

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6224615号
(P6224615)

(45) 発行日 平成29年11月1日(2017.11.1)

(24) 登録日 平成29年10月13日(2017.10.13)

| | |
|-------------------------|---------------------|
| (51) Int.Cl. | F I |
| A 6 1 K 38/17 (2006.01) | A 6 1 K 38/17 |
| A 6 1 P 35/04 (2006.01) | A 6 1 P 35/04 |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 0 5 |
| | A 6 1 P 43/00 1 2 1 |

請求項の数 11 (全 28 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2014-549212 (P2014-549212) | (73) 特許権者 | 514159047 |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年12月18日 (2012.12.18) | | カリフォルニア ノースステイト カレッ |
| (65) 公表番号 | 特表2015-506352 (P2015-506352A) | | ジ オブ ファーマシー, エルエルシー |
| (43) 公表日 | 平成27年3月2日 (2015.3.2) | | CALIFORNIA NORTHSTA |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2012/070399 | | TE COLLEGE OF PHARM |
| (87) 国際公開番号 | W02013/096335 | | ACY, LLC |
| (87) 国際公開日 | 平成25年6月27日 (2013.6.27) | | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95 |
| 審査請求日 | 平成27年12月18日 (2015.12.18) | | 757 エルク グローヴ, ウェスト |
| (31) 優先権主張番号 | 13/374, 369 | | タロン ドライヴ 9700 |
| (32) 優先日 | 平成23年12月22日 (2011.12.22) | | 9700 West Taron Dri |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | ve, Elk Grove, CA 9 |
| | | (74) 代理人 | 100102842 |
| | | | 弁理士 葛和 清司 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗血管新生およびがん処置のための $\alpha 5 \beta 1$ のアンタゴニストの投与

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) $0.01 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の量の VLO4 と、(ii) 対象に対する、単独で投与されたときの VP12 (ECL12) の治療的有効量より少ない量である、 $0.01 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の量の VP12 (ECL12) との組み合わせ、および (iii) 薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤であって、対象における血管新生を逆行させることにおける使用のためである、前記医薬製剤。

【請求項 2】

腫瘍浸潤の阻害における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3】

固形腫瘍の成長の阻害における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 4】

肺がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 5】

腺がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 6】

卵巣がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 7】

前立腺がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 8】

10

20

膀胱がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 9】

乳がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 10】

膵臓がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 11】

結腸がんの処置における使用のための、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

シャオドン・フェン

配列表

本出願は、E F S - W e b を介して A S C I I フォーマットで提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。該 A S C I I コピーは、2012年6月25日に作成され、CALPP2US.txtと名付けられ、4,387バイトのサイズである。

【0002】

背景

本発明の分野

本明細書中に提供される教示は、血管新生を阻害し、かつ、がんを処置するのに使用するための 5 1 アンタゴニストを含む医薬組成物に関し、該アンタゴニストはまた、2 1 アンタゴニストと組み合わせて、薬学的に許容可能な担体中でも使用され得る。

20

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

固形腫瘍の成長は、がん性組織中の新血管形成の制御ががん研究の目標の1つであるように、一般に、血管新生に依存的であると考えられる。それ故に、様々な潜在的血管新生インヒビターが、抗血管新生治療を使用する固形腫瘍および転移の処置において調査されている。しかしながら、残念なことに、少なくとも、(i) 血管新生を阻害または予防する；(ii) 固形腫瘍を封じ込める、および/または腫瘍サイズを低減するために処置する；ならびに(iii) 対象内部に転移をもたらす腫瘍浸潤を阻害または予防する、薬剤または薬剤の組み合わせを使用する特に有効な方法は、発見されないままである。

30

【0004】

当該技術分野では、今もなお、改善された血管新生インヒビターならびにかかるインヒビターを含むがん治療が必要とされている。血管新生は、微小血管の内皮細胞と細胞外マトリックス(E C M)タンパク質との間の複雑でダイナミックな相互作用を含む高度に調節された事象である。血管新生の制御は、がん治療を含む様々な処置において使用され得る。E C Mの組成および構造の変化は、創傷の凝血塊(wound clot)および腫瘍間質の顕著な特徴である。創傷治癒および腫瘍成長に関連する血管新生の調節におけるE C Mの役割は、一般に、当該技術分野において未定義のままである。しかしながら、血管新生の間、成長因子に対する内皮細胞の応答は、架橋フィブリンまたはI型コラーゲンのいずれかが優位を占める、取り囲んでいる3次元(3 D)細胞外マトリックス(E C M)の組成特性および力学特性によって調整される。

40

【0005】

同様に、例えば、腫瘍浸潤を制御する、転移性疾患を処置する等の新規方法は、当業者により当該技術分野への重大な貢献がなされたものと見なされるであろう。乳がん患者の60%超は、診断時に転移性疾患を有する。乳がん患者において最も多く見られる死因は、原発腫瘍部位から遠隔部位までがん細胞が転移拡散し、遠く離れた場所で乳がん細胞が成長することによるものである。転移は、いくつかのメカニズムを含む複雑なプロセスである：(1) 腫瘍細胞が、腫瘍を取り囲む細胞外マトリックスを通して移動すること；(2) 腫瘍細胞が、腫瘍内へ成長する血管新生された血管内へ浸潤すること；(3) 転移細胞

50

胞が、遠く離れた部位に接着すること、ここで該部位の微小環境が腫瘍成長を受け入れる力がある；および（４）新たに付着した細胞が、転移部位で増殖し、血管新生を誘導するはずである。それ故に、選択インヒビターの組み合わせによっては、このプロセスを制限することができるかもしれない。

【０００６】

したがって、少なくとも先の理由から、当業者は、血管新生を阻害するか、予防するか、または逆行すらさせる方法を、正しく理解するであろう。さらに、当業者は、血管新生を阻害することができるのみならず、血管新生がその中で起こる物理的かつ機械的な構造を破壊することもできる処置の組成物および方法を、正しく理解するであろう。かかる組成物および方法は、少なくとも（ｉ）血管新生を阻害または予防する；（ｉｉ）固形腫瘍を封じ込める、および／または腫瘍サイズを低減するために処置する；ならびに（ｉｉｉ）対象内部に転移をもたらす腫瘍浸潤を阻害または予防することができるかもしれない。

10

【発明の概要】

【０００７】

本明細書中に提供される教示は、概して、 2×1 アンタゴニストと組み合わせて、薬学的に許容可能な担体の中で使用される場合、血管新生を阻害、予防または逆行させ、がんを処置するのに使用するための 5×1 アンタゴニストを含む医薬組成物および方法に関する。いくつかの態様において、教示は、 5×1 アンタゴニスト、 2×1 アンタゴニストおよび薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤に向けられる。医薬製剤は、例えば、VLO4 および VP12 (ECL12) を含む。いくつかの態様において、教示は、 5×1 アンタゴニスト、 2×1 アンタゴニスト、ならびに、有効量の 5×1 アンタゴニストおよび有効量の 2×1 アンタゴニストを対象に投与するための取扱説明書を含む製品に向けられる。

20

【０００８】

いくつかの態様において、方法が、対象における血管新生を阻害すること、有効量の 2×1 アンタゴニストと組み合わせて有効量の 5×1 アンタゴニストを対象に投与することを含むことに向けられる。方法は、例えば、有効量の VLO4 および VP12 (ECL12) を対象に投与することを含み得る。いくつかの態様において、方法は腫瘍浸潤をさらに阻害する。また、いくつかの態様において、方法は、固形腫瘍の成長を阻害する。

【０００９】

いくつかの態様において、本明細書中に教示される方法は、有効量の抗増殖剤の投与をさらに含み得る。また、いくつかの態様において、方法は、有効量の放射線治療の投与を含み得る。

30

【００１０】

いくつかの態様において、方法は、対象において、血管新生を阻害すること、腫瘍浸潤を阻害すること、固形腫瘍の成長を阻害すること、またはこれらの組み合わせにすることができる。これらの態様において、先に記載されるとおり、方法は、有効量の抗増殖剤の投与、有効量の放射線治療、手術治療、またはこれらの組み合わせをさらに含み得る。

【００１１】

VLO4 は、単独で投与されても、VP12 (ECL12) と組み合わせて投与されても、有効であり得る。教示は、例えば、有効量の VLO4 を対象に投与することを含む、対象における血管新生を逆行させる方法を含む。いくつかの態様において、方法は、VLO4 および VP12 (ECL12) を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、方法は、さらに、腫瘍の成長を阻害し、血管新生を阻害し、および／または固形腫瘍の成長を阻害する。さらに、いくつかの態様において、方法は、有効量の抗増殖剤および／または放射線治療の投与をさらに含むことができる。それ故に、いくつかの態様において、方法は、有効量の化学治療の投与をさらに含む。

40

【００１２】

後に続く教示を理解する当業者は、概念が、クレーム、クレームに記載の本発明およびクレームに記載の用語の文字通りの理解をはるかに超えたさらなる態様にまで拡張できる

50

ことを、正しく理解するであろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】図 1 A ~ 1 C は、いくつかの態様に従い、ヒト微小血管の内皮細胞の血管新生の研究を例証するものである。

【 0 0 1 4 】

【図 2】図 2 A ~ 2 F は、いくつかの態様に従い、V E G F (1 0 0 n g / m l) により刺激されたフィブリン中の H D M E C による、血管新生の発芽および毛細管様構造の形成を示す。

【 0 0 1 5 】

【図 3】図 3 A ~ 3 D は、いくつかの態様に従い、核染色による毛細管様構造中の複数の細胞の存在、および共焦点顕微鏡解析により実証された管腔の存在を示す。

【 0 0 1 6 】

【図 4】図 4 は、いくつかの態様に従い、フィブリン中の H D M E C の血管新生の発芽に対する G P e n G R G D S P C A ペプチド [R G D (V N)] の効果をグラフ描画したものである。

【 0 0 1 7 】

【図 5】図 5 は、いくつかの態様に従い、フィブリン中の H D M E C の血管新生の発芽に対する V L O 4 ディスインテグリンの効果をグラフ描画したものである。

【 0 0 1 8 】

【図 6】図 6 A ~ 6 D は、いくつかの態様に従い、フィブリン中の H D M E C の血管新生の発芽に対する V L O 4 ディスインテグリンの阻害性効果の顕微鏡写真を示す。

【 0 0 1 9 】

【図 7】図 7 A および 7 B は、いくつかの態様に従い、V L O 4 ディスインテグリンが、フィブリン中、新たに形成された H D M E C の血管新生の発芽をどのように破壊するかについての顕微鏡写真を示す。

【 0 0 2 0 】

【図 8】図 8 A ~ 8 D は、いくつかの態様に従い、V L O 4 ディスインテグリン (インテグリンアルファ 5 ベータ 1 を遮断する) および V P 1 2 ディスインテグリン (E C L 1 2 、インテグリンアルファ 2 ベータ 1 を遮断する) が、フィブリン中の H D M E C の血管新生の発芽を、どのように相乗的に阻害したかを示す顕微鏡写真である。

【 0 0 2 1 】

【図 9】図 9 A ~ 9 D は、いくつかの態様に従い、V L O 4 ディスインテグリン (インテグリンアルファ 5 ベータ 1 を遮断する) およびインテグリンアルファ 2 ベータ 1 を遮断する抗体が、フィブリン中の H D M E C の血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す顕微鏡写真である。

【 0 0 2 2 】

【図 10】図 10 A ~ 10 D は、いくつかの態様に従い、エキスタチン (インテグリンアルファ v ベータ 3 を遮断する) および V P 1 2 ディスインテグリン (E C L 1 2 、インテグリンアルファ 2 ベータ 1 を遮断する) が、フィブリン中の H D M E C の血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す顕微鏡写真である。

【 0 0 2 3 】

【図 11】図 11 は、いくつかの態様に従い、V L O 4 (3 μ g / m l) が、収縮したコラーゲンからフィブリン 3 D マトリックス中への H T 1 0 8 0 腫瘍細胞浸潤をどのように有意に阻害するかをグラフ描画したものである。

【 0 0 2 4 】

【図 12】図 12 は、いくつかの態様に従い、V P 1 2 (3 μ g / m l 、インテグリンアルファ 2 ベータ 1 を遮断する E C L 1 2) 、V L O 4 (3 μ g / m l 、インテグリンアルファ 5 ベータ 1 を遮断する) およびエキスタチン (3 μ g / m l) が、収縮したコラーゲンからフィブリン 3 D マトリックス中への H T 1 0 8 0 腫瘍細胞浸潤をどのように有意に

