2)および免疫毒素(IT)治療の主な用量規制毒性は、血管漏出症候群(VLS)である。VLSは、体液とタンパク質の血管外遊出を伴う血管透過性の増加により特徴づけられ、間質浮腫と臓器不全をもたらす。VLSの症状には、体液貯留、低血圧、体重増加、末梢性浮腫、肺浮腫、胸水と心嚢液貯留、腹水、全身浮腫、および重度の場合は肺および心血管不全の徴候が含まれる。

30

【0123】

本開示のHPTP-ECD結合剤は、IL-2での治療が原因の血管漏出を軽減する有効治療法として使用できる。したがって、本発明の実施形態は、IL-2を投与されている患者における血管漏出を治療、軽減または予防する方法であって、該方法は、該方法は、該患者に有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。HPTP-ECD結合剤は、IL-2と共投与または別々に投与できる。IL-2とHPTP-ECD結合剤は、例えば静脈内、経口、貼薬、皮下注射などにより、あらゆる順序またはあらゆる方法で投与してよい。

40

【0124】

本開示の1つの実施形態は、(a)免疫応答が得られるような有効量のインターロイキン-2と(b)有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を患者に投与することを含む、腎細胞癌を治療する方法であり、インターロイキン-2とHPTP-ECD結合剤と一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。本明細書で開示される別の実施形態は、(a)高用量のインターロイキン-2と(b)有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を患者に投与することを含む、腎細胞癌を治療する方法である。

【0125】

患者に一連の組成物を投与することを含む、転移性黒色腫を治療する方法であって、該

50

組成物を任意の順序で任意の有効量で投与でき、第1組成物は高用量のインターロイキン-2を含み、第2組成物は有効量のHPTP-ECD結合剤を含む、方法がさらに開示される。

【0126】

患者に一連の組成物を投与することを含む、腎細胞癌を治療する方法であって、該組成物を任意の順序で任意の有効量で投与でき、第1組成物は高用量のインターロイキン-2を含み、第2組成物は有効量のHPTP-ECD結合剤を含む、方法がさらに開示される。

【0127】

本明細書では、治療を要する患者に、(a)免疫応答が得られるような有効量のインターロイキン-2と(b)有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を患者に投与することを含む治療を実施することにより転移性黒色腫を治療する方法であり、インターロイキン-2とHPTP-ECD結合剤と一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる、方法が開示される。

10

【0128】

本明細書では、治療を要する患者に、(a)免疫応答が得られるような有効量のインターロイキン-2と(b)有効量のHPTP-ECD結合剤を含む組成物を患者に投与することを含む治療を実施することにより転移性黒色腫を治療する方法であり、インターロイキン-2とHPTP-ECD結合剤と一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる、方法も開示される。

20

【0129】

本明細書では、癌患者の治療に使用できる組成物が開示され、ここで該癌患者は、患者において血管漏出症候群を誘発する1以上の癌薬物で治療されている。したがって、本明細書では、癌治療によりもたらされる血管漏出の軽減に有効な組成物が開示され、該組成物は有効量のHPTP-ECD結合剤を含む。

【0130】

本明細書で開示される別の態様は、医学的状態または疾患状態を有するヒトまたは他の哺乳動物の治療に有効な組成物であり、医学的状態または疾患状態の治療は血管漏出症候群を誘発し、該組成物は(a)有効量のHPTP-ECD結合剤と(b)1以上の医薬を含み、医薬のうちの少なくとも1つは血管漏出症候群を誘発する。

30

【0131】

さらなる態様において、本明細書では(a)有効量のHPTP-ECD結合剤と(b)1以上の化学療法剤を含む組成物が開示される。

【0132】

本明細書では血管漏出を制御するのに使用できる組成物も開示され、該組成物は本明細書に開示される有効量の1以上の剤を含む。本明細書では、炎症性疾患の患者を治療するのに使用できる組成物がさらに開示され、炎症性疾患の非限定的な例には敗血症、狼瘡および炎症性腸疾患が含まれ、該組成物は本明細書に開示される有効量のHPTP-ECD結合剤を含む。HPTP-ECD結合剤は、Tie-2シグナル伝達増幅因子として作用するHPTPのTie2デホスホリラーゼ活性を阻害する。

40

【0133】

腫瘍増殖は、しばしば、細胞増殖の制御消失と共に開始する複数ステップの過程である。癌細胞は次いで急速に分割し始め、顕微鏡的に小さい球体の腫瘍：上皮内癌になる。腫瘍塊が増殖すると、細胞は直近の毛細血管からだんだん遠くに離れていく。最後に腫瘍は増殖を止め、安定状態に達し、ここで増殖細胞数は死にゆく細胞数と均衡する。サイズの制限は、栄養分と酸素の欠乏によりもたらされる。組織においては、酸素の拡散の限界は毛細血管と細胞間の距離100 μ mに匹敵し、これは1本の血管の周りの3~5系統の細胞の範囲である。上皮内癌は、何年も検出されないまま休止状態にあり得、これらの小さい(2~3 mm^2)無血管性腫瘍関連の転移はほとんどない。

【0134】

50

栄養分および/または酸素の欠乏により腫瘍の増殖が止まると、この腫瘍血管系の減少により、悪性細胞への抗腫瘍剤の送達能も制限される。さらに、腫瘍血管系にわずかな増加があれば、抗腫瘍剤の悪性細胞への送達が転移を開始することなく可能になる。したがって、本開示の剤が T i e - 2 シグナル伝達をわずかに増幅するのに使用されれば、転移または制御不能な腫瘍細胞増殖を開始させることなく腫瘍細胞への血流を増加するのに使用でき、抗癌剤を悪性細胞に送達する方法が提供される。

【 0 1 3 5 】

本明細書では、必要とする患者に有効量の H P T P - E C D 結合剤を 1 以上の化学療法化合物または免疫療法化合物と共に投与することを含む、癌を治療する方法が開示される。「T i e - 2 シグナル伝達をわずかに増幅する」とは、十分な量の本開示の化合物が患者に投与されて腫瘍細胞血管系の量が増加し、循環が増加することで抗腫瘍化合物または治療薬の送達が腫瘍増殖を引き起こすことなく可能になることを意味し、ここで腫瘍細胞の増殖速度は腫瘍細胞死の速度よりも遅い。T i e - 2 シグナル伝達の増幅により、腫瘍血管系が安定し、血管新生シグナルに対し耐性ができて腫瘍血管新生と腫瘍増殖が減少し、一方で腫瘍血流と化学療法剤の送達が向上する。

10

【 0 1 3 6 】

アンジオポエチン - 2 は、グリーソンスコア、転移および癌特定の生存率と有意に相関する (Lind A.J. et al., "Angiopoietin-2 expression is related to histological grade, vascular density, metastasis and outcome in prostate cancer" Prostate, (2005), Vol.62, pp. 394- 299)。アンジオポエチン - 2 は、前立腺癌の骨、肝臓およびリンパ節転移において発現することが見出されたが、骨、肝臓およびリンパ節における前立腺癌の腫瘍細胞においてアンジオポエチン - 1 の発現はほとんどないか皆無である (Morrissey C. et al., "Differential expression of angiogenesis associated genes in prostate cancer bone, liver and lymph node metastasis" Clin. Exp. Metastasis, (2008), Vol. 25, pp. 377-388)。したがって、A n g - 2 のレベルを監視することは、前立腺癌の存在と、血管漏出による前立腺癌細胞の全身への拡散を評価する方法を提供する。

20

【 0 1 3 7 】

したがって、本開示の別の実施形態は、患者が治療を受けている間、患者の A n g - 2 レベルを監視することを含む、治療の有効性を評価する方法である。

【 0 1 3 8 】

病原体が原因の疾患における血管系の安定化

本明細書では、1 以上の病原体が原因の血管漏出症候群を予防または治療する方法が開示され、該方法は、治療を要するヒトまたは動物に有効量の 1 以上の H P T P - E C D 結合剤を投与することを含む。

30

【 0 1 3 9 】

1 つの実施形態は、1 以上の病原体が原因の血管漏出症候群を治療する方法であって、該方法は、治療を要するヒトまたは他の哺乳動物に (a) そのヒトまたは哺乳動物に存在する病原体に対し有効である有効量の 1 以上の化合物と、(b) 有効量の H P T P - E C D 結合剤を含む組成物を投与することを含み、病原体に対し有効である 1 以上の化合物と H P T P - E C D 結合剤は、一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。

