

(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2012-17331

(P2012-17331A)

(43) 公開日 平成24年1月26日(2012.1.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 6
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 H O 4 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 83 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-175420 (P2011-175420)	(71) 出願人	509012625
(22) 出願日	平成23年8月10日 (2011. 8. 10)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2007-522697 (P2007-522697) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ ス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
原出願日	平成17年7月19日 (2005. 7. 19)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/589, 782		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成16年7月20日 (2004. 7. 20)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンジオポエチン様4タンパク質のインヒビター、組み合わせ、およびそれらの使用

(57) 【要約】

【課題】 アンジオポエチン様4タンパク質のモジュレーター、ならびに疾患および病的状態の治療でのその使用方法を提供すること。

【解決手段】 A N G P T L 4 アンタゴニストと他の治療薬（例えば、抗癌薬）との組み合わせ、癌に感受性を示すかまたは癌と診断された哺乳動物、あるいは腫瘍成長が再発したかまたは癌細胞増殖が再発した哺乳動物の治療におけるその使用方法も提供する。また、A N G P T L 4 のインヒビターと血管形成のインヒビターとの組み合わせ、ならびに癌成長および／または血管形成に關与する障害を阻害するためのこのような組み合わせの使用方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

本出願は、第 119 条 (e) 項の下、2004 年 7 月 20 日出願の米国特許仮出願番号 60/589,782 号（その全体が本明細書中で参考として援用される）の優先権を主張する。

10

【0002】

発明の分野

本発明は、一般に、ヒトの疾患および病的状態（癌など）の治療に関する。本発明は、アンジオポエチン様 4 タンパク質（ANGPTL4）のインヒビター、ANGPTL4 のインヒビターと他の治療薬との組み合わせ、ならびに疾患または病的状態の診断および治療のためのこのような組成物の使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

癌は米国における主な死亡原因である。癌の治療のために種々の療法が使用されている。例えば、癌組織または死滅した組織を除去するために外科的方法が使用されている。充実性腫瘍の萎縮によって作用する放射線療法および急速に分化する細胞を死滅させる化学療法が癌治療として使用されている。

20

【0004】

1971 年に、Folkman は、抗血管形成が有効な抗癌ストラテジーであり得ることを提唱した。非特許文献 1。血管形成は、既存の血管および／または循環内皮幹細胞からの新規の血管系の発達である（例えば、非特許文献 2 を参照のこと）。血管形成は、1) プロテアーゼ放出後の局所細静脈（local venue）の細胞外基質の分解、2) 毛細管内皮細胞の増殖、および 3) 血管形成刺激への毛細管の移動からなる過程のカスケードである。非特許文献 3。

30

【0005】

新規の血管の成長は、胎児および生後発育（例えば、胚形成）、創傷治癒、および月経の正常な生理学的過程における必要条件である。例えば、非特許文献 4 を参照のこと。既存の毛細管からの新規の血管のこのような増殖は、さらに、種々の障害（腫瘍、増殖性網膜症、加齢黄斑変性、乾癬、炎症、糖尿病、および関節リウマチ（RA）が含まれるが、これらに限定されない）の病理学的発症における重要な役割を果たす。例えば、非特許文献 5 を参照のこと。

【0006】

血管形成の顕著な生理学的および病理学的重要性を考慮して、この過程を調節することができる因子を解明するために非常に多くの研究が行われてきた。血管形成過程が血管形成促進性（proangiogenic）分子と抗血管形成分子との間のバランスによって調節され、このバランスが種々の疾患（詳細には、癌）で狂わされることが示唆されている。例えば、非特許文献 6 を参照のこと。

40

【0007】

例えば、血管形成は、血管内皮増殖因子 A（VEGF、血管透過性因子（VPF）としても公知）および線維芽細胞増殖因子（FGF）のような分泌因子に依存する。例えば、非特許文献 7 および非特許文献 8 を参照のこと。血管形成および脈管形成における血管形成因子であることに加えて、多面性成長因子としての VEGF は、他の生理学的過程において複数の生物学的作用（内皮細胞の生存、血管透過性および血管拡張、単球走化性、ならびにカルシウム流入など）を示す。非特許文献 7。さらに、研究によって、いくつかの

50

非内皮細胞型（網膜色素上皮細胞、膀胱細胞、およびシュワン細胞など）に対する VEGF の分裂促進効果が報告されている。例えば、非特許文献 9；非特許文献 10；および非特許文献 11 を参照のこと。

【0008】

VEGF は、胎盤増殖因子（PlGF）、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D および VEGF-E が含まれる遺伝子ファミリーである。これらのリガンドは、内皮細胞上で発現したチロシンキナーゼ受容体に結合し、連結する。例えば、VEGF チロシンキナーゼ受容体ファミリーには、Flt1（VEGF-R1）（リガンド VEGF、VEGF-B、および PlGF に結合する）、Flk1/KDR（VEGF-R2）（VEGF、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E に結合する）、および Flt4（VEGF-R3）（VEGF-C および VEGF-D に結合する）が含まれる。例えば、非特許文献 12；および非特許文献 13 を参照のこと。

【0009】

アンジオポエチンは、血管内皮の別の増殖因子群である。例えば、非特許文献 14；非特許文献 15；非特許文献 16；および非特許文献 17 を参照のこと。アンジオポエチンは、VEGF と相補的且つ調和的な様式で作用するようであり、VEGF は、血管成長において作用する一方で、アンジオポエチンは、血管系の再造形、成熟、および安定化の調整によって作用する可能性が最も高い。例えば、非特許文献 18 を参照のこと。アンジオポエチン 1、アンジオポエチン 2、アンジオポエチン 3、およびアンジオポエチン 4 は、内皮細胞上で見出される受容体であるチロシンキナーゼ Tie2（Tek としても公知）受容体に結合する。例えば、非特許文献 19 を参照のこと。Tie1 オーファン受容体も存在する。

【0010】

血管形成は、増殖因子に依存するだけでなく、細胞外基質内に存在するそのリガンドと結合する細胞接着分子（CAM）（インテグリンが含まれる）にも影響を受ける。例えば、非特許文献 2；および非特許文献 20 を参照のこと。インテグリンは、細胞間隙および基底膜中に見出される細胞外基質タンパク質への細胞接着および移動を容易にする。細胞接着タンパク質のインテグリンファミリーは、少なくとも $22\alpha\beta$ ヘテロ二量体組み合わせ中で発現する少なくとも 18α および 8β サブユニットから構成される。例えば、非特許文献 21；および非特許文献 22 を参照のこと。これらのうちで、少なくとも 6 つ（ $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_1$ 、および $\alpha_1\beta_1$ ）の組み合わせが、血管形成に関与する（例えば、非特許文献 23；および非特許文献 24 を参照のこと）。特異的接着受容体の種々の遺伝子の不活化または動物モデルへの遮断抗体の投与により、内皮細胞の血管形成応答に顕著な効果があった。例えば、非特許文献 25 を参照のこと。

【0011】

これらの分子は、癌療法の標的であった。例えば、病的状態における血管形成の主な調節因子として VEGF が認識されることにより、VEGF 活性を遮断する試みが数え切れないほど行われている。阻害抗 VEGF 受容体抗体、可溶性受容体構築物、アンチセンスストラテジー、VEGF に対する RNA アプタマー、および低分子量の VEGF 受容体チロシンキナーゼ（RTK）インヒビターは全て、VEGF シグナル伝達の妨害における使用が提案されている。例えば、非特許文献 26 を参照のこと。抗 VEGF 中和抗体は、ヌードマウスにおいて種々のヒト腫瘍細胞株の増殖を抑制し（非特許文献 27；非特許文献 28；非特許文献 29；および非特許文献 30）、虚血性網膜障害モデルにおいて眼内血管形成も阻害する（非特許文献 31）ことが示されている。実際、ヒト化抗 VEGF 抗体である ババシズマブ（AVASTIN（登録商標）、Genentech）は、転移性結腸直腸癌の一次療法として米国 FDA で承認されている。例えば、非特許文献 32 を参照のこと。

【0012】

しかし、現在の癌治療方法は常に最適というわけではない。しばしば、単一治療型では病的状態を完全に抑制することができない。例えば、外科的手順は、しばしば、全ての癌

10

20

30

40

50

成長を除去することができない。他の癌治療（化学療法など）は数え切れないほど副作用が生じ、そして／または治療が無効になる（例えば、癌が薬物または治療に耐性を示すため）。VEGFもしくはVEGR受容体またはTie2受容体系の阻害では、時折、腫瘍成長が完全に抑制されなかった。例えば、非特許文献33；非特許文献32；非特許文献34；非特許文献27；非特許文献35；非特許文献36；非特許文献37；非特許文献28；非特許文献38；非特許文献39；非特許文献40；非特許文献41；非特許文献42；非特許文献43；および非特許文献44を参照のこと。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0013】

10

【非特許文献1】Folkman, N. Engl. J. Med. 285, 1182-1186 (1971)

【非特許文献2】Ferrara & Allitalo, Nature Medicine 5 (12) 1359-1364 (1999)

【非特許文献3】Ferrara et al., Endocrine Rev. 13: 18-32 (1992)

【非特許文献4】Folkman and Klagsbrun, Science 235: 442-447 (1987)

【非特許文献5】Ferrara, Recent Prog. Horm. Res. 55: 15-35 (2000), discussion 35-6

20

【非特許文献6】Carmeliet and Jain, Nature 407: 249-257 (2000)

【非特許文献7】Ferrara and Davis-Smyth, Endocrine Rev. 18: 4-25 (1997)

【非特許文献8】Ferrara J. Mol. Med. 77: 527-543 (1999)

【非特許文献9】Guerrin et al., J. Cell Physiol. 164: 385-394 (1995)

【非特許文献10】Obergh-Welsh et al., Mol. Cell. Endocrinol. 126: 125-132 (1997)

30

【非特許文献11】Sondell et al., J. Neurosci. 19: 5731-5740 (1999)

【非特許文献12】Ferrara et al., Nature Medicine 9 (6): 669-676 (2003)

【非特許文献13】Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 114 (5): 853-65 (2001)

【非特許文献14】Davis et al., Cell, 87: 1161-1169 (1996)

【非特許文献15】Suri et al., Cell, 87: 1171-1180 (1996)

40

【非特許文献16】Maisonpierre et al., Science 277: 55-60 (1997)

【非特許文献17】Valenzuela et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1904-1909 (1999)

【非特許文献18】Holash et al., Oncogene 18: 5356-5362 (1999)

【非特許文献19】Ward & Dumont, Seminars in Cell & Developmental Biology, 13: 19-27 (2002)

【非特許文献20】Carmeliet, Nature Medicine, 6 (3): 389-395 (2000)

50

【非特許文献21】Byzova et al., Mol. Cell., 6 (4) : 851-860 (2000)

【非特許文献22】Hood and Cheresch, Nature Reviews, 2 : 91-99 (2002)

【非特許文献23】Hynes and Bader, Thromb. Haemost., 78 (1) : 83-87 (1997)

【非特許文献24】Hynes et al., Braz. J. Med. Biol. Res., 32 (5) : 501-510 (1999)

【非特許文献25】Elicieri and Cheresch, Mol. Med., 4 : 741-750 (1998)

【非特許文献26】Siemeister et al., Cancer Metastasis Rev. 17 : 241-248 (1998)

【非特許文献27】Kim et al., Nature 362 : 841-844 (1993)

【非特許文献28】Warren et al., J. Clin. Invest. 95 : 1789-1797 (1995)

【非特許文献29】Borgstroem et al., Cancer Res. 56 : 4032-4039 (1996)

【非特許文献30】Melnik et al., Cancer Res. 56 : 921-924 (1996)

【非特許文献31】Adamis et al., Arch. Ophthalmol. 114 : 66-71 (1996)

【非特許文献32】Ferrara et al., Nature Reviews Drug Discovery, 3 : 391-400 (2004)

【非特許文献33】Gerber et al., Cancer Research, 60 : 6253-6258 (2000)

【非特許文献34】Millaue et al., Nature 367, 576-579 (1994)

【非特許文献35】Millaue et al., Cancer Res. 56 : 1615-1620 (1996)

【非特許文献36】Goldman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 8795-8800 (1998)

【非特許文献37】Asano et al., Cancer Research, 55 : 5296-5301 (1995)

【非特許文献38】Fong et al., Cancer Res. 59 : 99-106 (1999)

【非特許文献39】Wedge et al., Cancer Res. 60 : 970-975 (2000)

【非特許文献40】Wood et al., Cancer Res. 60 : 2178-2189 (2000)

【非特許文献41】Siemeister et al., Cancer Res. 59 : 3185-3191 (1999)

【非特許文献42】Lin et al., J. Clin. Invest. 103 : 159-165 (1999)

【非特許文献43】Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 8829-8834 (1998)

【非特許文献44】Siemeister et al., Cancer Res. 59, 3185-3191, (1999)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0014】

したがって、癌を制御するための新規且つより有効な治療薬が早急に必要である。以下の開示の概説から明らかなように、本発明は、これらおよび他の必要性について取り組んでいる。

【課題を解決するための手段】

【0015】

発明の要旨

本発明は、アンジオポエチン様4タンパク質(ANGPTL4)のインヒビターならびに疾患および病的状態を治療する(例えば、腫瘍成長または癌細胞増殖を遮断するかまたは減少させるか、腫瘍成長の再発を遮断するかまたは減少させるなど)ためのこのようなインヒビターの使用方法に関する。本発明は、ANGPTL4のインヒビターと抗癌薬との組み合わせおよび腫瘍成長を阻害するためのこのような組み合わせの使用方法を提供する。本発明はまた、ANGPTL4のインヒビターと血管形成のインヒビターとの組み合わせならびに癌成長および/または血管形成に關与する障害(例えば、新生物障害(例えば、腫瘍成長)および非新生物障害)を阻害するためのこのような組み合わせの使用方法を提供する。

【0016】

ANGPTL4のモジュレーター(例えば、ANGPTL4のアンタゴニストまたはアゴニスト)を提供する。本発明のANGPTL4アンタゴニストは、ANGPTL4の活性を阻害または減少させる分子である。ANGPTL4インヒビターには、小分子量の物質、ポリヌクレオチド、アンチセンス分子、RNAアプタマー、ANGPTL4に対するリボザイムまたはその受容体ポリペプチド、ANGPTL4のポリペプチド、アンタゴニスト改変体、ANGPTL4活性を直接または間接的に阻害する単離タンパク質、組換えタンパク質、抗体、またはその複合体もしくは融合タンパク質が含まれ得る。特定の実施形態では、ANGPTL4のアンタゴニストには、ANGPTL4に結合する抗体が含まれる。本発明の特定の実施形態では、アンタゴニストANGPTL4抗体は、ANGPTL4タンパク質の特定の物質または領域(例えば、N末端、N末端コイルドコイル領域、C末端、C末端フィブリノーゲン様領域、またはヒトANGPTL4のANGPTL4(1~183)、ANGPTL4(23~183)、ANGPTL4(1~約162)、ANGPTL4(約162~406)、ANGPTL4(23~406)、またはANGPTL4(184~406)アミノ酸サブシーケンス、および/またはマウスANGPTL4のmANGPTL4(1~183)、mANGPTL4(23~183)、mANGPTL4(1~約165)、mANGPTL4(23~約165)、mANGPTL4(23~410)、もしくはmANGPTL4(184~410)アミノ酸サブシーケンス)への結合によってANGPTL4の活性を阻害または減少させる抗体である。他のサブシーケンスには、例えば、hANGPTL4の40~183、60~183、80~183、100~183、120~183、140~183、40~406、60~406、80~406、100~406、120~406、140~406、および160~406、ならびに、例えば、mANGPTL4の40~183、60~183、80~183、100~183、120~183、140~183、40~410、60~410、80~410、100~410、120~410、140~410、および160~410も含まれるが、これらに限定されない。本発明の特定の実施形態では、ANGPTL4のアンタゴニストには、抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体(例えば、アンタゴニスト抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体)が含まれる。特定の実施形態では、本発明の抗体はヒト化抗体である。本発明の特定の実施形態では、ANGPTL4アンタゴニストは、SiRNA分子である。一実施形態では、SiRNA分子は、ANGPTL4-SiRNA分子であり、この分子は、ANGPTL4をコードする核酸のDNA配列(例えば、GTGGCCAGCCCTGCCCGAAGA)(配列番号3)をターゲティングする。

【0017】

腫瘍成長または癌細胞の増殖を遮断するかまたは減少させる方法を提供する。特定の実

10

20

30

40

50

施形態では、本方法は、有効量のアンジオポエチン様４（ANGPTL４）アンタゴニストを腫瘍または癌細胞に投与する工程を含む。別の実施形態では、ANGPTL４アンタゴニストは、アンタゴニスト抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体である。有効量で腫瘍成長または癌細胞の増殖が遮断または減少する。腫瘍細胞の移動の阻害方法も提供する。例えば、本方法は、有効量のANGPTL４アンタゴニストを腫瘍細胞に投与し、それにより、その移動が阻害される工程を含む。本発明の一実施形態では、ANGPTL４アンタゴニストの投与により、転移が阻害される。

【００１８】

さらなる治療薬（例えば、１つまたは複数の抗癌薬、同一または異なる抗原に対する抗体、１つまたは複数の抗血管形成薬またはインヒビター、鎮痛薬など）を、ANGPTL４アンタゴニストと組み合わせ、そして／または同時に投与することができる。さらなる治療手順（例えば、外科的手順、照射など）を行うか、本発明の方法において、または本発明の組成物と共に腫瘍および／または癌細胞に施すこともできる。本発明はまた、組み合わせ組成物（例えば、抗癌薬（例えば、抗血管形成薬など）、ANGPTL４アンタゴニスト、およびキャリア（例えば、薬学的に受容可能なキャリア）を含む組成物）を提供する。

10

【００１９】

抗癌薬には、例えば、当該分野で公知の抗癌薬および本明細書中に記載の抗癌薬が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、抗癌薬は、１つまたは複数の抗血管形成薬（例えば、VEGFアンタゴニストまたはインヒビターなど）を含む。一実施形態では、VEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体またはその活性フラグメント（例えば、ヒト化A4.6.1、Avastin（登録商標）など）を含む。特定の実施形態では、抗癌薬は、１つまたは複数の化学療法薬を含む。

20

【００２０】

腫瘍成長または癌細胞の増殖が遮断されるかまたは減少する組み合わせ方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、腫瘍または癌細胞に有効量の抗癌薬を投与する工程と、腫瘍または癌細胞に有効量のANGPTL４アンタゴニストを投与する工程とを含む。あるいはまたはさらに、有効量の抗癌薬（例えば、抗血管形成薬など）および有効量のANGPTL４アンタゴニストを含む組み合わせ組成物を投与することができる。有効量の組み合わせにより、腫瘍成長または癌細胞の増殖が遮断されるかまたは減少する。

30

【００２１】

腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を遮断するかまたは減少させる方法も提供する。本発明の特定の実施形態では、被験体は、少なくとも１つの抗癌薬での癌療法を受けていたか同時に受けており、被験体は、有効量のANGPTL４アンタゴニストを投与される。有効量のANGPTL４アンタゴニストの投与により、腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発が遮断されるかまたは減少する。特定の実施形態では、被験体は、ANGPTL４アンタゴニストでの治療を受けていたか同時に受けており、被験体は、有効量の抗癌薬（例えば、抗血管形成薬）を投与され、有効量の抗癌薬の投与により、腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発が遮断されるかまたは減少する。

【００２２】

典型的には、腫瘍および癌細胞は、被験体中に存在する。特定の実施形態では、被験体は、少なくとも１つの抗癌薬での癌療法を同時に受けているか、受ける予定である。典型的には、被験体は、哺乳動物（例えば、ヒト）である。特定の実施形態では、本発明の薬剤を、被験体に投与する。投与または手順工程を、任意の順序で行うことができる。一実施形態では、これらを連続的に行う。別の実施形態では、これらを同時に行う。あるいはまたはさらに、この工程を、連続的および同時の組み合わせとして任意の順序で行うことができる。

40

【００２３】

ANGPTL４モジュレーターのキットも提供する。特定の実施形態では、キットは、ANGPTL４アンタゴニスト、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤、

50

および容器を含む。一実施形態では、キットは、第 1 の量の抗癌薬（例えば、抗血管形成薬など）、第 2 の量の A N G P T L 4 アンタゴニスト、ならびに薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤、および容器を含む。別の実施形態では、キットは、第 1 の投薬形態の一定量の抗癌薬（例えば、抗血管形成薬など）、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤、ならびに第 2 の投薬形態の A N G P T L 4 アンタゴニスト、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤、ならびに容器を含む。その使用説明書も含めることができる。

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目 1)

腫瘍成長または癌細胞の増殖を遮断するかまたは減少させる方法であって、

a) 有効量の抗癌薬を該腫瘍または該癌細胞に投与する工程と、

b) 有効量のアンジオポエチン様 4 タンパク質 (A N G P T L 4) アンタゴニストを該腫瘍または該癌細胞に投与する工程と、

を包含し、

有効量の組み合わせによって該腫瘍成長または該癌細胞の増殖が遮断されるかまたは減少する、方法。

(項目 2)

前記抗癌薬が抗血管形成薬を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記抗血管形成薬が V E G F アンタゴニストである、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記 V E G F アンタゴニストが抗 V E G F 抗体である、項目 3 に記載の方法。

(項目 5)

前記抗 V E G F 抗体がヒト化 A 4 . 6 . 1 である、項目 4 に記載の方法。

(項目 6)

前記 A N G P T L 4 アンタゴニストが抗 A N G P T L 4 抗体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記抗 A N G P T L 4 抗体が A N G P T L 4 (1 8 4 ~ 4 0 6) に結合する、項目 6 に記載の方法。

(項目 8)

前記 A N G P T L 4 アンタゴニストが抗 α V β 5 抗体である、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記抗体がヒト化抗体である、項目 4、項目 6、または項目 8 に記載の方法。

(項目 10)

前記 A N G P T L 4 アンタゴニストが S i R N A 分子を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 11)

前記 S i R N A 分子が A N G P T L 4 - S i R N A 分子である、項目 10 に記載の方法。

(項目 12)

前記 A N G P T L 4 - S i R N A 分子が、A N G P T L 4 をコードする核酸の D N A 配列をターゲティングし、前記 D N A 配列が、少なくとも G T G G C C A A G C C T G C C C G A A G A (配列番号 3) を含む、項目 11 に記載の方法。

(項目 13)

前記腫瘍または前記癌細胞に第 3 の抗癌薬を投与する工程をさらに包含する、項目 1 に記載の方法。

(項目 14)

前記第 3 の抗癌薬が化学療法薬である、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記第 3 の抗癌薬が別の血管形成インヒビターである、項目 13 に記載の方法。

(項目 16)

10

20

30

40

50

前記投与工程（a）および（b）を連続的に行う、項目1に記載の方法。

（項目17）

前記投与工程（a）および（b）を同時に行う、項目1に記載の方法。

（項目18）

前記投与工程（a）および（b）を連続的にも同時にも行う、項目1に記載の方法。

（項目19）

前記投与工程を任意の順序で行う、項目1に記載の方法。

（項目20）

前記腫瘍または前記癌細胞が被験体中に存在する、項目1に記載の方法。

（項目21）

前記被験体がヒトである、項目20に記載の方法。

（項目22）

前記被験体が腫瘍成長または癌細胞の増殖を再発している、項目20に記載の方法。

（項目23）

被験体における腫瘍成長または癌細胞の増殖を遮断するかまたは減少させる方法であって、

有効量の抗血管形成薬および有効量のアンジオポエチン様4タンパク質（ANGPTL4）アンタゴニストを含む組み合わせ組成物を該被験体に投与する工程をさらに含み、有効量の組み合わせによって該腫瘍成長または該癌細胞の増殖が遮断されるかまたは減少する、方法。

（項目24）

さらなる薬剤を投与する工程をさらに含み、該さらなる薬剤が抗癌薬である、項目23に記載の方法。

（項目25）

被験体における腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を遮断するかまたは減少させる方法であって、

有効量のアンジオポエチン様4（ANGPTL4）アンタゴニストを被験体に投与する工程を含み、該被験体が抗癌薬での癌治療を受けていたかまたは同時に受けており、有効量の前記ANGPTL4アンタゴニストの投与により、前記腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発が遮断されるかまたは減少する、方法。

（項目26）

前記抗癌薬が1つまたは複数の化学療法薬である、項目25に記載の方法。

（項目27）

前記抗癌薬が抗血管形成薬を含む、項目25に記載の方法。

（項目28）

前記抗血管形成薬が抗VEGFインヒビターを含む、項目27に記載の方法。

（項目29）

前記抗VEGFインヒビターが抗VEGF抗体である、項目28に記載の方法。

（項目30）

前記抗VEGF抗体がヒト化A4.6.1である、項目29に記載の方法。

（項目31）

前記ANGPTL4アンタゴニストが抗ANGPTL4抗体である、項目25に記載の方法。

（項目32）

前記ANGPTL4アンタゴニストが抗 α V β 5抗体である、項目25に記載の方法。

（項目33）

前記抗体がヒト化抗体である、項目29、項目31、または項目32に記載の方法。

（項目34）

前記ANGPTL4アンタゴニストがSiRNA分子を含む、項目25に記載の方法。

（項目35）

10

20

30

40

50

前記 S i R N A 分子が A N G P T L 4 - S i R N A 分子である、項目 3 4 に記載の方法。
(項目 3 6)

前記 A N G P T L 4 - S i R N A 分子が、A N G P T L 4 をコードする核酸の D N A 配列をターゲティングし、前記 D N A 配列が、少なくとも G T G G C C A A G C C T G C C C G A A G A (配列番号 3) を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

さらなる薬剤を投与する工程をさらに含み、該さらなる薬剤が抗癌薬である、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 3 8)

腫瘍成長または癌細胞の増殖を遮断するかまたは減少させる方法であって、
有効量のアンジオポエチン様 4 (A N G P T L 4) アンタゴニストを該腫瘍または該癌細胞に投与する工程を含み、該抗 A N G P T L 4 アンタゴニストが A N G P T L 4 (1 8 4 ~ 4 0 6) に結合する抗体であり、該有効量によって該腫瘍成長または該癌細胞の増殖が遮断されるかまたは減少する、方法。

(項目 3 9)

A N G P T L 4 (1 8 4 ~ 4 0 6) に結合する抗体および V E G F アンタゴニストを含む組成物。

(項目 4 0)