10

20

30

40

50

阻害するかをグラフ描画したものである。

【0025】

【図13】図13は、いくつかの態様に従い、V L O 4 が、H 1 6 5 0（ヒト転移性の肺がん細胞株）およびA 5 4 9（ヒト肺胞性腺がん細胞株）の腫瘍細胞増殖を、どのように有意に阻害したかをグラフ描画したものである。

【発明を実施するための形態】

【0026】

詳細な説明

本明細書中に提供される教示は、概して、2 1 アンタゴニストと組み合わせて、薬学的に許容可能な担体の中で使用される場合、血管新生を阻害、予防または逆行させ、がんを処置するのに使用するための5 1 アンタゴニストを含む医薬組成物および方法に関する。

10

【0027】

いくつかの態様において、教示は、5 1 アンタゴニスト、2 1 アンタゴニストおよび薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤に向けられる。いくつかの態様において、教示は、5 1 アンタゴニスト、2 1 アンタゴニスト、ならびに、有効量の5 1 アンタゴニストおよび有効量の2 1 アンタゴニストを対象に投与するための取扱説明書を含む製品に向けられる。いくつかの態様において、用語「組成物」および「製剤」は、交換可能であり得る。

【0028】

20

いくつかの態様において、教示は、有効量の2 1 アンタゴニストと組み合わせて有効量の5 1 アンタゴニストを対象に投与することを含む、対象における血管新生を阻害する方法に向けられる。いくつかの態様において、方法は、腫瘍浸潤をさらに阻害する。また、いくつかの態様において、方法は、固形腫瘍の成長を阻害し得る。

【0029】

5 1 アンタゴニストは、例えば、5 1 を遮断する働きをする化学的な部分のいずれをも含み得る。同様に、2 1 アンタゴニストは、例えば、2 1 を遮断する働きをする化学的な部分のいずれをも含み得る。かかるアンタゴニストは、例えば、小分子医薬等の小分子、または、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド、タンパク質、核酸、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド等の巨大分子を含み得る。いくつかの態様において、ペプチドは、R G D を認識するモチーフを含み得る。いくつかの態様において、アンタゴニストは、例えばポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体等の抗体を含み得、いくつかの態様において、抗体は、ヒト化されていても、完全ヒトであってもよい。抗体は、5 1 アンタゴニスト、2 1 アンタゴニストまたはこれらの組み合わせに結合することが既に知られているものであってもよい；または、抗体は、5 1 アンタゴニスト、2 1 アンタゴニストまたはこれらの組み合わせに特異的に結合するように設計され得る。当業者は、本明細書中に提供される方法により使用するための、関心のあ

る抗体を選択および/または設計するやり方を望み、例えば、所望の抗体を産生する知られている方法があることを正しく理解することができる。それ故に、いくつかの態様において、血管新生および/またはコラーゲンマトリックス形成の活性に結合し下方調節するインヒビターまたはリガンドのいずれも使用することができる。かかるインヒビターは、

ディスインテグリン、R G D ペプチド、モノクローナル遮断抗体、化学的インヒビター、アンチセンスm R N A など、またはこれらの組み合わせのいずれをも含み得るが、これらに限定されない。

30

40

【0030】

いくつかの態様において、アンタゴニストは、5 1 アンタゴニスト、2 1 アンタゴニストに結合する1種または2種以上のディスインテグリン、またはこれらの組み合わせを含み得る。ディスインテグリンの例は、ヘビ毒抽出物から得られるディスインテグリンを含み得る。かかるインテグリンは、例えばR G D、ならびにK G D、M L D、V G D およびM V D ディスインテグリン等の非R G D を含み得、これらの配列は、活性ペプチ

50

ド配列を指し、例えば該配列の「阻害性ループ」中に存在し得る。

【0031】

例えば、VLO4は、単独で投与されても、VP12(ECL12)と組み合わせて投与されても、有効であり得る。教示は、例えば、有効量のVLO4を対象に投与することを含む、対象における血管新生を逆行させる方法を含む。いくつかの態様において、方法は、VLO4およびVP12(ECL12)を対象に投与することを含む。いくつかの態様において、方法は、さらに、腫瘍浸潤を阻害し、血管新生を阻害し、および/または固形腫瘍の成長を阻害する。さらに、いくつかの態様において、方法は、有効量の抗増殖剤および/または放射線治療の投与をさらに含み得る。それ故に、いくつかの態様において、方法は、有効量の化学治療の投与をさらに含む。

10

【0032】

ヘビ毒からのディスインテグリンは、以下を含み得る：(i) 約49～51残基および4つのジスルフィド結合を有する単鎖配列化合物の第1群；(ii) 約70残基および6つのジスルフィド結合を有する単鎖配列化合物の第2群；(iii) 7つのジスルフィド結合により架橋された約84残基を有する単鎖配列化合物の第3群；(iv) 8つのジスルフィド結合の形成に関与する16個のCys残基を有する約100残基を有する単鎖配列化合物の第4群；および(v) ホモ二量体またはヘテロ二量体を有する二量体化合物の第5群。二量体ディスインテグリンは、例えば、4つの鎖内ジスルフィド結合および2つの鎖間システイン連結の形成に関与する10個のシステイン残基を有する各サブユニットに約67残基を含み得る。

20

【0033】

いくつかの態様において、ディスインテグリンは、エキスタチン、VLO4、VP12(ECL12)またはこれらの組み合わせを含み得る。いくつかの態様において、ディスインテグリンは以下を含み得る：(i) エキスタチン、エリストコフィン(eristocophin)、エリストスタチン(eristostatin)およびオセラツシン(ocellatusin)；(ii) トリグラミン(trigramin)、キストリン(kistrin)、フラボリジン(flavoridin)、アルボラ布林(albolabrin)およびバーバリン(barbourin)；(iii) ピチスタチンおよびサルモシン(salmosin) 3；(iv) PII I；ならびに(v) コントルトロスタチン(contortrostatin)、EC3、ピリトキシシン(bilitoxin)およびEMF-10；ならびにこれらの組み合わせ。また、いくつかの態様において、ディスインテグリンは、例えば、EO4、EO5、EMS11、VLO4、VLO5、VB7、VA6またはこれらの組み合わせを含み得る。米国出願番号第12/821,873号は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0034】

いくつかの態様において、方法は、例えば、有効量のエキスタチンおよびVP12(ECL12)を対象に投与することを含むことができる。いくつかの態様において、コントルトロスタチンは、VP12(ECL12)の代わりか、またはこれに加えて使用されてもよい。いくつかの態様において、51インテグリン活性を遮断するRGDペプチドは、21インテグリン活性を遮断するモノクローナル抗体と組み合わせて使用され得る。

【0035】

アンタゴニストは、ディスインテグリン等のタンパク質を含む。また、本明細書中に教示されるタンパク質の1種と、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性を有するポリペプチドのいずれをも使用され得る。用語「同一性」は、配列がどの程度不変であるかに言及するために使用され得る。同一性は、恐らくペプチドフラグメントの構築物の場合タンパク質フラグメントの組み合わせと同様、タンパク質全体またはタンパク質の確定したフラグメントに対して言及され得る。配列アライメントへの計算論的アプローチは、一般に、広範囲のアライメントまたは局所的なアライメントのいずれかである。広範囲のアライメントの計算は、全長のクエリ配列全てに及ぶアライメントを「強要する」広範囲の最適化の形態である。これに反して、局所的なアライメントは、全面的に大きく多岐にわたることが

40

50

多い長い配列のうち、類似性の領域を同定するために使用され得る。局所的なアライメントは使用され得るものであるが、類似性の領域を同定するというさらなる課題のために計算するのは、より困難となり得る。当業者は、ダイナミックプログラミングのようなゆっくりではあるが正式に最適化する方法を含む多様な計算論的アルゴリズムが利用可能であり、かつ効率的ではあるが、完全な発見的アルゴリズムまたは大規模データベース検索のために設計された確率論的方法としてではないことを、正しく理解するであろう。いくつかの態様において、同一性のための配列アライメントは、局所的、広範囲、ダイナミック、進歩的、発見的、または確率論的であり得る。また、いくつかの態様において、配列アライメントは、結合することを模索されるタンパク質の活性領域等の、関心のあるモチーフの位置周辺に基づくことさえできる。ディスインテグリン中のモチーフは、例えば、阻害性ループ領域、RGD領域、同等の非RGD活性領域またはこれらの組み合わせを含み得る。当業者は、同じようなタンパク質構造またはペプチド構造からの機能についての情報を考慮して、例えば、受容体に結合する確率を査定すること、アゴニスト、アンタゴニストとして機能することなどの多くの所望の目的のいずれにとっても、配列同一性を容易に比較し得る。同一性または相同性を決定するために使用され得るプログラムの例は、例えば、BLASTおよびFASTAを含む。

10

【0036】

ポリペプチドは、タンパク質のバリエーションまたは突然変異体、キメラ構築物、フラグメント、少なくとも2種の連結したペプチドフラグメントの構築物、フラグメントのバリエーション、二量体などを含み得る。本明細書中に教示されるポリペプチドのいずれも、当業者に知られている組み換え手順を使用するか、あるいは、アミノ酸配列を構築することができる合成手順を使用して、例えばFmoc方法もしくはBoc方法等の液相または固相の合成技術を使用して、産生され得る。同様に、本明細書中に教示されるポリペプチドのいずれも、親和性タグなどの使用を通じて等、当業者に知られている手順を使用して、単離および/または精製され得る。いくつかの態様において、ポリペプチドは、阻害性ループ領域、RGDもしくは非RGDのペプチドフラグメント、アミノ酸、アミノ酸配列、アルケンを含むリンカー、またはこれらの組み合わせを含み得る。

20

【0037】

用語「バリエーション」は、あるペプチドに対する修飾を指し、該ペプチドがその結合特性を保持することを可能にするものである。かかる修飾は、これらに限定されないが、1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換される保存的置換；結合特性または二次構造への影響が最小となるアミノ酸の欠失または付加；リンカーのコンジュゲーション；例えば官能基の付加等の翻訳後修飾を含む。かかる翻訳後修飾の例は、これらに限定されないが、プロセスを通じた下記修飾基の付加を含み得、該プロセスは、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、脂肪酸による修飾、ペプチド間のジスルフィド結合の形成、ビオチン化、PEG化、およびこれらの組み合わせである。

30

【0038】

多くの態様において、薬剤の分子量は、対象からの薬剤の排除を確保するため、約40,000ダルトンか、またはこれを下回るべきである。いくつかの態様において、薬剤の分子量は、約300ダルトンから約40,000ダルトンまで、約8,000ダルトンから約30,000ダルトンまで、約10,000ダルトンから約20,000ダルトンまで及ぶか、またはこれらのうちの任意の範囲である。

40

【0039】

バリエーションは、保存的置換のみを含むポリペプチドの、単に保存的に修飾されたバリエーションであり得る。用語「保存的に修飾されたバリエーション」は、例えばバリンをイソロイシンに置換する等、電荷密度、親水性/疎水性、サイズおよび/または形状が類似したアミノ酸に置換されたアミノ酸である保存アミノ酸の置換を指す。対して、「非保存的に修飾されたバリエーション」は、例えばバリンをフェニルアラニンに置換する等、電荷密度、親水性/組成物、サイズおよび/または形状が異なるアミノ酸により置換されたアミノ酸である非保存アミノ酸の置換を指す。

50

【 0 0 4 0 】

いくつかの態様において、本明細書中に教示される方法は、有効量の抗増殖剤および/または有効量の放射線治療の投与等の、有効量の追加の生物活性剤または治療的処置の投与をさらに含み得る。いくつかの態様において、用語「薬剤」および「治療」は、交換可能であり得る。いくつかの態様において、例えば、放射線の投与は、第2剤の投与と考えることができる。