40

【 0 1 4 0 】

ヒトまたは哺乳動物において血管漏出症候群を生じさせ得る病原体感染と診断されたヒトまたは他の哺乳動物において血管漏出症候群を予防する方法がさらに開示され、該方法は、ヒトまたは哺乳動物に (a) そのヒトまたは哺乳動物に存在する病原体に対し有効である有効量の 1 以上の化合物と、(b) 有効量の 1 以上の H P T P - E C D 結合剤を含む組成物を投与することを含み、病原体に対し有効である 1 以上の化合物と 1 以上の H P T P - E C D 結合剤は、一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。

【 0 1 4 1 】

以下は、ウイルス、細菌および他の病原体の非限定的な例であり、病原性は、その生物

50

により誘発された血管漏出の程度を軽減することで抑制され得る。黄色ブドウ球菌、炭疽菌、緑膿菌、化膿性連鎖球菌およびデングウイルス。

【0142】

1つの実施形態は、細菌感染に苦しむ患者における血管漏出症候群を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することによる。細菌感染と診断されたヒトまたは他の哺乳動物における血管漏出症候群を予防する方法がさらに開示される。

【0143】

したがって、本開示の1つの実施形態は、細菌感染に苦しむ患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することによる。特定の実施形態では、細菌感染は炭疽菌感染である。特定の実施形態では、細菌感染は緑膿菌感染である。さらに他の実施形態では、細菌感染は化膿性連鎖球菌感染である。

10

【0144】

1つの実施形態は、ウイルス感染に苦しむ患者における血管漏出症候群を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することを含む。ウイルス感染と診断されたヒトまたは他の哺乳動物における血管漏出症候群を予防する方法がさらに開示される。

【0145】

別の実施形態は、ウイルス感染に苦しむ患者を治療する方法であって、該方法は、該患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与することによる。特定の実施形態では、ウイルス感染はデングウイルス感染である。

20

【0146】

HPTP - ECD結合剤は、1以上の抗菌または抗ウイルス剤と併用で投与してよく、HPTP - ECD結合剤と抗ウイルスまたは抗菌剤は、一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。したがって、本開示の実施形態は、細菌感染に苦しむ患者を治療する方法であり、該方法は、(a) HPTP - ECD結合剤と(b) 1以上の抗菌剤を投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と抗菌剤は一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。本開示の別の実施形態は、ウイルス感染に苦しむ患者を治療する方法であり、該方法は、(a) HPTP - ECD結合剤と(b) 1以上の抗ウイルス剤を投与することを含み、ここでHPTP - ECD結合剤と抗ウイルス剤は一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。

30

【0147】

本開示が提供する別の方法は、血管漏出症候群の患者の治療過程を決定する方法であって、以下を含む：

(a) 患者に有効量のHPTP - ECD結合剤を含む組成物を投与すること；(b) 治療過程の間、該患者において存在するアンジオポエチン - 2のレベルをモニタリングすること；および(c) アンジオポエチン - 2レベルが正常範囲に戻ったら治療を中止すること。

【0148】

さらなる態様は、炭疽菌に感染した患者における血管漏出を治療する方法に関し、該方法は、有効量のHPTP - ECD結合剤を炭疽症に対し有効性のある有効量の1以上の抗菌剤と併用で含む組成物を投与することを含み、HPTP - ECD結合剤と炭疽症に対し有効性のある抗菌剤は一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。

40

【0149】

さらに別の態様は、ウイルスに感染した患者における血管漏出を治療する方法に関し、該方法は、有効量のHPTP - ECD結合剤を有効量の1以上の抗ウイルス剤と併用で含む組成物を投与することを含み、HPTP - ECD結合剤と抗ウイルス剤は一緒に投与することも、任意の順序で投与することもできる。

【0150】

50

本開示の剤を用いる T i e - 2 シグナル伝達の増幅の増加は、A n g - 1 および / または A n g - 2 レベルに影響を及ぼす必要なしに血管系を安定させる方法を提供する。本明細書では、血管系を安定化させる方法が開示され、該方法は、患者に有効量の H P T P - E C D 結合剤を投与することを含む。

【 0 1 5 1 】

本開示の剤は A n g - 2 の量を増加させることなく T i e - 2 シグナル伝達を増幅できるので、患者に H P T P - E C D 結合剤を投与しながら患者の血清中の A n g - 2 の量をモニタリングすることは、炎症の結果としての例えば敗血症などの血管漏出症候群に関連の様々な病気または疾患状態の経過を判断する方法として機能する。したがって、炎症性疾患患者において血管系を安定化させる方法が開示され、ここでアンジオポエチン - 2 のレベルが上昇しており、該方法は以下を含む：(a) 患者に有効量の - E C D 結合剤組成物を投与すること；(b) 該患者において存在するアンジオポエチン - 2 のレベルをモニタリングすること；および(c) アンジオポエチン - 2 レベルが正常範囲に戻ったら治療を中止すること。

10

【 0 1 5 2 】

本明細書で「正常なアンジオポエチン - 2 レベル」が意味するのは、血清中約 1 n g / m L ~ 約 2 n g / m L の A n g - 2 の量である。あるいは、A n g - 2 レベルは、疾患状態、例えば重症の敗血症に苦しむ個体について決定でき、A n g - 2 レベルは患者血清中の A n g - 2 の量が正常範囲に最も近いレベルに低下するまでモニタリングできる。この場合、薬物の共投与は継続することもでき、中止することもできる。

20

【 0 1 5 3 】

したがって、本明細書では治療過程の間患者の血管系を安定化させる方法が開示され、該方法は、以下を含む：(a) 治療として患者に有効量の H P T P - E C D 結合剤と 1 以上の薬物を共投与すること；(b) 患者において存在するアンジオポエチン - 2 のレベルをモニタリングすること；および(c) 血清中のアンジオポエチン - 2 のレベルが低下しなければ、1 以上の薬物の投与を中止し、1 以上の他の薬物を選択すること。

【 0 1 5 4 】

H P T P - E C D 結合剤は、病原体に対する治療過程が維持できるように患者の血管系を安定化させるが、病原体に対する有効な治療を決定する間患者を安定化させるのにも使用され得る。すなわち、H P T P - E C D 結合剤自体が、血管漏出と合併症の減少により、病原体が原因の疾患の予後に有益な効果を及ぼし得る。

30

【 0 1 5 5 】

上述のどの H P T P - E C D 結合剤を含む組成物も、上述の全ての疾患または疾病を治療する医薬の製造への使用に適している。さらに、上述のどの H P T P - E C D 結合剤を含む組成物も、上述の全ての疾患または疾病の治療への使用に適している。

【 0 1 5 6 】

インビボの血管漏出

マイルズ (Miles) アッセイ (Miles, A. A. and E. M. Miles (1952) *Vascular reactions to histamine, histamine-liberator and leukotaxine in the skin of guinea-pig*. *J. Physiol.*, Vol. 118, pp. 228-257 その全容を参照として本明細書に組み込む) が、マウスモデルにおける致死性毒素並びに浮腫毒素 (E T [P A プラス E F]) が媒介する血管漏出を直接調査し定量化するのに使用され得る。以下は、Gozes Y. et al., *Anthrax Lethal Toxin Induces Ketotifen-Sensitive Intradermal Vascular Leakage in Certain Inbred Mice* *Infect. Immun.*, 2006 February, Vol. 74, No. 2, pp. 1266-1272 (その全容を参照として本明細書に組み込む) に記載される、本開示の H P T P - E C D 結合剤が炭疽菌に曝露されたヒトおよび動物における血管漏出を予防する能力を評価するのに使用され得る改変型マイルズアッセイである。

40

【 0 1 5 7 】

高純度の P A、L F および変異 L F E 6 8 7 C を前述のように精製する (Varughese M. et al., (1998) *Internalization of a Bacillus protective antigen-c-Myc fusion pr*

50

otein mediated by cell surface anti-c-Myc antibodies. Mol. Med. 4:87-95 その全容を参照として本明細書に組み込む)。ETまたはLTの用量は、各成分の量を指す(すなわち、100 μ gのLTは100 μ gのPAプラス100 μ gのLF)。アゼラスチン以外の全ての薬物はSigma Aldrich社(ミズーリ州セントルイス)から購入でき、アゼラスチンはLKT Laboratories社(ミネソタ州セントポール)から購入できる。LTは致死性毒素の略であり、PAは感染防御抗原の略であり、LFは致死性因子の略であり、EPは浮腫因子の略である。