A N G P T L 4 - S i R N A 分子を含む組成物であって、該 A N G P T L 4 - S i R N A 分子が、A N G P T L 4 をコードする核酸の D N A 配列をターゲティングし、該 D N A 配列が、少なくとも G T G G C C A A G C C T G C C C G A A G A (配列番号 3) を含む、組成物。

(項目 4 1)

第 1 の量の抗血管形成薬、第 2 の量のアンジオポエチン様 4 (A N G P T L 4) 薬、および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または希釈剤、ならびに容器を含むキット。

(項目 4 2)

第 1 の単位投薬形態の一定量の抗血管形成薬および薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤；第 2 の単位投薬形態の一定量のアンジオポエチン様 4 (A N G P T L 4) アンタゴニストおよび薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または希釈剤；ならびに容器を含むキット。

【図面の簡単な説明】

【0 0 2 4】

【図 1 A】図 1 は、ヒト A N G P T L 4 の核酸配列 (配列番号 1 (S E Q I D N O . 1)) を示す。

【図 1 B】図 1 は、ヒト A N G P T L 4 の核酸配列 (配列番号 1 (S E Q I D N O . 1)) を示す。

【図 2 A】図 2 は、ヒト A N G P T L 4 のアミノ酸配列 (配列番号 2 (S E Q I D N O .) 2) を示す。

【図 2 B】図 2 は、ヒト A N G P T L 4 のアミノ酸配列 (配列番号 2 (S E Q I D N O .) 2) を示す。

【図 3】図 3 のパネル A は、ジチオスレイトール (D T T) の存在下 (1 0 m M) または非存在下で S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) (4 ~ 2 0 %) にて分離した精製組換えマウス A N G P T L 4 (2 3 ~ 4 1 0) を示す。図 3 のパネル B は、S D S ゲルにて分離し、ウェスタンブロッティングによって検出された野生型 (レーン 1) および変異 h A N G P T L 4 (レーン 2) を示し、変異 h A N G P T L 4 は、R 1 6 2 G および R 1 6 4 E 置換を有する。

【図 4 A】図 4 のパネル A、B、および C は、A N G P T L 4 発現構築物での腫瘍細胞の形質導入および A N G P T L 4 発現構築物で形質導入された C O S 細胞 (C) 由来の馴化培地 (2) によって、A N G P T L 4 が A 6 7 3 腫瘍細胞 (パネル A および B) および U 8 7 M G 腫瘍細胞 (パネル B) の増殖を刺激することを概略的に示す (パネル C)。パネ

10

20

30

40

50

ルBでは、腫瘍細胞を、(1) AdLacZ発現構築物コントロール、(2) Ad-ANGPTL4発現構築物、または(3) Ad-SiRNA ANGPTL4構築物のいずれかで形質導入する。パネルCでは、A673腫瘍細胞を、(1) LacZ発現構築物、(2) ANGPTL4発現構築物、または(3) ANGPTL3発現構築物のいずれかで形質導入されたHepa(A)、HMVEC(B)、またはCOS細胞(C)由来の馴化培地によって増殖させる。

【図4B】図4のパネルA、B、およびCは、ANGPTL4発現構築物での腫瘍細胞の形質導入およびANGPTL4発現構築物で形質導入されたCOS細胞(C)由来の馴化培地(2)によって、ANGPTL4がA673腫瘍細胞(パネルAおよびB)およびU87MG腫瘍細胞(パネルB)の増殖を刺激することを概略的に示す(パネルC)。パネルBでは、腫瘍細胞を、(1) AdLacZ発現構築物コントロール、(2) Ad-ANGPTL4発現構築物、または(3) Ad-SiRNA ANGPTL4構築物のいずれかで形質導入する。パネルCでは、A673腫瘍細胞を、(1) LacZ発現構築物、(2) ANGPTL4発現構築物、または(3) ANGPTL3発現構築物のいずれかで形質導入されたHepa(A)、HMVEC(B)、またはCOS細胞(C)由来の馴化培地によって増殖させる。

10

【図4C】図4のパネルA、B、およびCは、ANGPTL4発現構築物での腫瘍細胞の形質導入およびANGPTL4発現構築物で形質導入されたCOS細胞(C)由来の馴化培地(2)によって、ANGPTL4がA673腫瘍細胞(パネルAおよびB)およびU87MG腫瘍細胞(パネルB)の増殖を刺激することを概略的に示す(パネルC)。パネルBでは、腫瘍細胞を、(1) AdLacZ発現構築物コントロール、(2) Ad-ANGPTL4発現構築物、または(3) Ad-SiRNA ANGPTL4構築物のいずれかで形質導入する。パネルCでは、A673腫瘍細胞を、(1) LacZ発現構築物、(2) ANGPTL4発現構築物、または(3) ANGPTL3発現構築物のいずれかで形質導入されたHepa(A)、HMVEC(B)、またはCOS細胞(C)由来の馴化培地によって増殖させる。

20

【図5】図5は、培養皿をコーティングした場合にmANGPTL4がA673増殖を刺激することを概略的に示す。

【図6A】図6のパネルAおよびBは、A673腫瘍細胞に結合するANGPTL4の種々の形態(パネルA)および種々の条件下でのANGPTL4の種々の形態(パネルB)を概略的に示す。

30

【図6B】図6のパネルAおよびBは、A673腫瘍細胞に結合するANGPTL4の種々の形態(パネルA)および種々の条件下でのANGPTL4の種々の形態(パネルB)を概略的に示す。

【図7A】図7のパネルAおよびBは、7日間(パネルA)または4日間(パネルB)成長させた場合のANGPTL4含有培地でのA673増殖を概略的に示す。パネルAでは、(1)はAdLacZ発現構築物コントロールであり、(2)はAd-hANGPTL4発現構築物であり、(3)はAdLacZ発現構築物およびrmANGPTL4である。パネルBでは、(1)はなにも添加せず、(2)は緩衝液コントロールであり、(3)はmANGPTL4(2.5 μg/ml)であり、(4)はhANGPTL4(2.5 μg/ml)であり、(5)はhIGG-hANGPTL4(2.5 μg/ml)であり、(6)はhIGG-mANGPTL4(2.5 μg/ml)である。

40

【図7B】図7のパネルAおよびBは、7日間(パネルA)または4日間(パネルB)成長させた場合のANGPTL4含有培地でのA673増殖を概略的に示す。パネルAでは、(1)はAdLacZ発現構築物コントロールであり、(2)はAd-hANGPTL4発現構築物であり、(3)はAdLacZ発現構築物およびrmANGPTL4である。パネルBでは、(1)はなにも添加せず、(2)は緩衝液コントロールであり、(3)はmANGPTL4(2.5 μg/ml)であり、(4)はhANGPTL4(2.5 μg/ml)であり、(5)はhIGG-hANGPTL4(2.5 μg/ml)であり、(6)はhIGG-mANGPTL4(2.5 μg/ml)である。

50

【図 8 A】図 8 のパネル A、B、および C は、ANGPTL4 がインビボでの腫瘍成長を促進し（パネル A およびパネル B）、アデノウイルス-Angptl4 構築物の腫瘍内投与を行った腫瘍で、例えば、抗 VEGF 抗体（AVSTIN（登録商標）（Genentech, South San Francisco））を使用した抗腫瘍治療を回避する傾向がある（パネル C）ことを概略的に示す。パネル A および C は、腫瘍サイズ（ cm^3 ）対腫瘍移植後の日数を示す。パネル B は、移植 20 日後の異種移植された A673 腫瘍の重量を示す。

【図 8 B】図 8 のパネル A、B、および C は、ANGPTL4 がインビボでの腫瘍成長を促進し（パネル A およびパネル B）、アデノウイルス-Angptl4 構築物の腫瘍内投与を行った腫瘍で、例えば、抗 VEGF 抗体（AVSTIN（登録商標）（Genentech, South San Francisco））を使用した抗腫瘍治療を回避する傾向がある（パネル C）ことを概略的に示す。パネル A および C は、腫瘍サイズ（ cm^3 ）対腫瘍移植後の日数を示す。パネル B は、移植 20 日後の異種移植された A673 腫瘍の重量を示す。

【図 8 C】図 8 のパネル A、B、および C は、ANGPTL4 がインビボでの腫瘍成長を促進し（パネル A およびパネル B）、アデノウイルス-Angptl4 構築物の腫瘍内投与を行った腫瘍で、例えば、抗 VEGF 抗体（AVSTIN（登録商標）（Genentech, South San Francisco））を使用した抗腫瘍治療を回避する傾向がある（パネル C）ことを概略的に示す。パネル A および C は、腫瘍サイズ（ cm^3 ）対腫瘍移植後の日数を示す。パネル B は、移植 20 日後の異種移植された A673 腫瘍の重量を示す。

【図 9】図 9 は、ANGPTL4 が腫瘍細胞（A673 および 4T-1）の細胞移動を誘導することを示し、（1）は血清を添加せず、（2）は 10% ウシ胎児血清（FCS）を添加し、（3）は PDGF-BB を添加し、（4）は ANGPTL4 を添加している。

【図 10 A】図 10 のパネル A および B は、抗 hANGPTL4 抗体が腫瘍成長を阻害することを示す（例えば、パネル A（HeLa-S3 細胞および Caki 細胞）およびパネル B（U87MG 細胞、293 細胞、および A673 細胞））。（1）は抗 hANGPTL4 抗体であり、（2）は抗ダウン症候群重要領域 1 タンパク質（Dscr）抗体コントロールであり、（3）はなにも添加せず、棒グラフの下の数値は、抗体濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示す。

【図 10 B】図 10 のパネル A および B は、抗 hANGPTL4 抗体が腫瘍成長を阻害することを示す（例えば、パネル A（HeLa-S3 細胞および Caki 細胞）およびパネル B（U87MG 細胞、293 細胞、および A673 細胞））。（1）は抗 hANGPTL4 抗体であり、（2）は抗ダウン症候群重要領域 1 タンパク質（Dscr）抗体コントロールであり、（3）はなにも添加せず、棒グラフの下の数値は、抗体濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示す。

【図 11】図 11 は、下に示した濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の ANGPTL4 またはビトロネクチンでコーティングしたプレートへの 293~1953（ $\alpha_v\beta_5$ ）細胞の接着を示す。コントロールとして BSA を使用する。

【図 12】図 12 は抗 $\alpha_v\beta_5$ および抗 hANGPTL4 抗体が ANGPTL4 細胞接着活性を無効にすることを示す。（1）は BSA であり、（2）はビトロネクチンであり、（3）は ANGPTL4 である。

【図 13 A】図 13 のパネル A、B、および C は、インテグリン $\alpha_v\beta_5$ への ANGPTL4 の結合を示す。パネル A は、 $\alpha_v\beta_5$ コーティングしたプレートへの表示の量を使用したタンパク質（mANGPTL4、hANGPTL4-N_{末端}、または hANGPTL4-C_{末端}）の結合を示す。パネル B は、抗 hANGPTL4 抗体を含む $\alpha_v\beta_5$ コーティングしたプレートへのタンパク質（mANGPTL4、hANGPTL4-N_{末端}、または hANGPTL4-C_{末端}）の結合阻害を示す。パネル C は、ANGPTL4 および $\alpha_v\beta_5$ の結合を示す。（1）はプレート上にコーティングされた hANGPTL4-C_{末端} であり、（2）はプレート上にコーティングし、抗 hANGPTL4 と共にインキュ

10

20

30

40

50

べートした h A N G P T L 4 - C 末端であり、(3) はプレート上にコーティングし、抗 D s c r と共にインキュベートした h A N G P T L 4 - C 末端であり、(4) はプレート上にコーティングしたビトロネクチンであり、(5) は $\alpha_v \beta_5$ の添加前にプレート上にコーティングした B S A である。

【図 1 3 B】図 1 3 のパネル A、B、および C は、インテグリン $\alpha_v \beta_5$ への A N G P T L 4 の結合を示す。パネル A は、 $\alpha_v \beta_5$ コーティングしたプレートへの表示の量を使用したタンパク質 (m A N G P T L 4、h A N G P T L 4 - N 末端、または h A N G P T L 4 - C 末端) の結合を示す。パネル B は、抗 h A N G P T L 4 抗体を含む $\alpha_v \beta_5$ コーティングしたプレートへのタンパク質 (m A N G P T L 4、h A N G P T L 4 - N 末端、または h A N G P T L 4 - C 末端) の結合阻害を示す。パネル C は、A N G P T L 4 および $\alpha_v \beta_5$ の結合を示す。(1) はプレート上にコーティングされた h A N G P T L 4 - C 末端であり、(2) はプレート上にコーティングし、抗 h A N G P T L 4 と共にインキュベートした h A N G P T L 4 - C 末端であり、(3) はプレート上にコーティングし、抗 D s c r と共にインキュベートした h A N G P T L 4 - C 末端であり、(4) はプレート上にコーティングしたビトロネクチンであり、(5) は $\alpha_v \beta_5$ の添加前にプレート上にコーティングした B S A である。

【図 1 3 C】図 1 3 のパネル A、B、および C は、インテグリン $\alpha_v \beta_5$ への A N G P T L 4 の結合を示す。パネル A は、 $\alpha_v \beta_5$ コーティングしたプレートへの表示の量を使用したタンパク質 (m A N G P T L 4、h A N G P T L 4 - N 末端、または h A N G P T L 4 - C 末端) の結合を示す。パネル B は、抗 h A N G P T L 4 抗体を含む $\alpha_v \beta_5$ コーティングしたプレートへのタンパク質 (m A N G P T L 4、h A N G P T L 4 - N 末端、または h A N G P T L 4 - C 末端) の結合阻害を示す。パネル C は、A N G P T L 4 および $\alpha_v \beta_5$ の結合を示す。(1) はプレート上にコーティングされた h A N G P T L 4 - C 末端であり、(2) はプレート上にコーティングし、抗 h A N G P T L 4 と共にインキュベートした h A N G P T L 4 - C 末端であり、(3) はプレート上にコーティングし、抗 D s c r と共にインキュベートした h A N G P T L 4 - C 末端であり、(4) はプレート上にコーティングしたビトロネクチンであり、(5) は $\alpha_v \beta_5$ の添加前にプレート上にコーティングした B S A である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

詳細な説明

定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明は特定の組成物または生物系に制限されず、勿論、変化し得ると理解すべきである。本明細書中で使用した専門用語は特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本発明を制限することを意図しないことも理解すべきである。本明細書および添付の特許請求の範囲で 사용되는ように、単数形「a」、「an」、および「the」には、明らかに別の内容を示さない限り、複数形が含まれる。したがって、例えば、「分子」には、任意選択的に、2つまたはそれを超えるこのような分子の組み合わせなどが含まれる。他で定義しない限り、全ての科学用語および技術用語は、関連分野で一般的に使用されているものと同一の意味を有すると理解される。本発明の目的のために、以下の用語を以下のように定義する。

【0026】

用語「A N G P T L 4」または「A n g p t l 4」は、アンジオポエチン様 4 ポリペプチドまたはタンパク質、その天然に存在する対立遺伝子形態、分泌形態、およびプロセシング形態をいう。例えば、ヒト由来の A N G P T L 4 は 406 アミノ酸タンパク質である一方で、マウス A N G P T L 4 は 410 アミノ酸タンパク質である。用語「A N G P T L 4」は、例えば、ポリペプチドのフラグメント (例えば、サブシーケンス、短縮形態など) (例えば、N 末端フラグメント、コイルドコイルドメイン、C 末端フラグメント、フィブリノーゲン様ドメイン、ヒトアンジオポエチン様 4 タンパク質のアミノ酸 1 ~ 183、23 ~ 183、1 ~ 約 162、23 ~ 約 162、23 ~ 406、184 ~ 406、約 16

2～406、または23～184およびマウスアンジオポエチン様4タンパク質のアミノ酸1～183、23～183、1～約165、23～約165、23～410、または184～410が含まれる)をいうためにも使用される。他のフラグメントには、例えば、hANGPTL4の40～183、60～183、80～183、100～183、120～183、140～183、40～406、60～406、80～406、100～406、120～406、140～406、および160～406ならびに、例えば、mANGPTL4の40～183、60～183、80～183、100～183、120～183、140～183、40～410、60～410、80～410、100～410、120～410、140～410、および160～410が含まれるが、これらに限定されない。ANGPTL4の任意のこのような形態を、本出願中で識別して言及することができる(例えば、「ANGPTL4(23～406)」、「ANGPTL4(184～406)」、「ANGPTL4(23～183)」、「mANGPTL4(23～410)」、「mANGPTL4(184～410)」(mはマウス配列を示す)など)。未変性(native)ANGPTL4のフラグメントのアミノ酸の位置を、未変性ANGPTL4配列中に示すように番号をつけた。例えば、未変性ANGPTL4フラグメント中のアミノ酸22位(Ser)はまた、未変性ヒトANGPTL4中の22位(Ser)でもある(例えば、図2を参照のこと)。一般に、未変性ANGPTL4のフラグメントは、生物活性を有する。

10

【0027】

用語「ANGPTL4モジュレーター」は、ANGPTL4もしくはその発現を活性化することができる分子(例えば、アゴニスト)またはANGPTL4の活性もしくはその発現を阻害することができる分子(例えば、アンタゴニスト(またはインヒビター))をいう。ANGPTL4アゴニストには、抗体および活性フラグメントが含まれる。ANGPTL4アンタゴニストは、ANGPTL4活性(例えば、細胞増殖もしくは成長、移動、接着、または代謝産物(例えば、脂質)の調整、またはその発現(ANGPTL4受容体(例えば、 $\alpha_v\beta_5$)へのその結合が含まれる))を中和、遮断、阻害、排除、減少、または妨害することができる分子をいう。ANGPTL4アンタゴニストには、例えば、抗ANGPTL4抗体およびその抗原結合フラグメント、ANGPTL4に特異的に結合し、それにより、1つまたは複数の受容体への結合が順序付けられる受容体分子および誘導体、抗ANGPTL4受容体抗体、ならびにANGPTL4受容体アンタゴニスト(受容体の小分子インヒビターなど)が含まれる。他のANGPTL4アンタゴニストには、ANGPTL4のアンタゴニスト改変体、アンチセンス分子(例えば、ANGPTL4-siRNA)、RNAアプタマー、およびANGPTL4またはその受容体に対するリボザイムも含まれる。特定の実施形態では、アンタゴニストANGPTL4抗体は、ANGPTL4の特定の配列または領域(例えば、N末端フラグメント、コイルドコイルドメイン、C末端フラグメント、フィブリノーゲン様ドメイン、ヒトアンジオポエチン様4タンパク質のアミノ酸1～183、23～183、1～約162、23～約162、23～406、184～406、または23～184およびマウスアンジオポエチン様4タンパク質のアミノ酸1～183、23～183、1～約165、23～約165、23～410、または184～410)への結合によってANGPTL4活性を阻害または減少させる抗体である。他のフラグメントには、例えば、hANGPTL4の40～183、60～183、80～183、100～183、120～183、140～183、40～406、60～406、80～406、100～406、120～406、140～406、および160～406ならびに、例えば、mANGPTL4の40～183、60～183、80～183、100～183、120～183、140～183、40～410、60～410、80～410、100～410、120～410、140～410、および160～410が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0028】

用語「抗ANGPTL4抗体」は、十分な親和性および特異性でANGPTL4に結合する抗体である。本発明の抗ANGPTL4抗体を、ANGPTL4活性が関与する疾患

50

または容態のターゲティングおよび妨害における治療薬として使用することができる。一般に、抗ANGPTL4抗体は、通常、他のANGPTL4ホモログ（例えば、ANGPTL3）に結合しない。

【0029】

用語「VEGF」および「VEGF-A」を、165アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子およびLeung et al., Science, 246:1306 (1989), Houck et al., Mol. Endocrin., 5:1806 (1991) およびRobinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144 (5): 853-865 (2001)に記載の関連する121、145、183、189、および206アミノ酸の血管内皮細胞増殖因子、その天然に存在する対立遺伝子形態、およびプロセシング形態をいうために交換可能に使用する。用語「VEGF」を、例えば、165アミノ酸のヒト血管内皮細胞増殖因子のうちのアミノ酸8～109または1～109を含むポリペプチドのフラグメントをいうためにも使用する。VEGFの任意のこのような形態を、本出願中で識別して言及することができる（例えば、「VEGF (8～109)」、「VEGF (1～109)」、または「VEGF165」）。未変性VEGFの「フラグメント」のアミノ酸の位置を、未変性VEGF配列中に示すように番号をつける。例えば、未変性VEGFフラグメント中のアミノ酸17位（メチオニン）はまた、未変性VEGF中の17位（メチオニン）でもある。未変性VEGFのフラグメントは、未変性VEGFに匹敵するKDRおよび／またはFlt-1受容体に対する結合親和性を有し得る。

【0030】

「抗VEGF抗体」は、十分な親和性および特異性でVEGFに結合する抗体である。本発明の抗VEGF抗体を、VEGF活性が関与する疾患または容態のターゲティングおよび妨害における治療薬として使用することができる。抗VEGF抗体は、通常、他のVEGFホモログ（VEGF-BまたはVEGF-Cなど）に結合せず、PlGF、PDGF、またはbFGFなどの他の増殖因子にも結合しない。例えば、米国特許第6,582,959号、同第6,703,020号；WO 98/45332；WO 96/30046；WO 94/10202；欧州特許第0666868B1号；米国特許出願番号20030206899号、20030190317号、20030203409号、および20050112126号；Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)；ならびに代理人整理番号P2072R1を参照のこと。「rhUMAb VEGF」または「Avastin（商標）」としても公知の抗VEGF抗体「ベバシズマブ（BV）」は、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)にしたがって生成された組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体である。これは、変異ヒトIgG1フレームワーク領域およびヒトVEGFのその受容体への結合を遮断するマウス抗hVEGFモノクローナル抗体A4.6.1由来の抗原結合相補性決定領域を含む。ベバシズマブの約93%のアミノ酸配列（ほとんどのフレームワーク領域を含む）は、ヒトIgG1に由来し、この配列の約7%はマウス抗体A4.6.1に由来する。ベバシズマブの分子量は約149,000ダルトンであり、グリコシル化されている。ベバシズマブおよび他のヒト化抗VEGF抗体は、2005年2月26日発行の米国特許第6,884,879号にさらに記載されている。

【0031】

「VEGFアンタゴニスト」は、VEGF活性（例えば、1つまたは複数のVEGF受容体へのその結合が含まれる）を中和、遮断、阻害、排除、減少、または妨害することができる分子をいう。VEGFアンタゴニストには、抗VEGF抗体およびその抗原結合フラグメント、VEGFに特異的に結合し、それにより、1つまたは複数の受容体への結合が順序付けられる受容体分子および誘導体、抗VEGF受容体抗体、VEGF受容体アンタゴニスト（VEGFRチロシンキナーゼの小分子インヒビターなど）、ならびに融合タンパク質（例えば、VEGF-Trap (Regeneron)、VEGF₁₂₁-ゲ

ロニン (P e r e g i n e)) が含まれる。V E G F アンタゴニストには、V E G F のアンタゴニスト改変体、V E G F に指向するアンチセンス分子、R N A アプタマー、および V E G F に対するリボザイム、または V E G F 受容体も含まれる。

【0032】

ポリペプチドの「未変性配列」は、天然に由来するポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。したがって、ポリペプチドの未変性配列は、任意の哺乳動物由来の天然に存在するポリペプチドのアミノ酸配列を有する。このようなポリペプチドの未変性配列を、天然から単離し、あるいは組換え手段または合成手段によって產生することができる。用語ポリペプチドの「未変性配列」は、特に、天然に存在するポリペプチドの短縮形態または分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列）、天然に存在する改変形態（例えば、選択的スプライシング形態）、および天然に存在するポリペプチドの対立遺伝子改変体を含む。

10

【0033】

「ポリペプチド鎖」は、非共有結合性相互作用またはジスルフィド結合とは対照的に、ペプチド結合によってその各ドメインが他のドメインに連結したポリペプチドである。

【0034】

ポリペプチド「改変体」は、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列が対応するポリペプチドの未変性配列と同一な生物活性ポリペプチドを意味する。このような改変体には、例えば、ポリペプチドの N 末端および／または C 末端の 1 つまたは複数のアミノ酸（天然に存在するアミノ酸および／または天然に存在しないアミノ酸）残基が負荷または欠失しているポリペプチドが含まれる。通常、改変体は、未変性のポリペプチド配列と少なくとも約 80 % のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも約 90 % のアミノ酸配列が同一であるか、少なくとも 95 % またはそれを超えるアミノ酸配列が同一である。改変体には、未変性配列の（典型的には、生物活性）ポリペプチドフラグメント（例えば、サブシーケンス、短縮など）が含まれる。

20

【0035】

「アミノ酸配列の同一率 (%)」を、本明細書中で、同一配列の一部としていかなる保存的置換を考慮せず、必要に応じて、最大配列同一率を達成するための配列のアラインメントおよびギャップの導入後に選択した配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の比率と定義する。アミノ酸配列同一率の決定のためのアラインメントを、当業者の範囲内の種々の方法（例えば、B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、A L I G N - 2、または M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアの使用)で達成することができる。当業者は、アラインメント計測のための適切なパラメータ（比較配列の全長にわたって最大アラインメントを達成することが必要な任意のアルゴリズムが含まれる）を決定することができる。しかし、本明細書中の目的のために、以下に記載のように配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 の使用によってアミノ酸配列同一率の値を得る。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムは、G e n e n t e c h, I n c. が著作権を有し、エンドユーザ用付属文書と共に U. S. C o p y r i g h t O f f i c e, W a s h i n g t o n D. C., 20559 に提出されており、米国著作権登録番号 T X U 510087 にて登録されており、G e n e n t e c h, I n c., S o u t h S a n F r a n c i s c o, C a l i f o r n i a を通して公的に利用可能である。A L I G N - 2 プログラムを、U N I X (登録商標) オペレーティングシステム（例えば、デジタル U N I X (登録商標) V 4.0 D) 用にコンパイルすべきである。全ての配列比較パラメータを、A L I G N - 2 プログラムで設定し、変更しない。

30

40

【0036】

本明細書中の目的のために、所与のアミノ酸配列 A の所与のアミノ酸配列 B とのアミノ酸配列同一率（所与のアミノ酸配列 B と一定のアミノ酸配列同一率を有するか含む所与のアミノ酸配列 A と表現することもできる）を、以下のように計算した：