【 0 0 4 1 】

生物活性剤は、対象において、治療効果、予防効果、治療効果と予防効果との両方、または他の生物学的活性効果に貢献することができる部分のいずれでもあり得る。生物活性剤はまた、診断特性も有し得る。生物活性剤は、これらに限定されないが、小分子、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、アミノ酸、オリゴペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質を含む。生物活性剤は、これらに限定されないが、抗増殖剤、抗悪性腫瘍薬、有糸分裂阻害薬、抗炎症薬、抗血小板、血液凝固阻止剤、抗フィブリン、抗トロンビン、抗生物質、抗アレルギー薬、抗酸化剤、および、これらのプロドラッグ、コドラッグ(codrug)、代謝産物、類似体、相同体、同類物、誘導体、塩のいずれか、ならびに、これらの組み合わせを含み得る。当業者が、本発明のいくつかの態様において、いくつかのその群、下位群および個々の生物活性剤を使用し得ないことを認識すべきことは、正しく理解されるはずである。

【 0 0 4 2 】

抗増殖剤は、例えば、アクチノマイシン D、アクチノマイシン I V、アクチノマイシン I 1、アクチノマイシン X 1、アクチノマイシン C 1、およびダクチノマイシン (Cosmegen.RTM., Merck & Co., Inc.) を含む。抗悪性腫瘍薬または有糸分裂阻害薬は、例えば、パクリタキセル (TAXOL, Bristol-Myers Squibb Co.)、ドセタキセル (TAXOTERE, Aventis S.A.)、メトトレキサート、アザチオプリン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、フルオロウラシル、塩酸ドキシソルピシン (ADRIAMYCIN, Pfizer, Inc.) およびマイトマイシン (MUTAMYCIN, Bristol-Myers Squibb Co.)、ならびに、これらのプロドラッグ、コドラッグ、代謝産物、類似体、相同体、同類物、誘導体、塩のいずれか、ならびに、これらの組み合わせを含む。抗血小板、血液凝固阻止剤、抗フィブリンおよび抗トロンビンは、例えば、ヘパリンナトリウム、低分子量ヘパリン、ヘパリン類縁体、ヒルジン、アルガトロバン、ホルスコリン、バピプロスト、プロスタサイクリンおよびプロスタサイクリン類似体、デキストラン、D - p h e - p r o - a r g - クロロメチルケトン (合成抗トロンビン)、ジピリダモール、糖タンパク質 I I b / I I I a 血小板膜受容体アンタゴニスト抗体、組み換え型ヒルジンならびにトロンビンインヒビター (ANGIOMAX, Biogen, Inc.)、ならびに、これらのプロドラッグ、コドラッグ、代謝産物、類似体、相同体、同類物、誘導体、塩のいずれか、ならびに、これらの組み合わせを含む。細胞分裂阻害剤または抗増殖剤は、例えば、アンジオペプチン (angiopeptin)、カプトプリル (CAPOTEN および CAPOZIDE, Bristol-Myers Squibb Co.)、シラザプリルまたはリシノプリル (PRINVIL および PRINZIDE, Merck & Co., Inc.) 等のアンジオテンシン変換酵素インヒビター；ニフェジピン等のカルシウムチャネルブロッカー；コルヒチン；線維芽細胞成長因子 (F G F) アンタゴニスト、魚油 (オメガ3 脂肪酸)；ヒスタミンアンタゴニスト；ロバスタチン (MEVACOR, Merck & Co., Inc.)；血小板由来成長因子 (P D G F) 受容体に特異的な抗体を含むがこれに限定されないモノクローナル抗体；ニトロプルシド；ホスホジエステラーゼインヒビター；プロスタグランジンインヒビター；スラミン；セロトニンブロッカー；ステロイド；チオプロテアーゼインヒビター；トリアゾロピリミジンを含むがこれに限定されない P D G F アンタゴニスト；および一酸化窒素、ならびに、これらのプロドラッグ、コドラッグ、代謝産物、類似体、相同体、同類物、誘導体、塩のいずれか、ならびに、これらの組み合わせを含む。抗アレルギー剤は、これらに限定されないが、ペミロラストカリウム (ALAMAST, Santen, Inc.) および、これらのプロドラッグ、コドラッグ、代謝産物、類似体、相同体、同類物、誘導体、塩のいずれか、ならびに、これらの組み合わせを含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

抗体治療は、本明細書中に教示される方法と組み合わせて投与される場合に有効であり得る生物活性剤を加えて提供する。AVASTATINは、例えばVEGFに対するヒトモノクローナル抗体であるが、結腸直腸がんにおいて、イリノテカン、5 - フルオロウラシルおよびロイコボリンの標準的なSaltzレジームと組み合わせて使用した場合に生存時間が30%より多く増加するという有益な結果をもたらした。当業者は、いくつかのモノクローナル抗体が有用であろうことを正しく理解するであろう。以下にさらに例を挙げる：

【表 1】

表.

| mAb 名 | 商標名 | 処置されるがん: |
|--------------------|-----------|--------------------------------------|
| リツキシマブ | RITUXAN | 非ホジキンリンパ腫 |
| トラスツズマブ | HERCEPTIN | 乳がん |
| ゲムツズマブ オゾガマイシン* | MYLOTARG | 急性骨髄性白血病 (AML) |
| アレムツズマブ | CAMPATH | 慢性リンパ性白血病 (CLL) |
| イブリツモマブ チウキセタン* | ZEVALIN | 非ホジキンリンパ腫 |
| トシツモマブ* | BEXXAR | 非ホジキンリンパ腫 |
| セツキシマブ | ERBITUX | 結腸直腸がん; 頭頸部がん |
| ベバシズマブ | AVASTIN | 結腸直腸がん; 非小細胞性肺がん; 乳がん; 神経膠芽腫; 腎がん |
| パニツムマブ | VECTIBIX | 結腸直腸がん |
| オフアツムマブ | ARZERRA | 慢性リンパ性白血病 (CLL) |

*コンジュゲートされたモノクローナル抗体を指す。

【 0 0 4 4 】

生物活性剤が、単独で、または他の生物活性剤と、本明細書中に教示される組成物および方法とを組み合わせるとえられ得ることは、正しく理解されるべきである。化学治療薬物は、例えば、併用化学治療レジームとして組み合わせるとえられる場合、最も有効であることもある。併用化学治療の原理は、作用の異なるメカニズムによって働く薬物を使用することであり、それによって、耐性がん細胞が発生する可能性が減少される。異なる効果を有する薬物を組み合わせる場合、各薬物は、その最適な用量で使用され得、耐え難い副作用がないときもあれば、低減されるときもある。

【 0 0 4 5 】

いくつかのがんに対する最も良好なアプローチは、手術、放射線治療および/または化学治療の組み合わせであってもよい。手術または放射線治療は、例えば、局所的に止められたがんを処置する一方で、化学治療はまた、遠く離れた部位まで分散したがん細胞を死滅することにも使用され得る。放射線治療または化学治療は、ときには、腫瘍を縮小させるための手術の前に与えられ得、それによって、完全に手術的除去する機会が改善され、これらのタイプの併用治療が、少なくともいくつかの態様における本明細書中に提供される教示を用いて使用するための潜在的価値のある治療となる。手術後の放射線治療および低用量の化学治療は、例えば、残っているがん細胞を破壊するのを助け得る。当業者は、がんの状態が、単独治療か併用かのいずれが望ましいのか決定するのに考慮すべき因子であり得ることを正しく理解するであろう。例えば、早期乳がんは、腫瘍のサイズおよび再発のリスクに応じて、手術のみか、または放射線治療、化学治療もしくはこれらの組み合わせと組み合わせた手術を使用することにより処置されてもよい。局所進行性の乳がんは、いくつかの態様において、例えば、化学治療、放射線治療および手術により処置され得る。

【 0 0 4 6 】

生存するために血液供給の少なくとも一部に依存するがん組織はいずれも、いくつかの態様において、処置可能であり得る。本明細書中に教示される方法を使用して処置され得るがんの例は、これらに限定されないが、前立腺、膀胱、肺、乳房、骨肉腫、脾臓、結腸、黒色腫、精巣、結腸直腸、尿路上皮、腎細胞、肝細胞、白血病、リンパ腫および卵巣がんならびに中枢神経系悪性腫瘍を含み得る。肺がんもまた、分散していることが多いが、いくつかの態様において、処置され得る。同様に、リンパ腫および急性骨髄性白血病を含む白血病等の液性がんでも、本明細書中に提供される教示を組み込む方法を使用するいくつかの態様において処置され得る。

【 0 0 4 7 】

本明細書中に教示される組み合わせは、治癒に向けられないときもあるが、むしろ、症状を軽減し、延命させ得る。かかる併用治療は、例えば切除不能な非小細胞肺癌、食道がんまたは膀胱がんを有する対象等、放射線治療または手術処置に好適ではない進行がんを有するそれらにとっても、有用であり得る。

【 0 0 4 8 】

いくつかの態様において、方法は、例えば、有効量の V L O 4 および有効量の V P 1 2 (E C L 1 2) を対象に投与することを含み得る。ここで、TAXOL、G-CSF等の細胞毒性剤またはこれらの組み合わせは、例えば、併用治療を提供するために投与され得る。また、いくつかの態様において、これらの方法は、放射線治療、手術治療、またはこれらの組み合わせにより達成され得る。

【 0 0 4 9 】

いくつかの態様において、方法は、対象において、血管新生を阻害または予防すること、血管新生を逆行させること、腫瘍浸潤を阻害または予防すること、固形腫瘍の成長を阻害または予防すること、固形腫瘍のサイズを低減させること、またはこれらの組み合わせにすることができる。これらの態様において、先に記載したように、方法は、有効量の抗増殖剤、有効量の放射線治療、手術治療、またはこれらの組み合わせの投与をさらに含み得る。

【 0 0 5 0 】

当業者は、「腫瘍浸潤」が、がん性細胞を移動させることによる組織壁への浸透として定義され得、腫瘍浸潤が転移に不可欠であり得ることを正しく理解するであろう。腫瘍浸潤は、腫瘍が成長するにつれ周囲の組織への浸潤を含み得、毛細血管の内皮細胞が腫瘍に浸潤し、腫瘍血管を通して創出する、すなわち腫瘍組織の新血管形成である。腫瘍細胞はまた、転移のため、血液循環内へ、血管内侵入もすることができる。腫瘍細胞は、その後、遠隔臓器、管外遊出物(extravasate)の中に拘束され得、再び新たな部位の中へ移動し、浸潤サイクルを再び開始することができる。それ故に、腫瘍浸潤を阻害または予防することによって、腫瘍(単数)または腫瘍(複数)が封じ込められ得、よって転移を阻害または予防し得る。

【 0 0 5 1 】

使用および投与方法

組成物は、対象において、疾患の処置における治療効果および/または予防効果、または1種もしくは2種以上の疾患の症状の寛解を提供し得る。用語「対象」および「患者」は、交換可能に使用され、例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットおよびマウス等の非霊長類；例えば、サルまたはヒト等の霊長類を含むがこれらに限定されない哺乳動物等の動物を指す。

【 0 0 5 2 】

本明細書中に提供される組成物は、当業者に知られている投与様式のいずれをも使用して、対象に投与され得る。例えば、いくつかの態様において、局所的な投与が使用され、またいくつかの態様において、全身性投与が使用される。いくつかの態様において、全身投与および局所投与の組み合わせが使用される。当業者は、選択される治療プログラム、投与される薬剤、対象の病気、および所望される効果が、使用される投与スケジュールお

10

20

30

40

50

よび投与プログラムに影響を及ぼし得ることを正しく理解するであろう。

【 0 0 5 3 】

当業者は、投与される薬剤の量が、投与の方法と同様、例えば対象の疾患のタイプ、年齢、性別および重量等の因子に従い変動し得ることを理解する。例えば、局所投与および全身性投与は、有効である量と実質的に異なることを要求し得る。投薬計画はまた、治療応答を最適化するためにも調整されてもよい。いくつかの態様において、当業者に知られている喫緊の治療状況または治療的要因に示されるように、単回のボースで投与されてもよく；いくつかに分割した用量が、時間をかけて投与されてもよく；用量は、比例的に減少または増加されてもよく；または、これらの組み合わせのいずれでもよい。投薬値が、緩和されるべき病気の重症度により変動してもよいことに留意すべきである。投薬計画は、個々のニーズと、投与する人か、または組成物の投与を監督する人の専門家としての判断とに従い、時間をかけて調整されてもよい。本明細書に記載の投薬範囲は、例示のためだけであって、医師により選択され得る投薬範囲に限定されるものではない。