【0158】

動物

BALB/cJ、DBA/2J、C3H/HeJ、C3H/HeOuj、WBB6F1/J-Kit^w/Kit^{w-v}および同一コロニーの野生型ホモ接合対照マウスは、The Jackson Laboratory社(メイン州バーハーバー)から購入できる。BALB/cヌード、C57BL/6JヌードおよびC3Hヘアレス(C3.cg/TifBomTac-hr)マウスはTaconic Farms社(ニューヨーク州ジャーマンタウン)から購入できる。C3Hヌードマウスは、国立がん研究所のAnimal Production Area(メリーランド州フレデリック)から購入できる。マウスは8~12週齢になると使用される。C3Hヘアレスとヌード動物以外、全てのマウスは皮内(i.d.)注射の24時間前に剃毛される。全身性LTに対する感受性を評価するため、マウスに100 μ gのLTを腹腔内注射(i.p.)し、5日かけて倦怠の徴候または死亡を観察する。Fischer 344ラットは、Taconic Farms社(ニューヨーク州ジャーマンタウン)から購入でき、体重150~180gで使用される。ラットの尾の静脈に12 μ gのLTを250 μ gのマスト細胞安定剤のケトチフェンありまたはなしで静脈内注射(i.v.)し、死亡までの正確な時間を監視する。

【0159】

マイルズアッセイ

マイルズアッセイは、エバンスブルー色素(内在性血清アルブミンに結合する)の静脈注射をトレーサーとして使用し、試験物質の皮内注射後末梢血管からの巨大分子漏出をアッセイする。ヌードマウスと正常な剃毛マウスに200 μ lの0.1%エバンスブルー色素(Sigma Chemical Co.社、ミズーリ州セントルイス)を静脈注射する。10分後、30 μ lの試験毒素または対照試料(PAのみ、LFのみ、EFのみ、またはリン酸緩衝食塩水)を左右の側腹部並びに1つまたは2つの背側部位に皮内注射する。漏出の程度を定量化するため、皮内注射部位の周りの同サイズ(直径1.0~1.5cm)の皮膚領域を注射から60分後に取り除き、ホルムアミド(1ml)中41で48時間保存し、色素を抽出させる。試料の₆₂₀を読み取り、リン酸緩衝食塩水、PAまたはLFで処置した対照と比較して漏出の程度を計算する。

【0160】

LT媒介型漏出に対するHPTP-ECD結合剤の有効性を試験する実験では、上述のようにマウスにエバンスブルーを静脈注射し、色素注射の10分後に試験剤を腹腔内注射により全身的に導入する。LTは、エバンスブルーの注射の30分後に皮内注射により導入される。別の実施形態では、試験される剤は皮内注射により局所に導入され得、LTは10分後に同じ部位に注射される。

【0161】

細胞毒性実験

MC/9マスト細胞は、ATCC社(バージニア州マナサス)から入手でき、1-グルタミン(2mM)、2-メルカプトエタノール(0.05mM)、ラットT-STIM(BD Biosciences-Discovery Labware社、マサチューセッツ州ベッドフォード)(10%)およびウシ胎児血清(FBS、最終濃度10%; Invitrogen-GIBCO BRL社、メリーランド州ゲイザースバーグ)を補充したダルベッコ変法イーグル培地で成長させる。次に、様々なLTの濃度またはPAのみの対照で処置する前に、細胞を96ウェルのプレートに10⁴/ウェルの密度で蒔く。6、

10

20

30

40

50

12および24時間後、Promega社のCellTiter 96 Aqueous One Solution細胞増殖アッセイ(Promega社、ウィスコンシン州マディソン)を使用して製造者のプロトコルに従い生存率を評価する。あるいは、毒性アッセイはFBS(無血清培地)を除く全てのサプリメントを備える培地で実行され得る。他の実施形態では、プールされた3~5継代のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)がCambrex Corp社(Cambrex社、メリーランド州ウォーカーズビル)から購入でき、内皮細胞接着因子(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)で前処理されたフラスコ内でEGM-MV Bullet kit(Cambrex社、メリーランド州ウォーカーズビル)中成長させる。細胞毒性実験については、細胞は、典型的にはEGM-MV Bullet kit中96ウェルのプレートに蒔かれる。アッセイ当日、この培地を10%のFBSまたはヒト血清(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)を補充されたM199培地(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)と交換し、細胞を96ウェルのプレートに $2 \times 10^3 / 0.1 \text{ ml}$ / ウェルの密度で再度蒔き、様々な濃度のLTで3連で処置する。細胞の生存率は、典型的にはMC/9細胞に関し24、48および72時間の時点で評価する。

10

【0162】

HUVEC透過性アッセイ

HUVEC単層は、24ウェルのプレートでTranswell-Clear細胞培養インサート(直径6.5mm、孔径0.4 μm ; Corning-Costar社、マサチューセッツ州アクトン)上で、管腔コンパートメント(インサート内部)と管腔下コンパートメント(組織培養プレートウェル)からなる2チャンバの培養システムを作り、効果的に培養できる。細胞を蒔く前に、インサートを内皮細胞接着因子(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)でコートする。10%の鉄補充仔ウシ血清と1%の内皮細胞増殖因子(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)を含む、事前に加熱したCS-C培地(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)をインサートの配置前にウェルに加える。次に、HUVEC細胞懸濁液(200 μL の 5×10^5 細胞/ml)を各インサートに加える。細胞は、単層の適切な形成を確保するため5%CO₂中37℃で最長21日培養される。バリア機能を試験するため、培地を10%FBSを補充したRPMIに替えるか、または血清なしのRPMIに替えてよい。バリア機能を評価するため、西洋わさびペルオキシダーゼ酵素(Sigma社、ミズーリ州セントルイス)をインサートに加える(10 μg / ウェル)。LT(1 μg / mL)またはPAのみ(1 μg / mL)若しくはLFのみ(1 μg / mL)の対照処置を二重ウェルに加え、毎時間(12時間の間)、管腔下コンパートメントから10 μL の試料を取り、100 μL の基質[2',2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチゾリン(ethylbenzthiazolin)6-スルホン酸)](A-3219; Sigma社、ミズーリ州セントルイス)を加えて、405nmの読み取りで、西洋わさびペルオキシダーゼの酵素活性を試験した。

20

30

【0163】

炭疽症併用治療

血管組織がより安定化すると、炭疽菌感染に対する既知の抗菌剤の有効性が高まる。したがって、HPTP-ECD結合剤は、炭疽症治療の併用治療として評価され得る。以下、炭疽菌感染の治療に有用な併用治療の一部としてのHPTP-ECD結合剤の有効性を決定するのに使用され得る一連のアッセイを記載する。

40

【0164】

LFは、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ(MAPKK)を切断し、シグナル伝達を妨害し、マクロファージの溶解をもたらすことが見出されている。したがって、マイルズアッセイに加えて、HPTP-ECD結合剤がLT活性効果を阻害する能力を確認するのに以下の細胞ベースのペプチド切断アッセイが使用され得る。以下のアッセイに関し、MAPKKideは、List Biological Laboratories社(カリフォルニア州キャンベル)から購入できる。フッ化ペプチド基質はAnaspec社(カリフォルニア州サンノゼ)から入手可能である。

50

【0165】

インビボアッセイ

併用炭疽症治療過程の評価を開始する1週間前に、試験剤(各200mg)を800 μ LのDMSOに溶解させて-20 $^{\circ}$ Cで保存する。注射の直前に各試験剤をPBSに溶解させて2% DMSO中最終濃度0.5mg/mLとする。試験動物を、PBS中マウス当たり 2×10^7 の胞子の腹腔内注射により0日目に攻撃する。治療は攻撃24時間後に開始した。適切な治療レジメンの一例は、シプロフロキサシン(50mg/kg)とHPTP-ECD結合剤(5mg/kg)の併用である。無治療動物の対照試料、シプロフロキサシンのみ、本開示の剤のみ、およびシプロフロキサシンと本開示の剤の併用を動物に与え、注射14日後まで1日2回モニタリングした。

10

【0166】

シプロフロキサシンと試験される剤は、便利にも、それぞれ200 μ Lの量を10日間1日1回ずつ注射して非経口投与され得る。生存した動物は全て14日目に屠殺する。瀕死とみられる病気の動物(すなわち、活動性または歩行運動レベルの重篤な低下または欠如、外部刺激に対する無反応、または簡単に得られる食餌や水を摂取できない、などを以下の付随のいずれかの徴候と共に提示するもの:被毛の荒れ、うずくまる、正常な体温を維持できない、低体温の徴候、呼吸器系困難、または他のひどく衰弱した状態)は、これらの症状が現れた日に屠殺すべきである。

【0167】

細菌誘発性血管漏出の調節

病原菌は血管漏出の原因となることが知られている。この誘発性血管漏出は、抗菌剤および他の医薬が侵入する微生物を標的化する能力を阻害する。したがって、HPTP-ECD結合剤は、細菌感染の結果として生じる過剰な血管漏出を予防することにより宿主免疫系を高めるために、単独または他の医薬成分と併用で使用され得る。