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

50

(式中、Xは、配列アラインメントプログラムA L I G N-2によって、このプログラムのAおよびBのアラインメントにおいて完全な一致とスコアリングされたアミノ酸残基数であり、Yは、B中の総アミノ酸残基数である)。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さと同じでなく、Bに対するAのアミノ酸同一率はAに対するBのアミノ酸同一率と等しくないと認識される。

【0037】

本明細書中で使用される、用語「ANGPTL4 変異体」は、上記の変異体および／または未変性のANGPTL4 配列中の1つまたは複数のアミノ酸変異を含むANGPTL4をいう。任意選択的に、1つまたは複数のアミノ酸変異には、アミノ酸置換が含まれる。本発明で使用されるANGPTL4 およびその変異体を、当該分野で周知の種々の方法によって調製することができる。ANGPTL4 のアミノ酸配列変異体を、ANGPTL4 DNAの変異によって調製することができる。このような変異体には、例えば、ANGPTL4 のアミノ酸配列内の残基の欠失、挿入、または置換(例えば、ATCC 寄託番号209284で寄託されているか図2に示す核酸によってコードされるヒトアミノ酸配列)が含まれる。欠失、挿入、および置換を任意に組み合わせて、所望の活性を有する最終構築物に到達することができる。変異体をコードするDNA中の変異を、読み取り枠外に配列を配置してはならず、好ましくは、変異により、二次mRNA構造を得ることができる相補領域が作製されない。欧州特許第75, 444 A号。

【0038】

ANGPTL4 変異体を、任意選択的に、未変性ANGPTL4 をコードするDNA中のヌクレオチドの部位特異的変異誘発またはファージディスプレイ技術、それによる変異体をコードするDNAの産生、およびその後の組換え細胞培養物中でのDNAの発現によって調製する。

【0039】

アミノ酸配列変異の導入部位を予め決定する一方で、変異自体を予め決定する必要はない。例えば、所与の部位での変異能力を最適にするために、標的コドンまたは標的領域を無作為に変異誘発させ、発現されたANGPTL4 変異体を所望の活性の最適な組み合わせについてスクリーニングすることができる。公知の配列を有するDNA中の予め決定した部位に置換変異を作製する技術(例えば、部位特異的変異誘発など)は周知である。本明細書中に記載のANGPTL4 変異体を、PCT公開WO 00/63380号などに記載のファージディスプレイ技術によって調製することができる。

【0040】

このようなクローンを選択した後、変異タンパク質領域を除去し、タンパク質産生のための適切なベクター(一般に、適切な宿主の形質転換のために使用することができる発現ベクター型)に入れることができる。

【0041】

アミノ酸配列の欠失は、一般に、約1~30残基、任意選択的に1~10残基、任意選択的に1~5残基またはそれ未満の範囲であり、典型的には連続している。

【0042】

アミノ酸配列挿入には、1残基から本質的に無制限の長さのポリペプチドまでのアミノ末端および／またはカルボキシ末端の融合および1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。配列内挿入(すなわち、未変性のANGPTL4 配列内の挿入)は、一般に、約1~10残基、任意選択的に1~5残基、または任意選択的に1~3残基の範囲であり得る。末端挿入の例には、組換え宿主からの分泌を容易にするためのN末端へのシグナル配列(宿主細胞と異種でも相同でもよい)の融合が含まれる。

【0043】

さらなるANGPTL4 変異体は、未変性のANGPTL4 中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その位置に異なる残基が挿入されているANGPTL4 変異体である。本発明の一実施形態では、ANGPTL4 変異体には、ANGPTL4 の162位および／もしくは164位での置換またはmANGPTL4 の169位での置換が含まれる

。このような置換を、表 1 に示す置換にしたがって行うことができる。A N G P T L 4 改変体はまた、本明細書中に記載の非天然アミノ酸でありうる。

【0044】

アミノ酸を、以下のようにその側鎖の性質の類似性にしたがって分類することができる (A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))。

(1) 非極性: A l a (A)、V a l (V)、L e u (L)、I l e (I)、P r o (P)、P h e (F)、T r p (W)、M e t (M)

(2) 非電荷極性: G l y (G)、S e r (S)、T h r (T)、C y s (C)、T y r (Y)、A s n (N)、G l n (Q) 10

(3) 酸性: A s p (D)、G l u (E)

(4) 塩基性: L y s (K)、A r g (R)、H i s (H)

あるいは、天然に存在する残基を、以下のように共通の側鎖の性質に基づいて分類することができる。

(1) 疎水性: ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e ;

(2) 中性疎水性: C y s、S e r、T h r、A s n、G l n ;

(3) 酸性: A s p、G l u ;

(4) 塩基性: H i s、L y s、A r g ;

(5) 鎖の配向に影響を与える残基: G l y、P r o ; 20

(6) 芳香族: T r p、T y r、P h e

【0045】

【表 1】

表 1

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノロイシン	Leu
Leu (L)	ノロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0046】

「天然に存在するアミノ酸残基」（すなわち、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸残基）を、以下からなる群から選択することができる：アラニン（Ala）；アルギニン（Arg）；アスパラギン（Asn）；アスパラギン酸（Asp）；システイン（Cys）；グルタミン（Gln）；グルタミン酸（Glu）；グリシン（Gly）；ヒスチジン（His）；イソロイシン（Ile）；ロイシン（Leu）；リジン（Lys）；メチオニン（Met）；フェニルアラニン（Phe）；プロリン（Pro）；セリン（Ser）；スレオニン（Thr）；トリプトファン（Trp）；チロシン（Tyr）；およびバリン（Val）。「天然に存在しないアミノ酸残基」は、ポリペプチド鎖中の隣接アミノ酸残基と共有結合することができる上記に列挙した天然に存在するアミノ酸残基以外の残基をいう。天然に存在しないアミノ酸残基の例には、例えば、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、および他のアミノ酸残基アナログ（Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)）ならびに米国特許出願公開第20030108885号および同第20030082575号に記載のアミノ酸残基など）が含まれる。簡単に述べれば、これらの手順は、サプレッサートRNAを天然に存在しないアミノ酸残基で活性化し、その後RNAをインビトロまたはインビボで転

写および翻訳する工程を含む。例えば、米国特許出願公開第20030108885号および同第20030082575号；ならびにNoren et al., Science 244:182 (1989)；およびEllman et al., supraを参照のこと。

【0047】

「単離」ポリペプチドは、その自然環境の成分から同定、分離、および／または回収されたポリペプチドである。その自然環境の汚染成分は、ポリペプチドの診断または治療での使用を妨害する材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性溶質または非タンパク質性溶質が含まれ得る。特定の実施形態では、ポリペプチドを、(1) Lowry法で決定したところ、95重量%を超えるポリペプチドまたは99重量%を超えるポリペプチドに精製するか、(2) スピンカップシークエネーターを用いて少なくとも15残基のN末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度に精製するか、(3) クーマシーブルーまたは銀染色を使用した還元条件下または非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製する。単離ポリペプチドには、組換え細胞内のin situのポリペプチドが含まれ、これは、ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかし、通常、単離ポリペプチドを、少なくとも1つの精製工程によって調製する。

【0048】

用語「抗体」を最も広い意味で使用し、モノクローナル抗体（全長またはインタクトなモノクローナル抗体が含まれる）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性(multispecific)抗体（例えば、二重特異性抗体）、および、所望の生物活性を示す限り、抗体フラグメント（以下を参照のこと）が含まれる。

【0049】

他で示さない限り、表現「多価抗体」を、本明細書を通して、3つまたはそれを超える抗原結合部位を含む抗体を示すために使用する。多価抗体を、典型的には、3つまたはそれを超える抗原結合部位を有するように操作し、一般に、IgM抗体またはIgA抗体の未変性配列ではない。

【0050】

「抗体フラグメント」は、一般に、インタクトな抗体の抗原結合部位を含み、それにより、抗原結合能力を保持するインタクトな抗体の一部のみを含む。本発明の定義に含まれる抗体フラグメントの例には、以下が含まれる：(i) VL、CL、VH、およびCH1ドメインを有するFabフラグメント；(ii) CH1ドメインのC末端に1つまたは複数のシステイン残基を有するFabフラグメントであるFab'フラグメント；(iii) VHおよびCH1ドメインを有するFdフラグメント；(iv) VHおよびCH1ドメインならびにCH1ドメインのC末端に1つまたは複数のシステイン残基を有するFd'フラグメント；(v) 抗体の1つのアームにVLおよびVHドメインを有するFvフラグメント；(vi) VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989))；(vii) 単離CDR領域；(viii) F(ab')₂フラグメント（ヒンジ領域でのジスルフィド結合によって連結した2つのFab'フラグメントを含む2価フラグメント）；(ix) 一本鎖抗体分子（例えば、一本鎖Fv；scFv）(Bird et al., Science 242:423-426 (1988))；およびHouston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))；(x) 同一のポリペプチド鎖中に軽鎖可変領域(VL)に連結した重鎖可変領域(VH)を含む2つの抗原結合部位を有する「ダイアボディ(diabody)」(例えば、欧州特許第404,097号；WO 93/11161号；およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)を参照のこと)；(xi) 相補性軽鎖ポリペプチドと共に抗原結合領域対を形成するタンデムFdセグメント対(VH-CH1-VH-CH1)を含む「線状抗体(linear antibodies)」(Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-106

2 (1995) ; および米国特許第 5, 641, 870 号) 。

【0051】

本明細書中で使用される、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体（すなわち、考えられる天然に存在する変異（少量であり得る）以外は集団を含む各抗体が同一である）をいう。モノクローナル抗体は特異性が高く、1つの抗原に対して指向する。さらに、典型的に異なる決定基（エピトープ）に対して指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の1つの決定基に対して指向する。修飾語「モノクローナル」は、任意の特定の方法による抗体の産生が必要であると解釈されない。例えば、本発明によって使用されるモノクローナル抗体を、Kohler et al., Nature 256:495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができるか、組換えDNA法（例えば、米国特許第4, 816, 567号を参照のこと）によって作製することができる。「モノクローナル抗体」を、例えば、Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) またはMarks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) に記載の技術を使用したファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

【0052】

本明細書中のモノクローナル抗体には、特に、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の種に由来するか特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか相同である一方で、残りの鎖が別の種に由来するか別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか相同する「キメラ」抗体、所望の生物活性を示す限り、このような抗体のフラグメントが含まれる（米国特許第4, 816, 567号およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)）。

20

【0053】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの部分については、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基に置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基に置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中に見出されない残基を含み得る。これらの修飾を、抗体の能力をさらに洗練させるために行う。一般に、ヒト化抗体は、実質的に全ての少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを含み、全てまたは実質的に全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、全てまたは実質的に全てのFRがヒト免疫グロブリン配列のFRに対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Fc）（典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域）の少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986) ; Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) ; およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) を参照のこと。

30

40

【0054】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生され、そして／または本明細書中に開示の任意のヒト抗体の作製技術を使用して作製された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、特に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を排除する。ヒト抗体を、当該分野で公知の種々の技術を使用して産生することができる。一実施形態では、ヒト抗体を、ファージライブラリーがヒト抗体を発現する場合、ファージライブラリーから選択する（Vaughan et al., Nature Biotechnology 14:309-314 (1996) ; Sheets et al.

50

， PNAS (USA) 95: 6157-6162 (1998)；Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991)；Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)）。ヒト抗体を、トランスジェニック動物（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されているマウス）へのヒト免疫グロブリン遺伝子座の移入によって作製することもできる。攻撃誘発の際、ヒト抗体産生が認められ、これはあらゆる点でヒトで認められる産生と酷似している（遺伝子の再編成、アセンブリ、および抗体レパートリーが含まれる）。このアプローチは、例えば、米国特許第5, 545, 807号；同第5, 545, 806号；同第5, 569, 825号；同第5, 625, 126号；同第5, 633, 425号；同第5, 661, 016号、ならびに以下の科学論文に記載されている：Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)；Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368: 812-13 (1994)；Fishwild et al., Nature Biotechnology 14: 845-51 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996)；Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)に記載されている。あるいは、ヒト抗体を、標的抗原に対して指向する抗体を産生するヒトBリンパ球（このようなBリンパ球を、個体から回収するか、インビトロで免疫化することができる）の不活化によって調製することができる。例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)；Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)；および米国特許第5, 750, 373号を参照のこと。

【0055】

用語「可変」は、可変ドメインの一定の部分が抗体間の配列中で広範に異なるという事実をいい、それぞれの特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性において使用される。しかし、可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均一に分布していない。可変性は、軽鎖および重鎖の可変ドメイン中の超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存されている部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。未変性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、これらは大部分がβシート立体配置を取り、3つの超可変領域によって連結されて、βシート構造（いくつかの場合、その一部）に連結しているループを形成する。各鎖中の超可変領域は、FRと極めて接近して保持され、他の鎖由来の超可変領域と共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照のこと）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、種々のエフェクター効果（抗体の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）への関与など）を示す。

【0056】

本明細書中で使用される、用語「超可変領域」は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。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、軽鎖可変ドメイン中の残基24～34（L1）、50～56（L2）、および89～97（L3）ならびに重鎖可変ドメイン中の31～35（H1）、50～65（H2）、および95～102（H3）（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（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26～3

2 (L1)、50～52 (L2)、および91～96 (L3)、ならびに重鎖可変ドメイン中の26～32 (H1)、53～55 (H2)、および96～101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含む。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書中で定義された超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0057】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、インタクトな抗体を異なる「クラス」に割り当てることができる。インタクトな抗体には5つの主なクラス (IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM) が存在し、これらのうちのいくつかを、「サブクラス」 (イソ型) (例えば、IgG₁ (非AおよびAアロタイプが含まれる)、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、およびIgA₂) にさらに分類することができる。異なる抗体クラスに対応する重鎖定常ドメインを、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ぶ。異なる免疫グロブリンクラスのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。

10

【0058】

任意の脊椎動物種由来の抗体の軽鎖を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、 κ (6) および λ (8) と呼ばれる2つの明確に異なる型の1つに割り当てることができる。

【0059】

用語「Fc領域」を、インタクトな抗体のパパイン消化によって生成することができる免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用する。Fc領域は、未変性配列のFc領域または改変Fc領域であり得る。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界が変化し得るにもかかわらず、ヒトIgG重鎖Fc領域は、一般に、約Cys226位または約Pro230位のアミノ酸残基からFc領域のカルボキシル末端までのひと続き (stretch) と定義する。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン (CH2ドメインおよびCH3ドメイン) および任意選択的にCH4ドメインを含む。

20

【0060】

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

【0061】

ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」 (「Cg2」ドメインとも呼ばれる) は、通常、約231位のアミノ酸残基から約340位のアミノ酸残基までにわたる。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対合しないという点で固有である。むしろ、2つのN結合分岐炭水化物鎖が、インタクトな未変性IgG分子の2つのCH2ドメインの間に入っている。炭水化物がドメインドメイン対合の代わりとなってCH2ドメインの安定化に役立つと推測されている。Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985)。本明細書中のCH2ドメインは、未変性配列のCH2ドメインまたは変性CH2ドメインであり得る。

30

【0062】

「CH3ドメイン」は、Fc領域中のC末端からCH2ドメインまで (すなわち、IgGの約341位のアミノ酸残基から約447位のアミノ酸残基まで) のひと続きの残基を含む。本明細書中のCH3領域は、未変性配列のCH3ドメインまたは変性CH3ドメイン (例えば、一方の鎖中に移入された「突出部 (protuberance)」および他方の鎖中に対応する移入された「溝 (cavity)」を有するCH3ドメイン) であり得る (米国特許第5,821,333号 (特に本明細書中で参考として援用される) を参照のこと)。このような変異CH3ドメインを使用して、本明細書中に記載の多重特異性 (例えば、二重特異性) 抗体を作製することができる。

40

【0063】

「ヒンジ領域」は、一般に、ヒトIgG1の約Glu216または約Cys226から約Pro230までのひと続きと定義される (Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985))。他のIgGイソ型のヒンジ領域を、第1およ

50

び最後のシステイン残基を配置して同一の位置に重鎖内 S-S 結合を形成することによって I g G 1 配列と整列させることができる。本明細書中のヒンジ領域は、未変性配列のヒンジ領域または変異ヒンジ領域であり得る。変異ヒンジ領域の 2 つのポリペプチド鎖は、一般に、ポリペプチド鎖あたり少なくとも 1 つのシステイン残基を保持し、その結果、変異ヒンジ領域の 2 つのポリペプチド鎖は 2 つの鎖の間にジスルフィド結合を形成することができる。本明細書中の好ましいヒンジ領域は、未変性配列のヒトヒンジ領域（例えば、未変性配列のヒト I g G 1 ヒンジ領域）である。

【0064】

「機能的 F c 領域」は、未変性配列の F c 領域の少なくとも 1 つの「エフェクター機能」を有する。例示的「エフェクター機能」には、C 1 q 結合；補体依存性細胞傷害性（C D C）；F c 受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B 細胞受容体；B C R）の下方制御などが含まれる。このようなエフェクター機能は、一般に、結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせられるべき F c 領域が必要であり、このような抗体エフェクター機能の評価のために当該分野で公知の種々のアッセイを使用して評価することができる。

【0065】

「未変性配列の F c 領域」は、天然で見出される F c 領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。

【0066】

「改変 F c 領域」は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾によって未変性配列の F c 領域と異なるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、改変 F c 領域は、未変性配列の F c 領域または親ポリペプチドの F c 領域と比較して少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されている（例えば、未変性配列の F c 領域中または親ポリペプチドの F c 領域中に約 1 個～約 10 個のアミノ酸の置換、好ましくは、約 1 個～約 5 個のアミノ酸置換を有する）。本明細書中の改変 F c 領域は、典型的に、例えば、未変性配列の F c 領域および／または親ポリペプチドの F c 領域と少なくとも約 80 % の配列が同一であるか、少なくとも約 90 % の配列が同一であるか、少なくとも約 95 % またはそれを超える配列が同一である。

【0067】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「A D C C」は、F c 受容体（F c R）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、その後に標的細胞を溶解させる細胞媒介性反応をいう。A D C C の媒介のための主な細胞（NK 細胞）は F c γ R I I I のみを発現するのに対して、単球は、F c γ R I、F c γ R I I、および F c γ R I I I を発現する。造血細胞上での F c R 発現は、R a v e t c h a n d K i n e t, A n n u. R e v. I m m u n o l 9 : 4 5 7 - 9 2 (1 9 9 1) の 4 6 4 頁の表 3 にまとめられている。目的の分子の A D C C 活性を評価するために、インビトロ A D C C アッセイ（米国特許第 5, 500, 362 号または同第 5, 821, 337 号に記載のアッセイなど）を行うことができる。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（P B M C）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいはまたはさらに、目的の分子の A D C C 活性を、例えば、C l y n e s e t a l., P N A S (U S A) 9 5 : 6 5 2 - 6 5 6 (1 9 9 8) に開示の動物モデルなどの動物モデルにおいてインビボで評価することができる。

【0068】

「ヒトエフェクター細胞」は、1 つまたは複数の F c R を発現し、エフェクター機能を発揮する白血球である。典型的には、細胞は、少なくとも F c γ R I I I を発現し、A D C C エフェクター機能を発揮する。A D C C を媒介するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞（P B M C）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性 T 細胞、および好中球が含まれ、一般に、P B M C および NK 細胞が好ましい。エフェクター細胞を、天然供給源（例えば、本明細書中に記載の血液または P B M C）から単離することができる。

【0069】

10

20

30

40

50

用語「Fc受容体」および「FcR」を、抗体のFc領域に結合する受容体を説明するために使用する。好ましいFcRは、未変性配列のヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体に結合する(γ受容体)FcRであり、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIサブクラスの受容体(これらの受容体の対立遺伝子改変体および選択的スプライシング形態が含まれる)が含まれる。FcγRII受容体には、主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有するFcγRIIA(「活性化受容体」)およびFcγRIIB(「阻害受容体」)が含まれる。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害受容体FcγRIIIBは、その細胞質ドメイン中に、免疫受容体チロシン阻害モチーフ(ITIM)を含む(Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)に概説)。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。他のFcR(将来的に同定されるFcRが含まれる)は、本明細書中の用語「FcR」に含まれる。この用語には、母方のIgGの胎児への輸送を担う新生児受容体(neonatal receptor)(FcRn)も含まれる(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976); およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))。

10

【0070】

20

「補体依存性細胞傷害性」および「CDC」は、補体存在下での標的の溶解をいう。補体活性化経路は、同族抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)への補体系(C1q)の第1の成分の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイ(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996))を行うことができる。

【0071】

「親和性成熟」抗体は、1つまたは複数のそのCDR中に1つまたは複数の変化を有し、これらの変化を持たない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性が改良された抗体である。好ましい親和性成熟抗体は、ナノモルまたはさらにピコモルの標的抗原に対して親和性を有する。親和性成熟抗体を、当該分野で公知の手順によって産生する。Mark et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)は、VHおよびVLドメインのシャフリングによる親和性成熟を記載している。CDRおよび/またはフレームワーク残基の無作為な変異誘発は、Barbas et al., Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al., Gene 169:147-155 (1995); Yellton et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)に記載されている。

30

【0072】

本明細書中の「可動性リンカー」は、ペプチド結合によって連結された2つまたはそれを超えるアミノ酸残基を含むペプチドをいい、これによって連結された2つのポリペプチド(2つのFd領域など)の回転自由度が増加する。このような回転自由度により、可動性リンカーによって連結された2つまたはそれを超える抗原結合部位をより効率的に各標的抗原に近づけることが可能である。適切な可動性リンカーペプチド配列の例には、gly-ser、gly-ser-gly-ser、ala-ser、およびgly-gly-gly-serが含まれる。

40

【0073】

「二量体化ドメイン」は、少なくとも2つのアミノ酸残基(一般に、システイン残基)または少なくとも2つのペプチドまたはポリペプチド(同一または異なるアミノ酸配列を

50

有する)の会合によって形成される。ペプチドまたはポリペプチドは、共有結合および／または非共有結合によって互いに相互作用し得る。二量体化ドメインの例には、Fc領域；ヒンジ領域；CH3領域；CH4領域；CH1-CL対；米国特許第5,821,333号(特に本明細書中で参考として援用される)の記載のように操作された「ノブ(knob)」および／または「突出部(protruberance)」との「接合部分」；ロイシンジッパー(例えば、jun/fosロイシンジッパー、Kostelney et al., J. Immunol., 148:1547-1553(1992)を参照のこと；または酵母GCN4ロイシンジッパー)；イソロイシンジッパー；受容体二量体対(例えば、インターロイキン8受容体(IL-8R)；およびインテグリンヘテロ二量体(LFA-1およびGPIIb/IIIaなど)またはその二量体形成領域；二量体リガンドポリペプチド(例えば、神経成長因子(NGF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、インターロイキン8(IL-8)、血管内皮増殖因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、PDGFメンバー、および脳由来神経栄養因子(BDNF)(Arakawa et al., J. Biol. Chem. 269(45):27833-27839(1994)およびRadziejewski et al., Biochem. 32(48):1350(1993)を参照のこと)またはその二量体形成領域；ジスルフィド結合を形成することができるシステイン残基対；ペプチドとポリペプチドとの間にジスルフィド結合を形成することができるように少なくとも1つのシステイン残基(例えば、約1個、2個、または3個〜約10個のシステイン残基)(以後、「合成ヒンジ」)をそれぞれ含むペプチド対またはポリペプチド対；ならびに抗体可変領域が含まれる。本明細書中で最も好ましい二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域である。

【0074】

抗体の「機能的抗原結合部位」は、標的抗原に結合することができる抗原結合部位である。抗原結合部位の抗原結合親和性は、抗原結合部位が由来する親抗体と必ずしも同等の強さではないが、抗原への抗体の結合を評価するための公知の種々の方法のいずれか1つを使用して抗原結合能力を測定可能でなければならない。さらに、本明細書中の多価抗体の各抗原結合部位の抗原結合親和性は、量的に同一である必要はない。本明細書中の多量体抗体について、機能的抗原結合部位数を、超遠心分離分析を使用して評価することができる。この分析方法にしたがって、異なる比率で標的抗原と多量体抗体とを組み合わせ、複合体の平均分子量を計算し、異なる機能的結合部位数を計算する。これらの理論値を得られた実際の実験値と比較し、機能的結合部位数を評価する。

【0075】

指定された抗体の「生物学的特徴」を有する抗体は、同一の抗原に結合する他の抗体が区別される1つまたは複数の生物学的特徴を有する抗体である。

【0076】

目的の抗体によって結合された抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)などに記載の日常的な交差遮断(cross-blocking)アッセイを行うことができる。

【0077】

1つまたは複数のさらなる治療薬「と組み合わせた」投与には、同時(併用)投与および／または任意の順序での連続的投与が含まれる。

【0078】

治療される「哺乳動物」は、哺乳動物として分類される任意の動物(ヒト、家畜(domestic animal)および家畜(farm animal)、ならびに動物園の動物、競技動物(sports)、またはペット用動物が含まれる)(イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ブタなど)をいう。典型的には、哺乳動物はヒトである。

【0079】

「障害」は、本発明の分子を使用した治療から恩恵を受けるであろう任意の容態である

10

20

30

40

50

。これには、慢性および急性の障害または疾患（哺乳動物が問題の障害にかかりやすい病的状態が含まれる）が含まれる。本明細書中の治療すべき障害の制限されない例には、任意の形態の腫瘍、良性および悪性腫瘍；血管新生化腫瘍；肥大；白血病およびリンパ性悪性疾患；ニューロン、神経膠細胞、星状細胞、視床下部、および他の腺、マクロファージ、上皮、間質、および胞胚腔の障害；ならびに不適当な、異常な、過剰のおよび／または病理学的な血管新生および／または血管透過性を生じる炎症性障害、血管形成障害、および免疫障害、血管障害が含まれる。

【0080】

用語「有効量」または「治療有効量」は、哺乳動物の疾患または障害を治療するのに有効な薬物の量をいう。癌の場合、有効量の薬物により、癌細胞数を減少させることができ、腫瘍サイズを減少させることができ、周辺器官への癌細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度遅延させ、典型的には停止させる）ことができ、腫瘍の転移を阻害（すなわち、ある程度遅延させ、典型的には停止させる）ことができ、腫瘍成長をある程度阻害することができる。薬物によって既存の癌細胞の増殖を防止し、そして／または死滅させることができる程度まで、静菌性および／または細胞傷害性を示し得る。癌療法のために、インビボでの有効性を、例えば、生存期間、疾患進行時間（TTP）、反応速度（RR）、応答の持続時間、および／または生活の質の評価によって測定することができる。