10

【 0 0 5 4 】

用語「投与」または「投与すること」は、疾患の症状を、*in vivo*または*ex vivo*のいずれかで、診断、予防、処置または寛解するために、対象の細胞または組織の中へ組成物を取り込ませる方法を指す。一例において、化合物は、*in vivo*で非経口的に、対象に投与され得る。他の例において、化合物は、組成物の有用性および有効性を決定するためのアッセイを含むがこれに限定されない目的で、対象からの細胞組織と化合物とを*ex vivo*で組み合わせることによって、対象に投与され得る。化合物が、1つまたは複数の活性薬剤と組み合わせられて、対象に取り込まれる場合、用語「投与」または「投与すること」は、例えば先に記載のいずれかの薬剤等の他の薬剤とともに、化合物の連続または同時の取り込みを含み得る。本発明の医薬組成物は、その目的とする投与経路と適合するように製剤化される。投与経路の例は、これらに限定されないが、例えば、静脈内、皮内、筋肉内および皮下への注射等の非経口；経口；吸入；経鼻；経皮；経粘膜；ならびに直腸への投与を含む。

20

【 0 0 5 5 】

本発明の化合物の「有効量」は、治療上の有効量または予防上の有効量を説明するために、使用され得る。有効量はまた、疾患の症状を寛解させる量でもあり得る。「治療上の有効量」は、所望の治療結果を達成するために必要な投薬および期間において有効である量を指し、また、所望の効果をもたらす処置プランに参加することができる研究者、獣医、医師または他の臨床医により追求される、組織、全身または対象において任意の生物学的応答または薬物応答を引き出す、活性な化合物、プロドラッグまたは医薬剤の量も指し得る。いくつかの態様において、治療上の有効量は、障害の1種もしくは2種以上の症状の寛解、障害の進行の予防、または、障害の退行をもたらすのに十分な量で投与される必要があり得る。いくつかの態様において、例えば、治療上の有効量は、組成物の所望の作用の少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも100%の測定可能な応答を提供する薬剤の量を指し得る。用語「処置すること」は、本明細書中に教示される1種もしくは2種以上の治療剤または予防剤を投与することを指す。

30

40

【 0 0 5 6 】

「予防上の有効量」は、血管新生、腫瘍成長もしくは腫瘍浸潤を予防、阻害または逆行させること等の、所望の予防上の結果を達成するのに必要な投薬および期間において有効である量を指す。典型的には、予防的用量は、疾患の発症前、または疾患の発症の早期に、疾患の発症もしくは疾患の症状を予防または阻害するため、対象に使用される。予防上の有効量は、治療上の有効量より少なくても、多くても、等しくてもよい。

【 0 0 5 7 】

50

投与は、局所または全身性であり得る。いくつかの態様において、投与は経口であり得る。他の態様において、投与は、皮下注射であり得る。他の態様において、投与は、滅菌等張水性緩衝液を使用する静脈内注射であり得る。他の態様において、投与は、可溶化剤、および注射部位の不快感を和らげるためにリグノカイン等の局所麻酔薬を含み得る。他の態様において、投与は、例えば、投与の容易さおよび均一性を得るために非経口であってもよい。

【0058】

化合物は、投薬単位で投与され得る。用語「投薬単位」は、一体投薬として対象に投与され得る化合物の、個別の所定の分量を指す。活性化合物の所定の分量は、所望の治療効果を生じさせるために選択され得、薬学的に許容可能な担体により投与され得る。各单位投薬における所定の分量は、次のものを含むが、これらに限定されない：(a) 活性化合物の特有の性質および達成されるべき特定の治療効果、ならびに、(b) かかる投薬単位を作り投与する当該技術分野に固有の制限。

10

【0059】

「薬学的に許容可能な担体」は、組成物とともに投与される、希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルである。担体は、州または連邦の監督機関による承認後、薬学的に許容可能であるか、または、米国薬局方協会においてリスト化されているか、または、対象への使用のためのものとして一般に認識されている他の供給源である。

【0060】

薬学的な担体は、生理的に適合性のある溶媒、分散媒、被覆剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのいずれかならびに全てを含む。薬学的な担体の例は、これらに限定されないが、水、油等の滅菌液体、ならびに、例えばリン脂質および糖脂質等の脂質を含む。これらの滅菌液体は、これらに限定されないが、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ごま油などの、石油、動物、植物または合成起源に由来するものを含む。水は、静脈内投与のための好ましい担体であり得る。生理食塩水溶液、水性右旋糖およびグリセロール溶液もまた、特に注射可能な溶液のための、液体担体であり得る。

20

【0061】

好適な薬学的な賦形剤は、これらに限定されないが、デンプン、糖、不活性ポリマー、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉(chalk)、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどを含む。組成物はまた、少量の湿潤剤、乳化剤、pH緩衝剤、またはこれらの組み合わせも含み得る。組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸薬、カプセル、粉末、徐放性製剤などの形態を取り得る。経口製剤は、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、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含み得る。Martin, E.W. Remington's Pharmaceutical Sciencesを参照。補充の活性化合物もまた、組成物中に取り込まれ得る。

30

【0062】

いくつかの態様において、担体は、経口投与に好適である。他の態様において、担体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、舌下または経口の投与に好適であり得る。他の態様において、薬学的に許容可能な担体は、薬学的に許容可能な塩を含んでもよい。

40

【0063】

経口投与のための医薬製剤は、リボソームを含んでもよい。リボソームおよびエマルションは、特に疎水性薬物に有用な、送達ビヒクルまたは送達担体である。治療剤の生物学的な安定性に応じて、タンパク質安定化のためのさらなる戦略が採用されてもよい。さらに、例えば、標的に特異的な抗体で被覆されたリボソーム等の、標的化薬物送達システムの中の薬物を投与してもよい。リボソームは、例えば、標的タンパク質に結合し、標的タンパク質を発現する細胞に選択的に取り入れられるように、設計され得る。

【0064】

治療組成物は、典型的には、製造および保管の条件下で、滅菌かつ安定でなければなら

50

ない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に好適な秩序だった他の構造物として製剤化され得る。いくつかの態様において、担体は、溶媒または分散媒であり得、これらに限定されないが、水；エタノール；例えばグリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコールなどのポリオール；および、これらの組み合わせを含む。適当な流動性は、例えば、レシチン等の被覆を使用する、分散に必要な粒子サイズを維持する、界面活性剤を使用する等の様々なやり方で、維持され得る。

【0065】

いくつかの態様において、例えば、糖；マンニトール、ソルビトール、グリセロールおよびこれらの組み合わせを含むがこれらに限定されないポリアルコール；ならびに塩化ナトリウム等の等張剤が使用され得る。持続的な吸収特性は、例えば、モノステアリン酸塩、ゼラチンおよび徐放性ポリマー等の吸収を遅延させる薬剤を含ませることによって、組成物中に導入され得る。担体は、活性化合物を速放性に対して保護するために使用され得、かかる担体は、植込錠(implant)およびマイクロカプセル化された送達システムにおける制御放出製剤を含むが、これらに限定されない。生分解性ポリマーおよび生体適合性ポリマー、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリグリコールのコポリマー(polyglycolic copolymer)(PLG)などが使用され得る。かかる製剤は、一般に、当業者に知られている方法を使用して調製され得る。

【0066】

化合物は、例えば注射のための油性懸濁液等の懸濁液として投与されてもよい。親油性の溶媒またはビヒクルは、これらに限定されないが、例えば、ごま油等の脂肪油；オレイン酸エチルまたはトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル；およびリポソームを含む。注射のために使用され得る懸濁液はまた、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストラン等の懸濁液の粘度を増大させる物質をも含んでもよい。任意に、懸濁液は、化合物の溶解性を増大させ、高度に濃縮された溶液の調製を可能にする安定剤または薬剤を含んでもよい。

【0067】

一態様において、滅菌された注射可能な溶液は、先に記載の所望の追加成分のいずれか1種またはいずれかの組み合わせを有する溶媒中の活性化合物の有効量を組み込むこと、該溶液を濾過すること、その後、滅菌することによって調製され得る。他の態様において、分散液は、活性化合物を、分散媒と先に記載の所望の追加成分のいずれか1種またはいずれかの組み合わせとを含む滅菌されたビヒクル中に組み込むことによって調製され得る。滅菌粉末は、真空乾燥、凍結乾燥またはこれらの組み合わせにより、滅菌された注射可能な溶液中に使用するために調製され得、活性成分およびいずれかの所望の追加成分からなり得る粉末が産出される。さらに、追加成分は、別々に調製された滅菌され濾過された溶液からのものであり得る。他の態様において、抽出物は、抽出物の溶解性を高める1種または2種以上の追加化合物と組み合わせで調製されてもよい。

【0068】

いくつかの態様において、治療上または予防上の組成物の有効量は、約0.001 nMから約0.10 Mまで；約0.001 nMから約0.5 Mまで；約0.01 nMから約150 nMまで；約0.01 nMから約500 μMまで；約0.01 nMから約1000 nMまで、0.001 μM～約0.10 M；約0.001 μMから約0.5 Mまで；約0.01 μMから約150 μMまで；約0.01 μMから約500 μMまで；約0.01 μMから約1000 nMまでの濃度またはその中のいかなる範囲にも及んでもよい。いくつかの態様において、組成物は、約0.001 mg/kgから約500 mg/kgまで；約0.005 mg/kgから約400 mg/kgまで；約0.01 mg/kgから約300 mg/kgまで；約0.01 mg/kgから約250 mg/kgまで；約0.1 mg/kgから約200 mg/kgまで；約0.2 mg/kgから約150 mg/kgまで；約0.4 mg/kgから約120 mg/kgまで；約0.15 mg/kgから約100 mg/kgまで、約0.15 mg/kgから約50 mg/kgまで、約0.5 mg/kgから約1

10

20

30

40

50

0 mg / kg までに及ぶ量またはその中のいかなる範囲で投与してもよい。ここでヒト対象は、平均約 70 kg と仮定する。

【0069】

いくつかの態様において、化合物は、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素等の好適な推進剤またはこれらの組み合わせを含んでもよいエアゾールスプレーまたは噴霧器を通じて吸入により投与され得る。一態様において、加圧エアゾールのための投薬単位は、絞り弁を通じて送達されてもよい。他の態様において、例えばゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、吸入器において使用されてもよく、例えばデンプンまたはラクトース等の好適な粉末基剤と化合物との粉末化混合物を含むよう製剤化され得る。

10

【0070】

本明細書中の教示は、1種または2種以上の薬剤の投与のための徐放性製剤を包含する。いくつかの態様において、徐放性製剤は、かかる薬剤の対象への投与の投薬および/または頻度を低減し得る。

【0071】

組成物は、注射により医薬製剤として投与され得る。いくつかの態様において、製剤は、水性の注射可能な賦形剤と組み合わせて抽出物を含み得る。好適な水性の注射可能な賦形剤の例は、当業者に周知であり、それらと製剤を製剤化する方法とは、Alfonso AR: Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985等のかかる標準的な参考文献から見出されてもよい。好適な水性の注射可能な賦形剤は、水、水性の生理食塩溶液、水性の右旋糖溶液などを含み、任意に、マンニトールもしくは他の糖の溶液またはグリシンもしくは他のアミノ酸の溶液等の、酸で修飾されたアラビノガラクトタンパク質組成物のための溶解エンハンサーを含む。

20

【0072】

典型的には、本明細書中に教示される組成物は、皮下、筋肉内、腹腔内または静脈内に注射することによって投与され得る。局所的投与は、いくつかの態様において、例えば固形腫瘍等の処置されるべき組織の領域中への薬剤の直接注射を含み得る。いくつかの態様において、静脈内投与が使用され、それは、15分前後等の、数分間~1時間またはそれ以上の期間にわたる持続的な静脈内点滴であり得る。投与される量は、製剤のタイプ、単位投薬のサイズ、賦形剤の種類および当業者に周知の他の因子に応じて広く変更させてもよい。製剤は、例えば、約0.0001%から約10%(w/w)まで、約0.01%から約1%まで、約0.1%から約0.8%まで、またはその中のいずれかの範囲を含んでもよく、残りは賦形剤(単数)または賦形剤(複数)を含む。