20

【0168】

単独または併用治療でのHPTP-ECD結合剤の有効性を決定するのに使用され得る試験およびアッセイを以下に記載する。

【0169】

黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)は、グラム陽性敗血症性ショックの主要な病原体であり、血漿キニノーゲンの消費と関連付けられている。黄色ブドウ球菌誘発性血管漏出活性に対するHPTP-ECD結合剤の効果は、黄色ブドウ球菌が分泌する2種類のシステインプロテナーゼに対するこれらの剤の活性を測定することで決定され得る。細胞溶解活性のあるスタホパインA(*ScpA*)は、ブラジキニン(*BK*) B_2 受容体依存性の態様でモルモットスキンにおいて血管漏出を誘発する。この効果はそれ自体は血管漏出活性をもたないスタホパインB(*SspB*)により増大される。*ScpA*は、ヒト血漿からの血管漏出活性も産生する。

30

【0170】

敗血症性ショックの重要な病態生理学的機構は、血漿が血管外空間に漏れることで生じる血液量不足の低血圧である。*ScpA*が、20nMという低い濃度で、モルモット皮膚内に注射して5分以内に血管漏出を誘発したことが見出されており、この反応は共存する*SspB*により増大され、このことは、これらのプロテナーゼによる血管漏出が効率的にインビボで生じることを示す(Imamura T. et al., Induction of vascular leakage through release of bradykinin and a novel kinin by cysteine proteinases from *Staphylococcus aureus*(2005) J. Experimental Medicine, Vol. 201, No. 10, pp. 1669-1676)。

40

【0171】

血管漏出アッセイ

動物は、以下の手順を用いて血管漏出を評価され得る。100 μ Lの食塩水中エバンスブルー色素(*Sigma Aldrich*社)1%の溶液を尾静脈に注射する。30分後マウスを屠殺し、右心室を通して食塩水で灌流し血管内エバンスブルーを除去する。肺を

50

切除し、1 mL のホルムアミド中 55 で一晩かけて抽出する。エバンスブルー量は、ホルムアミド抽出物の OD₆₂₀ マイナス OD₅₀₀ として決定する。

【0172】

本明細書に開示の剤は、ウイルスが原因の血管漏出の影響を媒介し、したがって身体そのものの免疫系が病原体により高い耐性を及ぼすことが可能になることでインフルエンザの重症性を低下させる単一の薬剤治療として使用され得る。以下のアッセイは、HPTP - ECD 結合剤が、改善された血管完全性によりウイルス性重症度を阻害する効果を決定するのに使用され得る。

【0173】

本開示のアッセイは、ウイルスブランク、ウイルス細胞傷害効果 (CPE) およびウイルス赤血球凝集素 (hemagglutinin) の阻害を用い得る。

10

【0174】

タンパク質分解感受性アッセイ

HPTP - ECD 結合剤は、赤血球凝集素に結合することでタンパク質集合を不安定化させることが決定され得る。以下の手順は、HPTP - ECD 結合剤による不安定さの増加と、それゆえの赤血球凝集素のタンパク質分解性攻撃に対する増加した感受性を決定するのに使用され得る。融合立体構造において、赤血球凝集素はプロテアーゼ消化に対しより感受性が高くなる。この特性は、融合阻害剤が赤血球凝集素と相互作用するかどうかを確認するのに使用され得る (LuoG. et al., "Molecular mechanism underlying the action of anovel fusioninhibitor of influenza A virus." J. Virol., (1997), Vol. 71, No. 5, pp.4062-4070)。したがって、HPTP - ECD 結合剤は、血管漏出の制御により、体内免疫応答を増強することで赤血球凝集素消化に間接的に影響を及ぼす能力を評価され得る。

20

【0175】

赤血球凝集素外部ドメインの精製した三量体を 5 μM の濃度で試験される剤と共に培養した。三量体は、無処理赤血球凝集素の対照と、試験剤の溶解に用いる溶媒である DMSO で処理した赤血球凝集素を pH 7.0 と pH 5.0 でトリプシン消化に供する。pH 5.0 の試料については、赤血球凝集素三量体は pH 5.0 のバッファーで 15 分かけて処理され、pH 7.0 に中和される。トリプシン (20 ng) を 10 μL で試料に加え、消化は 37 で 1 時間進行する。存在する赤血球凝集素の量は、抗赤血球凝集素 (H3) 抗血清を用いてウェスタンブロットゲル電気泳動法により評価する。有効な阻害剤を含んでいる試料は、トリプシンによる赤血球凝集素消化を増加させる。

30

【0176】

さらに、併用治療は、抗ウイルス薬をインフルエンザウイルスによる血管漏出の重症性を予防する剤と共に提供することによりインフルエンザを治療する方法を提供できる。

【0177】

抗ウイルス化合物、例えばオセルタミビルが本開示の併用治療のインビボの評価と HPTP - ECD 結合剤の有効性の評価に使用され得る。併用薬物は、インフルエンザ A / NWS / (H1N1) ウイルスに感染させたマウスに単回用量で投与する。場合によっては、動物の感染は、その肺を通して複数のウイルス経路を含む。1つの便利なプロトコルは、ウイルス曝露の 4 時間前に開始して 20 mg / kg / 日を 1 日 2 回 5 日間投与することを含む。次に動物を 10⁻² から 10 倍の範囲で異なるウイルス濃度で攻撃する (10^{5.75} 細胞培養 50% 感染用量 (CCID₅₀) / mL)。各群のマウス 4 匹を 6 日目に屠殺し、肺を除去し、0 (正常) ~ 4 (最高濃紫着色) の圧密スコアを割り当て、計量し、均質化し、ホモジネートを 2000 × g で 10 分間遠心分離し、上清の様々な 10 倍希釈物を、96 時間 37 で培養した CPE をエンドポイントとして用いて MDC K 細胞におけるウイルス滴定アッセイを行う。

40

【0178】

一元放射免疫拡散カイトを用いて、6 日目にマウスから採取した血清の a₁ - AG アッセイを行う。各群のさらに 8 匹のマウスを死亡について引き続き 21 日間観察し、動脈血

50

酸素飽和度 ($S a O_2$) の値を、通常 $S a O_2$ の低下が始まる 3 日目から、値がさもなくば死亡するほど動物の最大限まで低下したことが示される 11 日目まで、パルスオキシメトリにより決定する (Sidwell R. et al., (1992) Utilization of pulse oximetry for the study of the inhibitory effects of antiviral agents on influenza virus in mice. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 473- 476) 。

【 0 1 7 9 】

細胞におけるタンパク質チロシンホスファターゼベータの阻害

本明細書では、細胞におけるタンパク質チロシンホスファターゼベータ (H P T P -) 活性を阻害する方法が開示され、該方法は、細胞を有効量の H P T P - E C D 結合剤と接触させることを含む。細胞は、インビボ、エクスピボまたはインビトロで接触され得る。

10

【 0 1 8 0 】

投与

特定の剤の性質により、本開示の剤は、ヒトおよび他の動物に、非経口 (例えば静脈内または腹腔内注射) 、皮下、経口、局所的、直腸的、頬内、口腔若しくは鼻腔スプレーとして、投与され得る。

【 0 1 8 1 】

本開示の H P T P - E C D 結合剤は、好ましくは、投与がしやすく用量の均一性がとれるように用量単位で製剤される。本明細書では「用量」または「用量単位」という表現は、治療を受ける患者に適した剤の物理的な個々の単位を指す。しかし、本発明の H P T P - E C D 結合剤と組成物の 1 日当たりの総量は、適切な医学的判断の範囲内で主治医により決定されることを理解されたい。

20

【 0 1 8 2 】

用量

H P T P - E C D 結合剤投与の有効な用量とスケジュールは経験的に決定してよく、このような決定をすることは当該分野の範囲内である。当業者であれば、投与されなければならない剤の用量は、例えば、剤を受ける対象、投与経路、使用される剤の特定の種類、および対象に投与されている他の薬物により異なることを理解しよう。例えば、抗体の適切な用量を選択する案内が、抗体医薬の文献、例えば、Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) ch. 22 and pp. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al., eds., Raven Press, New York (1977) pp. 365-389に見られる。単独で使用する場合は、この剤の典型的な用量は、上述の要因により、1日当たり体重の約 $0.01 \text{ mg} / \text{kg} \sim 500 \text{ mg} / \text{kg}$ 以上、または約 $0.01 \text{ mg} / \text{kg} \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約 $0.1 \text{ mg} / \text{kg} \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約 $0.1 \text{ mg} / \text{kg} \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ まで、または約 $0.2 \text{ mg} / \text{kg} \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 、または約 $1 \text{ mg} / \text{kg} \sim$ およそこの範囲であり得る。