【0081】

「治療」は、処置上の治療および予防的または防止的手段をいう。治療が必要な者には、既に障害を罹患している者および障害を予防すべき者が含まれる。

【0082】

本明細書中のANGPTL4分子に関する用語「生物活性」および「生物学的に活性な」は、特異的に結合して細胞応答（例えば、増殖、接着、移動、脂質調整など）を調節する分子の能力をいう。細胞応答には、ANGPTL4受容体（例えば、 $\alpha_V\beta_5$ インテグリン受容体）によって媒介される細胞応答（接着、移動、および／または増殖が含まれるが、これらに限定されない）も含まれる。この文脈では、用語「調整する」には、促進および阻害の両方が含まれる。本発明の分子には、ANGPTL4受容体（例えば、 $\alpha_V\beta_5$ インテグリン受容体）のアゴニストおよびアンタゴニストも含まれる。

【0083】

本明細書中で使用される、「肥大」を、腫瘍形成に関与しない天然の成長と無関係な器官または構造の質量の増大と定義する。器官または組織の肥大は、各細胞の質量の増大（真性肥大）、組織を作製する細胞数の増加（過形成）、またはその両方のいずれかに起因する。

【0084】

用語「癌」および「癌性」は、典型的には、無秩序の細胞増殖によって特徴づけられる哺乳動物の生理学的容態をいうか説明する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ性悪性疾患が含まれるが、これらに限定されない。このような癌のより詳細な例には、腎臓癌もしくは腎癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、直腸結腸癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌が含まれる）、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肝臓癌、膀胱癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌（gastric cancer）または胃の癌（stomach cancer）（消化器癌が含まれる）、膵癌、頭頸部癌、グリア芽細胞腫、網膜芽細胞腫、星細胞腫、テコマ、男性化腫瘍、肝細胞腫、血液悪性腫瘍（非ホジキンリンパ腫（NHL）、多発性骨髄腫、および急性血液悪性腫瘍が含まれる）、子宮内膜癌もしくは子宮癌、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛癌、唾液腺癌、外陰癌、甲状腺癌、食道癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、上咽頭癌、鼻咽頭癌、咽頭癌、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌、シュワン腫、乏突起細胞腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫瘍、ならびにB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中等度の悪性度の濾胞性NHL；中等度の悪性

度のびまん性NH L；高悪性度の免疫芽細胞NH L；高悪性度のリンパ芽球性NH L；高悪性度の小さな非切れ込み細胞NH L；巨大病変NH L；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；およびワンデンシュトレームマクログロブリン血症が含まれる）；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ性白血病（ALL）；有毛細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；および移植後リンパ球増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症（phakomatoses）に関連する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に関連する浮腫など）、およびメージ症候群が含まれる。

【0085】

用語「抗新生物組成物」は、少なくとも1つの活性な治療薬（例えば、「抗癌薬」）を含む癌治療で有用な組成物をいう。治療薬（抗癌薬）の例には、以下が含まれるが、これらに限定されない：例えば、化学療法薬、増殖抑制薬、細胞傷害薬、放射線治療で使用される薬剤、抗血管形成薬、アポトーシス薬、抗チューブリン薬、毒素、癌を治療するための他の薬剤（例えば、抗-VEGF中和抗体）、VEGFアンタゴニスト、抗HER-2、抗CD20、上皮成長因子受容体（EGFR）アンタゴニスト（例えば、チロシンキナーゼインヒビター）、HER1/EGFRインヒビター、エルロチニブ、COX-2インヒビター（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、1つまたは複数のErbB2、ErbB3、ErbB4に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）、またはVEGF受容体、血小板由来の成長因子（PDGF）および／または幹細胞因子（SCF）の受容体チロシンキナーゼのインヒビター（例えば、イマチニブメシレート（Gleevec（登録商標）Novartis））、TRAIL/Apo2、および他の生物活性薬および有機化学薬など。その組み合わせも本発明に含まれる。

【0086】

本明細書中で使用される、用語「細胞傷害薬」は、細胞機能を阻害または防止し、そして／または細胞破壊を起こす物質をいう。この用語は、放射性同位体（ ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬、小分子毒素または細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素（そのフラグメントおよび／または改変体が含まれる）などの毒素が含まれることが意図される。

【0087】

本明細書中で使用される場合、「増殖抑制薬」は、細胞増殖をインビトロおよび／またはインビボで阻害する化合物または組成物をいう。したがって、成長抑制薬は、S期の細胞の比率を有意に減少させるものであり得る。成長抑制薬の例には、細胞周期（S期以外）の進行を遮断する薬剤（G1の停止およびM期の停止を誘導する薬剤など）が含まれる。古典的なM期遮断薬には、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、TAXOL（登録商標）、およびトポII阻害薬（ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンなど）が含まれる。G1期を停止させる薬剤（例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、およびara-CなどのDNAアルキル化剤）は、S期の停止にも波及する。さらなる情報を、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)（特に、p. 13）に見出すことができる。

【0088】

「化学療法薬」は、癌治療に有用な化合物である。化学療法薬の例には、アルキル化剤（チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミドなど）；アルキルスルホン酸塩（ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなど）；アジリジン（ベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパなど）；エチレンイミンおよびメチラメルアミン（アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミ

ド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロールメラミンが含まれる) ; アセトゲニン (特に プラタシンおよびプラタシノン (bul lat ac in one)) ; δ -9-テトラヒドロカンナビノール (ドロナビノール、MAR IN OL (登録商標)) ; β -ラパコン ; ラパコール ; コルヒチン ; ベツリン酸 ; カンプトテシン (合成アナログトポテカン (HYC AM T IN (登録商標) が含まれる) 、CPT-11 (イリノテカン、CAMPTOSAR (登録商標)) 、アセチルカンプトセシン、スコボレクチン (sc o p o l e c t i n) 、および9-アミノカンプトテシンが含まれる) ; プリオスタチン ; カリスタチン ; CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビセレシン合成アナログが含まれる) ; ポドフィロトキシシン ; ポドフィリン酸 (p o d o p h y l l i n i c a c i d) ; テニポシド ; クリプトフィシン (c r y p t o p h y c i n) (特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8) ; ドラスタチン ; ズオカルマイシン (d u o c a r m y c i n) (合成アナログKW-2189およびCB1-TM1が含まれる) ; エレウセロビン (e l e u t h e r o b i n) ; パンクラチスタチン (p a n c r a t i s t a t i n) ; サルコジクチン (s a r c o d i c t y i n) ; スポンジスタチン ; ナイトロジェンマスタード (クロランブシル、クロラムブシル、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビシン (n o v e m b i c h i n) 、フェネステリン (p h e n e s t e r i n e) 、プレドニムスチン (p r e d n i m u s t i n e) 、トロホスファミド (t r o f o s f a m i d e) 、ウラシルマスタードなど) ; ニトロソ尿素 (n i t r o s u r e a) (カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロリムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンなど) ; 抗生物質 (エンジイン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン (特に、カリケアマイシン γ I I およびカリケアマイシン ω I I) (例えば、Agnew、Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) を参照のこと) など) ; ダイネミシン (d y n e m i c i n) (ダイネミシンAが含まれる) ; エスペラミシン (e s p e r a m i c i n) ; ならびにネオカルチノスタチン発色団および関連色素タンパク質であるエンジイン抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン (a u t h r a m y c i n) 、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン (c a c t i n o m y c i n) 、カラビシン (c a r a b i c i n) 、カルミノマイシン (c a r m i n o m y c i n) 、カルジノフィリン (c a r z i n o p h i l i n) 、クロモマイシン (c h r o m o m y c i n i s) 、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (d e t o r u b i c i n) 、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン (A D R I A M Y C I N (登録商標) 、モルフォリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシン、塩酸ドキソルビシンリボソーム注射 (D O X I L (登録商標)) 、およびデオキシドキソルビシンが含まれる) 、エピルビシン、エソルビシン (e s o r u b i c i n) 、イダルビシン、マルセロマイシン (m a r c e l l o m y c i n) 、マイトマイシン (マイトマイシンCなど) 、ミコフェノール酸、ノガルマイシン (n o g a l a m y c i n) 、オリボマイシン (o l i v o m y c i n) 、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (p o t f i r o m y c i n) 、ピューロマイシン、ケラマイシン (q u e l a m y c i n) 、ロドルビシン (r o d o r u b i c i n) 、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン (t u b e r c i d i n) 、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン (z o r u b i c i n) ; 代謝拮抗物質 (メトトレキセート、ゲムシタビン (G E M Z A R (登録商標)) 、テガフル (U F T O R A L (登録商標)) 、カペシタビン (X E L O D A (登録商標)) 、エポシロン、および5-フルオロウラシル (5-FU) など) ; 葉酸アナログ (デノプテリン (d e n o p t e r i n) 、メトトレキセート、プテロプテリン (p t e r o p t e r i n) 、トリメトトレキセートなど) ; プリンアナログ (フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン (t h i a m i p r i n e) 、チオグアニンなど) ; ピリミジンアナログ (アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジンなど) ; アンドロゲン (カルウステロン (c a l u s t e r o n e) 、ドロ

モスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど)；抗アドレナル (anti-adrenal) (アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど)；葉酸補給薬 (フォリン酸 (frolinic acid) など)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil)；ビスアントレン (bisantrene)；エダトラキセート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルシン；ジアジコン (diaziquone)；エルフォルニシン (elfornithine)；酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate)；エトグルシド (etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン (lonidainine)；マイタンシノイド (maytansinoid) (マイタンシンおよびアンサミトシン (ansamitocin) など)；ミトグアゾン (mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダンモル (mopidamol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメト (phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントリン (losoxantrone)；2-エチルヒドラジン；プロカルバジン；PSK (登録商標) ポリサッカリド複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン (razoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピログエルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン (triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテシン (特に、T-2 毒素、ベラクリンA (verracurin A)、ロリジンAおよびアングイジン (anguidine))；ウレタン；ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン (mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール (mitolactol)；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；チオテパ；タイソイド (例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子処方物 (ABRAXANETM)、およびドキセタキセル (doxetaxel) (TAXOTERE (登録商標)))；クロラムブシル (chlorambucil)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金アナログ (シスプラチンおよびカルボプラチンなど)；ビンブラスチン (VELBAN (登録商標))；白金；エトポシド (VP-16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボビン (leucovorin)；ビノレルビン (NAVELBINE (登録商標))；ノバントロン；エダトレキセート (edatrexate)；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼインヒビターであるRFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (difluorometilhyllornithine) (DMFO)；レチノイド (レチノイン酸など)；上記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つまたはそれを超える組み合わせ (CHOP (シクロホスファミド、ドキシソルビシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略語) など) およびFOLFOX (5-FUおよびロイコボビンと組み合わせたオキサリプラチン (ELOXATINTM) を使用した治療計画の略語) が含まれる。

【0089】

癌の成長を促進することができるホルモンの作用を調節、減少、遮断、または阻害するように作用する抗ホルモン薬 (しばしば、全身 (systemic) または全身 (whole-body) 治療の形態である) もこの定義に含まれる。これら自体がホルモンであり得る。例には、抗女性ホルモン薬および選択的エストロゲン受容体調節物質 (SERM) (例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標) タモキシフェンが含まれる)、ラロキシフェン (EVISTA (登録商標))、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン (keoxifene)、LY117018、オナプリストン (onapristone)、およびトレミフェン (FARESTON (登録商標)) が含まれる)；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方調節因子 (ERD)；卵巣を抑制するか遮断するように機能する薬剤 (例えば、黄体形成 (1

10

20

30

40

50

e u t i n i z i n g) ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニスト (酢酸ロイプロリド (LUPRON (登録商標) および ELIGARD (登録商標) など)、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン、およびトリプテレリン (tripterelin)) ; 他の抗アンドロゲン (フルタミド、ニルタミド、およびビカルタミドなど) ; ならびに副腎中でのエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター (例えば、4 (5) -イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール (MEGASE (登録商標))、エキセメスタン (AROMASIN (登録商標))、ホルメスタチン (formestane)、ファドロゾール、ボロゾール (vorozole) (RIVISOR (登録商標))、レトロゾール (FEMARA (登録商標))、およびアナストロゾール (ARIMIDEX (登録商標)) など) が含まれる。さらに、化学療法薬のこのような定義には、ビスフォスフォネート (クロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標) または OSTAC (登録商標) など)、エチドロロン酸 (DIDROCAL (登録商標))、NE-58095、ゾレドロロン酸/ゾレドロロン酸塩 (ZOMETA (登録商標))、アレンドロネート (FOSAMAX (登録商標))、パミドロロン酸 (AREDIA (登録商標))、チルドロン酸 (SKELID (登録商標))、またはリセドロロン酸 (ACTONEL (登録商標)) など) ; ならびにトロキサシタビン (troxacitinabine) (1, 3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド (特に、異常な細胞増殖に關与するシグナル伝達経路において遺伝子発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (例えば、PKC- α 、Raf、H-Ras、および上皮成長因子受容体 (EGF-R) など) ; ワクチン (THERATOPE (登録商標) ワクチンおよび遺伝子治療ワクチン (例えば、ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、および VAXID (登録商標) ワクチンなど) ; トポイソメラーゼ I インヒビター (例えば、LURTOTECAN (登録商標)) ; rmRH (例えば、ABARELIX (登録商標)) ; ラパチニブジトシレート (Erbb-2 および GW572016 としても公知の EGFR 二重チロシンキナーゼ小分子インヒビター) ; COX-2 インヒビター (セレコキシブ (CELEBREX (登録商標) など) ; 4- (5- (4-メチルフェニル) -3- (トリフルオロメチル) -1H-ピラゾール-1-イル) ベンゼンスルホンアミド ; ならびに上記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸、または誘導体が含まれる。

【0090】

用語「サイトカイン」は、一方の細胞集団によって放出され、細胞内メディエーターとして他方の細胞に対して作用するタンパク質の一般名である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインのうちで、成長ホルモン (ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなど) ; 副甲状腺ホルモン ; チロキシ ; インスリン ; プロインシュリン ; リラキシ ; プロレラキシ (prorelaxin) ; 糖タンパク質ホルモン (濾胞刺激ホルモン (FSH)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、および黄体形成ホルモン (LH) など) ; 肝臓成長因子 ; 線維芽細胞成長因子 ; プロラクチン ; 胎盤ラクトゲン ; 腫瘍壊死因子 α および β ; ミューラー管阻害物質 ; マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド ; インヒビン ; アクチビン ; 血管内皮増殖因子 (例えば、VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E) ; 胎盤由来成長因子 (PLGF) ; 血小板由来成長因子 (PDGF (例えば、PDGFA、PDGFB、PDGFC、PDGFD)) ; インテグリン ; トロンボポエチン (TPO) ; 神経成長因子 (NGF- α など) ; 血小板成長因子 ; トランスフォーミング成長因子 (TGF) (TGF α および TGF β など) ; インスリン様成長因子 I および II ; エリスロポエチン (EPO) ; 骨誘導因子 ; インターフェロン (インターフェロン α 、 β 、および γ など)、コロニー刺激因子 (CSF) (マクロファージ-CSF (M-CSF) など) ; 顆粒球-マクロファージ-CSF (GM-CSF) ; 顆粒球-CSF (G-CSF) ; インターロイキン (IL) (IL-1、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-

14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-30など）；セクレトグロビン／ウテログロビン（secretoglobin/uteroglobin）；オンコスタチンM（OSM）；腫瘍壊死因子（TNF α またはTNF- β など）；ならびに他のポリペプチド因子（LIFおよびキットリガンド（KL）が含まれる）が含まれる。本明細書中で使用される、用語「サイトカイン」には、天然供給源または組換え細胞培養物由来のタンパク質および未変性配列のサイトカインの生物活性等価物が含まれる。

【0091】

本明細書中で使用される、用語「プロドラッグ」は、親薬物と比較して腫瘍細胞に対する細胞傷害性が低く、酵素的に活性化するかより活性な親形態に変換することができる薬学的に活性な物質の前駆体または誘導体形態をいう。例えば、Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) および Stella et al., “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Human a Press (1985) を参照のこと。本発明のプロドラッグには、より活性な細胞傷害性遊離薬に変換することができるリン酸塩含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、硫酸塩含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、 β ラクタム含有プロドラッグ、任意選択的に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは任意選択的に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシンプロドラッグおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグが含まれるが、これらに限定されない。本発明で使用するためにプロドラッグ形態に誘導体化することができる細胞傷害薬の例には、上記の化学療法薬が含まれるが、これらに限定されない。

【0092】

「血管形成因子または血管形成薬」は、血管の発達を刺激する（例えば、血管形成、内皮細胞増殖、血管の安定性、および／または脈管形成などを促進する）成長因子である。例えば、血管形成因子には、例えば、VEGFおよびVEGFファミリーのメンバー、PDGF、PDGFファミリー、線維芽細胞成長因子ファミリー（FGF）、TIEリガンド（アンジオポエチン）、エフリン、ANGPTL3、ANGPTL4などが含まれるが、これらに限定されない。創傷治癒を促進する因子（成長ホルモン、インスリン様成長因子-I（IGF-I）、VIGF、上皮細胞成長因子（EGF）、CTGFおよびそのファミリーのメンバー、ならびにTGF- α およびTGF- β ）も含まれるであろう。例えば、Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53: 217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22: 3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5 (12): 1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22: 6549-6556 (2003)（例えば、血管形成因子を列挙した表1）；および Sato, Int. J. Clin. Oncol., 8: 200-206 (2003) を参照のこと。

【0093】

「抗血管形成薬」または「血管形成インヒビター」は、血管形成、脈管形成、または望ましくない血管透過性を直接または間接的に阻害する低分子量の物質、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、単離タンパク質、組換えタンパク質、抗体、またはその複合体もしくは融合タンパク質をいう。例えば、抗血管形成薬は、上記で定義した血管形成薬に対する抗体または他のアンタゴニスト（例えば、VEGFに対する抗体、VEGF受容体に対する抗体、VEGF受容体シグナル伝達を遮断する小分子（例えば、PTK787/ZK2284、SU6668））である。抗血管形成薬には、未変性の血管形成インヒビター（例え

ば、アンジオスタチン、エンドスタチンなど）も含まれる。例えば、Klagsbrun and D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)（例えば、悪性黒色腫の抗血管形成薬療法を列挙した表3）; Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)（例えば、抗血管形成因子を列挙した表2）; および Sato, *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)（例えば、表1は、臨床試験で使用した抗血管形成薬を列挙している）を参照のこと。

【0094】

用語「標識」は、本明細書中で使用される場合、ポリペプチドと直接または間接的に結合する検出可能な化合物または組成物をいう。標識自体が検出可能であり得るか（例えば、放射性同位体標識または蛍光標識）、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学的变化を触媒することができる。

【0095】

「単離」核酸分子は、通常はポリペプチド核酸の天然供給源中で会合した少なくとも1つの汚染核酸分子から同定および分離された核酸分子である。単離核酸分子は、自然界で見出される形態または配置とは異なる。したがって、単離核酸分子は、天然の細胞中に存在する核酸分子と区別される。しかし、単離核酸分子には、通常はポリペプチドを発現する細胞中に含まれ、例えば、天然の細胞と異なる染色体位置に存在する核酸分子が含まれる。

【0096】

表現「調節配列」は、特定の宿主生物中の作動可能に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列をいう。原核生物に適切な調節配列には、例えば、プロモーター、任意選択的に、オペレーター配列、およびリボゾーム結合部位が含まれる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが公知である。

【0097】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係におかれた場合、「作動可能に連結されて」いる。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現された場合、ポリペプチドのDNAと作動可能に連結されているか、プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列と作動可能に連結されているか、リボゾーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結された」は、連結されるDNA配列が連続していること、分泌リーダーの場合には、連続し且つ読み枠内に存在することを意味する。しかし、エンハンサーは、必ずしも連続している必要はない。従来の制限部位でのライゲーションによって連結される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを、従来の慣習にしたがって使用する。

【0098】

本明細書中で使用される、表現「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」を交換可能に使用し、全てのこのような表示には子孫が含まれる。したがって、用語「形質転換体」および「形質転換細胞」には、初代対象細胞および継代数と無関係のこれに由来する培養物が含まれる。全子孫は、意図的および不注意な変異によってDNAの内容が正確に同一でないかもしれないことも理解される。スクリーニングした最初に形質転換した細胞と同一の機能または生物活性を有する変異子孫が含まれる。異なる表示が意図される場合、文脈から明らかである。

【0099】

ANGPTL4

アンジオポエチン様4タンパク質（ANGPTL4）は、分泌タンパク質であり、アンジオポエチンファミリーのメンバーである。これは、肝臓フィブリノーゲン／アンジオポ

10

20

30

40

50

エチン関連タンパク質 (HFARP) (Kim et al., Biochem. J. 346:603-610 (2000))、PGAR (PPAR γ アンジオポエチン関連タンパク質) (Yoon, et al., Mol. Cell Biol., 20:5343-5349 (2000))、絶食誘発性脂肪因子 (FIAF) (Kerten et al., J. Biol. Chem., 275:28488-28493 (2000))；アンジオポエチン関連タンパク質 (ARP-4)；NL2 (米国特許第6,348,350号；同第6,372,491号；および同第6,455,496を参照のこと)；および Ang 6としても公知である。

【0100】

ヒト由来の ANGPTL4 は406アミノ酸タンパク質である一方で (例えば、米国特許第6,348,350号、同第6,372,491号、および同第6,455,496号)、マウスANGPTL4は410アミノ酸タンパク質である (Kim et al., Biochem. J. 346:603-610 (2000))。マウスおよびヒトは、アミノ酸レベルで約75%同一である。Kim et al., Biochem. J. 346:603-610 (2000)。ANGPTL4は、シグナルペプチド、3つの潜在的なN-グリコシル化部位、および分子内ジスルフィド結合に参与し得る4つのシステインを有する。例えば、図3のパネルAに示すように、ANGPTL4はより高次の分子構造を形成する。例えば、Ge et al., J. Biol. Chem., 279(3):2038-2045 (2004)；Ge et al., J. Lipid Res. 45:2071-2079 (2004)；およびMandard et al., J. of Biol. Chem., 279(33):34411-34420 (2004)も参照のこと。ANGPTL4を、タンパク質分解的にプロセッシングすることもできる。例えば、Ge et al., J. Biol. Chem., 279(3):2038-2045 (2004)；およびMandard et al., J. of Biol. Chem., 279(33):34411-34420 (2004)も参照のこと。本明細書中に記載するように、ANGPTL4のR162GおよびR164E置換により、SDSゲル上で野生型 (または未変性) タンパク質よりも高い分子量に泳動する変異ANGPTL4が得られる (図3、パネルBを参照のこと)。

【0101】

アンジオポエチンファミリーの保存領域には、コイルドコイルドメインおよびC末端フィブリノーゲン (FBN) 様ドメインが含まれる。例えば、Kim et al., Biochem. J. 346:603-610 (2000)を参照のこと。C末端フィブリノーゲン様ドメインを放出する調節された方法で、ANGPTL4がタンパク質分解的にプロセッシングされることが示唆される。例えば、Ge et al., J. Biol. Chem., 279(3):2038-2045 (2004)を参照のこと。アンジオポエチンファミリーの他のメンバーには、Tie2受容体に結合するアンジオポエチン1、アンジオポエチン2、およびアンジオポエチン3/アンジオポエチン4が含まれる。例えば、Davis et al., Cell 87, 1161-1169 (1996)；Maisonpierre et al., Science 277, 55-60 (1997)；Valenzuela et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 96, 1904-1909 (1999)；ならびに米国特許第5,521,073号；同第5,650,490号；および同第5,814,464号を参照のこと。アンジオポエチン1および4は、Tie2受容体のアゴニストであるようである一方で、アンジオポエチン2および3は、Tie2受容体のアンタゴニスト (場合により、アゴニスト) であるようである。例えば、Folkman & D'Amore, Cell, 87:1153-1155 (1996)；Suri et al., Cell, 87:1171-1180 (1996)；Maisonpierre et al., Science 277:55-60 (1997)；およびWard & Dumont, Seminars in Cell & Developmental Biology, 13:19-27 (2002)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0102】

別のファミリーメンバー、アンジオポエチン様3タンパク質(ANGPTL3)は、インテグリン $\alpha_v\beta_5$ に結合する血管形成因子である。例えば、2003年11月20日に公開された米国特許出願20030215451号およびCamenisch et al., J. Biol. Chem., 277(19):17281-17290(2002)を参照のこと。ANGPTL3は、受容体Tie2に結合しないようである。Camenish et al., Journal of Biol. Chem. 277(19):17281-17290(2002)。ANGPTL3はまた、血漿脂質レベルの調節因子である。例えば、Koishi et al., Nat. Genetics 30:151-157(2002)を参照のこと。

10

【0103】

ANGPTL4は、インテグリン $\alpha_v\beta_5$ に結合する。例えば、図11、12、および13を参照のこと。インテグリン $\alpha_v\beta_5$ は、細胞外基質タンパク質(ビトロネクチンおよびDell-1が含まれる)の受容体である(例えば、Stupack and Chersesh, Journal of Cell Science 115:3729-3738(2002)を参照のこと)。 α_v インテグリンは、腫瘍の進行および転移に参与している。例えば、Marshall, J F and Hart, I R Semin. Cancer Biol. 7(3):129-38(1996)を参照のこと。さらに、血管形成における α_v インテグリンの役割も示されている。例えば、Eliceiri, B P and Chersesh, D A Molecular Medicine 4:741-750(1998)を参照のこと。例えば、 $\alpha_v\beta_5$ のモノクローナル抗体は、ウサギ角膜モデルおよびニワトリ絨毛尿膜モデルにおいてVEGF誘導性血管形成を阻害することが示されている。例えば、M. C. Friedlander, et al., Science 270:1500-1502(1995)を参照のこと。 $\alpha_v\beta_3$ および $\alpha_v\beta_5$ のアンタゴニストは、成長因子および腫瘍誘導性血管形成を阻害することも示されている。例えば、Eliceiri and Chersesh, Current Opinion in Cell Biology, 13:563-568(2001)を参照のこと。