30

【0073】

いくつかの態様において、組成物は、処置される疾患状態のための少なくとも1種の他の治療剤、特にがんを処置することができる例えば化学治療剤等の他の薬剤と併せて投与され得る。必要とされる薬剤の量は、要求される薬剤(単数)または薬剤(複数)の量が、有意な応答が対象から得られる程度まで低減されるように、実質上でさえも、低減され得る。有意な応答は、これらに限定されないが、吐き気の低減または排除、耐性の目に見える増大、処置へのより速い応答、処置へのより精選された応答、またはこれらの組み合わせを含み得る。

40

【0074】

方法は、有効量の抗増殖剤、有効量の放射線治療、手術治療またはこれらの組み合わせをさらに含み得る。教示はまた、がんを処置する方法にも向けられる。いくつかの態様において、方法は、がん処置を必要とする対象へ薬剤を投与することを含む。ここで、薬剤の用量は、対象において薬剤の実質的により高い用量を投与するとき;および、薬剤と組み合わせて放射線治療を投与するときに、そうでなければ生じたとであろう免疫抑制を低減または排除するよう選択される。ここで、免疫抑制の低減および排除は、薬剤の実質的に高い用量と組み合わせて対象に投与される場合にそうでなければ観察された放射線治療の効率と比較されるとき放射線治療の効率を高める。いくつかの態様において、薬剤は、

50

本明細書中に提供される薬剤と組み合わせて1種または2種以上の化学治療剤を含む。これらの態様において、薬剤は、ダカルバジン、パクリタキセル、ドキソルビシンまたはこれらの組み合わせからなる群から選択され得る。

【0075】

いくつかの態様において、有効量は、ヒトの平均体重に対し、例えば、約1 mg / 日から約1000 mg / 日まで、約10 mg / 日から約500 mg / 日まで、約50 mg / 日から約250 mg / 日まで、またはその中のいずれかの範囲に及ぶことができる。固形腫瘍を処置するため、同様の量が治療上で有効であろう。当業者は、過度の実験をすることなく、その投量およびこの開示を考慮して、既定の疾患のための本発明の組成物の治療上の有効量を決定することができるであろう。

10

【0076】

いくつかの態様において、G - C S Fは、当業者に有効であると知られている、いずれかの量、時間および投与の方法を使用して、本明細書中に教示される組成物と組み合わせて投与される。G - C S Fは、NEUPOGENであり得、例えば、約0.1 μg / kgから約1 mg / kgまで、約0.5 μg / kgから約500 μg / kgまで、約1 μg / kgから約250 μg / kgまで、約1 μg / kgから約100 μg / kgまで、約1 μg / kgから約50 μg / kgまで、またはその中のいずれかの範囲に及ぶ量で投与され得る。

【0077】

いくつかの態様において、放射線治療は、例えば約20 Gyから約100 Gyまでの、単回の局所的な高用量のレンジで投与され得る。いくつかの態様において、放射線治療は、1週間の時間枠の間、約2用量から約5用量までを含む用量の、修飾された少分割照射レジームを使用して、約20 Gyから約100 Gyまでに及ぶ全用量で投与され得る。いくつかの態様において、放射線治療は、約2日間から約3日間に及ぶ時間枠の間で、2用量から3用量までを含む用量の修飾された少分割照射レジームを使用して、約20 Gyから約100 Gyまでに及ぶ全用量で投与され得る。放射線治療はまた、3日間の時間枠の間、毎日、約15 Gyから約20 Gyまでに及ぶ単回用量を投与することを含む用量の修飾された少分割照射レジームを使用して、約45 Gyから約60 Gyまでに及ぶ全用量で投与され得る。

20

【0078】

本明細書中に教示される組成物および治療は、組み合わせて投与され得る。例えば、組み合わせは、例えば、30分間、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、18時間、1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、2週間、3週間、4週間、6週間、3ヶ月、6ヶ月、1年間、もしくはそれらのいずれかの組み合わせ、または、当業者によって必要と考えられるいずれかの時間で投与され得る。薬剤は、同時に、連続して、または周期的に、対象に投与され得る。周期的治療は、例えば処置の効率を高めるため等のいずれの所望の目的で、所定期間、第1剤を投与すること、第2の所定期間、第2剤または治療を投与すること、および、この周期を繰り返すことを含む。薬剤はまた、並行して投与され得る。用語「並行して」は、正確に同時の薬剤の投与に限定されないが、むしろ、薬剤がさらなる利益を提供するために一緒に働くことができるよう、薬剤が、連続し、かつ時間間隔をあけて投与され得ることを意味する。各薬剤は、薬剤（単数）または薬剤（複数）を投与する適切な手段のいずれかを使用する適切な形態のいずれかで、別々に、または一緒に、投与され得る。

30

40

【0079】

製品

本発明は、最終の、包装され、かつラベル付きの医薬品を包含する製品を提供する。製品は、例えば密封されたガラスバイアルまたは他の容器等の適切な器または容器中の、適切な単位投薬形態を含む。非経口投与に好適な投薬形態の場合、例えば本明細書中に教示される抽出物を含む1種または2種以上の薬剤の活性成分は、滅菌され、微粒子フリーの溶液としての投与に好適である。換言すると、本発明は、非経口溶液と凍結乾燥粉末との両方を包含し、夫々が滅菌されており、後者は注射前の再構成に好適である。代わりに、

50

単位投薬形態は、経口、経皮、局所または経粘膜の送達に好適な固体であってもよい。

【0080】

いくつかの態様において、単位投薬形態は、静脈内、筋肉内、局所的、または皮下への投与に好適である。よって、本発明は、好ましくは滅菌され、各送達経路に好適である溶液を包含する。薬剤の濃度および送達される量は、本明細書に記載のとおり、含まれている。

【0081】

いずれの医薬品のように、包装材料および容器は、保管および輸送の間、医薬品の安定性を保護するよう設計される。加えて、製品は、関心事である疾患の、予防的、治療的または寛解的な処置として組成物を適当に投与するやり方について、例えば医師、技術者または患者等の使用者に助言することができる使用のための取扱説明書または他の資料を含み得る。いくつかの態様において、取扱説明書は、実際の投薬およびモニターする手順を含むがこれらに限定されない投薬計画を示すか、または示唆することができる。

【0082】

他の態様において、取扱説明書は、組成物の投与が、例えばアナフィラキシー等のアレルギー応答を含むがこれに限定されない有害応答をもたらし得ることを示す資料を含み得る。資料は、アレルギー応答が、軽度の掻痒性皮疹としてのみ表示しても、重度のものとしてもよく、紅皮症、血管炎、アナフィラキシー、スティーブンス・ジョンソン症候群などを含んでもよいことを示すことができる。資料は、アナフィラキシーが致命的なものであり得、異種タンパク質のいずれもが体内に導入された場合に生じ得ることを示すべきである。資料は、これらのアレルギー応答が、蕁麻疹または発疹としてそれら自身に現れ得、致死的全身体性応答へ発展し得、例えば10分以内等の暴露後すぐに生じ得ることを示すべきである。資料は、アレルギー応答が、知覚障害、低血圧、咽頭水腫、精神状態の変化、顔面または咽頭の血管浮腫、気道閉塞、気管支痙攣、蕁麻疹および掻痒、血清病、関節炎、アレルギー性の腎炎、糸球体腎炎、側頭動脈炎、好酸球増多、またはこれらの組み合わせを対象に経験させ得ることをさらに示し得る。

【0083】

いくつかの態様において、製品は、例えば、箱、瓶、チューブ、バイアル、容器、噴霧器、吸入器、静脈内（I.V.）用バッグ、封筒などの1種または2種以上の包装材料；および、本明細書中に教示される抽出物を包装材料内に含む少なくとも1種の単位投薬形態の薬剤を含み得る。他の態様において、製品はまた、関心事である疾患のための、予防的、治療的または寛解的な処置として組成物を使用するための取扱説明書も含んでもよい。

【0084】

他の態様において、製品は、例えば、箱、瓶、チューブ、バイアル、容器、噴霧器、吸入器、静脈内（I.V.）用バッグ、封筒などの1種または2種以上の包装材料；および、例えば、グリコサミノグリカン、リン脂質、ポリ（アルキレングリコール）、本明細書中に教示される他の生物活性剤等の第2剤を含む第2組成物とともに、本明細書中に教示されるような抽出物を包装材料内に含む少なくとも1種の単位投薬形態の薬剤を含む第1組成物、または、これらのプロドラッグ、コドラッグ、代謝産物、類似体、相同体、同類物、誘導体、塩のいずれか、および、これらの組み合わせを含み得る。他の態様において、製品はまた、関心事である疾患のための、診断的、予防的、治療的または寛解的な処置として組成物を使用するための取扱説明書も含んでもよい。

【0085】

いかなる理論または作用メカニズムにも限定されるつもりはないが、以下の例は、本明細書中に提示される教示をさらに例証するために提供される。当該技術分野における技術の中から熟考されるバリエーションがいくつかあること、例が、クレームに対して制限を与えるものと解釈されるつもりはないことは、正しく理解されるべきである。

【0086】

例1．ヒトモデルを、血管新生を細胞外マトリックスと関連させるように調製した。

10

20

30

40

50

この研究において、我々は、血管新生の発芽と細胞外マトリックス（ECM）環境の統合性との相関を、*in vivo*および*in vitro*での血管新生モデルを使用して調査した。我々は、モデルにおいて、5 μ M 1アンタゴニストおよび2 μ M 1アンタゴニストを使用した。ここで、5 μ M 1アンタゴニストはディスインテグリンVLO4であり、2 μ M 1アンタゴニストはディスインテグリンVP12（ECL12）であった。

【0087】

材料

3-DのECMモデルを調製した。ゼラチンで被覆された微小担体ビーズ（Cytodex-3）を、Pharmacia（Uppsala, Sweden）から購入した。95%のI型コラーゲンと5%のIII型コラーゲンと（Vitrogen）を含む滅菌されたネイティブのウシ皮膚コラーゲンを、Collagen Biomaterials（Palo Alto, CA）から得た。ジメチルジクロロシラン、アプロチニン、ジブチリル環状AMP、ヒドロコルチゾン、トリプシン、大豆トリプシンインヒビターおよびEDTAを、Sigma Chemical Co.（St. Louis, MO）から得た。内皮細胞基本培地（EBM）、内皮細胞成長培地bulletkit-2（EGM-2 BULLETKIT）、ウシ脳抽出物および上皮成長因子を、Clonetics Corp.（San Diego, CA）から得た。正常ヒト血清を、BioWhittaker, Inc.（Walkersville, MD）から得た。血小板由来成長因子-BB（PDGF-BB）、血管内皮細胞成長因子（VEGF）および塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）を、Chemical Co.（St. Louis, MO）から購入した。VEGF-Cは、Kari Alitaloから快く頂いた。ヒトトロポニンBを、Calbiochem（San Diego, CA）から得た。また、ヨウ化プロピジウム（PI）を、Molecular Probes（Eugene, OR）から購入した。

【0088】

細胞培養

ヒト皮膚微小血管の内皮細胞（HDMEC）を、ヒト新生児包皮から単離した。つまり、細かく切ってトリプシン処理したヒト包皮から最初に採取した後、微小血管の内皮細胞を、PERCOLL密度勾配によりさらに精製した。HDMECを、30%の正常ヒト血清の存在下で10ng/mlの上皮成長因子、0.4%のウシ脳抽出物、17.5マイクロg/mlのジブチリル環状AMPおよび1マイクロg/mlのヒドロコルチゾンにより補充されたEBMからなるEGM（内皮細胞成長培地）中、I型コラーゲンで被覆した組織培養フラスコ上で培養した。内皮細胞培養物を、培養中に典型的な玉石単層を形成したこと、第V型因子関連抗原の免疫染色が陽性であったこと、およびアセチル化低密度リポタンパク質を選択的に取り込んだことに基づいて特徴付けし、>99%純粋であることを決定した。全ての実験は、継代が10回以下のHDMECを用いて行った。ウシ大動脈の内皮細胞（BAEC）を、BioWhittaker, Inc.（Walkersville, MD）から得て、メーカーの指示に従い培養した。継代が4回と8回との間のBAECを、実験のために使用した。