30

【 0 1 8 3 】

H P T P - E C D 結合剤の投与スケジュールは、限定ではなく、1日1回、毎週3回、毎週2回、毎週1回、毎月3回、2回、毎月1回、および隔月に1回、を含む。

40

【 0 1 8 4 】

製剤

本発明の1つの態様では、薬剂的に許容可能な組成物が準備され、これらの組成物は、本明細書に記載される剤のいずれかと、薬剂的に許容可能な担体を含み、さらに他の薬剤、アジュバントまたは希釈物を含み得る。例えば、医薬組成物は、抗微生物剤、抗炎症剤、麻酔剤などの1以上の追加の活性成分も含み得る。

【 0 1 8 5 】

製剤は、投与形態により変わり得る。医薬組成物は、例えば、錠剤、座薬、丸薬、カプセル剤、粉末、液剤、懸濁液、ローション、クリーム、ゲルなどの固形、半固形または液体の剤形であり得、好ましくは、正確な用量を単回投与するのに適した単位剤形である。

50

【0186】

本開示の目的に関し、「賦形剤」と「担体」という用語は本開示の記載全体で交換可能に使用され、本明細書では「安全で有効な医薬組成物の製剤の実施で使用される成分」と定義される。製剤業者は、賦形剤は、主として安全で安定した機能的な医薬を送達する働きをし、送達用の全ピヒクルの一部としてだけでなく、活性成分がレシピエントにおいて有効に吸収される手段としても作用するのに使用されることを理解しよう。賦形剤は、不活性フィラーとして単純で直接的な役割を果たし得るか、または賦形剤は本明細書では成分を確実に送達するためのpH安定化システムまたはコーティングの一部であり得る。

【0187】

「薬剤的に許容可能な」とは、生物学的にまたはその他の望ましくないものではない物質を意味し、すなわち、物質は、何らの所望でない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含有される医薬製剤の他のすべての成分と有害な態様で相互作用することなく、患者に投与され得る。担体は、当然ながら、あらゆる活性成分の分解を最小限化し、当業者には周知であるような対象におけるあらゆる有害な副作用を最小限化するように、選択される。本明細書に記載される剤の製剤の調製と関連して使用され得る典型的な担体と医薬組成物を調製する従来の方法を開示しているRemington'sPharmaceutical Sciences, 18th ed., Gennaro, AR. Ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990)を参照されたい。当業者であれば、例えば投与経路および投与される組成物の濃度により、ある特定の担体により好ましい場合があることを理解されよう。

10

【0188】

固形組成物の従来非毒性固形担体は、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、ブドウ糖、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む。液体の薬剤的に投与可能な組成物は、例えば、本明細書に記載される活性因子および所望により薬剤的アジュバントを、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの賦形剤中に溶解、分散させるなどして調整され得、それによって溶液または懸濁液が生成する。所望であれば、投与される医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンナトリウムアセテート、オレイン酸トリエタノールアミンなどのごく少量の非毒性補助物質も含み得る。そのような剤形を調製する実際の方法は、当業者には既知であるまたは明らかになる。

20

30

【0189】

本開示の剤は、活性治療薬を送達する液体、乳剤または懸濁液中にも存在し得る。液体の薬剤的に投与可能な組成物は、例えば、本明細書に記載される活性因子および所望により薬剤的アジュバントを、例えば、水、食塩水、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの賦形剤中に溶解、分散させるなどして調整され得、それによって溶液または懸濁液が生成する。所望であれば、投与される医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンナトリウムアセテート、オレイン酸トリエタノールアミンなどのごく少量の非毒性補助物質も含み得る。そのような剤形を調製する実際の方法は、当業者には既知であるまたは明らかになる；例えばRemington'sPharmaceutical Sciences, 18th ed., Gennaro, AR. Ed., Mack Publishing, Easton Pa. (1990)を参照されたい。

40

【0190】

注射剤、例えば、無菌の注射可能な水性または油性の懸濁液を、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を用いて従来技術に従い製剤してよい。無菌の注射可能な調製物は、例えば、1, 3-ブタンジオール中の溶液として、非毒性非経口の許容可能な希釈物または溶媒中の無菌注射溶液、懸濁液または乳液であってもよい。使用してよい許容可能なピヒクルと溶媒のなかには、水、リンゲル液、U.S.P.および等張性塩化ナトリウム溶液がある。さらに、無菌の固定油が溶媒または懸濁培地として従来的に使用される。この目的のためには、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含むあらゆる無刺激の固定油が利用され得る。さらに、オレイン酸などの脂肪酸が、注射液の調製に使用される。

50

【0191】

注射液製剤は、使用前に、例えば細菌を保持するフィルターによる濾過、または無菌水または他の無菌注射液培地に溶解または分散し得る滅菌固形組成物として滅菌剤を含むことで滅菌され得る。

【0192】

本開示の剤は、活性治療薬を鼻、喉または気管支の管などの身体の腔にエアロゾルとして送達する液体、乳剤または懸濁液中にも存在し得る。これらの調製物中、剤と他の構成剤との比率は剤形の要件により異なる。

【0193】

意図される投与形態により、医薬組成物は、例えば、錠剤、座薬、丸薬、カプセル剤、粉末、液剤、懸濁液、ローション、クリーム、ゲルなどの固形、半固形または液体の剤形であり得、好ましくは、正確な用量を単回投与するのに適した単位剤形である。組成物は、上述のように、有効量の剤を薬剤的に許容可能な担体と併用で含み、さらに、他の医薬品、薬剤、担体、アジュバント、希釈物などを含み得る。

10

【0194】

剤をヒト以外の哺乳動物体内に送達する場合は、哺乳動物は、非ヒト霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、モルモットまたはげっ歯類であり得る。ヒトおよび哺乳動物という用語は特定の年齢や性別は意味しない。したがって、雌雄の別なく成人および新生児対象、並びに胎児を含むことが意図される。患者、対象、ヒトまたは哺乳動物とは、疾患または疾病に罹患している対象を指す。「患者」という用語は、ヒトと獣医学的対象を含む。

20

【0195】

キット

ヒト、哺乳動物または細胞に送達される剤を含むキットも開示される。キットは、ヒト、哺乳動物または細胞内に送達されるHPTP - ECD結合剤を含む組成物の1以上の包装された単位用量を含み得る。キットは、所望により、キットの構成要素を使用するための説明書を含む。剤は、無菌製剤として包装され得、使用時まで製剤の無菌性を保つ気密密封容器が設計される。

実施例

【実施例1】

30

【0196】

HPTP 細胞外ドメインタンパク質の産生

全長HPTP cDNA (配列番号1)を、製造者(Origene社)の指示に従いヒト胎盤ライブラリーからクローン化する。全ての可溶性のHPTP の細胞外ドメイン(ECD)をコードするcDNAを、C末端にHis-His-His-His-His-His-Gly(6His-Gly)(配列番号3)を付加されたアミノ酸1~1621をコードする全長cDNAからPCRによりクローン化する。得られたcDNAを、HEK293細胞における一過性(pShuttle-CMV)または安定した(pcDNA3.1(-))発現のため、哺乳動物発現ベクターにクローン化する。精製HPTP ECD(ED)を得るため、ECD発現ベクターで形質移入したHEK293細胞をOptiMEM無血清(Gibco社)中通常の成長条件下で24時間培養する。次いで培養上清を回収し、遠心分離してデブリを除去し、1mLの洗浄済みNi-NTAアガロース(Qiagen社)(500µLのパック入り)を各清澄培地10µLに加えて、4で一晩振とうする。翌日、混合物をカラムに充填し、20ベッド体積のpH8の50mMのNaH₂PO₄、300mMのNaCl、20mMのイミダゾールで洗浄する。次いで、精製したHPTP 細胞外ドメインタンパク質(配列番号4)をpH8の50mMのNaH₂PO₄、300mMのNaCl、250mMのイミダゾール中200µL/溶出で溶出する。画分のタンパク質含有量を還元-変性SDS-ポリアクリルイミドゲル電気泳動法を用い、銀染色(Invitrogen社)により検出し、質量分析により確認して分析する。