20

【0104】

本発明は、アンジオポエチン様4タンパク質(ANGPTL4)のモジュレーター(例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト)の組成物およびこれらのモジュレーターの他の治療薬との組み合わせを提供する。例えば、ANGPTL4のアンタゴニストの抗癌薬との組み合わせおよび腫瘍成長または癌細胞増殖の遮断または減少におけるその使用方法を提供する。本発明はまた、ANGPTL4のアンタゴニストおよび/または他の抗癌薬を使用した腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を遮断するかまたは減少させる方法を提供する。ANGPTL4のアンタゴニストの組成物、抗血管形成薬の組み合わせ、および新生物障害または非新生物障害の新血管形成の遮断または減少におけるその使用方法も提供する。

30

【0105】

ANGPTL4モジュレーターおよびその使用

40

ANGPTL4のモジュレーターは、ANGPTL4活性を調整する分子(例えば、アゴニストおよびアンタゴニスト)である。用語「アゴニスト」を、未変性のANGPTL4受容体(例えば、 $\alpha_v\beta_5$ インテグリン)を介してシグナルを伝達する能力を有する場合、ANGPTL4のペプチドアナログおよび非ペプチドアナログならびにこのようなANGPTL4分子に特異的に結合する抗体をいうために使用する。ANGPTL4受容体(例えば、 $\alpha_v\beta_5$)の生物学的役割の文脈で、用語「アゴニスト」を定義する。特定の実施形態では、アゴニストは、上記に定義するように、未変性のANGPTL4の生物活性(細胞の増殖、移動、および/もしくは接着、ならびに/または脂質ホメオスタシス(homeostasis)の調整など)を有する。

【0106】

50

用語「アンタゴニスト」を、ANGPTL4またはその受容体（例えば、 $\alpha_v\beta_5$ ）に結合する能力と無関係に、ANGPTL4の生物活性を阻害する能力を有する分子をいうために使用する。したがって、ANGPTL4またはその受容体に結合する能力を有するアンタゴニストには、抗ANGPTL4抗体および抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体が含まれる。アンタゴニストANGPTL4を、例えば、ANGPTL4活性（ANGPTL4の接着、移動、増殖、および／または脂質ホメオスタシス活性の調整）の阻害によって評価することができる。 $\alpha_v\beta_5$ インテグリン受容体活性に関して、 $\alpha_v\beta_5$ インテグリン受容体のモジュレーターを、当該分野で公知の方法によって決定することができる。例えば、J. W. Smith et al. in J. Biol. Chem. 265:12267-12271 (1990)に記載の方法を使用することができる。

10

【0107】

治療上の使用

ANGPTL4は、癌標的に関与する。ANGPTL4は、いくつかの腫瘍細胞で発現される場合、インビトロおよびインビボでの腫瘍細胞増殖を引き起こす（例えば、図4、図5、図7、ならびに図8のパネルAおよびパネルBを参照のこと）。ANGPTL4は抗血管形成因子（例えば、抗VEGF抗体）で治療された腫瘍で発現した場合、腫瘍は成長能力を維持することができる（例えば、図8のパネルCを参照のこと）。ANGPTL4はまた、腫瘍細胞を移動させる（例えば、図9を参照のこと）。これは、腎癌で上方制御されることも示されている。例えば、代理人整理番号P5032R1;WO 02/07941;およびLe Jan et al., American Journal of Pathology, 162(5):1521-1528(2003)を参照のこと。さらに、ANGPTL4は血管形成促進因子(proangiogenic factor)であり（例えば、S. Le Jan et al., Am. J. Pathol., 162(5):1521-1528(2003)を参照のこと）、癌療法の標的である。VEGFのように(Shweiki et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 92:768-772(1995)、ANGPTL4発現は、低酸素状態に応答して増加する。例えば、Le Jan et al., American Journal of Pathology, 162(5):1521-1528(2003)を参照のこと。

20

【0108】

ANGPTL4は、種々の条件下で、腫瘍細胞（例えば、A673細胞）に結合する（例えば、図6のパネルAおよびB）。例えば、図4のパネルAおよびパネルBに示すように、ANGPTL4は、細胞がANGPTL4を発現する発現構築物で形質導入された場合にインビトロでいくつかの腫瘍細胞増殖を刺激する。図4のパネルCはまた、ANGPTL4で形質導入したCOS7細胞由来の馴化培地の添加によってA673細胞の増殖が誘導されることを示す。図7のパネルAおよびBも参照のこと。ANGPTL4は、ANGPTL4が培養皿上にコーティングされた場合にA673細胞の増殖が誘導されるが（図5を参照のこと）、腎臓上皮細胞、腎臓メサンギウム細胞、またはHUVECの細胞増殖は誘導しない。ANGPTL4はまた、腫瘍細胞の細胞移動を誘導する。例えば、図9を参照のこと。

30

40

【0109】

ANGPTL4は、主に、脂肪組織、胎盤、肝臓、および腎臓で発現し、ob/ob（レプチンノックアウト）マウスおよびdb/db（レプチン受容体ノックアウト）マウスでも上方制御される。例えば、Yoon et al., Mol. Cell. Biol. 20:5343-5349(2000);Kim et al., Biochem. J., 346:603-610(2000);Kersten et al., J. Biol. Chem., 275:28488-28493(2000);およびLe Jan et al., American Journal of Pathology 162(5):1521-1528(2003)を参照のこと。ANGPTL4はまた、脂質モジュレーターおよびリポタンパク質リパーゼのインヒビターであると報告されている。例え

50

ば、Yu et al., PNAS USA 102 (5) : 1767-1772 (2005); Yoshida et al., J. Lipid Res. 43: 1770-1772 (2002); および Wiesner et al., J. Endocrinology 180: R1-R6 (2004) を参照のこと。ANGPTL4 発現はまた、脂肪組織中の PPAR γ および α によって誘導され、飢餓によって誘導される。これは、脂肪前駆細胞および肝細胞の増殖ならびに／または脂肪前駆細胞の移動も調整し、それに伴って血清中のトリグリセリドレベルおよびコレステロールレベルが調整される。米国特許仮出願番号 60/589,875 号および同時に提出された代理人整理番号 P2156R1 (全ての目的のために参考として援用される) を参照のこと。研究者は、血管形成と脂質生成との間の関係を報告している。例えば、Sierra-Honigsmann et al., "Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor" Science 281: 1683-1686; (1998); Rupnick et al., "Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature" Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 99 (16): 10730-10735 (2002); および Fukumura et al., "Paracrine Regulation of Angiogenesis and Adipocyte Differentiation During In Vivo Adipogenesis." Circ. Res. 93: e88-e97 (2003) を参照のこと。

【0110】

本発明によれば、ANGPTL4 モジュレーターおよび／または ANGPTL4 モジュレーターと他の治療薬との組み合わせを使用して、種々の新生物または非新生物容態を治療することができることが意図される。一実施形態では、ANGPTL4 モジュレーター (例えば、ANGPTL4 のアンタゴニスト) を、癌細胞または腫瘍成長の阻害で使用する。例えば、図 10 のパネル A および B に示すように、抗 ANGPTL4 ポリクローナル抗体は、用量依存性様式で腫瘍細胞増殖を阻害した。ANGPTL4 により、腫瘍細胞を移動させることができる (例えば、図 9 を参照のこと)。本発明によれば、ANGPTL4 アンタゴニストを使用して腫瘍の転移を阻害することもできることが意図される。ANGPTL4 はまた、脂肪前駆細胞の移動を誘導する。米国特許仮出願番号 60/589,875 号および同時に提出された代理人整理番号 P2156R1 を参照のこと。特定の実施形態では、1 つまたは複数の抗癌薬を ANGPTL4 アンタゴニストと共に投与して、癌細胞または腫瘍成長を阻害することができる。本明細書中の「併用療法」の項を参照のこと。

【0111】

治療すべき新生物障害の例には、用語「癌」および「癌性」が付いた本明細書中に記載の新生物障害が含まれるが、これらに限定されない。本発明のアンタゴニストでの治療が可能な非新生物容態には、例えば、望ましくないか異常な肥大、関節炎、関節リウマチ (RA)、乾癬、乾癬性プラーク、サルコイドーシス、粥状動脈硬化、動脈硬化プラーク、心筋梗塞由来の浮腫、糖尿病性網膜症および他の増殖性網膜症 (未熟児網膜症が含まれる)、水晶体後線維増殖症、血管新生緑内障、加齢黄斑変性、糖尿病性黄斑浮腫、角膜新血管形成、角膜移植片新血管形成、角膜移植片拒絶、網膜／脈絡膜新血管形成、隅角の新血管形成 (ルベオーシス)、眼新生血管疾患、血管再狭窄、動静脈奇形 (AVM)、髄膜腫、血管腫、血管線維腫、甲状腺過形成 (グレーブス病が含まれる)、角膜および他の組織の移植、慢性炎症、肺炎、急性肺損傷 / ARDS、敗血症、原発性肺高血圧症、悪性肺浸出、脳浮腫 (例えば、急性脳卒中 / 閉鎖性頭部外傷 / 外傷に関連する)、滑膜炎、RA におけるパンヌス形成、骨化性筋炎、肥大型骨形成、骨関節炎 (OA)、難治性腹水、多嚢胞性卵巣疾患、子宮内膜症、細胞外液疾患 (3rd spacing of fluid disease) (膵炎、区画症候群、熱傷、腸疾患)、子宮筋腫、早産、慢性炎症 (IBD (クローン病および潰瘍性大腸炎) など)、腎臓の同種移植片拒絶、炎症性腸疾患

、ネフローゼ症候群、望ましくないか異常な組織塊の成長（非癌性）、肥満、脂肪組織塊の成長、血友病性関節、肥厚性瘢痕、発毛の抑制、オスラー－ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫水晶体後線維増殖症、強皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水、心膜滲出液（心膜炎に関連する）、および胸膜滲出液が含まれるが、これらに限定されない。

【0112】

ANGPTL4のモジュレーター（例えば、ANGPTL4のアゴニストまたはアクチベーター）を、病理学的障害の治療のために使用することができる。ANGPTL4のモジュレーター（例えば、ANGPTL4のアゴニスト）を、血管形成もしくは新血管形成および／または肥大の傾向のある病理学的障害（例えば、血管性外傷、創傷、断裂、切開、熱傷、潰瘍（例えば、糖尿病性潰瘍、褥瘡、血友病性潰瘍、静脈瘤性潰瘍）、組織増殖、重量増加、末梢動脈疾患、分娩誘導、発毛、表皮水疱症、網膜萎縮症、骨折、骨と脊髄の融合、半月板裂傷などが含まれるが、これらに限定されない）の治療で使用することができる。米国特許仮出願番号60／589,875号および同時に提出された代理人整理番号P2156R1も参照のこと。

10

【0113】

併用療法

上に示すように、本発明は、ANGPTL4アンタゴニストを別の治療薬と共に投与する併用療法を提供する。例えば、ANGPTL4アンタゴニストを、抗癌治療薬または抗新血管形成治療薬と組み合わせて使用して、種々の新生物容態または非新生物容態を治療する。一実施形態では、新生物容態または非新生物容態を、異常または望ましくない血管形成に関連する病理学的障害を特徴とする。ANGPTL4アンタゴニストを、同一組成物中または個別の組成物としてこれらの目的に有効な別の薬剤と連続的または組み合わせて投与することができる。あるいはまたはさらに、ANGPTL4の複数のインヒビターを投与することができる。

20

【0114】

本発明のアンタゴニストおよび／または薬剤を、同一または異なる投与経路を使用して、同時に（例えば、1つの組成物として）または2つまたはそれを超える個別の組成物として投与することができる。あるいはまたはさらに、任意の順序で連続的に投与することができる。特定の実施形態では、2つまたはそれを超える組成物の投与の間隔は、分から日、週から月までの範囲であり得る。例えば、抗癌薬を、最初に投与し、その後ANGPTL4インヒビターを投与することができる。しかし、同時投与またはANGPTL4アンタゴニストの最初の投与も意図される。

30

【0115】

ANGPTL4アンタゴニストと組み合わせて投与される治療薬の有効量は、医師または獣医の判断による。治療すべき容態が最大に管理されるように投与および投薬量の調整を行う。用量は、さらに、使用される治療薬の型および治療される特定の患者などの要因に依存する。抗癌薬の適切な投薬量は、現在使用されている量であり、抗癌薬とANGPTL4アンタゴニストとの組み合わせ作用（相乗効果）によって軽減することができる。特定の実施形態では、インヒビターの組み合わせにより、1つのインヒビターの有効性が強化される。用語「強化する」は、その一般的または承認された用量での治療薬の有効性の改善をいう。本明細書中の「薬学的組成物」も参照のこと。

40

【0116】

典型的には、腫瘍成長または癌細胞の増殖などの病理学的障害を遮断するかまたは減少させるためのANGPTL4アンタゴニストおよび抗癌薬は、同一または類似の疾患に適切である。一実施形態では、抗癌薬は、抗血管形成薬である。

【0117】

癌に関連する抗血管形成療法は、腫瘍成長を支持するための栄養素の供給に必要な腫瘍血管の発達を阻害することを目的とする癌治療戦略である。血管形成が原発性腫瘍成長および転移の両方に関与するので、本発明によって提供された抗血管形成治療は、

50

原発部位の腫瘍の新生物成長を阻害し、続発性部位への腫瘍の転移を防止することができ、それにより、他の治療薬によって腫瘍を攻撃可能である。

【0118】

多数の抗血管形成薬が同定されており、これらは当該分野で公知であり、本明細書中（例えば、定義に列挙）および、例えば、Carmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al., Nature Reviews: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); および Sato, Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) に列挙した抗血管形成薬が含まれる。米国特許出願番号 US 20030055006 号も参照のこと。一実施形態では、ANGPTL4 アンタゴニストを、抗 VEGF 中和抗体（またはフラグメント）および／または他の VEGF アンタゴニストもしくは VEGF 受容体アンタゴニスト（例えば、可溶性 VEGF 受容体（例えば、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、ニューロピリン（例えば、NRP1、NRP2））フラグメント、VEGF または VEGFR を遮断することができるアプタマー、中和抗 VEGFR 抗体、VEGFR チロシンキナーゼ（RTK）の低分子量インヒビター、VEGF のアンチセンスストラテジー、VEGF または VEGF 受容体に対するリボザイム、VEGF のアンタゴニスト改変体；およびこれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない）と組み合わせて使用する。あるいはまたはさらに、2 つまたはそれを超える血管形成インヒビターを患者に同時投与することができる。特定の実施形態では、1 つまたは複数のさらなる治療薬（例えば、抗癌薬）を、ANGPTL4 アンタゴニストおよび抗血管形成薬と組み合わせて投与することができる。

【0119】

本発明の特定の態様では、本発明のアンタゴニストとの腫瘍併用療法に有用な他の治療薬には、他の癌療法（例えば、手術、放射線治療（例えば、照射または放射性物質の投与が含まれる）、化学療法、本明細書中に列挙され、且つ当該分野で公知の抗癌薬での治療、またはこれらの組み合わせ）が含まれる。あるいはまたはさらに、本明細書中に記載の同一または 2 つまたはそれを超える異なる抗原に結合する 2 つまたはそれを超える抗体を、患者に同時投与することができる。時折、1 つまたは複数のサイトカインを患者に投与することも有益であり得る。

【0120】

化学療法薬

特定の態様では、本発明は、有効量の ANGPTL4 のアンタゴニストおよび／または血管形成インヒビターおよび 1 つまたは複数の化学療法薬を癌に感受性を示すか癌と診断された患者に投与することによる、腫瘍成長または癌細胞の増殖を遮断するかまたは減少させる方法を提供する。種々の化学療法薬を、本発明の併用治療方法で 사용할ことができる。意図される化学療法薬の例示的且つ非限定的なリストを、本明細書中の「定義」に示す。

【0121】

当業者に理解されているように、治療薬の適切な用量は、およそ、一般に、化学療法薬を単独または他の化学療法薬と組み合わせて投与する臨床療法で既に使用されている用量である。治療される容態によって投薬量が増加する可能性が高い。治療を行う医師は、各被験体に適切な用量を決定することができる。

【0122】

腫瘍成長の再発

本発明はまた、腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を阻害または防止する方法および組成物を提供する。例えば、図 8 のパネル C は、腫瘍が ANGPTL4 も発現する場合に抗 VEGF 抗体（AVASTIN）で治療される腫瘍が治療を回避する能力（例えば、1 つの再発型）を概略的に示す。

【0123】

腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を使用して、1 つまたは複数の現在利用可能な

療法（例えば、癌療法（化学療法、放射線療法、手術、ホルモン療法、および／または生物学的療法／免疫療法、特に、特定の癌のための標準的な治療計画など））を受けたか治療された患者が臨床的に適切に治療されないか、患者がもはや治療からいかなる有益な効果も得られず、これらの患者がさらなる有効な療法を必要とする容態を説明する。本明細書中で使用される場合、この句は、「非応答／難治性」患者（例えば、依然として療法に応答する患者、副作用を生じる患者、耐性を示す患者、療法に応答しない患者、療法に満足に応答しない患者などを説明する）の容態もいうことができる。種々の実施形態では、癌は、癌細胞数が有意に減少しないか増加し、腫瘍サイズが有意に減少しないか増加し、あるいは、癌細胞のサイズまたは数がさらに減少しない腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発である。癌細胞が腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発であるかどうかを、この

10

【0124】

本発明は、被験体の腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を遮断するかまたは減少させるための1つまたは複数の本発明のANGPTL4アンタゴニストの投与による、被験体の腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を遮断するかまたは減少させる方法を提供する。特定の実施形態では、ANGPTL4アンタゴニストを、癌療法の後に投与することができる。特定の実施形態では、ANGPTL4を、癌療法と同時に投与する。あるいはまたはさらに、ANGPTL4アンタゴニスト療法を別の癌療法と交互に実施し、これを

任意の順序で実施することができる。本発明はまた、癌を罹患しやすい患者の癌の発症または再発を防止するための1つまたは複数のANGPTL4阻害抗体の投与方法を含む。一般に、被験体は、癌療法を受けていたか同時に受ける。一実施形態では、癌療法は、抗血管形成薬での治療である。抗血管形成薬には、当該分野で公知の抗血管形成薬および本明細書中の定義で見出される抗血管形成薬が含まれる。一実施形態では、抗血管形成薬は、抗VEGF中和抗体またはフラグメント（例えば、ヒト化A4.6.1、AVASTIN（登録商標）（Genentech, South San Francisco, CA）、Y0317、M4、G6、B20、2C3など）である。例えば、米国特許第6,582,959号、同第6,884,879号、同第6,703,020号；WO 98/45332；WO 96/30046；WO 94/10202；欧州特許第0666868B1号；米国特許出願番号20030206899号、同第20030190317号、同第20030203409号、および同第20050112126号；Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)；および代理人整理番号PR2072-4を参照のこと。腫瘍成長の再発または癌細胞増殖の再発を遮断するかまたは減少させるために、さらなる薬剤を、ANGPTL4アンタゴニストと組み合わせて投与することができる。例えば、本明細書中の「併用療法」の項を参照のこと。

20

30

【0125】

一実施形態では、本発明のANGPTL4アンタゴニストまたはANGPTL4発現を減少させる他の治療薬を投与して、一定の生物薬、ホルモン薬、放射線、および化学療法薬に対する癌細胞の耐性または感受性の減少を逆転させ、それにより、1つまたは複数のこれらの薬剤に対して癌細胞が再感作され、その後に癌を治療または管理する（転移の防止が含まれる）ために投与する（または投与し続ける）ことができる。

40

【0126】

抗体

本発明の抗体には、抗ANGPTL4抗体および抗ANGPTL4フラグメント抗体、抗血管形成薬または血管形成インヒビターである抗体、抗癌薬である抗体、ANGPTL4受容体に対する抗体（例えば、抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体）、または本明細書中に記載の他の抗体が含まれる。例示的な抗体には、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、フラグメント抗体、多重特異性抗体、ヘテロ抱合抗体、多価抗体、エフェクタ

50

一機能抗体などが含まれる。

【0127】

ポリクローナル抗体

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体の調製方法は、当業者に公知である。例えば、本発明の抗体に対するポリクローナル抗体を、関連抗原およびアジュバントの1回または複数回の皮下（s c）注射または腹腔内（i p）注射によって動物内に惹起する。二官能性剤または誘導体化剤（d e r i v a t i z i n g a g e n t）（例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介して抱合）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C l₂、またはR¹ N = C = N R（式中、RおよびR¹は異なるアルキル基である））を使用して、免疫化すべき種で免疫原性を示すタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビター）に関連抗原を抱合するのに有用であり得る。

10

【0128】

例えば、100 μgまたは5 μgのタンパク質または複合体（それぞれウサギまたはマウス用）を3体積のフロイント完全アジュバントと組み合わせ、溶液を複数の部位に皮内注射することによって本発明の分子、免疫原性複合体、または誘導体に対して動物を免疫化する。1ヶ月後、動物を、元の量の1/5～1/10のペプチドまたは複合体を含むフロイント完全アジュバントの複数の部位への皮下注射によって動物を追加免疫する。7～14日後、動物を採血し、抗体力価について血清をアッセイする。力価がプラトーに達するまで動物を追加免疫する。典型的には、動物を同一抗原の複合体で追加免疫するが、異なるタンパク質に抱合し、そして/または異なる架橋試薬を使用している。複合体を、タンパク質融合物として組換え細胞培養物中で作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝集剤を適切に使用して、免疫応答を増強する。

20

【0129】

モノクローナル抗体

本明細書中に記載の抗原に対するモノクローナル抗体を、K o h l e r e t a l . , N a t u r e , 256:495 (1975)に最初に記載されたハイブリドーマ法を使用して作製することができるか、組換えDNA法（米国特許第4,816,567号）によって作製することができる。

30

【0130】

ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物（ハムスターまたはマカクザルなど）を上記のように免疫化して、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか産生することができるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫化することができる。次いで、リンパ球を、適切な融合剤（ポリエチレングリコールなど）を使用して骨髓腫細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（G o d i n g , 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 , p p . 59-103 (A c a d e m i c P r e s s , 1986)）。

【0131】

このようにして調製したハイブリドーマ細胞を、典型的には、非融合親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する1つまたは複数の物質を含む適切な培養培地中に播種して成長させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（H G P R TまたはH P R T）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（H A T培地）（これらの物質はH G P R T欠損細胞の成長を阻害する）を含む。

40

【0132】

典型的な骨髓腫細胞は、効率よく融合し、選択された抗体産生細胞によって抗体の安定な高レベル産生を支持し、H A T培地などの培地に感受性を示す骨髓腫細胞である。これらのうち、好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株（S a l k I n s t i t u t e

50

Cell Distribution Center, San Diego, California USAから利用可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍由来の株)およびAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから利用可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞など)である。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロミエローマ(heteromyeloma)細胞株も記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

10

【0133】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培養培地を、例えば、ANGPTL4、 $\alpha_v\beta_5$ 、または血管形成分子に指向するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性を、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ(放射免疫アッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)など)によって決定することができる。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性を、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220(1980)のScatchard分析によって決定することができる。

20

【0134】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定した後、クローンを、限界希釈手順によってサブクローン化し、標準的な方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))によって増殖させることができる。この目的に適切な培養培地には、例えば、D-MEM培地またはRPMI-1640培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物内で腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

【0135】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、プロテインA-Sepharose、ハイドロキシルアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィなど)によって、培養培地、腹水、または血清から適切に分離する。

30

【0136】

組換えDNA法(米国特許第4,816,567号に記載の方法など)によってモノクローナル抗体を作製することもできる。モノクローナル抗体をコードするDNAを、従来の手順(例えば、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブの使用による)を使用して、容易に単離および配列決定する。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAを発現ベクターに入れ、次いで、別の方法で免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞(大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞など)にトランスフェクトして組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成することができる。抗体の組換え産生を、以下により詳細に記載する。

40

【0137】

別の実施形態では、抗体または抗体フラグメントを、McCafferty et al., Nature, 348:552-554(1990)に記載の技術を使用して生成した抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)はそれぞれ、ファージライブラリーを使用したマウス抗体およびヒト抗体の単離を記載している。その後の

50

精製は、鎖シャフリング (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)) ならびに非常に巨大なファージライブラリーの構築のための戦略としての組み合わせ感染およびインビボ組換え (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)) による高親和性 (nM 範囲) ヒト抗体の産生を記載している。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替法である。

【0138】

DNA を、例えば、ヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列相同なマウス配列への置換 (米国特許第 4, 816, 567 号; Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)) または免疫グロブリンコード配列への非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部もしくは一部の共有結合によって修飾することができる。

【0139】

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドに、抗体の定常領域を置換するか、抗体の 1 つの抗原組み合わせ部位の可変ドメインを置換して、一方の抗原に対する特異性を有する 1 つの抗原組み合わせ部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原組み合わせ部位を含む 2 価のキメラ抗体を作製する。

【0140】

ヒト化抗体およびヒト抗体

本発明の抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。ヒト化抗体は、これに移入された非ヒト供給源由来の 1 つまたは複数のアミノ酸残基を有する。しばしば、これらの非ヒトアミノ酸残基を、「導入 (import)」残基といい、典型的には、「導入」可変領域から取り出される。本質的に Winter and co-workers (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)) の方法にしたがって、げっ歯類 CDR または CDR 配列へのヒト抗体の対応する配列の置換によってヒト化することができる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的にインタクト未満のヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列に置換されたキメラ抗体 (米国特許第 4, 816, 567 号) である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの CDR 残基およびおそらくいくつかの FR 残基がげっ歯類抗体中の類似の部位由来の残基に置換されているヒト抗体である。

【0141】

ヒト化抗体の作製において使用すべきヒト可変ドメイン (軽鎖および重鎖の両方) の選択は、抗原性の減少のために非常に重要である。いわゆる「最良適合 (best-fit)」法にしたがって、げっ歯類抗体の可変ドメイン配列を、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。次いで、げっ歯類の配列に最も近いヒト配列を、ヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として許容する (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定の低位集団の全ヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体に同一のフレームワークを使用することができる (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993))。

【0142】

抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的性質を保持しながら抗体をヒト化することがさらに重要である。この目的を達成するために、典型的な方法にしたがって、ヒト化抗体を、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列および種々の概

念ヒト化産物の分析過程によって調製する。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に利用可能であり、当業者に良く知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元高次構造を例示および表示するコンピュータプログラムは利用可能である。これらのディスプレイの検討により、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性の高い役割が分析される（すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基が分析される）。この方法では、所望の抗体特性（標的抗原に対する親和性の増加など）が達成されるように、FR残基を、レシピエントから選択して組み合わせ、配列に導入する。一般に、CDR残基は、直接且つほとんど実質的に抗原結合への影響に関与する。