【0089】

内皮細胞がロードされた微小担体ビーズ（ECビーズ）の調製

ゼラチンで被覆されたCYTODEX-3微小担体ビーズを、メーカーの説明どおりに調製した。おおよそ80,000個の滅菌微小担体ビーズを洗浄し、EGM中に再懸濁し、おおよそ450万個の内皮細胞（HDMECまたはBAEC）に加えた。ビーズと細胞とを、穏やかに渦を巻きながら混合し、37 $^{\circ}$ Cで6hrインキュベートし、その後、37 $^{\circ}$ Cのオーブン中、軌道ミキサー上で24~36hr回転させ、内皮細胞がロードされた微小担体ビーズ（ECビーズ）が生成された。

【0090】

例2．細胞移動および毛細血管の芽の形成を、ヒトモデルにおけるフィブリンゲルとI型コラーゲンゲル中で同定した。

図1A~1Cは、いくつかの態様に従い、ヒト微小血管の内皮細胞血管新生の研究を例証したものである。ウシフィブリンゲル中ウシ肺動脈内皮細胞の血管新生の挙動を調査するよう予め設計された、微小担体の*in vitro*での血管新生アッセイを、ヒト微小血管の内皮細胞血管新生の研究のために修飾した。HDMECを、先に記載したように、ヒト新生児包皮から単離し、使用し、画像を、様々な倍率で取得した。ここで、血管新生の発芽に

対する血管新生因子の効果を、毛細血管の芽を有するECビーズの数とパーセントとを計算することによって視覚的に定量化した。

【0091】

図1Aは、ステップIのプロセスを示す。ここで、予め記載したとりに単離されたヒトフィブリノーゲンを、 1 mg/ml の濃度でM199培地中に溶解し($\text{pH } 7.4$)、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ミクロンフィルターを通じて濾過により滅菌した。等張の 1.5 mg/ml コラーゲン溶液を、滅菌したネイティブウシI&III型コラーゲン(Vitrogen, Collagen Bio materials, Palo Alto, CA)を5X M199培地と蒸留水との中に混合することによって調製した。 pH を、 1 N のNaOHを使用して 7.4 に調整した。

【0092】

図1Aはまた、ステップIIのプロセスも示す。ここで、ある実験において、VEGF、VEGF-C、bFGFまたはPDGF-BB等の成長因子を、フィブリノーゲンとコラーゲンとの溶液に加えた。

【0093】

RGDペプチドを使用する実験において、初めにECビーズを、様々な濃度のペプチドと1時間インキュベートし、次に、ECM溶液を加えた。その後、約500個のECビーズを、ECMタンパク質溶液に加えた後、 0.5 U/ml のヒトトロンビンを加えた。各懸濁液の 0.3 ml アリコートをし、24ウェル組織培養プレートの適切なウェルにすぐに加えた。ゲル化後、 1 ml の新鮮なアッセイ培地(HDMEC用に20%の正常ヒト血清で補充したEBMまたはBAEC用に10%のウシ胎仔血清で補充したEBM)を各ウェルに加えた。

【0094】

図1Bおよび1Cは、どのようにして血管新生応答を視覚的にモニターし、ビデオ画像取得により記録したかを示す。具体的には、毛細血管の芽の形成を、NIKON NP-2サーモスタットおよびSheldon #2004二酸化炭素フローミキサーを収容するインキュベーターを備えたNIKON Diaphot-TMD倒立顕微鏡(Nikon Inc., Melville, NY)を用いて観察、記録した。顕微鏡を、Macintosh G3コンピュータと連結したDage-MTI CCD-72SビデオカメラおよびSony 12" PVM-122ビデオモニターからなるビデオシステムに直接接続した。画像を、Adobe Photoshopを使用して様々な倍率で取得した。血管新生の発芽に対する血管新生因子の効果を、毛細血管の芽を有するECビーズの数とパーセントを決定することにより、視覚的に定量化した。3通りのウェルの夫々における100~200個のビーズ(5つのランダムな低拡大視野)を、各実験条件で計算した。全ての実験は、少なくとも3回繰り返した。図1Bは、抗血管新生因子を使用して血管新生の発芽が存在しないことを示し、図1Cは、血管新生因子を使用して血管新生の発芽が存在することを示す。

【0095】

図2A~2Fは、いくつかの態様に従い、VEGF(100 ng/ml)により刺激されたフィブリン中のHDMECによる血管新生の発芽および毛細管様構造の形成を示す。図2Aは、血管新生因子を加えない対照フィブリンゲル中で何が起きたかを例証したものである。ここで、芽の形成は、48hr後でも有意に生じなかった。図2Bは、VEGFの存在下、HDMECが、48hr以内に、血管新生の発芽を形成し、フィブリンゲル中に浸潤、移動したことを例証したものである。図2Cは、5日までに、VEGFで刺激されたHDMECが、フィブリンゲル中で分岐した毛細管様構造を形成したことを示す。図2Dは、VEGFを有するフィブリン中のHDMECが、局所的な毛細血管のアーケードおよび網目構造を5日間で形成したことを示す。図2Eは、VEGFを有するフィブリン中のHDMECが、非制御の毛細管網目構造を5日間で形成したことを示す。図2Fは、より高い倍率の典型的な毛細管網目構造であるが、網目構造が、隣接するビーズから毛細管が分岐し融合した結果として形成されたことを例証したものである。a)およびb)が100x、c)およびd)が400xの倍率。

【0096】

図3A~3Dは、いくつかの態様に従い、核染色による毛細管様構造における複数の細

10

20

30

40

50

胞の存在および共焦点顕微鏡解析により実証された管腔の存在を示す。図3Aは、HDM ECが、100 ng/mlのVEGFの存在下、5日後、フィブリンゲル中の伸長し分歧した毛細血管の芽を形成したことを示す。図3Bにおいて、A)における培養物を固定し、ヨウ化プロピジウム(PI)により染色し、核を明らかにした。図3Cは、100 ng/mlのVEGFを有するフィブリン中のHDM ECにより形成された典型的な毛細管様構造の位相差顕微鏡写真を示す。図3Dは、コンピュータ処理の撮像による反射的な(reflective)共焦点顕微鏡により得られた、毛細管様構造の接線方向に切断した、一連の隣接する1ミクロン厚の切片を示し、初めに管の上端(0~3ミクロン)、次に2つの壁の間の中央管腔(8~19ミクロン)の存在を明らかにした。a)およびb)が100x、c)およびd)が400xの倍率。

10

【0097】

図4は、いくつかの態様に従い、フィブリン中のHDM ECの血管新生の発芽に対するGPENGRGDSPCAペプチド[RGD(VN)]の効果をグラフ描画する。GPENGRGDSPCA(配列番号5)は、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)の特異的なアンタゴニストである。微小担体ビーズ上で培養されたHDM ECを、様々な用量のRGD[VN](12.5 mM~100 mM)ペプチドとともにRTで1hrインキュベートした。ECビーズを、VEGF(100 ng/ml)が存在するフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンを用いて重合させた。RGD[VN]は、対照ペプチドであるGRGES P[RG E](配列番号6)と比較して、フィブリン中のHDM ECの血管新生の発芽を有意に阻害した。

20

【0098】

図5は、いくつかの態様に従い、フィブリン中のHDM ECの血管新生の発芽に対するVLO4ディスインテグリンの効果をグラフ描画したものである。微小担体ビーズ上で培養したHDM ECを、様々な用量のVLO4(0.3 μg/ml~3 μg/ml)とともにRTで30分間インキュベートした。ECビーズを、VEGF(100 ng/ml)が存在するフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンにより重合させた。VLO4は、フィブリン中VEGFにより誘導されたHDM ECの血管新生の発芽を、用量依存的に阻害した。

【0099】

図6A~6Dは、いくつかの態様に従い、フィブリン中のHDM ECの血管新生の発芽に対するVLO4ディスインテグリンの効果を例証する顕微鏡写真を示す。微小担体ビーズ上で培養したHDM ECを、様々な用量のVLO4(図6A~6Dの夫々が0.01 μg/ml、0.1 μg/ml、0.3 μg/mlおよび1 μg/ml)とともに室温で30分間インキュベートした。ECビーズを、VEGF(100 ng/ml)が存在するフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンにより重合させた。VLO4は、フィブリン中VEGFにより誘導されたHDM ECの血管新生の発芽を、用量依存的に阻害した。

30

【0100】

図7Aおよび7Bは、いくつかの態様に従い、VLO4ディスインテグリンが、フィブリン中のHDM ECの新たに形成された血管新生の発芽をどのように妨害するかの顕微鏡写真を示す。微小担体ビーズ上で培養されたHDM ECを、VEGF(30 ng/ml)、bFGF(25 ng/ml)およびヘパリン様多糖CH2(10 μg/ml)と、様々な用量のVLO4(0.01 μg/ml~1 μg/ml)と混合した。ECビーズをフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンを用いて重合させた。図7Aは、HDM ECが、5日後に、フィブリン中、広範囲に及ぶ毛細血管の芽を形成したことを示す。図7Bは、VLO4(3 μg/ml)を5日目にシステム中へ加えたところ、それが、24時間以内に新たに形成された血管新生の発芽を完全に破壊したことを示す。

40

【0101】

図8A~8Dは、VLO4ディスインテグリン(インテグリンアルファ5ベータ1を遮断する)およびVP12ディスインテグリン(ECL12、インテグリンアルファ2ベータ

50

タ1を遮断する)が、いくつかの態様に従い、フィブリン中のHDMECの血管新生の発芽をどのようにして相乗的に阻害したかを示す顕微鏡写真である。微小担体ビーズ上で培養されたHDMECを、VEGF(30 ng/ml)と、bFGF(25 ng/ml)と、VLO4(0.01 µg/ml)の有無と、および/または、VP12(10 µg/ml)と、混合した。ECビーズをフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンを用いて重合させた。図8Aは、HDMECが、フィブリン中、VEGFおよびbFGFにより誘導された広範囲に及ぶHDMECの毛細管の芽を、3日後に形成したことを示す。図8Bは、低用量のVLO4(0.01 µg/ml)が、HDMECの血管新生の発芽を有意には阻害しなかったことを示す。図8Cは、VP12(10 µg/ml)が血管新生の発芽を有意には阻害しなかったことを示す。図8Dは、VLO4とVP12との組み合わせが、VEGFおよびbFGFにより誘導されたフィブリン中の血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す。

10

【0102】

図9A~9Dは、VLO4ディスインテグリン(インテグリンアルファ5ベータ1を遮断する)およびインテグリンアルファ2ベータ1を遮断する抗体が、いくつかの態様に従い、フィブリン中のHDMECの血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す顕微鏡写真である。微小担体ビーズ上で培養されたHDMECを、VEGF(30 ng/ml)と、bFGF(25 ng/ml)と、VLO4(0.01 µg/ml)の有無と、および/または、インテグリンアルファ2ベータ1遮断抗体(5 µg/ml)と、混合した。ECビーズをフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンにより重合させた。図9Aは、HDMECが、フィブリン中、VEGFおよびbFGFにより誘導されたHDMECの広範囲に及ぶ毛細血管の芽を形成したことを示す。図9Bは、低用量のVLO4(0.01 µg/ml)が、HDMECの血管新生の発芽を有意には阻害しなかったことを示す。図9Cは、インテグリンアルファ2ベータ1遮断抗体が、血管新生の発芽を有意には阻害しなかったことを示す。図9Dは、VLO4とインテグリンアルファ2ベータ1遮断抗体との組み合わせが、VEGFおよびbFGFにより誘導されたフィブリン中の血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す。

20

【0103】

図10A~10Dは、エキスタチン(インテグリンアルファvベータ3を遮断する)およびVP12ディスインテグリン(EC12、インテグリンアルファ2ベータ1を遮断する)が、いくつかの態様に従い、フィブリン中のHDMECの血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す顕微鏡写真である。微小担体ビーズ上で培養されたHDMECを、VEGF(30 ng/ml)と、bFGF(25 ng/ml)と、エキスタチン(0.1 µg/ml)の有無と、および/または、VP12(10 µg/ml)と、混合した。ECビーズをフィブリノーゲン溶液に加え、その後、トロンピンにより重合させた。図10Aは、HDMECが、3日後に、フィブリン中、VEGFおよびbFGFにより誘導されたHDMECの広範囲に及ぶ毛細血管の芽を形成したことを示す。図10Bは、低用量のエキスタチン(0.1 µg/ml)が、HDMECの血管新生の発芽を有意には阻害しなかったことを示す。図10Cは、VP12(10 µg/ml)が、血管新生の発芽を有意には阻害しなかったことを示す。図10Dは、エキスタチンとVP12との組み合わせが、VEGFおよびbFGFにより誘導されたフィブリン中の血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す。