40

50

【実施例 2】

【0197】

精製された H P T P 細胞外ドメインタンパク質を、例えば実施例 1 に記載の手順により産生する。H P T P 細胞外ドメイン免疫原を産生するため、精製された H P T P 細胞外ドメイン - 6 - H i s タンパク質を E D C 結合化学を用いてブタのサイログロブリン (S i g m a 社) に結合させる (H o c k f i e l d , S . e t a l . , (1 9 9 3) C o l d S p r i n g H a b o r L a b o r a t o r y P r e s s . , V o l . 1 p p . 1 1 1 - 2 0 1 , I m m u n o c y t o c h e m i s t r y) 。 得 ら れ た H P T P 細胞外ドメイン - サイログロブリン複合体を p H 7 . 4 の P B S に対し透析する。次に、成体 B a l b / c マウスを複合体 (1 0 0 ~ 2 0 0 μ g) と完全フロイントアジュバントの 1 : 1 の混合物で皮下免疫感作する。2 ~ 3 週後、マウスに不完全フロイントアジュバントと複合体の 1 : 1 の混合物を腹腔内または皮下注射する。注射を 4 ~ 6 週に繰り返す。3 回目の注射から 7 日後にマウスから血清を採取し、H P T P 細胞外ドメイン抗原に対する免疫反応性を E L I S A およびウエスタンブロット法でアッセイする。抗原に対し良好な応答を示すマウスは、31 ゲージの超長針を用いて 5 0 μ l の精製された H P T P 細胞外ドメインタンパク質を 1 : 1 で水酸化ミョウバンと混合した単回脾臓内注射でブーストする (C o d i n g , J . W . , (1 9 9 6) M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : P r i n c i p l e s a n d P r a c t i c e s . T h i r d E d i t i o n , A c a d e m i c P r e s s L i m i t e d , p . 1 4 5) 。 マウスは 2 . 5 % アベルチンで短時間麻酔し、皮膚と左斜体壁を 1 センチ切開する。抗原混合物を、針を脾臓の後方部分から前方部分に挿入し、長手方向に注入して投与する。体壁を縫合し、皮膚を 2 つの小型金属クリップで封着する。マウスの無事な回復をモニタリングする。術後 4 日目にマウスの脾臓を除去し、単一細胞の懸濁液を作製してマウス骨髄腫細胞と融合させハイブリドーマ細胞株を作製する (S p i t z , M . , (1 9 8 6) M e t h o d s I n E n z y m o l o g y , V o l . 1 2 1 . E d s . J o h n J , L a g o n e a n d H e l e n V a n V u n a k i s . p p . 3 3 - 4 1 (A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k , N Y)) 。 得 ら れ た H i b r i d o m a を 1 5 % の ウ シ 胎 児 血 清 (H y c l o n e 社) と ヒ ポ キ サ ン チ ン 、 ア ミ ノ プ テ リ ン と チ ミ ジ ン を 補 充 し た ダ ル ベ ッ コ 変 法 培 地 (G i b c o 社) 中 で 培 養 す る 。

10

20

【0198】

陽性ハイブリドーマのスクリーニングは融合の 8 日後から開始し、15 日間継続する。ハイブリドーマ産生抗 H P T P 細胞外ドメイン抗体は、2 組の 9 6 ウェルのプレート上で E L I S A により同定され、1 組はヒスチジンタグをつけた H P T P 細胞外ドメインでコートされ、もう一方は陰性対照としてヒスチジンタグをつけた細菌性 M u r A タンパク質でコートされる。二次抗体は西洋わさびペルオキシダーゼ (H R P) (J a c k s o n I m m u n o r e s e a r c h 社) で標識されたロバ抗マウス I g G である。免疫応答性は、A B T S 錠剤を p H 7 . 5 の T B S バ ッ フ ェ ー に 溶 解 さ せ て 開 始 さ れ る 発 色 を 用 い て ウ ェ ル 内 で モ ニ タ リ ン グ さ れ る 。 個 々 の H R P 反 応 混 合 物 は 、 1 0 0 マ イ ク ロ リ ッ ト ル の 1 % S D S を 添 加 さ れ て 停 止 さ れ 、 分 光 光 度 計 で 4 0 5 n m で 吸 光 度 を 読 み 取 ら れ る 。 H P T P 細胞外ドメイン - 6 H i s と 相 互 作 用 す る が m u r A - 6 H i s タンパク質とは相互作用しないハイブリドーマ産生抗体は、さらなる分析に使用される。限界希釈 (0 . 8 細胞 / ウェル) を 9 6 ウェルプレートの陽性クローンに 2 回行い、クローン性は、ウェルの 9 9 % 超が陽性反応を有することと定義される。抗体イソタイプを、イソストリップ手法 (R o c h e 社) を用いて決定する。さらなる評価用に精製抗体を得るために、組織培地上清をプロテイン A またはプロテイン G カラムを用いて親和性精製する。

30

40

【0199】

H P T P - E C D タンパク質に対し免疫応答性のある 6 つのモノクローナル抗体が単離され、以下のとおり命名された : R 1 5 E 6 、 R 1 2 A 7 、 R 3 A 2 、 R 1 1 C 3 、 R 1 5 G 2 および R 5 A 8 。 E L I S A と ウ エ ス タ ン ブ ロ ッ ト 法 に お け る H P T P - C D タンパク質との反応に基づき、R 1 5 E 6 がさらなる研究用に選ばれた。

【実施例 3】

【0200】

モノクローナル抗体 R 1 5 E 6

モノクローナル抗体 R 1 5 E 6 を本願の実施例 2 と米国特許第 7 , 9 7 3 , 1 4 2 号に

50

記載されるように同定し特徴づけた；手順と結果を以下に要約する。

【0201】

A．免疫沈降により示されるようにR15E6は内在性のHPTP と結合する。

材料：Cambrex社のヒト臍帯静脈内皮細胞（HUV EC）、EGM培地、およびトリプシン中和液；OPTIMEM I（Gibco社）、ウシ血清アルブミン（BSA；Santa Cruz社）、リン酸緩衝食塩水（PBS；Gibco社）、アンジオポエチン1（Ang1）、血管内皮増殖因子（VEGF）および線維芽細胞増殖因子（FGF）を含む増殖因子（R&D Systems社）、Tie2モノクローナル抗体（Duke大学/P&G社）、VEGF受容体2（VEGFR2）ポリクローナル抗体（Whitaker et al）、プロテインA/Gアガロース（Santa Cruz社）、トリス-グリシンプレキャストゲル電気泳動/転写システム（6～8%）（Invitrogen社）、PVD F膜（Invitrogen社）、溶解バッファー（20mmのトリス-HCl、137mmのNaCl、10%のグリセロール、1%のトリトン-X-100、2mMのEDTA、1mMのNaOH、1mMのNaF、1mMのPMSF、1μg/mlのロイペプチン、1μg/mlのペプスタチン）

10

【0202】

方法：HUV ECを抗体（OPTIMEM中）またはOPTIMEM Iのみで30分間前処理する。前処理除去後、細胞をAng1（100ng/ml）で6分間PBS+0.2%BSA中で処理し、溶解バッファー中で溶解させる。溶解物をトリス-グリシンゲルに直接通すか、または2～5μg/mlのTie-2抗体または10μg/mlのR15E6抗体とプロテインA/Gアガロースを用いて免疫沈降させる。免疫沈降した試料を溶解バッファーで1回すすぎ、1倍濃度の試料バッファー中、5分間沸騰させる。試料をトリス-グリシンゲルで分離し、PVD F膜に転写し、表示された抗体（pTYR Ab（PY99、Santa Cruz社）、Tie-2、VEGFR2および/またはR15E6）を用いてウエスタンブロット法で検出する。

20

【0203】

結果：IP/ウエスタンブロット法により、R15E6はHPTP のサイズと一致する主要な高分子量のバンドを認識する（図1、パネルA、レーン2）。強度がより低い、低分子量のバンドは、HPTP の低グリコシル化前駆体をおそらく表している。対照の非免疫IgGを用いての免疫沈降（IP）は、HPTP の分子量範囲内にバンドを示さず（図1、パネルA、レーン1）、併用Tie2/VEGFR2のIPは、予測された分子量のバンドを示す（図1、パネルA、レーン3）。この結果は、R15E6がHPTP を認識し、HPTP に対し特異的であることを示す。

30

【0204】

B．FACS分析で示されるように、R15E6は内在性のHPTP に結合する。

材料：Cambrex社のHUV EC、EGM培地およびトリプシン中和液；Molecular Probes社の二次Alexfluor 488-タグ付き抗体；ハンクス平衡塩類溶液（Gibco社）；FACSCANフローサイトメーターおよびBeckon Dickinson社のCellQuestソフトウェア。

【0205】

方法：HUV ECをトリプシン化し、トリプシン中和液で処理し、HBSSですすぐ。R15E6抗体（0.6μg）を50μlのHBSS中250,000個の細胞に加え、氷中20分インキュベートする。細胞を1mlのHBSSですすいだ後、2μgの蛍光結合二次抗体を氷中20分かけて加える。細胞をすすいで1mlのHBSS中に再懸濁させてから、CellQuestソフトウェアを用いてFACSCANフローサイトメーターで分析する。対照細胞は蛍光結合二次抗体のみで処理する。