【0143】

あるいは、免疫化の際に、内因性免疫グロブリン非産生条件下でヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することが現在可能である。例えば、キメラマウスおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖結合領域（J_H）遺伝子のホモ接合性欠失によって内因性抗体産生が完全に阻害されることが記載されている。このような生殖系列変異マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの導入により、抗原攻撃誘発の際にヒト抗体が産生される。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); および Duchosal et al., Nature 355:258 (1992) を参照のこと。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーに由来し得る (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech 14:309 (1996))。

【0144】

ヒト抗体を、当該分野で公知の種々の技術（ファージディスプレイライブラリー (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)) が含まれる）を使用して産生することもできる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、繊維状バクテリオファージの大または小コートタンパク質 (M13またはfd) のいずれかにインフレイムでクローン化し、ファージ粒子表面上に機能的抗体フラグメントとしてディスプレイする。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的性質に基づいた選択により、これらの性質を示す抗体をコードする遺伝子も選択される。したがって、ファージはB細胞のいくつかの性質を模倣する。種々の形式でファージディスプレイを行うことができる（例えば、Johnson, K. S. and Chiswell, D. J., Curr Opin in Struct Biol 3:564-571 (1993) に概説されている）。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイに使用することができる。例えば、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) では、免疫化マウスの脾臓由来のV遺伝子の小さな無作為の組み合わせライブラリーから種々の多数の抗オキサゾロン抗体が単離された。非免疫化ヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリーを構築し、種々の多数の抗原（自己抗原が含まれる）に対する抗体を、例えば、本質的に Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) または Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993) に記載の技術にしたがって単離することができる。米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号も参照のこと。Cole et al. and Boerner et al. の技術もヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) および Boe

10

20

30

40

50

erner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991))。ヒト抗体を、インビトロ活性化B細胞によって生成することもできる(米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号を参照のこと)。

【0145】

抗体フラグメント

抗体フラグメントも本発明に含まれる。抗体フラグメント産生のための種々の技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化に由来していた(Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) および Brennan et al., Science, 229:81 (1985))を参照のこと)。しかし、現在、これらのフラグメントを、組換え宿主細胞によって直接産生することができる。例えば、抗体フラグメントを、上記で考察の抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントを、大腸菌から直接回収し、化学的にカップリングしてF(ab')₂フラグメントを形成することができる(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチにしたがって、F(ab')₂フラグメントを、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体フラグメントの他の産生技術は、当業者に明らかである。他の実施形態では、最適な抗体は、一本鎖Fvフラグメント(scFv)である。WO 93/16185; 米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号を参照のこと。FvおよびsFvは、定常領域を欠くインタクトな組み合わせ部位を有する唯一の種である。したがって、これらは、インビボでの非特異的結合の減少に適切である。sFv融合タンパク質を構築して、sFvのアミノ末端およびカルボキシ末端のいずれかにエフェクタータンパク質の融合物を得ることができる。Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supraを参照のこと。抗体フラグメントは、例えば、米国特許第5,641,870号に記載の「線状抗体」でもあり得る。このような線状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性であり得る。

【0146】

多重特異性抗体(例えば、二重特異性)

本発明の抗体には、例えば、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する多重特異性抗体も含まれる。このような分子は、通常、2つの抗原のみに結合する一方で(すなわち、二重特異性抗体、BsAb)、本明細書中で使用される場合、三重特異性抗体などのさらなる特異性を有する抗体がこの表現に含まれる。BsAbの例には、腫瘍細胞抗原に指向する1つのアームおよび細胞傷害性誘発分子に指向する他のアームを有するBsAb(抗FcγRI/抗CD15、抗p185^{HER2}/FcγRIII(CD16)、抗CD3/抗悪性B細胞(1D10)、抗CD3/抗p185^{HER2}、抗CD3/抗p97、抗CD3/抗腎細胞癌、抗CD3/抗OVCA-R-3、抗CD3/L-D1(抗結腸癌)、抗CD3/抗メラニン細胞刺激ホルモンアナログ、抗EGF受容体/抗CD3、抗CD3/抗CAMA1、抗CD3/抗CD19、抗CD3/MoV18、抗神経細胞接着分子(NCAM)/抗CD3、抗葉酸結合タンパク質(FBP)/抗CD3、抗膀胱癌(pan carcinoma)関連抗原(AMOC-31)/抗CD3など); 腫瘍抗原に特異的に結合する1つのアームおよび毒素に結合する1つのアームを有するBsAb(抗サポリン/抗Id-1、抗CD22/抗サポリン、抗CD7/抗サポリン、抗CD38/抗サポリン、抗CEA/抗リシンA鎖、抗インターフェロン-α(IFN-α)/抗ハイブリドマイディオタイプ、抗CEA/抗ピンカアルカロイドなど); 変換酵素活性化プロドラッグのBsAb(抗CD30/抗アルカリホスファターゼ(リン酸マイトマイシンプロドラッグのマイトマイシンアルコールへの変換を触媒する)など); 繊維素溶解薬として使用することができるBsAb(抗フィブリン/抗組織プラスミノゲンアクチベーター(tPA)、抗フィブリン/抗ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター(uPA)など); 免疫複合体を細胞表面受容体にターゲティングするためのBsAb(

抗低密度リポタンパク質 (LDL) / 抗Fc受容体 (例えば、FcγRI、FcγRII、またはFcγRIII) など) ; 感染症の治療で使用するBsAb (抗CD3 / 抗単純ヘルペスウイルス (HSV)、抗T細胞受容体: CD3複合体 / 抗インフルエンザ、抗FcγR / 抗HIVなど) ; インビトロまたはインビボでの腫瘍検出のためのBsAb (抗CEA / 抗EOTUBE、抗CEA / 抗DPTA、抗p185^{HER2} / 抗ハプテンなど) ; ワクチンアジュバンとしてのBsAb ; ならびに診断ツールとしてのBsAb (抗ウサギIgG / 抗フェリチン、抗西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) / 抗ホルモン、抗ソマトスタチン / 抗物質P、抗HRP / 抗FITC、抗CEA / 抗β-ガラクトシダーゼなど) が含まれる。三重特異性抗体の例には、抗CD3 / 抗CD4 / 抗CD37、抗CD3 / 抗CD5 / 抗CD37、および抗CD3 / 抗CD8 / 抗CD37が含まれる。全長抗体または抗体フラグメント (例えば、F(ab')₂ 二重特異性抗体) として二重特異性抗体を調製することができる。

10

【0147】

二重特異性抗体の作製方法は当該分野で公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (この2つの鎖は異なる特異性を有する) の同時発現に基づく (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の無作為な分類のために、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は、10種の異なる抗体分子の混合物を産生する可能性があり、そのうちの1つのみが正確な二重特異性構造を有する。通常はアフィニティクロマトグラフィー工程によって行われる正確な分子の精製はむしろ煩雑であり、収率が低い。類似の手順が、WO 93/08829およびTraunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) に開示されている。

20

【0148】

異なるアプローチにしたがって、所望の結合特異性 (抗体-抗原組み合わせ部位) を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合する。ヒンジ領域の少なくとも一部、CH2領域、およびCH3領域を含む免疫グロブリンの重鎖定常ドメインと融合することが好ましい。少なくとも1つの融合物中に存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域 (CH1) を有することが好ましい。免疫グロブリンの重鎖融合物および、所望ならば、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAを、個別の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。構築に使用された比率が等しくない3つのポリペプチド鎖によって最適な収率が得られる実施形態では、これにより、3つのポリペプチドフラグメントの相互の比率の調整が非常に柔軟に行える。しかし、等しい比率の少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現によって収率が高くなるか、比率が特に重要でない場合、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

30

【0149】

このアプローチの一実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアーム中の第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖および他方のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (第2の結合特異性が得られる) から構成される。たった半分の二重特異性分子中の免疫グロブリン軽鎖によって容易な分離方法が得られるので、この非対称構造によって望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離が容易になることが見出された。このアプローチは、WO 94/04690 に開示されている。二重特異性抗体の生成についてのさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986) を参照のこと。

40

【0150】

WO 096/27011に記載の別のアプローチにしたがって、抗体分子対間の接合部分を、ヘテロ二量体の比率を最大にするように操作し、組換え細胞培養物から回収することができる。好ましい接合部分は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1の抗体分子の接合部分由来の1つまたは複数の小アミノ酸

50

鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換する。巨大側鎖と同一または類似のサイズの代償的「空洞」を、巨大アミノ酸側鎖のより小さな側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）への置換によって第2の抗体分子の接合部分に作製する。これにより、ホモ二量体などの他の望ましくない最終産物を越えたヘテロ二量体収率を増加させる機構が得られる。

【0151】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を生成する技術も文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan et al., Science, 229:81 (1985)は、インタクトな抗体をタンパク質分解によって切断してF(ab')₂フラグメントを生成する手順を記載している。隣接ジチオールを安定化して分子間ジスルフィド結合を防止するためのジチオール錯化剤である硫酸ナトリウムの存在下で、これらのフラグメントは減少する。次いで、F(ab')₂フラグメントを、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換する。次いで、メルカプトエチルアミンでの還元によってF(ab')₂-TNB誘導体の1つをF(ab')₂-チオールに変換し、等モル量の他のF(ab')₂-TNB誘導体と混合して二重特異性抗体を形成させる。産生された二重特異性抗体を、抗体の選択的固定化のための薬剤として使用することができる。

【0152】

最近の進歩によって大腸菌からF(ab')₂-SHフラグメントを直接回収することが容易になり、これを化学的にカップリングして二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体F(ab')₂分子の産生を記載している。各F(ab')₂フラグメントを大腸菌から個別に分離し、インビトロでの有向(directed)化学的カップリングに供して二重特異性抗体を形成した。このようにして形成された二重特異性抗体は、VEGF受容体および正常なヒトT細胞を過剰発現する細胞に結合し、ヒト乳癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【0153】

二重特異性抗体フラグメントの作製および組換え細胞培養物からの直接的単離のための種々の技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のF(ab')₂部分に連結した。ヒンジ領域の抗体ホモ二量体を還元して単量体を形成させ、次いで、再度酸化させて抗体ヘテロ二量体を形成させた。抗体ホモ二量体産生にもこの方法を利用することができる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に記載の「ダイアボディ」テクノロジーにより、二重特異性抗体フラグメントの別の作製機構が得られる。フラグメントは、リンカーによって軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結した重鎖可変ドメイン(V_H)を含み、このリンカーは、短すぎて同一鎖上の2つのドメインを対合させることが不可能である。したがって、1つのフラグメントのV_HおよびV_Lドメインは、別のフラグメントの相補的V_LおよびV_Hドメインとの対合を強いられ、それにより、2つの抗原結合部位が形成される。一本鎖Fv(sFv)二量体の使用による二重特異性抗体フラグメントの別の作製戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照のこと。

【0154】

2価を超える抗体が意図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0155】

ヘテロ複合体抗体

二重特異性抗体には、架橋または「ヘテロ複合体(heteroconjugate)」

」抗体が含まれ、本発明の抗体である。例えば、ヘテロ複合体中の抗体の一方をアビジンにカップリングし、他方をビオチンにカップリングすることができる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞の望ましくない細胞へのターゲティング（米国特許第4,676,980号）およびHIV感染症の治療（WO 91/00360、WO 92/200373、欧州特許第03089号）が提案されている。ヘテロ複合体抗体を、任意の従来の架橋法を使用して作製することができる。適切な架橋剤は当該分野で周知であり、多数の架橋技術と共に米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0156】

多価抗体

本発明の抗体には、多価抗体が含まれる。多価抗体を、抗体が結合する抗原を発現する細胞によって2価抗体よりも迅速に内在化（および／または異化）することができる。本発明の抗体は、3つまたはそれを超える抗原結合部位を有し、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に産生することができる（IgMクラス以外の）多価抗体（例えば、4価抗体）であり得る。多価抗体は、二量体化ドメインおよび3つまたはそれを超える抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域またはヒンジ領域を含む（またはこれらからなる）。このシナリオでは、抗体は、Fc領域およびFc領域のアミノ末端側に3つまたはそれを超える抗原結合部位を含む。本明細書中の好ましい多価抗体は、3～約8個の抗原結合部位を含むが（またはこれらからなる）、4つが好ましい。多価抗体は、少なくとも1つのポリペプチド鎖（および好ましくは2つのポリペプチド鎖）を含み、ポリペプチド鎖は2つまたはそれを超える可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc（式中、VD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域の1つのポリペプチド鎖であり、X1およびX2はアミノ酸またはポリペプチドを示し、nは0または1である）を含み得る。例えば、ポリペプチド鎖は、VH-CH1-可動性リンカー-VH-CH1-Fc領域鎖またはVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を含み得る。本明細書中の多価抗体は、好ましくは、少なくとも2つ（好ましくは4つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに含む。本明細書中の多価抗体は、例えば、約2～約8個の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。本明細書中で意図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、任意選択的に、CLドメインをさらに含む。

【0157】

エフェクター機能の操作

例えば、癌治療における抗体の有効性を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾することが望ましいかもしれない。例えば、システイン残基をFc領域に移入し、それにより、この領域中の鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、内在化能力が改良され、そして／または補体媒介性細胞死滅および抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を増加させることができる。Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992) および Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照のこと。抗腫瘍活性が増強されたホモ二量体を、Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993) に記載のように、ヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは、二重Fc領域を有し、それにより、補体溶解およびADCC能力を増強できるように抗体を操作することができる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照のこと。抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように、抗体（特に、抗体フラグメント）にサルベージ（salvage）受容体結合エピトープを組み込むことができる。本明細書中で使用される、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子のインビボ血清半減期の増加を担うIgG分子（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄）のFc領域のエピトープをいう。

【0158】

免疫複合体

本発明はまた、治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、または動物を起源とする酵素活性毒素またはそのフラグメント）、または放射性同位体（すなわち、放射性複合体（radioconjugate））などの細胞傷害薬に抱合した本明細書中に記載の抗体を含む免疫複合体に関する。放射性複合体抗体の産生のために、種々の放射性核種を利用可能である。例には、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が含まれるが、これらに限定されない。

【0159】

このような免疫複合体の生成に有用な化学療法薬を上に記載している。例えば、BCNU、ストレプトゾイシン（streptozocin）、ビンクリスチン、5-フルオロウラシル、米国特許第5,053,394号、同第5,770,710号に記載の集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、エスペラミシン（米国特許第5,877,296号）など（本明細書中の化学療法薬の定義も参照のこと）を、抗ANGPTL4、抗 $\alpha\text{V}\beta 5$ 、抗血管形成抗体、またはそのフラグメントに抱合することができる。

【0160】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は、高放射性原子を含み得る。種々の放射性同位体を、放射性抱合された抗ANGPTL4または抗血管形成抗体またはそのフラグメントの産生に利用可能である。例には、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 、 ^{111}In 、およびLuの放射性同位体などが含まれるが、これらに限定されない。複合体を診断のために使用する場合、複合体は、シンチグラフィ研究のための放射性原子（例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または ^{123}I ）または核磁気共鳴（NMR）映像法（磁気共鳴映像法（MRI）としても公知）のためのスピン標識（ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、または鉄など）を含み得る。

【0161】

放射性標識または他の標識を、公知の方法で複合体中に組み込むことができる。例えば、ペプチドを生合成するか、適切なアミノ酸前駆体（例えば、水素の代わりにフッ素-19を含む）を使用したアミノ酸の化学合成によって合成することができる。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ または ^{123}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、および ^{111}In などの標識を、ペプチド中のシステイン残基を介して結合させることができる。イットリウム-99を、リジン残基を介して結合させることができる。IODOGEN法（Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57）を使用して、ヨウ素-123を組み込むことができる。例えば、他の方法を詳述したMonoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy（Chatall, CRC Press 1989）を参照のこと。

【0162】

使用することができる酵素活性毒素およびそのフラグメントには、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖（緑膿菌由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン（modectin）A鎖、 α -サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンシン（dianthin）タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、ニガウリインヒビター、クルシン、クロチン、サバオナリア・オフィシナリス（sapaonarria officinalis）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、ネオマイシン、およびトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日公開のWO 93/21232を参照のこと。

【0163】

抗体と細胞傷害薬との複合体を、種々の二官能性タンパク質カップリング剤（N-スクシニミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオネート（SPDP）、スクシニミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサ-1-カルボキシレート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（塩酸ジメチルアジポイミドなど）、活性エステル（ジスクリニミジルスベレートなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トリエン2, 6-ジイソシアネートなど）、およびビス活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど）など）を使用して作製する。例えば、リシン免疫毒素を、Vittetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載のように調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性ヌクレオチドの抱合のための例示的キレート剤である。WO 94/11026を参照のこと。リンカーは、細胞中の細胞傷害薬の放出を容易にする「切断リンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー（Charl et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)；米国特許第5,208,020号）を使用することができる。

【0164】

あるいは、抗ANGPTL4、抗 $\alpha_v\beta_5$ 、または抗血管形成抗体および細胞傷害薬を含む融合タンパク質を、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製することができる。DNAの長さは、互いに隣接するか複合体の所望の性質を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されている2つの複合体部分をコードする各領域を含み得る。

【0165】

特定の実施形態では、腫瘍プレタargeティングで使用するために、抗体を、「受容体」（ストレプトアビジンなど）に抱合し、抗体-受容体複合体を患者に投与し、その後清澄化薬（clearing agent）を使用して循環から非結合複合体を除去し、細胞傷害薬（例えば、放射性核種）に抱合した「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。特定の実施形態では、抗体と核溶解（nucleolytic）活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼまたはDNAエンドヌクレアーゼ（デオキシリボヌクレアーゼ（Dnアーゼなど）））との間に免疫複合体を形成する。

【0166】

マイタンシン（maytansine）およびマイタンシノイド（maytansinoid）

本発明は、1つまたは複数のマイタンシノイド分子に抱合した本発明の抗体を提供する。マイタンシノイドは、チューブリン重合の阻害によって作用する有糸分裂（mitotic）インヒビターである。マイタンシンは、東アフリカの低木マイテナス・セラタ（Maytenus serrata）から最初に単離された（米国特許第3,896,111号）。その後、一定の微生物がマイタンシノイド（マイタンシノール（maytansinol）およびC-3マイタンシノールエステルなど）も産生することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成マイタンシノールならびにその誘導体およびアナログは、例えば、米国特許第4,137,230号；同第4,248,870号；同第4,256,746号；同第4,260,608号；同第4,265,814号；同第4,294,757号；同第4,307,016号；同第4,308,268号；同第4,308,269号；同第4,309,428号；同第4,313,946号；同第4,315,929号；同第4,317,821号；同第4,322,348号；同第4,331,598号；同第4,361,650号；同第4,364,866号；同第4,424,219号；同第4,450,254号；同第4,362,663号；および同第4,371,533号に開示されている。

【0167】

抗ANGPTL4、抗 $\alpha_v\beta_5$ 、または抗血管形成抗体を、抗体またはマイタンシノイド分子の生物活性を有意に減少させることなくマイタンシノイド分子に抱合する。1抗体分子あたり平均3～4個のマイタンシノイド分子が抱合し、抗体の機能または溶解性に負の影響を与えることなく標的細胞の細胞傷害性の増強に有効性を示しているが、1分子の毒素／抗体でさえも裸の抗体を使用するよりも細胞傷害性を増強すると予想される。マイタンシノイドは当該分野で周知であり、公知の技術によって合成するか、天然供給源から単離することができる。適切なマイタンシノイドは、例えば、米国特許第5,208,020号および他の特許ならびに上記に言及したおよび非特許刊行物に開示されている。一実施形態では、マイタンシノイドは、マイタンシノールおよびマイタンシノール分子の芳香環または他の位置が修飾されたマイタンシノールアナログ（種々のマイタンシノールエステルなど）である。

10

【0168】

抗体－マイタンシノイド複合体を作製するための当該分野で公知の結合基が多数存在し、米国特許第5,208,020号または欧州特許第0425235B1号、およびCharlisset al., Cancer Research 52:127-131 (1992)に開示の結合基が含まれる。結合基には、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、感光基、ペプチダーゼ不安定性基、またはエステラーゼ不安定性基が含まれ、上記で定義された特許に開示のように、ジスルフィド基およびチオエーテル基が好ましい。

20

【0169】

抗体とマイタンシノイドとの複合体を、種々の二官能性タンパク質カップリング剤（N-スクシニミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）、スクシニミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサノ-1-カルボキシレート、イミオンチオラン（IT）など）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジポイミデート塩酸塩など）、活性エステル（スベリン酸ジスクシニミジルなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス-（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トルエン2,6-ジイソシアネートなど）、およびビス活性フッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど）を使用して作製することができる。典型的なカップリング剤には、ジスルフィド結合を得るためのN-スクシニミジル-3-（2-ピリジルジチオ）-プロピオネート（SPDP）（Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]）およびN-スクシニミジル-4-（2-ピリジルチオ）ペンタノエート（SPP）が含まれる。

30

【0170】

結合型に依存して、マイタンシノイド分子の種々の位置にリンカーを結合することができる。例えば、従来のカップリング技術を使用した水酸基との反応によってエステル結合を形成することができる。水酸基を有するC-3位、ヒドロキシメチル基で修飾されたC-14位、水酸基で修飾されたC-15位、および水酸基を有するC-20位で反応が起こり得る。マイタンシノールまたはマイタンシノールアナログのC-3位にリンカーを形成する。

40

【0171】

カリケアマイシン

別の目的の免疫複合体は、1つまたは複数のカリケアマイシン分子と抱合した本発明の抗体を含む。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNAを破壊することができる。カリケアマイシンファミリーの複合体の調製については、米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、同第5,877,296号（全てAmerican Cy

50

anamid Company)を参照のこと。使用することができるカリケアマイシンの構造アナログには、 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-アセチル- γ_1^I 、PSAG、および θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) および上記のAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれるが、これらに限定されない。抗体を抱合することができる別の抗腫瘍薬は、葉酸拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシンおよびQFAは共に細胞内作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介性内在化によるこれらの薬剤の細胞取り込みにより、その細胞傷害作用が非常に増強される。

【0172】

他の抗体修飾

他の抗体修飾が本明細書中で意図される。例えば、抗体を、種々の非タンパク質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマー）のうちの1つと結合することができる。抗体を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョン中に捕捉することができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示されている。

【0173】

リポソームおよびナノ粒子

本発明のポリペプチドを、リポソーム中に処方することができる。例えば、本発明の抗体を、免疫リポソームとして処方することができる。抗体を含むリポソームを、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); および米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号などに記載の当該分野で公知の方法によって調製する。循環時間が造抗されたリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。一般に、リポソームの処方および使用は、当業者に公知である。

【0174】

特に有用なリポソームを、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む液体組成物を使用した逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームを所定の孔サイズのフィルターから押し出して所望の直径のリポソームを得る。Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載のように、ジスルフィド鎖間反応を介して、本発明の抗体のFab'フラグメントをリポソームに抱合することができる。化学療法薬（ドキソルビシンなど）を、任意選択的にリポソーム内に含める。Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989)を参照のこと。

【0175】

他の用途

本発明の抗体には種々の用途がある。例えば、抗ANGPTL4抗体を、ANGPTL4の診断アッセイ（例えば、癌検出（例えば、腎癌検出）のための特定の細胞、組織、または血清におけるその発現の検出など）でを使用することができる。一実施形態では、ANGPTL4抗体を、本明細書中に提供した方法を使用した治療のための患者集団（例えば、ANGPTL4を発現する患者、ANGPTL4が上昇した患者、ANGPTL4レベルに感受性を示す癌患者）の選択のために使用する。当該分野で公知の種々の診断アッセ

10

20

30

40

50

イ技術（競合結合アッセイ、直接または間接的サンドイッチアッセイ、および均一相または不均一相において行った免疫沈降アッセイなど）を使用することができる（Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158）。診断アッセイで使用する抗体を、検出可能な部分で標識することができる。検出可能な部分は、直接または間接的に検出可能なシグナルを生じることができるはずである。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（ ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、または ^{125}I など）、蛍光化合物、化学発光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリンなど）、または酵素（アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼなど）であり得る。当該分野で公知の検出可能部分に抗体を結合する任意の方法（Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); および Nygren, J. Histochem. And Cytochem., 30:407 (1982) に記載の方法が含まれる）を使用することができる。
【0176】

抗ANGPTL4抗体はまた、組換え細胞培養物または天然供給源からのANGPTL4またはANGPTL4フラグメントのアフィニティ生成に有用である。この過程では、当該分野で周知の方法を使用して、ANGPTL4に対する抗体を、Sephadex樹脂または濾紙のような適切な支持体に固定する。次いで、固定された抗体を、精製すべきANGPTL4を含むサンプルと接触させ、その後、支持体を適切な溶媒で洗浄し、サンプル中のANGPTL4以外の固定化抗体に結合した実質的に全ての材料を除去する。最後に、支持体を別の適切な溶媒で洗浄し、抗体からANGPTL4を放出させる。

【0177】

本発明のポリペプチドに対する共有結合修飾

本発明のポリペプチド（例えば、ポリペプチドアンタゴニストフラグメント、融合分子（例えば、免疫融合分子）、本発明の抗体）の共有結合修飾は、本発明の範囲内に含まれる。適切な場合、ポリペプチドの化学合成または酵素切断もしくは化学的切断によってこれを行うことができる。ターゲティングされたポリペプチドのアミノ酸残基と選択された側鎖、N末端残基、もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤との反応または修飾アミノ酸もしくは非天然アミノ酸の成長中のポリペプチド鎖への組み込みによって、他のポリペプチドの共有結合修飾型を分子に移入する（例えば、Ellman et al., Meth. Enzym. 202:301-336 (1991); Noren et al., Science 244:182 (1989); ならびに米国特許出願公開番号20030108885号および同第20030082575号）。

【0178】

システイニル残基を、 α -ハロアセテート（および対応するアミン）（クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなど）と反応させてカルボキシメチル誘導体またはカルボキシアミドメチル誘導体を得ることが最も一般的である。システイニル残基は、プロモトリフルオロアセトン、 α -ブロモ- β -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル2-ピリジルジスルフィド、p-クロロメルクリベンゾエート、2-クロロメルクリ-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1, 3-ジアゾールとの反応によっても誘導される。

【0179】

pH 5.5~7.0でのジエチルピロカーボネート（この薬剤はヒスチジル側鎖に非確定特異的であるため）との反応によってヒスチジル残基を誘導体化する。パラ-プロモフェナシルプロミドも有用である。反応を、典型的には、pH 6.0にて0.1 Mカルコジル酸ナトリウム中で行う。