30

40

【0104】

例3. HT1080腫瘍モデルの解析

図11は、VLO4(3 µg/ml)が、いくつかの態様に従い、どのようにして収縮したコラーゲンからフィブリン3Dマトリックス中へのHT1080腫瘍細胞浸潤を有意に阻害するかをグラフ描画したものである。VLO4は、収縮した3Dコラーゲンマトリックスから3Dフィブリンマトリックス中へのHT1080腫瘍細胞浸潤を、用量依存的に阻害する。

【0105】

50

図12は、VP12 (3 µg/ml、ECL12 インテグリンアルファ2ベータ1を遮断する)、VLO4 (3 µg/ml、インテグリン アルファ5ベータ1を遮断する) およびエキスタチン (3 µg/ml) が、いくつかの態様に従い、どのようにして収縮したコラーゲンからフィブリン3Dマトリックス中へのHT1080腫瘍細胞浸潤を阻害するかをグラフ描画したものである。それは、インテグリンアルファvベータ3、インテグリン アルファ2ベータ1およびインテグリンアルファ5ベータ1が全て腫瘍浸潤において重要な役割を果たすことを示す。

【0106】

図13は、VLO4が、いくつかの態様に従い、どのようにしてH1650 (ヒト転移性肺がん細胞株) およびA549 (ヒト肺胞性腺がん細胞株) の腫瘍細胞増殖を有意に阻害したかをグラフ描画したものである。それは、VLO4が腫瘍浸潤のみならず、腫瘍細胞増殖も阻害することを示す。

10

【0107】

例4. フィブリンおよびコラーゲンの受容体は、血管新生を相乗的に調節する。

我々は、インテグリン 1発現が、in vitroおよびin vivoにおいて、コラーゲンリッチではなく、フィブリンリッチなマトリックス環境において高度に上方調節されることを、示した。先に記載した3DのHDMECモデルを、VLO4およびVP12 (ECL12) の2種のディスインテグリンを使用する併用治療を実証するこの実験において使用した。

【0108】

20

ディスインテグリンは、マムシ毒から単離されたインテグリン 1および 3のインヒビタータンパク質の新規ファミリーを代表するものである。それらは、Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を含む低分子量のシステインリッチなペプチドである。それらは、インテグリン機能の、知られている最も強力なインヒビターである。ディスインテグリンは、黒色腫細胞および線維芽細胞のフィブロネクチンへの接着を含む細胞外マトリックスへの細胞接着を妨げ、血小板凝集の強力なインヒビターである。

【0109】

VLO4は、*Vipera lebetina obtusa*の毒に由来する。それは、強力で不可逆的な 51インテグリンアンタゴニストである。下記構造は、代表的なVLO4であって、65アミノ酸構造である：

30

【数1】

PE-VLO4

```

1   5   10   15   20   25   30   35   40   45   50   55   60   65
MNSGNPCCDPVTCKPRRGEHCVSGPCCRNCKFLNAGTICKRARGDDMNDYCTGISPDGPRNPWKG
|----- N末端 -----|
|----- C末端 -----|

```

(配列番号1)

【0110】

VLO4は、Sigma-aldrichに依頼することができる。CAS No. 105718を参照。また、Calvete, J. Biochem. J. 372:725-734(2003) (その全体を参照により本明細書に組み込む) も参照。

40

【0111】

*Vipera palestinae*毒から単離されたVP12 (ECL12) (*Vipera palestinae*毒またはVP12) は、コラーゲン受容体 2 1インテグリンに対して強力な阻害活性を示した。構造的には、VP12は、ヘテロ二量体性C-レクチン型タンパク質とのアミノ酸配列相同性を示すVP12AおよびVP12Bの2種のサブユニットからなる。Sigma Aldrichは、カタログno. V0628の下、*Vipera palestinae*毒を売っており、この例で使用した組成物は、Dr. Cezary Marcinkiewicz, Biotechnology Center, Temple University College of Science and Technology, Philadelphia, PA 19122から有難く頂いた。Cance

50

r Biol Ther. 8(15):1507-16(2009) (その全体を参照により本明細書に組み込む)を参照。

【数 2】

| | | | | | | | |
|---|--|-----|----|----|-----|-----|----|
| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 49 | |
| VP12A | DQDCLPGWSFYEGNCYKAFDEPKSWVDAEKFCQKQSNKGHLASIEGLGK | | | | | | |
| VP12B | DQDCLPGWSYFEKYCYKVFQVKKNWEDA EKFC TEEVKDGHLSLH-SNE | | | | | | |
| 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 109 | 10 |
| ANFVAKLVSEDDQSETLREPQIHVWIGLRDQSERQOCSSH-WTDGSAVSVEXXXXXXXXXXXXXX | | | | | | | |
| EVEF---MTSL-AFPILKYD-I-VVMGLRNFW--RDCP-WKWSDDAKLDYKAWSDEP--NCYG | | | | | | | |
| 110 | 120 | 130 | | | | | |
| XXXXXXXXXXXXXXXXXXGLAYPFICXXXXX(...) (配列番号2) | | | | | | | |
| AM-TTDY-QWLRWNCNDPRYFVCKSPA (配列番号3) | | | | | | | |

(配列番号2)

20

【0112】

VP12 (ECL12) のサブユニットである VP12A および VP12B を示す。ここで、灰色のエリアは、保存アミノ酸を表し、ギャップ (-) は、配列類似性を最大にするために含ませ、X は、VP12A サブユニット中の未同定のアミノ酸を表す。また、Staniszewska, I. Cancer Biology & Therapy 8(15):1507-1516(2009) (その全体を参照により本明細書に組み込む) も参照。

【0113】

図7A~7Dは、いくつかの態様に従い、v3 アンタゴニストであるエキスタチンを21 アンタゴニストである VP12 (ECL12) と組み合わせた場合に、血管新生の発芽を相乗的に阻害したことを示す。図7Aは、VEGF および bFGF 中の HDM EC 培養における血管新生の発芽を示す。図7Bは、エキスタチンを図7Aの培養物へ加えた場合に血管新生の発芽が阻害されたことを示す。図7Cは、VP12 (ECL12) を図7Aの培養物へ加えた場合に血管新生の発芽が阻害されたことを示す。また一方で、図7Dは、エキスタチンと VP12 (ECL12) の両方を、図7Aの培養物へ加えた場合に、血管新生の発芽が相乗的に阻害されたことを示す。

30

【0114】

エキスタチンは、v3 に対する特異的なディスインテグリンであって、フィブリン中の HDM EC の血管新生の発芽を用量依存的に阻害する。一方、VP12 (ECL12) は、コラーゲン受容体インテグリン21 に対するディスインテグリンインヒターであるが、in vitroでの血管新生の発芽に対する阻害効果はない。しかしながら、驚くべきことに、この例は、VP12 (ECL12) が、エキスタチンと組み合わせて投与した場合、エキスタチンによる血管新生の発芽の阻害を、いかに有意に、かつ相乗的に高めたかを例証するものである。エキスタチン (ディスインテグリンエキスタチン-アルファまたはカリナチン (Carinatin)) は、Echis carinatus (ソー・スケールド・バイパー (Saw-scaled viper)) の毒に由来する。それは、破骨細胞の骨への付着を破壊し、骨再吸収を阻害し、糖タンパク質IIb / IIIa (GpIIb / IIIa、IIb3) 受容体の阻害を介して、ADPに誘導される血小板凝集を防ぐ、強力で不可逆的なv3 インテグリンアンタゴニストである。エキスタチンは、糖タンパク質IIb - IIIa複合体上に発現した血小板受容体とのフィブリノーゲン相互作用を阻害し、血小板表面上の糖タンパク質IIb - IIIa受容体に結合することによって作用し、ADP、トロンビン、

40

50

血小板活性化因子およびコラーゲンにより誘導される凝集を阻害する。下記構造は、代表的なエキスタチンであって、エキスタチンの49アミノ酸構造である：

【数3】

1 10 20 30 40 49

QCESGPCCRN CKFLKEGTIC KRARGDDMDD YCNGKTCDCP RNPHKGPAT

(配列番号4)

【0115】

10

エキスタチンは、例えばSigma-aldrichから市販されている。CAS Nos. 129038-42-2 および 154303-05-6を参照。また、Calvete, J. Biochem. J. 372:725-734(2003) (その全体を参照により本明細書に組み込む) も参照。

【図1】

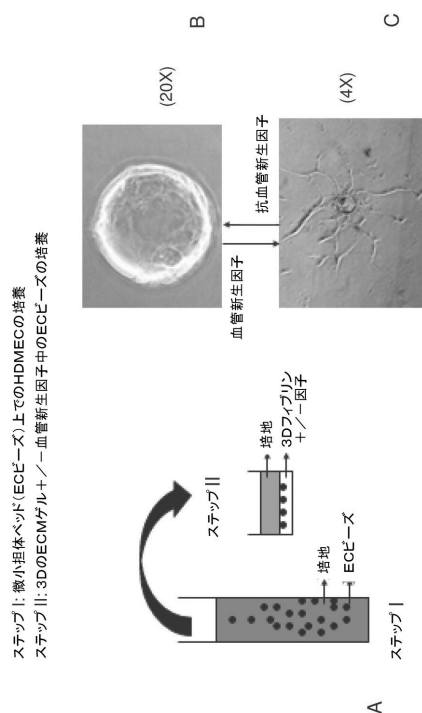


図1

【図2】

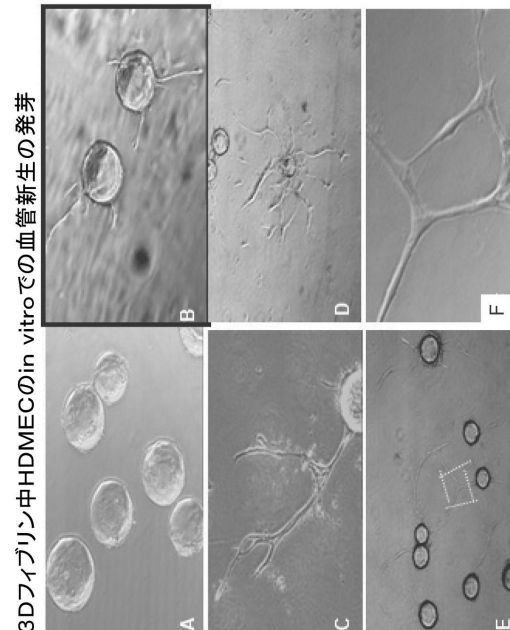
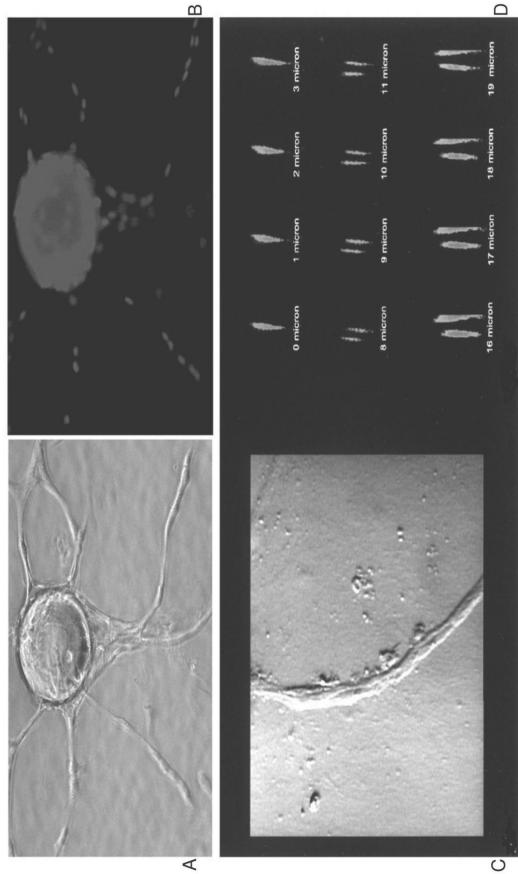