40

【0206】

結果：FACS分析により、蛍光シグナルにおいて、無傷のHUV EC、R15E6は、二次抗体のみと比較して強力なシフト（細胞の90超）をもたらす（図1、パネルB）。この結果は、R15E6が無傷の内皮細胞表面に提示される内在性のHPTP に結合

50

することを示す。

【実施例 4】

【0207】

R15E6は、Tie2活性化を増大させる

R15E6は、Tie2リガンドであるアンジオポエチン1 (Ang1)の存在下および非存在下でTie2リン酸化を増大させる。

【0208】

方法：様々な濃度のR15E6の存在または非存在下で、Ang1の添加ありまたはなしで、HUVECを上述したように無血清培地で培養する。溶解物が調製され、Tie2抗体を用いて免疫沈降され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離され、PVDF膜に転写される。膜に結合した免疫沈降されたタンパク質は次いで連続的ウエスタンブロットに供され、抗ホスホチロシン抗体を用いてTie2リン酸化を定量化してからTie2抗体を用いて全Tie2を定量化する。Tie2リン酸化は、抗ホスホチロシンシグナルの全Tie2シグナルに対する比率として表す。

10

【0209】

結果：R15E6は、Ang1の存在下および非存在下の両方でTie2リン酸化を増大させる(図2)。この結果は、内皮細胞表面のHPTPにR15E6が結合することで、その生物学的機能が調節され、その結果としてリガンドの有無にかかわらずTie2の活性化が増大することを示す。

20

【実施例 5】

【0210】

抗VE-PTP細胞外ドメイン抗体の生成

A. マウスVE-PTP細胞外ドメインタンパク質(VE-PTP-ECD)の産生

VE-PTP-ECDは任意適当な方法により産生され得る。そのような方法は当技術分野では周知である。例えば、VE-PTP-ECDは、HPTP-ECDをコードするcDNAの代わりにVE-PTP-ECD cDNAが使用される、本開示の実施例1に類似の方法を用いて産生され得る。配列番号5は、VE-PTP-ECDをコードするヌクレオチド配列を提供する。配列番号6は、VE-PTP-ECDのアミノ酸配列を提供する。

【0211】

B. VE-PTP ECDに対する抗体の生成

抗VE-PTP抗体は、当技術分野では周知の方法により、容易に生成される。例えば、抗VE-PTP抗体は、VE-PTP-ECDをHPTP細胞外ドメインの代わりにし、得られたタンパク質でラットを免疫感作することにより、本開示の実施例2の方法を用いて生成され得る。この研究で使用されたラット抗マウスVE-PTP抗体は、D. Vestweber博士のご厚意により提供された(mAb 109)。抗体は、Baumer S. et al., Blood, 2006, Vol. 107, pp. 4754-4762に記載のように生成した。簡単に説明すると、抗体は、ラットをVE-PTP-Fc融合タンパク質で免疫感作することで生成された。免疫感作、ハイブリドーマ融合、およびスクリーニングは、Gotsch U., et al., J Cell Sci., 1997, Vol. 110, pp. 583-588およびBosse R. and Vestweber D., Eur J Immunol., 1994, Vol. 24, pp. 3019-3024に記載のように実施した。

30

40

【0212】

融合タンパク質を構築し、VE-PTPの732位のアミノ酸で終わる最初の8個のフィブロネクチンIII型様リピートがヒトIgG1のFc部分とフレームを合わせて融合されるようにした(239位のアミノ酸プロリンから始まる)。このpcDNA3(Invitrogen社)にクローン化した構築物をCHO細胞細胞に安定的に形質移入し、融合タンパク質をプロテインAセファロース親和性精製により精製した。

【実施例 6】

【0213】

抗VE-PTPECD抗体の硝子体内注射

50

レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル：脈絡膜血管新生モデルは、血管新生加齢黄斑変性モデルを代表すると考えられている。脈絡膜血管新生を前述のように生成した。Tobe T, et al., Am. J. Pathol., 1998, Vol. 153, pp. 1641-1646を参照されたい。成体 C57BL/6 マウスは、各眼のブルッフ膜の3か所にレーザー誘発性裂創を有し、1または2 μ g のラット抗マウス VE-PTP-ECD 抗体 (IgG2a) の硝子体内注射を片眼に1回受け、もう一方の眼にはビヒクル (5%のデキストロース) を受けた。これらの処置を7日目に反復した。レーザーの14日後、マウスをフルオレセイン標識デキストラン (平均分子量 2×10^6 、Sigma社、ミズーリ州セントルイス) で灌流し、血管新生の程度を蛍光顕微鏡により脈絡膜フラットマウントにおいて評価した。各ブルッフ膜裂創部位における脈絡膜血管新生の面積を、治療群については観察者に隠して画像分析により測定した。脈絡膜血管新生の面積は、片眼の3つの裂創の平均である。図3に示すように、VE-PTP-ECD 抗体での処置は、1および2 μ g の両用量で、ビヒクル対照での処置に対し、脈絡膜血管新生を有意に減少させた。

10

【実施例7】

【0214】

酸素誘発虚血性網膜症

酸素誘発虚血性網膜症モデルは、増殖性糖尿病性網膜症モデルを代表すると考えられている。虚血性網膜症は、Smith, L.E.H., et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 35,101-111 (1994) に記載された方法により、C57BL/6 マウスにおいて作製された。

20

【0215】

出生後7日目 (P7) の C57BL/6 マウスとそれらの母マウスを気密チャンバに入れ、高酸素状態 (75 \pm 3% の酸素) に5日間曝した。酸素は PROOX モデル 110 酸素コントローラ (Reming Bioinstrument Co. 社、ニューヨーク州レッドフィールド) により継続的にモニタリングした。P12 にマウスは大気に戻され、手術用顕微鏡下で、ハーバードポンプマイクロインジェクションシステムおよび引いた (pulled) ガラスピペットを使用して、1または2 μ g の VE-PTP-ECD 抗体の1 μ l の硝子体内注射を片眼に送達し、もう一方の眼にビヒクルを注射した。P17 に、前述したように、網膜表面の血管新生の面積を P17 に測定した。Shen J, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2007, Vol. 48, pp. 4335-4341 を参照されたい。簡単に説明すると、マウスに0.5 μ g のラット抗マウス PECAM 抗体 (PharMingen 社、カリフォルニア州サンノゼ) を含む1 μ l の眼内注射をした。12時間後、マウスを安楽死させ、眼を10%ホルマリン中に固定した。網膜を切除し、1:500で、Alexa 488 を結合させたヤギ抗ラット IgG (Invitrogen 社、カリフォルニア州カールスバッド) 中、40分かけてインキュベートし、洗浄し、全載した。治療群について隠された観察者が、ニコン蛍光顕微鏡を用いてスライドを検査し、Image Pro Plus ソフトウェア (Media Cybernetics 社、メリーランド州シルバースプリング) を用いてコンピュータ化画像分析により網膜当たりの血管新生面積を測定した。図4は、VE-PTP-ECD 抗体での処置が、1および2 μ g の両用量で、ビヒクル対照での処置に対し、網膜の脈絡膜血管新生を有意に減少させたことを示す。図5は、ビヒクル処置のマウス対2 μ g の VE-PTP-ECD 抗体で処置したマウスの代表的なホールマウントを示す。

30

40

【実施例8】

【0216】

VE-PTP-ECD 抗体の皮下注射

硝子体内投与の酸素誘発虚血性網膜症モデルを実施例7に記載のように実施したが (P5 ~ P12 まで75%の酸素雰囲気中に閉じ込める)、VE-PTP-ECD 抗体 (1mg/kg) は、マウスが大気に戻されたP12と、P14とP16に再度 (全部で3回投与) 皮下投与した。血管新生は上述のようにP17日目に評価した。図6は、VE-PTP-ECD 抗体の皮下投与により、網膜血管新生の面積が減少することを示す。