【0180】

リジニル残基およびアミノ末端残基を、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させる。これらの薬剤での誘導体化は、リジニル残基の電荷を逆にする効果がある。 α -アミノ含有残基を誘導体化するのに適切な他の薬剤には、イミドエステル（メチルピコリニミデート、など）、ピリドキサルリン酸、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、*O*-メチルイソ尿素、2, 4-ペンタンジオン、およびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が含まれる。

【0181】

1つまたはいくつかの従来の試薬、特に、フェニルグリオキサール、2, 3-ブタンジオン、1, 2-シクロヘキサジオン、およびニンヒドリンと反応によってアルギニル残基を修飾する。アルギニン残基の誘導体化には、グアニジン官能基の pK_a が高いので、アルカリ条件下で反応を行うことが必要である。さらに、これらの試薬は、リジン基およびアルギニン ϵ -アミノ基と反応することができる。

10

【0182】

チロシル残基の特異的修飾を行うことができ、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基へのスペクトル標識の移入が特に興味深い。最も一般的には、*N*-アセチルイミジゾール (*N*-acetyl imidazole) およびテトラニトロメタンを使用して、*O*-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体をそれぞれ形成する。¹²⁵I または ¹³¹I を使用してチロシル残基をヨード化して、放射免疫アッセイで使用される標識タンパク質を調製する。

20

【0183】

カルボジイミド ($R-N=C=N-R'$ (式中、 R および R' は異なるアルキル基である)) (1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリニル-4-エチル)カルボジイミドまたは1-エチル-3-(4-アゾニア-4, 4-ジメチルフェニル)カルボジイミドなど)との反応によって、カルボキシル側鎖基 (アスパルチルまたはグルタミル) を選択的に修飾する。さらに、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパルチル残基およびグルタミル残基を、アスパラギニル残基およびグルタミニル残基に変換する。

【0184】

グルタミニル残基およびアスパラギニル残基を、しばしば、対応するグルタミル残基およびアスパルチル残基にそれぞれ脱アミド化する。これらの残基を、中性または塩基性条件下で脱アミド化する。これらの残基の脱アミド化形態は、本発明の範囲内に含まれる。

30

【0185】

他の修飾には、プロリンおよびリジンのヒドロキシル化、セリル残基またはトレオニル残基の水酸基のリン酸化、リジン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、*N*-末端アミンのアセチル化、および任意のC末端カルボキシル基のアミド化が含まれる。

【0186】

別の共有結合修飾型は、本発明のポリペプチドへのグリコシドの化学的または酵素的カップリングを含む。これらの手順は、*N*または*O*結合グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞中でのポリペプチド産生を必要としないという点で有利である。使用したカップリング様式に依存して、糖を、(a) アルギニンおよびヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) 遊離スルフヒドリル基 (システインの遊離スルフヒドリル基など)、(d) 遊離ヒドロキシル基 (セリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基など)、(e) 芳香族残基 (フェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの芳香族残基など) または (f) グルタミンのアミド基に結合することができる。これらの方法は、1987年9月11日公開のWO 87/05330およびApplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

40

【0187】

50

本発明のポリペプチド上に存在する任意の炭水化物部分を、化学的または酵素的に除去することができる。化学的脱グリコシル化には、化合物トリフルオロメタンスルホン酸またはその等価な化合物へのポリペプチドの曝露が必要である。この処理により、結合している糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）以外の全てまたはほとんどの糖が切断される一方で、ポリペプチドはインタクトなままである。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) および Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981) に記載されている。例えば、抗体上の炭水化物部分の酵素的切断を、Thotakura et al., Meth. Enzymol. 138:350 (1987) に記載の種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって行うことができる。 10

【0188】

本発明のポリペプチドの別の共有結合修飾型は、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号、または同第4,179,337号に記載の様式での種々の非タンパク質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン）のうちの1つへのポリペプチドの結合を含む。

【0189】

ベクター、宿主細胞、および組換え法

本発明のポリペプチドを、容易に入手可能な技術および材料を使用した組換えによって産生することができる。 20

【0190】

本発明のポリペプチド（例えば、ANGPTL4または抗ANGPTL4抗体、抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体または抗血管形成抗体（例えば、抗VEGF抗体））の組換え産生のために、ポリペプチドをコードする核酸を単離し、さらなるクローニング（DNAの増幅）または発現のための複製ベクターに挿入する。従来の手順を使用して、本発明のポリペプチドをコードするDNAを容易に単離し、配列決定する。例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブの使用などによって、モノクローナル抗体をコードするDNAを単離し、配列決定する。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には、一般に、1つまたは複数の以下が含まれるが、これらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。 30

【0191】

シグナル配列成分

本発明のポリペプチドを、組換えによって直接産生することができるだけでなく、異種ポリペプチド（典型的には、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有するシグナル配列または他の配列である）との融合ポリペプチドとして産生することもできる。選択された異種シグナル配列は、典型的には、宿主細胞によって認識およびプロセッシングされた（すなわち、シグナルペプチドによって切断された）配列である。未変性のポリペプチドシグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核宿主細胞については、シグナル配列を、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列に置換する。酵母分泌のために、未変性シグナル配列を、例えば、酵母インベルターゼリーダー、 α 因子リーダー（サッカロミセス属およびクリベロミセス属の α 因子リーダーが含まれる）、酸ホスファターゼリーダー、カンジタ・アルビカンスのグルコアミラーゼリーダー、またはWO 90/13646に記載のシグナルに置換することができる。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列およびウイルス分泌リーダー（例えば、単純ヘルペスgDシグナル）が利用可能である。 40

【0192】

このような前駆領域のDNAを、本発明のポリペプチドをコードするDNAに読み枠内 50

でライゲーションする。

【0193】

複製起点成分

発現ベクターおよびクローニングベクターは共に、1つまたは複数の選択された宿主細胞中でベクターが複製することができる核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターでは、この配列は、宿主染色体DNAと無関係にベクターが複製することができる配列であり、複製起点または自己複製配列が含まれる。このような配列は、種々の細菌、酵母、およびウイルスで周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適切であり、2 μ プラスミドの複製起点は酵母に適切であり、種々のウイルスの複製起点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、またはBPV）は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点成分は、哺乳動物発現ベクターに必要な（初期プロモーターを含むので、典型的にはSV40の複製起点のみを使用することができる）。

10

【0194】

選択遺伝子成分

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含み得る。典型的な選択遺伝子は、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセート、またはテトラサイクリン）に対する耐性を付与するか、（b）栄養要求性欠損を補足するか、（c）天然培地から利用できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする（例えば、バチルス属のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）。

20

【0195】

選択スキームの1つの例は、宿主細胞の成長を停止させる薬物を使用する。異種遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は、薬物耐性が付与されたタンパク質を産生し、それにより、選択レジメ（regimen）で生存する。このような優性選択（dominant selection）の例は、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸、およびハイグロマイシンを使用する。

【0196】

哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの別の例は、細胞が抗体核酸を取り込む能力を同定することができる選択マーカー（DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインーIおよびII（典型的には、霊長類メタロチオネイン遺伝子）、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなど）である。

30

【0197】

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞を、メトトレキセート（Mtx）（DHFRの競合的アンタゴニスト）を含む培養培地中の全ての形質転換体の培養によって最初に同定する。野生型DHFRを使用する場合の適切な宿主細胞は、DHFR活性が欠損したチャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株である。

【0198】

あるいは、本発明のポリペプチド（野生型DHFRタンパク質）をコードするDNA配列およびアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ（APH）などの別の選択マーカーで形質転換または同時形質転換された宿主細胞（特に、内因性DHFRを含む野生型宿主）を、アミノグリコシド抗生物質（例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418）などの選択マーカーのための選択剤を含む培地での細胞増殖によって選択することができる。米国特許第4,965,199号を参照のこと。

40

【0199】

酵母での使用に適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドYrp7中に存在するtrp1遺伝子である（Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)）。trp1遺伝子により、トリプトファン中で成長能力を欠く酵母変異株（例えば、ATCC番号44076またはPEP4-1）の選択マーカーが得られる。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。次いで、酵母宿主細胞ゲノム中のtr

50

p1 損傷の存在により、トリプトファンの非存在下での成長による形質転換の検出に有効な環境が得られる。同様に、Leu2 欠損酵母株 (ATCC 20, 622 または 38, 626) に Leu2 遺伝子を有する公知のプラスミドを補足する。

【0200】

さらに、1.6 μ m 環状プラスミド pKD1 由来のベクターを、クリベロミセス属酵母の形質転換に使用することができる。あるいは、K. ラクチスについての組換えウシキモシンの大量生産のための発現系が報告されている。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クリベロミセス属の産業株 (industrial strain) による成熟組換えヒト血清アルブミン分泌のための安定な多コピー発現ベクターも開示されている。Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

10

【0201】

プロモーター成分

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、本発明のポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結されたプロモーターを含む。原核生物宿主と共に使用するのに適切なプロモーターには、phoA プロモーター、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (trp) プロモーター系、ならびに tac プロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。しかし、他の公知の細菌プロモーターも適切である。細菌系で使用するプロモーターは、本発明のポリペプチドをコードする DNA に作動可能に連結されたシャイン-ダルカルノ (S. D.) 配列も含む。

20

【0202】

真核生物のためのプロモーター配列が公知である。事実上全ての真核生物遺伝子は、転写が開始される部位から約 25~30 塩基上流に位置する AT リッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写開始から 70~80 塩基上流に見出される別の配列は、CNC AAT 領域 (N は任意のヌクレオチドであってよい) である。ほとんどの真核生物遺伝子の 3' 末端は、AATAA 配列であり、この配列は、コード配列の 3' 末端にポリ A テールを付加するためのシグナルであり得る。これらの全配列を、真核生物発現ベクターに適切に挿入する。

【0203】

酵母宿主と共に使用される適切なプロモーター配列の例には、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素 (エノラーゼなど)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのプロモーターが含まれる。

30

【0204】

成長条件によって調節される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトロム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、およびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素のプロモーター領域である。酵母発現で使用する適切なベクターおよびプロモーターは、欧州特許第 73, 657 号にさらに記載されている。酵母プロモーターと共に酵母エンハンサーを使用することも有利である。

40

【0205】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの本発明のポリペプチドの転写を、例えば、ポリオマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス (アデノウイルス 2 など)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、典型的には、サルウイルス 40 (SV40) などのウイルスのゲノムから得たプロモーター、異種哺乳動物プロモーター (例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グ

50

ロブリンプロモーター)、熱ショックプロモーター(プロモーターが宿主細胞系と適合する場合)によって調節する。

【0206】

SV40ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターを、SV40ウイルス複製起点も含むSV40制限フラグメントとして得ることが都合が良い。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターを、HindIII制限フラグメントとして得ることが都合がよい。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを使用した哺乳動物宿主中のDNA発現系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の改変は、米国特許第4,601,978号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞におけるヒト β -インターフェロンのcDNAの発現については、Reyes et al., Nature 297:598-601(1982)も参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復を、プロモーターとして使用することができる。

【0207】

エンハンサーエレメント成分

高等真核生物による本発明のポリペプチドをコードするDNAの転写を、しばしば、ベクターへのエンハンサー配列の挿入によって増加させる。現在、哺乳動物遺伝子由来の多数のエンハンサー配列が公知である(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン)。典型的には、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例には、複製起点の後期側(bp100~270)のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化エレメントの増強については、Yaniv, Nature 297:17-18(1982)も参照のこと。エンハンサーを、ベクター中のポリペプチドコード配列の5'位または3'位にスプライシングすることができるが、典型的には、プロモーターから5'位に配置する。

【0208】

転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞)で使用される発現ベクターは、転写終結およびmRNAの安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの一般に5'、時折3'の非翻訳領域から利用可能である。これらの領域は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化部位として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO 94/11026およびこれに開示されている発現ベクターを参照のこと。

【0209】

宿主細胞の選択および形質転換

本明細書中のベクターにおける本発明のポリペプチドをコードするDNAをクローニングまたは発現する適切な宿主細胞は、上記の原核細胞、酵母細胞、または高等真核細胞である。この目的に適切な原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物などの真正細菌(例えば、腸内細菌科(大腸菌属(例えば、大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ(例えば、ネズミチフス菌)、セラチア(例えば、セラチア・マルセスカンス)、および赤痢菌など)、ならびに桿菌(枯草菌、バチルス・リケニホルミス(例えば、1989年4月12日公開のDD 266,710に開示のバチルス・リケニホルミス41P)など)、シュードモナス(緑膿菌など)および放線菌類)が含まれる。典型的には、大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294(ATCC 31,446)であるにもかかわらず、大腸菌B株、大腸菌X1776株(ATCC 31,537)、および大腸菌W3110株(ATCC 27,325)などの他の株も適切である。これらの例は、制限ではなく、むしろ例示である。

【0210】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物は、本発明のポリペプチドをコードするベクターの適切なクローニング宿主または発現宿主である。出芽酵母（すなわち、一般的なパン酵母）は、下等真核生物宿主微生物で最も一般的に使用されている。しかし、多数の他の属、種、および株（分裂酵母；クリベロミセス宿主（例えば、クリベロミセス・ラクチス、K. フラジリス（ATCC 12, 424）、K. ブルガリクス（ATCC 16, 045）、K. ウィケラミイ（ATCC 24, 178）、K. ワルチイ（ATCC 56, 500）、K. ドロソフィラルム（ATCC 36, 906）、K. サーモトレランス、およびK. マルキサヌスなど）；ヤロウィア属（欧州特許第402, 226号）；ピキア・パストリス（欧州特許第183, 070号）；カンジダ；トリコデルマ・レエシア（欧州特許第244, 234号）；アカパンカビ；シュワニオマイセス（Schwanniomyces）（シュワニオマイセス・オシデンタリスなど）；および糸状菌類（例えば、パンカビ、アオカビ類、トリボクラジウム、およびアスペルギルス宿主（A. ニジュランスおよびクロカビなど）など）を本明細書中で一般に利用可能であり、且つ有用である。

【0211】

本発明のグリコシル化ポリペプチドの発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。多数のパキウウイルス株ならびに改変体および対応する許容状態の昆虫宿主細胞（ヨウトガ（毛虫）、ネッタイシマカ（蚊）、ヒトスジシマカ（蚊）、キイロショウジョウバエ（ショウジョウバエ）、およびカイコなど）が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株が公的に利用可能であり（例えば、オートグラフィア・カリフォルニカNPVのL-1改変体およびカイコNPVのBm-5株）、このようなウイルスを、特にヨウトガ細胞のトランスフェクションのための本発明のウイルスとして使用することができる。ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養物を、宿主として使用することもできる。

【0212】

しかし、脊椎動物細胞に最も高い関心が寄せられており、培養（組織培養）での脊椎動物細胞の増殖は日常的手段となりつつある。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7、ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓株（293細胞または懸濁培養での増殖についてサブクローン化された293細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK, ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／DHFR（CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリサル腎臓細胞（VERO-76, ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA, ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK, ATCC CCL 34）；パッファローラット肝細胞（BRL 3A, ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138, ATCC CCL 75）；ヒト肝細胞（Hep G2, HB 8065）；マウス乳癌（MMT 060562, ATCC CCL 51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）；MRC 5細胞；FS4細胞；およびヒト肝細胞腫株（Hep G2）である。

【0213】

宿主細胞を、本発明で産生するポリペプチドのための上記発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切にように改変した従来の栄養培地中で培養する。

【0214】

宿主細胞の培養

本発明のポリペプチドを産生するのに使用される宿主細胞を、種々の培地中で培養することができる。Ham's F10 (Sigma)、最少必須培地 (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Sigma) などの市販されている培地が宿主細胞の培養に適切である。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号;同第4,657,866号;同第4,927,762号;同第4,560,655号;または同第5,122,469号;WO 90/03430;WO 87/00195;または米国特許再発行30,985号に記載の任意の培地を、宿主細胞の培養培地として使用することができる。これらの培地のいずれかに、必要に応じて、ホルモンおよび/または他の成長因子 (インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子など)、塩 (塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩など)、緩衝液 (HEPESなど)、ヌクレオチド (アデノシンおよびチミジンなど)、抗生物質 (ゲンタマイシン (商標) 薬など)、微量元素 (通常、 μ モル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義する)、およびグルコースまたは等価なエネルギー源を補足することができる。任意の他の必要な栄養補助剤を、当業者に公知の適切な濃度で含めることもできる。培養条件 (温度およびpHなど) は、発現のために選択した宿主細胞で以前に使用した条件であり、当業者に明らかである。

【0215】

ポリペプチドの精製

組換え技術を使用する場合、本発明のポリペプチド (例えば、ANGPTL4)、本発明の抗体 (例えば、抗ANGPTL4抗体、抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体、または抗血管形成分子抗体) を、細胞内に産生するか、細胞膜周辺腔中に産生するか、培地に直接分泌させることができる。本発明のポリペプチドを、培養培地または宿主細胞溶解物から回収することができる。膜に結合している場合、適切な界面活性剤溶液 (例えば、Triton-X 100) を使用するか、酵素切断によって膜から放出させることができる。本発明のポリペプチド発現で使用される細胞を、種々の物理的手段または化学的手段 (凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、または細胞溶解剤など) によって破壊することができる。

【0216】

組換え細胞のタンパク質またはポリペプチドから本発明のポリペプチドを精製することが望ましいかもしれない。以下の手順は適切な精製手順の例である: イオン交換カラムでの分画; エタノール沈殿; 逆相HPLC; シリカでのクロマトグラフィ; 陰イオンまたは陽イオン交換樹脂 (ポリアスバラギン酸カラム、DEAEなど) によるヘパリンSEPHAROSE (商標) クロマトグラフィでのクロマトグラフィ; 等電点電気泳動; SDS-PAGE; 硫酸アンモニウム沈殿; 例えば、Sephadex G-75を使用したゲル濾過; IgGなどの夾雑物を除去するためのプロテインA Sepharoseカラム; および本発明のポリペプチドのエピトープタグ化形態に結合させるための金属キレートカラム。種々のタンパク質精製方法を使用することができ、このような方法は当該分野で公知であり、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982) に記載されている。選択される精製工程は、例えば、使用される産生過程および産生された本発明の特定のポリペプチドの性質に依存する。

【0217】

例えば、細胞から調製された抗体組成物を、例えば、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティクロマトグラフィを使用して精製することができる。アフィニティクロマトグラフィが典型的な精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAが適切性であるかどうかは、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、または $\gamma 4$ 重鎖に基づいて抗体を精製することができる (Lindma

rk et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。全マウスアイソタイプおよびヒト γ 3にはプロテインGが推奨される (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。アフィニティリガンドが結合したマトリクスはほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリクスを利用可能である。細孔性ガラス (controlled pore glass) またはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなどの機械的に安定なマトリクスにより、アガロースよりも流速が速くなり、処理時間が短くなる。抗体が C_H3 ドメインを含む場合、Bakerbond ABX (商標) 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。回収される抗体に依存して、他のタンパク質精製技術 (例えば、上記の技術) の利用可能である。大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌された抗体の単離手順を記載している Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) も参照のこと。

10

【0218】

薬学的組成物

保存のための凍結乾燥処方物または水溶液の形態の本発明のポリペプチド、本発明の分子、およびその組み合わせの治療処方物ならびに本発明にしたがって使用される本明細書中に記載の治療処方物を、所望の精製度のポリペプチドと任意選択的な薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]) との混合によって調製する。受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに無毒であり、緩衝液 (リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および他の有機酸の緩衝液など) ; 抗酸化剤 (アスコルビン酸およびメチオニンが含まれる) ; 防腐剤 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; 塩化ヘキサメトニウム; 塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール; アルキルパラベン (メチルパラベンまたはプロピルパラベンなど) ; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; およびm-クレゾールなど) ; 低分子量 (約10残基未満) ポリペプチド; タンパク質 (血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど) ; 親水性ポリマー (ポリビニルピロリドンなど) ; アミノ酸 (グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど) ; モノサッカリド、ジサッカリド、および他の炭水化物 (グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる) ; キレート剤 (EDTAなど) ; 糖 (スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなど) ; 塩形成対イオン (ナトリウムなど) ; 金属複合体 (例えば、Zn-タンパク質複合体) ; および/または非イオン性界面活性剤 (TWEEN (商標)、PLURONICS (商標)、またはポリエチレングリコール (PEG) など) が含まれる。

20

30

【0219】

また、有効成分を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル (例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルローズまたはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ (メチルメタクリレート) マイクロカプセル)、コロイド状薬物送達系 (例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)、またはマクロエマルジョン中に捕捉することができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980) に開示されている。

40

【0220】

インビボ投与で使用すべき処方物は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜での濾過によって容易に行われる。

【0221】

徐放性調製物を調製することができる。徐放性調製物の適切な例には、本発明のポリペプチドを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、マトリクスが造形品 (例

50

えば、フィルム)またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と γ エチルL-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー(LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射用ミクロスフェア)など)、およびポリ-D-(+)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーが100日間超にわたって分子を放出することができる一方で、一定のヒドロゲルはより短い期間タンパク質を放出する。カプセル化抗体が体内に長期間保持される場合、抗体は37°Cで水分に曝露された結果として変性または凝集し、それにより、生物活性を喪失し、免疫原性が変化する可能性がある。関連する機構に依存した安定化のための合理的ストラテジーを考案することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子内S-S結合形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含水率の調節、適切な添加物の使用、および特定のポリマーマトリクス組成物の開発によって安定化することができる。多価電解質被膜を有するカプセルを記載している米国特許第6,699,501号も参照のこと。

【0222】

遺伝子療法によって本発明の薬剤(ANGPTL4、ANGPTL4アゴニスト、またはANGPTL4アンタゴニスト)を被験体に移入することができる。遺伝子療法は、被験体への核酸の投与によって行われる療法をいう。遺伝子療法の適用では、遺伝子を細胞に移入し、例えば、欠失遺伝子の置換のための治療有効遺伝子産物のインビボ合成を行う。「遺伝子療法」には、1回の治療で持続的効果が得られる従来の遺伝子療法および治療有効DNAまたはmRNAの1回または反復投与を含む遺伝子療法薬の投与が含まれる。アンチセンスRNAおよびDNAを、インビボでの一定の遺伝子の発現の遮断のための治療薬として使用することができる。例えば、本明細書中に記載のAd-ANGPTL4-SiRNAを参照のこと。短鎖アンチセンスオリゴヌクレオチドをこれらがインヒビターとして作用する細胞に導入することができるが、細胞膜による取り込みの制限によって細胞内濃度が低くなることが既に示されている。(Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146(1986))。例えば、負電荷のホスホジエステル基の非荷電性基への置換によって、オリゴヌクレオチドを修飾して、その取り込みを増強することができる。遺伝子療法の方法の一般的概説については、例えば、Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12:488-505(1993); Wu and Wu Biotherapy 3:87-95(1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596(1993); Mulligan Science 260:926-932(1993); Morgan and Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-217(1993); および May TIBTECH 11:155-215(1993)を参照のこと。使用することができる組換えDNAテクノロジー分野で一般的に公知の方法は、Ausubel et al. eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; および Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記載されている。

【0223】

生存細胞への核酸の移入に利用可能な種々の技術が存在する。核酸が、培養細胞にインビトロで導入されるのか、意図する宿主の細胞にインビボで導入されるのかどうかによって技術は変化する。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の導入に適切な技術には、リポソーム、エレクトロポレーション、微量注入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン

10

20

30

40

50

酸カルシウム沈殿法の使用が含まれる。現在好ましいインビボ遺伝子導入技術には、ウイルス（典型的には、レトロウイルス）ベクターでのトランスフェクションおよびコートタンパク質ーリポソーム媒介トランスフェクションが含まれる（Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993)）。例えば、インビボ核酸導入技術には、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、レンチウイルス、レトロウイルス、またはアデノ随伴ウイルスなど）でのトランスフェクションおよび脂質ベースの系（脂質媒介性遺伝子導入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、およびDC-Cholである）が含まれる。遺伝子療法でのウイルスベクターの使用例を、Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); Grossman and Wilson Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993); Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994); Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mestrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); およびWalsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993)に見出すことができる。

10

20

【0224】

いくつかの状況では、標的細胞をターゲティングする薬剤（細胞表面膜タンパク質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上の受容体のリガンドなど）を核酸供給源に提供することが望ましい。リポソームを使用する場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、例えば、特定の細胞型に向かうキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環時に内在化を受けるタンパク質の抗体、細胞内局在化をターゲティングして細胞内半減期を増強するタンパク質のターゲティングおよび／または取り込みの促進のために使用することができる。受容体媒介性エンドサイトーシス技術は、例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); およびWagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)に記載されている。遺伝子の作製および遺伝子治療プロトコルの概説については、Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992)を参照のこと。

30

【0225】

投薬量および投与

公知の方法（ボラスとしての静脈内投与、長期間にわたる連続的注入、筋肉内投与、腹腔内投与、脳脊髄内（intracerebrospinal）投与、皮下投与、関節内投与、髄液嚢内投与、鞘内、経口投与、局所投与、または吸入経路、および／または皮下投与など）にしたがって、本発明の分子を、ヒト患者に投与する。

【0226】

特定の実施形態では、本発明の治療は、ANGPTL4アンタゴニストと1つまたは複数の抗癌薬（例えば、抗血管形成薬）との組み合わせ投与を含む。一実施形態では、さらなる抗癌薬（例えば、1つまたは複数の異なる抗血管形成薬、1つまたは複数の化学療法薬など）が存在する。本発明はまた、複数のインヒビター（例えば、同一抗原に対する複数の抗体または異なる癌活性分子に対する複数の抗体）の投与を意図する。一実施形態では、異なる化学療法薬のカクテルを、ANGPTL4アンタゴニストおよび／または1つまたは複数の抗血管形成薬と共に投与する。組み合わせ投与には、個別の処方物または単一の薬学的処方物を使用した同時投与および／またはいずれかの順序での連続投与が含まれる。例えば、ANGPTL4アンタゴニストは、抗癌薬の前、後、交互に投与することができるか、同時に投与することができる。一実施形態では、両方の（または全ての）活