図2

【図 3】



【図 4】

図 3

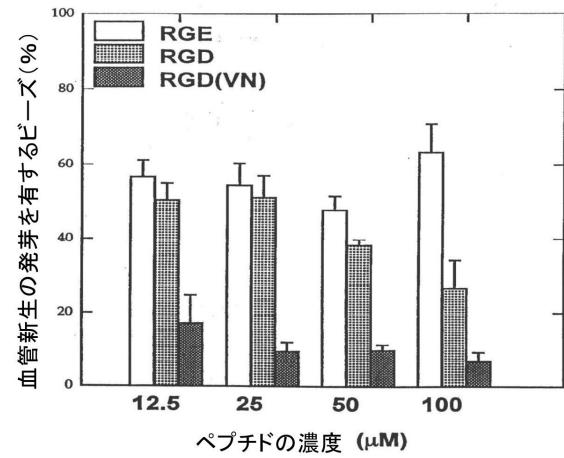


図 4

【図 5】

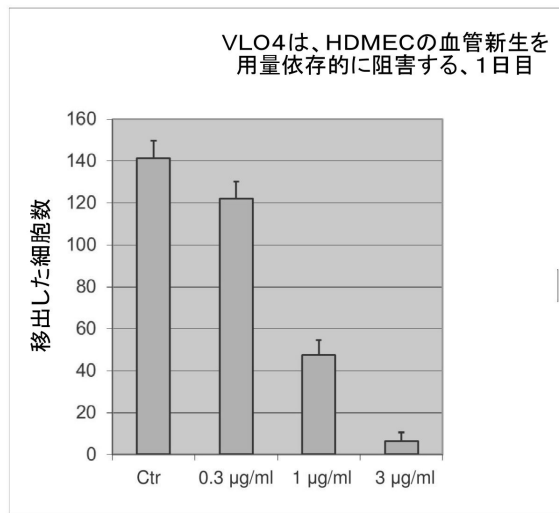


図 5

【図 6】

ディスインテグリンVLO4は、血管新生を用量依的に阻害する、48時間、5×

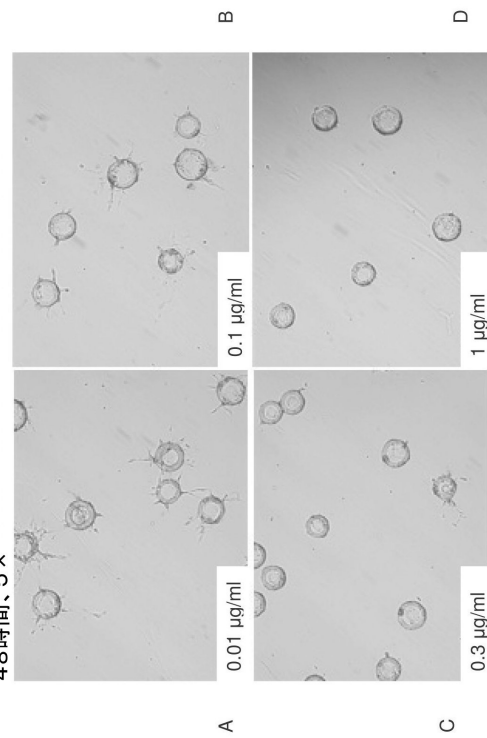
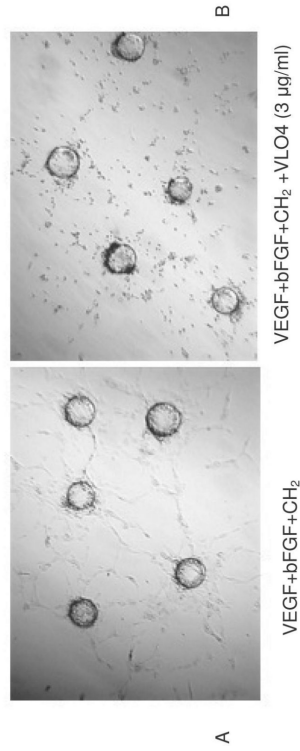


図 6

【 図 7 】

ディスインテグリンVLO4(インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を遮断する)は、VEGF+bFGF+CH2により誘導される血管新生の毛細管網目構造を破壊する



【 図 8 】

血管新生の阻害におけるECL12とVLO4との間のクロストーク

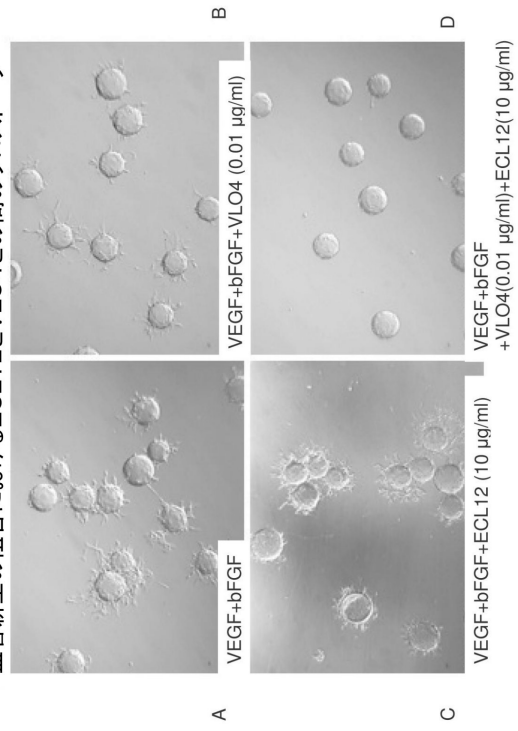


図 8

【 図 9 】

インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ および $\alpha 2 \beta 1$ の相乗効果

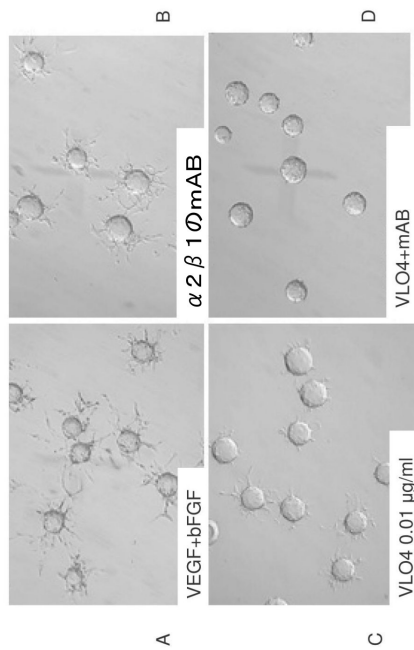


図 9

【 図 10 】

血管新生の阻害におけるECL12とエキスタチンとの間のクロストーク

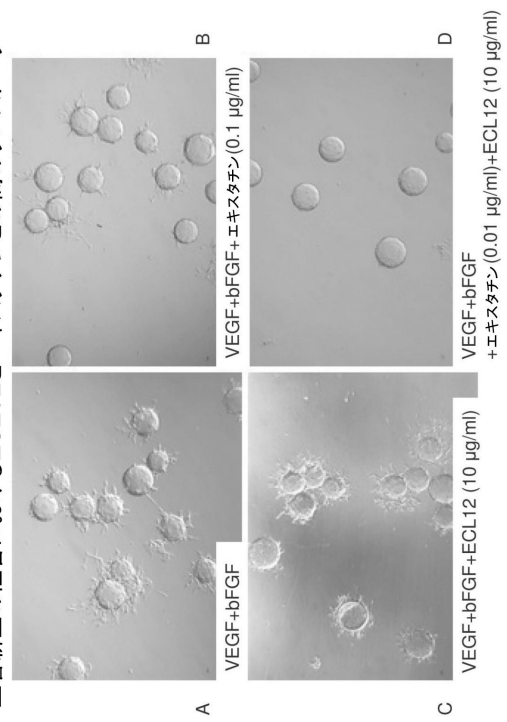


図 10

【図 1 1】

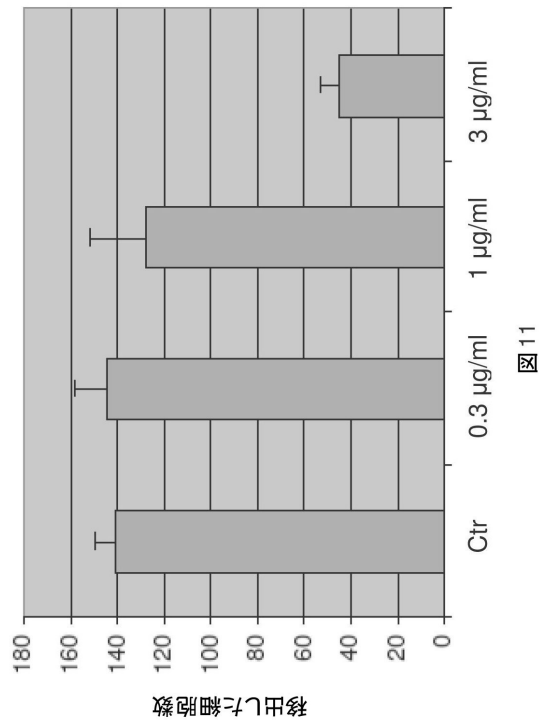


図 11

【図 1 2】

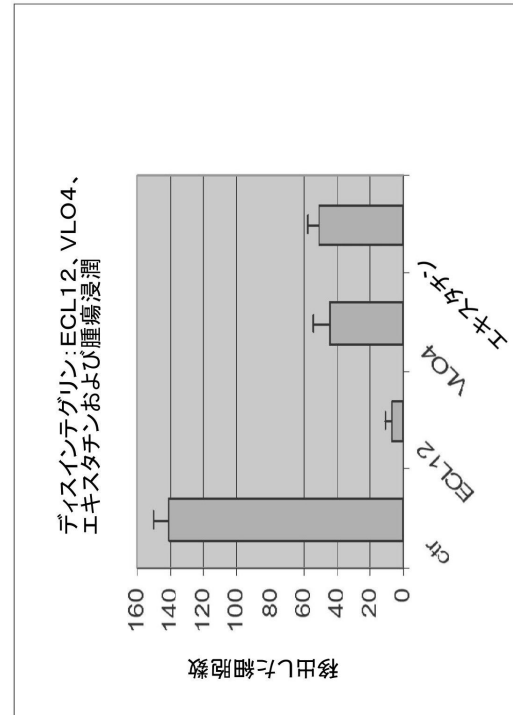


図 12

【図 1 3】

細胞死滅%

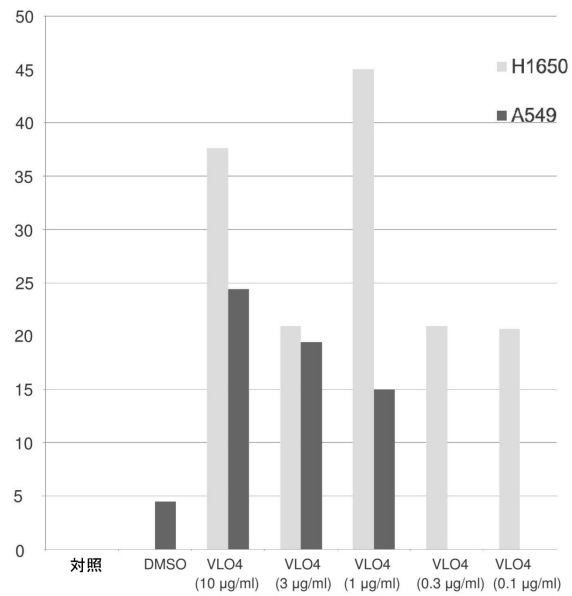


図 13

【配列表】

0006224615000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 フェン, シャオドン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95608 カーマイケル、 グラント アベニュー 60
41

審査官 上條 肇

(56)参考文献 特表2002-514605(JP, A)

特表2008-542445(JP, A)

Biochem J., 2003年, Vol.372, No.2, p.725-734

Nuclear Medicine and Biology, 2007年, Vol.34, No.4, p.371-381

Cancer Biology & Therapy, 2009年, Vol.8, No.15, p.1507-1516

Toxicon, 2012年, Vol.60, No.4, p.512-519

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 45/00 - 45/08

A61K 38/00 - 38/58

A61K 39/00 - 39/44

A61P 35/00 - 35/04

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d