50

【実施例 9】

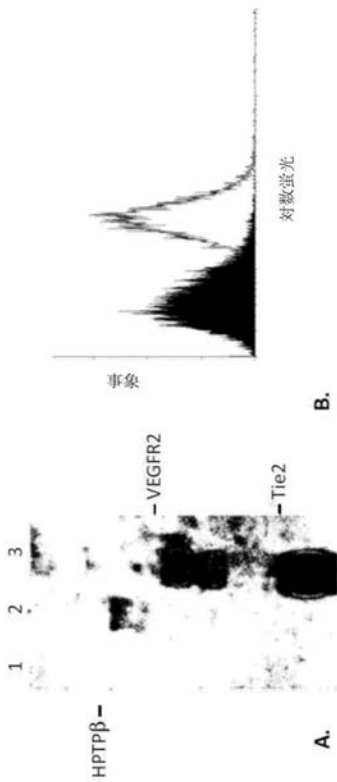
【0217】

実施例 8 に記載した実験を 2 mg / kg の皮下投与量で反復した (図 7) 。

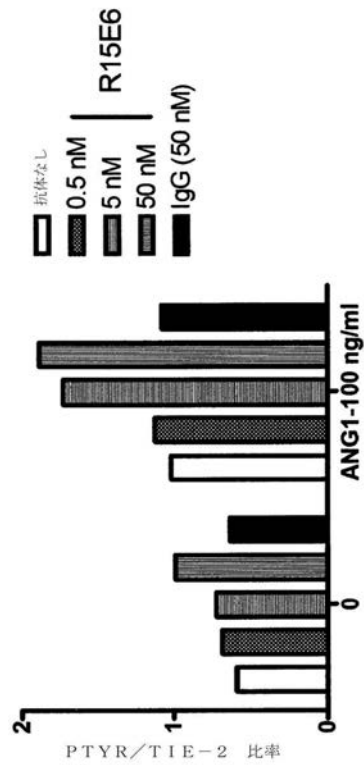
【0218】

本開示の多くの実施形態が記載されるが、基本例が変更されて、本発明の H P T P - E C D 結合剤、方法および過程を利用または包含する他の実施形態を提供し得ることは、明らかである。実施形態と例は例示目的であり、本開示を限定するものと解釈してはならず、むしろ、添付の特許請求の範囲が本発明の範囲を規定する。

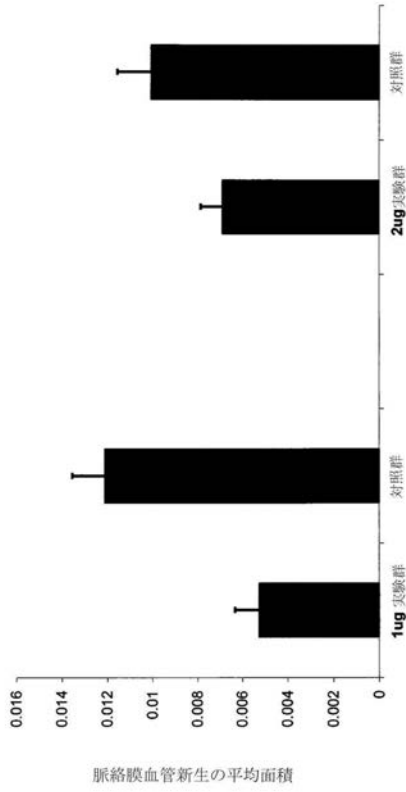
【 図 1 】



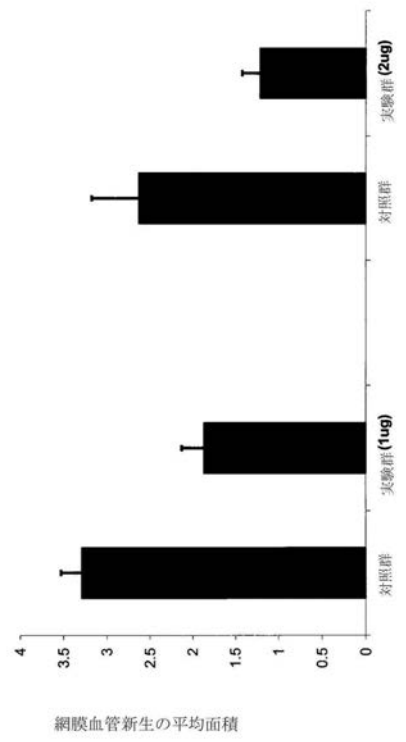
【 図 2 】



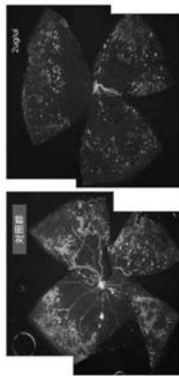
【 図 3 】



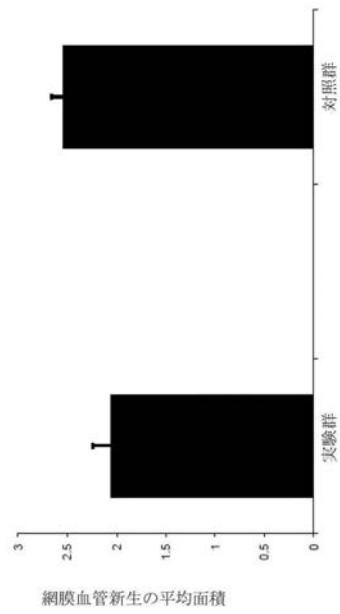
【 図 4 】



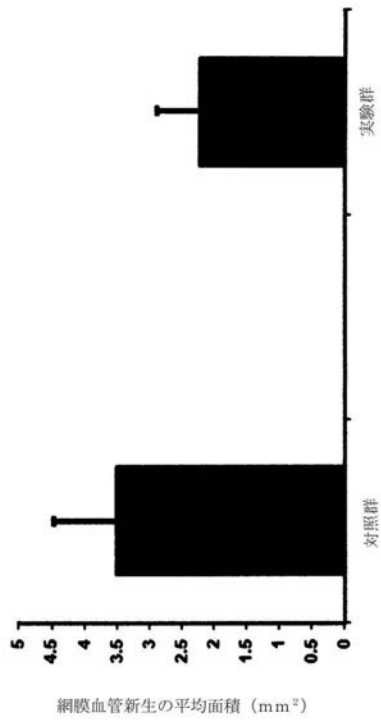
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2017200947000001.app

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|---------------------|------------|
| A 6 1 P 31/10 (2006.01) | A 6 1 P 31/10 | 4 C 0 8 6 |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01) | A 6 1 P 31/04 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 P 25/00 (2006.01) | A 6 1 P 25/00 | |
| A 6 1 P 13/12 (2006.01) | A 6 1 P 13/12 | |
| A 6 1 P 17/00 (2006.01) | A 6 1 P 17/00 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 1 1 | |
| A 6 1 K 31/337 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 K 31/7068 (2006.01) | A 6 1 K 31/337 | |
| A 6 1 K 31/517 (2006.01) | A 6 1 K 31/7068 | |
| A 6 1 K 31/704 (2006.01) | A 6 1 K 31/517 | |
| A 6 1 K 31/4745 (2006.01) | A 6 1 K 31/704 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 31/4745 | |
| A 6 1 K 45/06 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 T | |
| A 6 1 K 38/20 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 P | |
| A 6 1 K 47/60 (2017.01) | A 6 1 K 39/395 D | |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01) | A 6 1 K 45/06 | |
| A 6 1 K 31/7088 (2006.01) | A 6 1 K 38/20 | |
| C 0 7 K 16/40 (2006.01) | A 6 1 K 47/60 | |
| C 1 2 N 15/02 (2006.01) | A 6 1 K 48/00 | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | A 6 1 K 31/7088 | |
| G 0 1 N 33/68 (2006.01) | C 0 7 K 16/40 Z N A | |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 C | |
| | C 1 2 P 21/08 | |
| | G 0 1 N 33/68 | |
| | G 0 1 N 33/53 D | |

(72)発明者 ロバート シャルヴィッツ

アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 9 , ベックスリー , ブライデン ロード 2 5 4 9

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36

4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE12 DA01 DA05

4C076 AA94 BB11 BB13 BB16 CC01 CC10 CC11 CC17 CC18 CC27

CC32 CC35 CC41 DD09 DD09M DD09Q EE23 EE23M EE23Q EE59

EE59M EE59Q FF31

4C084 AA02 AA03 AA13 AA17 AA19 AA20 BA42 BA44 DA14 MA66

NA05 NA06 NA12 NA14 ZA021 ZA441 ZA442 ZA811 ZA891 ZB261

ZB262 ZB331 ZB332 ZB351 ZB352 ZC202 ZC751

4C085 AA13 AA14 BB36 BB41 BB43 CC02 CC23 DD63 EE01 EE03

GG01 GG02 GG04

4C086 AA01 AA02 BA02 BC46 CB22 EA10 EA16 EA17 MA01 MA02

MA03 MA04 MA05 MA66 NA05 NA06 NA12 NA14 ZA02 ZA44

ZA81 ZA89 ZB26 ZB33 ZB35 ZC20 ZC75

4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 FA74 GA26

【外国語明細書】

2017200947000001.pdf