40

50

性成分 (active agent) がその生物活性を同時に発揮する期間が存在する。

【0227】

疾患の防止または治療のために、ANGPTL4 アンタゴニストの適切な投薬量は、上記定義の治療すべき疾患の型、疾患の重篤度および経過、防止または治療目的でインヒビターを投与しているかどうか、以前の治療、患者の病歴およびインヒビターに対する応答性、ならびに主治医の判断に依存する。インヒビターを、1回または治療を通して患者に適切に投与する。併用療法の投与計画では、本発明の組成物を、治療有効量または治療的に相乗効果のある量で投与する。本明細書中で使用される、「治療有効量」は、本発明の組成物の投与および／またはANGPTL4 アンタゴニストおよび1つまたは複数の治療薬の同時投与によってターゲティングされる疾患または容態が軽減または阻害される量である。薬剤の組み合わせの投与効果は付加的であり得る。一実施形態では、投与の結果は、相乗効果である。治療的に相乗効果のある量は、特定の疾患に関連する容態または症状を相乗的または有意に軽減または排除するのに必要なANGPTL4 アンタゴニストおよび1つまたは複数の他の治療薬（例えば、血管形成インヒビター）の量である。

10

【0228】

疾患の型および重篤度に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $50 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1 \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$ ）のANGPTL4 アンタゴニストまたは血管形成インヒビターは、例えば、1つまたは複数の個別の投与または連続注入による患者の投与のための第1の候補投薬量である。典型的な1日量は、上記要因に依存して、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上の範囲であり得る。数日間またはそれを超える繰り返し投与のために、容態に依存して、疾患の症状が望ましく抑制されるまで治療を継続する。しかし、他の投薬計画が有用であり得る。典型的には、臨床医は、本発明の分子を、必要な生物学的効果が得られる投薬量に到達するまで投与する。本発明の治療過程を、従来の技術およびアッセイによって容易にモニタリングする。

20

【0229】

例えば、血管形成インヒビター（例えば、AVASTIN（登録商標）（Genentech）などの抗VEGF抗体）の調製および投与計画を、製造者の説明者にしたがって使用するか、当業者によって経験的に決定することができる。別の例では、このような化学療法薬の調製および投与計画を、製造者の説明者にしたがって使用するか、当業者によって経験的に決定することができる。化学療法薬の調製および投与計画は、Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992) にも記載されている。

30

【0230】

治療有効性

本発明の治療有効性を、新生物障害または非新生物障害の評価で一般的に使用されている種々の終点によって測定することができる。例えば、癌治療を、例えば、腫瘍の緩解、腫瘍重量、またはサイズの縮小、無増悪期間、生存期間、無増悪生存率、全奏功率、奏功期間、および生活の質によって評価することができる。本明細書中に記載の抗血管形成薬が腫瘍血管系をターゲティングし、必ずしも新生物細胞自体ではないので、抗血管形成薬は固有の抗癌薬クラスを示し、それにより、薬物に対する臨床反応を固有に測定および定義する必要がある。例えば、二次元分析における50%を超える腫瘍の縮小は、応答を宣言するための標準的なカットオフである。しかし、本発明のインヒビターは、原発性腫瘍を縮小させることなく転移の拡大を阻害することができるか、単純に腫瘍静止効果 (tumouristatic effect) を発揮することができる。したがって、治療の有効性を決定するアプローチ（例えば、血管形成の血漿マーカーまたは尿マーカーの測定および放射線画像化による応答の測定が含まれる）を使用することができる。

40

【0231】

一実施形態では、本発明を、非新生物障害または新生物障害（例えば、癌）に感受性を示すか診断されたヒト患者の生存期間を増加させるために使用することができる。生存期

50

間を、最初の薬物の投与から死亡までの時間と定義する。1つの態様では、本発明のANGPTL4アンタゴニストを、1つまたは複数の抗癌薬と組み合わせてヒト患者に投与し、それにより、1つの治療型のみと比較して患者の生存期間が有効に増加する（例えば、1つの治療型と比較して、約5%の増加、約10%の増加、約20%の増加、約30%の増加、約40%の増加、あるいは約50%またはそれを超える増加）。

【0232】

別の実施形態では、本発明は、非新生物障害または新生物障害（例えば、癌）に感受性を示すか診断されたヒト患者の無増悪生存率を増加させる方法を提供する。疾患の進行期間を、薬物の投与から疾患が進行するまでの時間と定義する。一実施形態では、ANGPTL4アンタゴニストおよび1つまたは複数の抗癌薬の本発明の併用療法により、抗癌薬のみと比較して、少なくとも約2ヶ月、少なくとも約4ヶ月、少なくとも約6ヶ月、少なくとも約8ヶ月、1年またはそれを超えて無増悪生存率が有意に増加する。

10

【0233】

さらに別の実施形態では、本発明の治療により、種々の治療法で治療した癌に感受性を示すか癌と診断されたヒト患者群で応答率が有意に増加する。応答率を、治療に応答した治療患者の比率と定義する。本発明の一実施形態では、ANGPTL4アンタゴニストおよび1つまたは複数の抗癌薬を使用した本発明の併用療法により、単一の癌療法（例えば化学療法のみ）での治療群と比較して、この治療患者群の応答率が有意に増加し、この増加のカイ2乗p値は、例えば、0.010未満、0.005未満、または0.001未満である。

20

【0234】

1つの態様では、本発明は、癌に感受性を示すか癌と診断されたヒト患者またはヒト患者群の応答期間を増加させる方法を提供する。応答期間を、最初の応答から疾患の進行までの時間と定義する。本発明の特定の実施形態では、ANGPTL4アンタゴニストおよび1つまたは複数の抗癌薬を使用した本発明の併用療法により、例えば、応答期間を、例えば、少なくとも2ヶ月、少なくとも4ヶ月、少なくとも6ヶ月統計的に有意に増加させることができる。

【0235】

製品

本発明の別の実施形態では、上記の障害の治療に有用な材料を含む製品を提供する。製品は、容器、ラベル、および添付文書を含む。適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが含まれる。容器を、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成することができる。容器は、容態治療に有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針で突き刺すことができるストッパーを有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性成分は、ANGPTL4モジュレーターである。容器上または容器に封入したラベルは、最適な容態の治療のために組成物を使用することを示す。製品は、さらに、薬学的に受容可能な緩衝液（リン酸緩衝化生理食塩水など）、リンゲル液、およびデキストロース溶液を含む第2の容器を含み得る。製品は、さらに、商業的および使用者の観点から望ましい他の材料（さらなる活性成分、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、ニードル、およびシリンジが含まれる）を含む。

30

40

【0236】

材料の寄託

以下の材料を、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA. 20110-2209, USA (ATCC) に寄託した。

【0237】

【表 2】

材料	ATCC 寄託番号	寄託日
ANGPTL4 (NL2-DNA 22780-1078)	209284	9/18/97
抗体 A4.6.1 を産生するハイブリドーマ細胞株	ATCC HB-10709	3/29/91

特許手続き上の微生物寄託の国際的承認に関するブダペスト条約（ブダペスト条約）の下に寄託を行った。これにより、寄託日から30年間寄託物が生きたまま確実に維持される。寄託物を、ブダペスト条約の条項に従い、且つ Genentech, Inc. と ATCC との間の合意を条件として ATCC から利用可能であり、適切な米国特許の発行時または任意の米国または外国特許出願の公開時にいずれが最初であっても寄託物の培養物の子孫の公的な恒久的且つ無制限の利用が保証され、合衆国法典第35巻第122条およびこれに準拠する米国特許商標局の規則（連邦規則集第37巻第1.14条（886 O G 638を特に参照する））が含まれる）に従って米国特許商標局長によって権利を与えると決定された者の子孫の利用が保証される。

【0238】

出願の譲受人は、寄託した材料の培養物が適切な条件下での培養時に死滅、紛失、または破壊された場合、通知の際に材料を別の寄託物と迅速に取り替えることに同意している。特許法にしたがって任意の政府当局で付与された権利に違反して、寄託材料の利用が発明の実施を許可すると解釈されない。

【実施例】

【0239】

本明細書中に記載の寄託物、実施例、および実施形態は例示のみを目的とし、これらを考慮して種々の修正形態または変更形態が当業者に示唆され、これらが本出願の精神および範囲ならびに添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれると理解される。実施例で言及した市販の試薬を、他で示さない限り、製造者の説明書に従って使用した。

【0240】

実施例1：ANGPTL4は、腫瘍細胞の増殖および細胞移動を刺激する

アデノウイルスベクターの生成および形質導入。アデノウイルス構築物を、本質的に製造者が説明するように、Stratagene (La Jolla, CA) の Ad-easy ベクター構築キットのポリリンカー部位への Not1-Not1 cDNA インサートのクローン化によって構築した。例えば、Hesser et al., Blood, 104 (1): 149-158 (2004) を参照のこと。

【0241】

hAngptl4 (23-406) (PUR9384)、mAngptl4 (184-410) - IgG (PUR9388)、および mAngptl4 (23-410) (PUR9452) シングルフラグタグ化タンパク質の生成。採取した細胞培養液を、抗 flag M2 樹脂 (Sigma #A-2220) に一晚通過させた。カラムを、PBS でベースラインまで洗浄し、50 mM クエン酸ナトリウム (pH 3.0) で溶離した。この体積を、Amicon-15 10,000 MWCO (Millipore #UFC901024) で濃縮した。最終工程は、1 mM HCl / Super Q 水への透析および 0.2 μm の濾過であった。4~20% のトリス / グリシン (Invitrogen #EC6028 box) SDS page ゲル + / - 10 mM DTT を使用して、純度を決定した。正確なタンパク質を、質量分析またはエドマン N 末端配列決定によって同定した。

【0242】

hAngptl4 (184-406) - IgG (PUR 9441) N 末端フラグタグおよびその後の連続した N 末端 huFc タグの生成。採取した細胞培養液を、ProSep A (Amersham #113111835) に一晚通過させた。次いで、カラムを、PBS でベースラインまで洗浄した。次いで、4 カラム体積の 0.5 M TMAc / PBS (pH 7.5) 洗浄工程を行い、その後、ベースラインまで PBS 洗浄を行った

。溶離工程は、50 mMクエン酸ナトリウム (pH 3.0) バンプ (bump) であった。この体積を、Amicon-15 10,000 MWCO (Millipore #UFC901024) で濃縮した。最終工程は、1 mM HCl / Super Q 水への透析および0.2 μmの濾過であった。4~20%のトリス/グリシン (Invitrogen #EC6028box) SDS page ゲル+/-10 mM DTTを使用して、純度を決定する。正確なタンパク質を、質量分析またはエドマンN末端配列決定によって同定した。当該分野で公知の標準的技術を使用して、組換えタンパク質を作製することもできる。

【0243】

Ad-ANGPTL4-SiRNAの生成。4つの潜在的なANGPTL4-SiRNA分子 (Qiagen) を、全長hANGPTL4配列に基づいて生成した。1つのANGPTL4-SiRNAを、SiRNAがhANGPTL4発現を阻害する能力に基づいて選択した。これは、以下のANGPTL4のDNA標的配列GTGGCCAAAGCC TGCCCGAAGA (配列番号3) をターゲティングした (例えば、r (GGCCAAAGCCUGCCCGAAGAUU) (配列番号4) および/またはr (UCUUCGGGCAAGGCUUGGCCAC) (配列番号5))。SiRNAを、RNAプロモーター (例えば、H1プロモーター (GenScript)) を含むCMVpShuttle-H1.1導入ベクターにクローン化した。次いで、SiRNA発現カセットをクローン化して、アデノウイルスAdhANGPTL4-SiRNA構築物を生成した。例えば、アデノウイルス構築物を、本質的に製造者が説明するように、Stratagene (LaJolla, CA) のAd-easyベクター構築キットのポリリンカー部位へのNot1-Not1 cDNAインサートのクローン化によって構築した。例えば、Hessner et al., Blood, 104 (1): 149-158 (2004) を参照のこと。

【0244】

ANGPTL4の発現を、抗FLAG抗体を使用したウェスタンブロッティング分析によって検証した。製造者の説明書にしたがって、1つの強く発現するクローンを選択し、力価を増幅した。ウイルス調製物を、CsCl遠心分離によって精製し、PCRによって復帰変異体について試験した。製造者の説明書にしたがって、ウイルス力価を、96ウェル細胞溶解実験によって決定した。これらのベクターを、提供されたpShuttleCMV-lacZと共に、E1およびE3領域が欠失したAd5ゲノムを含むAdEasyベクターを含むBJ5183エレクトロコンピテント細菌中で組み換えた。初代ウイルスストックを、宿主HEK293細胞への組換えAdEasyプラスミドの一過性トランスフェクションによって調製した。アデノウイルスストックを、HEK293細胞中でさらに増幅し、製造者が記載のように、CsCl勾配精製法を使用して精製した。アデノウイルス作用力価 (working titer) を、Elisaアッセイによって得た。

【0245】

mANGPTL4の生成。293細胞を、全長mANGPTL4 (1~410) をコードする核酸を含む構築物で一過性にトランスフェクトした。mANGPTL4を上清から精製し、実験に使用した。

【0246】

インビトロでの腫瘍細胞増殖。ANGPTL4は、インビトロで、ヒトA673横紋筋肉腫腫瘍細胞 (HTB 1598) の増殖を刺激した。図4のパネルAを参照のこと。以前に記載のように、Ad-Angptl4、Ad-LacZ、Ad-Angptl13のアデノウイルス構築物を生成した (Hessner et al., Blood, 104 (1): 149-158 (2004))。A673細胞を、感染多重度 (MOI) 100にて、アデノウイルス-ANGPTL4構築物 (Ad-Angptl4)、コントロールとしてのアデノウイルス-LacZ構築物 (Ad-LacZ)、またはアデノウイルス-ANGPTL3構築物 (Ad-Angptl3) を含むいずれかの構築物で形質導入した。5% FCS高グルコースDMEM中でのA673細胞の3日間の増殖後、細胞を計数した。図4のパネルAに示すように、Ad-Angptl4は腫瘍細胞増殖を刺激した。Ad

ーLacZコントロールと比較して、Ad-Angptl4で処置した細胞において、約2倍を超える細胞数の増加が認められた。Ad-Angptl4はまた、コントロールと比較して、MCF7細胞（ヒト乳腺腫）の増殖を約3倍、TK10細胞（腎細胞癌株）の増殖を約2倍、A549細胞（ヒト肺癌）の増殖を約1.5倍に刺激した。Ad-Angptl4はまた、U87MG細胞の増殖を刺激した。細胞（A673、U87MG、4T-1、またはCaki）を、感染多重度（MOI）500にて、アデノウイルス-ANGPTL4構築物（Ad-Angptl4（2））、コントロールとしてのアデノウイルス-LacZ構築物（Ad-LacZ（1））、またはアデノウイルスANGPTL4-SiRNA構築物（3）を含むいずれかの構築物で形質導入した図4のパネルBを参照のこと。5%FCS高グルコースDMEM中での細胞の2～3日間の増殖後、細胞を計数した。

10

【0247】

ANGPTL4で形質導入したCOS細胞由来の馴化培地もA673細胞の増殖を誘導した。図4のパネルCを参照のこと。アデノウイルス構築物（Ad-Angptl4（2）、Ad-LacZ（1）、またはAd-Angptl3（3））で形質導入した肝細胞（Hepa）（A）、ヒト微小血管内皮細胞（HMEC）細胞（B）、またはCOS7（C）由来の馴化培地を、A673細胞に添加した。5%FCS高グルコースDMEM中でのA673細胞の4日間の増殖後、細胞を計数した。図4のパネルCに示すように、COS細胞+Ad-Angptl4由来の上清は、コントロールおよび使用した他の細胞型（肝細胞およびHMEC細胞）由来の上清と比較して、腫瘍細胞増殖を刺激した。

20

【0248】

培養皿にコーティングした場合のAngptl4活性。Angptl4によるA673細胞の増殖も、培養皿へのタンパク質のコーティングによって試験した。プレートを、種々の濃度で（例えば、コーティングなし、 $0.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または $30\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、マウスAngptl4、LZ-hAngptl4、フィブロネクチン、NL4（コントロールタンパク質）、IgG-hAngptl4（184～406）、mAngptl3、hAngptl3、mAngptl4（23～410）、Lz-hAngptl4（184～406）、Fc-hAngptl4（184～406）、またはBSAでコーティングした。96ウェル平底プレート（MaxiSorp, Nunc, Denmark）を、 4°C で一晩コーティングした。ヒトA673腫瘍細胞を採取し、5%FCSを含むHG-DMEM培地中で 10^5 細胞/ ml に希釈した。200 μl の細胞懸濁液（ 10^4 細胞/ウェル）を、コーティングしたウェルに添加し、プレートを、 37°C で選択された期間インキュベートした。非接着細胞をPBS洗浄によって除去し、クリスタルバイオレットまたはLandegrenのPNAS法を使用して細胞付着を測定した。Landegren, U.（1984）J. Immunol. Methods 67: 379-388を参照のこと。結果を、3連のウェルの平均OD₅₅₀値またはOD₄₀₅値で示す。

30

【0249】

同様に、ヒト臍帯またはヒト腎臓（Cambrex）のいずれかから単離したヒト初代臍静脈内皮細胞（HUVEC）の上皮細胞（epi）およびメサングウム細胞（mesa）を採取し、同一条件の使用によって試験した。増殖アッセイのために、製造者（Cambrex）によって各細胞型のために供給された培地を使用した。ANGPTL4は、腎臓上皮細胞、腎臓メサングウム細胞、またはヒト臍静脈内皮細胞（HUVEC）の増殖を誘導しないようであるが、A673の増殖を誘導しなかった（図5）。

40

【0250】

A673細胞へのANGPTL4結合のFACS分析。ヒトA673細胞へのANGPTL4の結合を、FACS分析によって試験した。A673細胞を、10cm培養皿に500,000～ 1×10^6 細胞/サンプルウェルでプレートした。FACSの前日に、細胞を分割した。細胞を、PBSで1回洗浄し、10mlの20mM EDTAを含むPBSを添加し、10～20分間インキュベートした。20分後、プレートから細胞を擦り取

50

った。10 ml の 5 % FCS を含む PBS を添加し、細胞を、50 ml Falcon チューブに移した。細胞を、1.8 K rpm にて 4 °C で 5 分間スピンした。上清を除去し、細胞を、1 ml の 5 % FCS を含む PBS に再懸濁した。100 μ l の細胞懸濁液を、1 μ g のタンパク質を含む 5 ml FACS チューブに分布させ、氷上で 30 分以上インキュベートした。以下のタンパク質を使用した：mAngptl4 (23~410)、PUR 9452、0.428 mg/ml (2 μ l / サンプル) ; hAngptl4 (23~406)、PUR 9384、+/- 90 μ g/ml (10 μ l / サンプル) ; hAngptl4 (184~406) - IgG、PUR 9441、1.5 mg/ml (1 μ l / サンプル) ; およびコントロール FLAG-BAP (Sigma) 0.1 mg/ml (2 μ l / サンプル)。インキュベーション後、チューブを、氷上 5 ml の 5 % FCS を含む PBS で満たした。細胞を、2 K rpm で 5 分間スピンした。上清を除去した。抗 FLAG-FITC 抗体 (Sigma) を添加し (2 μ l の抗体 (100 μ g/ml ストック))、氷上で 5 分以上インキュベートした。最終抗体濃度は、1 μ g/ml であった。5 ml の 5 % FCS を含む PBS を添加し、細胞を 1.8 K rpm にて 4 °C で 5 分間スピンした。上清を除去し、細胞を、氷上で 5 % FCS を含む 0.25 ml PBS 中に再懸濁した。受容体内在化を防止するための 0.05 % アジ化ナトリウムも存在させることができる。サンプルあたり 1 μ l の 50 倍希釈したヨウ化プロピジウム (PI) のストックを添加することができる。次いで、細胞を、FACS に供した。種々の条件下で (図 6 のパネル B) (酸素正常状態、低酸素状態 (0 % O₂ で 24 時間)、または PMA (200 nM で 24 時間)) 種々の ANGPTL4 形態 (ヒトおよびマウス ANGPTL4) が A673 細胞 (図 6 のパネル A) に結合した。低酸素状態試験のために、細胞を、5 % CO₂ にて 37 °C で 24 時間インキュベートし、95 % N₂ で 24 時間インキュベートした。あるいは、細胞を、37 °C のインキュベーター中にて 200 nM ホルボールエステル (PMA) の存在下、5 % CO₂、および酸素正常状態で活性化した。

【0251】

ANGPTL4 を発現する細胞由来の馴化培地。Angptl4 を発現する細胞由来の馴化培地を使用するか組換え Angptl4 を添加した場合の A673 細胞の増殖を試験した。アデノウイルス構築物 (Ad-Angptl4 (2)、Ad-LacZ (1)、または Ad-LacZ + rmAngptl4 (23~410) (3) (5 μ g/ml)) で形質導入した COS7 由来の 500 μ l の馴化培地 (上清) を、A673 細胞に添加した。5 % FCS 高グルコース DMEM を含む培地中で 7 日間細胞を増殖させた後 (図 7 のパネル A)、細胞を計数した。5 % FCS を含む培地への組換え Angptl4 の添加および 4 日間の細胞の増殖によっても A673 増殖を試験した。添加せず (1)、緩衝液コントロール (2)、mAngptl4 (23~410) (2.5 μ g/ml) (3)、hAngptl4 (23~406) (2.5 μ g/ml) (4)、hIgG-hAngptl4 (184~406) (2.5 μ g/ml) (5)、または hIgG-mAngptl4 (184~410) (2.5 μ g/ml) (6) のいずれかを、示した濃度で培地に添加した。5 % FCS 高グルコース DMEM を含む培地中で 4 日間細胞を増殖させた後 (図 7 のパネル B)、細胞を計数した。培地に添加した ANGPTL4 または組換えタンパク質を発現する細胞由来の馴化培地による A673 細胞の増殖は、細胞密度に依存し得る。図 7 のパネル A (示した条件下で 7 日間増殖させた場合の細胞増殖) およびパネル B (示した条件下で 4 日間増殖させた場合の細胞増殖) を参照のこと。

【0252】

Angptl4 は細胞移動を誘導する。本発明者らは、Angptl4 がマウス 4T-1 腫瘍細胞の細胞移動を誘導する能力を試験した。細胞運動性を、孔サイズ 3 μ m の HTS マルチウェル組織培養インサート (Becton Dickinson, NJ) を使用して、記載のように測定した (例えば、Camenisch, et al., J. Biol. Chem., 277 (19): 17281-17290 (2002) を参照のこと)。hANGPTL4 (1~406) を、50/50/0.1 % BSA で 5、1、および 0.2 μ g/ml に希釈した。正のコントロールとして、膜を、培地または 0.1 μ g/m

1の組換えヒトPDGF-BB (R&D Systems)を含む10%ウシ胎児血清 (FCS)とインキュベートした。50/50/0.1%BSAを、負のコントロールとして使用した。マウス4T1腫瘍を、PBSで3回洗浄し、採取し、約 10^5 細胞/mlを含む50/50/0.1%BSA中に再懸濁した。mANGPTL4をNL2と示す以下の細胞調製物を試験した。

【0253】

【表3】

4T-1	
50/50/0.1%BSA	NL2 5 ug
+10%FBS	NL2 0.5 ug
+10%FBS	NL2 0.2 ug
50/50/0.1%BSA	PDGF-BB 0.1 ug

10

調製物を下の室に添加し、調製物を37℃で19時間インキュベートした。

【0254】

細胞懸濁液 (250 μ l) を下の室に添加し、細胞を、37℃で一晩5%CO₂加湿インキュベーター中に移動させた。インキュベーション後、上および下の室から培地を吸引し、より下の膜表面に移動した細胞を、メタノールで固定し (400 μ lのMeOHにて4℃で30分間固定し、MeOHを除去し、40分間風乾する)、ヨウ化YO-PRO-1 (Molecular Probes, OR) (400 μ lのヨウ化YO-PRO-1 (10 μ m) (1mMストックの100倍希釈物)) で染色した。移動の結果を、Openlabソフトウェア (Improvision, MA) を使用した20倍での顕微鏡視野あたりの平均細胞数として定量する。

20

【0255】

別の実験では、Angptl4は、4T-1腫瘍細胞の移動に伴ってA673細胞の移動を誘導することが見出された。mANGPTL4を、50/50/0.1%BSAで6、1.5、および0.375 μ g/mlに希釈した。正のコントロールとして、膜を、培地または0.1 μ g/mlの組換えヒトPDGF-BB (R&D Systems) を含む10%ウシ胎児血清 (FCS) とインキュベートした。50/50/0.1%BSAを、負のコントロールとして使用した。4T-1およびA673細胞を採取し、50/50/0.1%BSAに再懸濁した (2×10^5 細胞/ml)。mANGPTL4をNL2と示す以下の細胞調製物を試験した。

30

【0256】

【表4】

4T-1		A673	
50/50/0.1%BSA	NL2 6 μ g	50/50/0.1%BSA	NL2 6 μ g
+10%FBS	NL2 1.5 μ g	+10%FBS	NL2 1.5 μ g
+10%FBS	NL2 0.375 μ g	+10%FBS	NL2 0.375 μ g
50/50/0.1%BSA	PDGF-BB 0.1 μ g	50/50/0.1%BSA	NL2 0.375 μ g

40

調製物を750 μ lの下室に添加し、調製物を37℃で19時間インキュベートした。

【0257】

細胞懸濁液 (250 μ l) (5×10^4) を下の室に添加し、細胞を、37℃で7時間5%CO₂加湿インキュベーター中に移動させた。インキュベーション後、上および下の室から培地を吸引し、より下の膜表面に移動した細胞を、メタノールで固定し (400 μ lのMeOHにて4℃で30分間固定し、MeOHを除去し、40分間風乾する)、ヨウ化YO-PRO-1 (Molecular Probes, OR) (400 μ lのヨウ化YO-PRO-1 (10 μ m) (1mMストックの100倍希釈物)) で染色した。移動

50

の結果を、Openlabソフトウェア(Improvision, MA)を使用した20倍での顕微鏡視野あたりの平均細胞数として定量する。(1)血清を添加せず、(2)10%ウシ胎児血清(FCS)を添加し、(3)PDGF-BBを添加し、(4)ANGPTL4を添加した図9を参照のこと。ANGPTL4および10%FCSの両方を使用して、A673細胞および4T-1細胞が移動した。したがって、Angptl4に対するアンタゴニストを使用して、例えば、1つの理論に拘束されないが、腫瘍細胞の移動の防止によって転移を阻害することができる。

【0258】

ANGPTL4はインビボで腫瘍サイズを増加させる。ヒトA673横紋筋肉腫細胞(HTB 1598)を、以前に記載のように培養した(Kim et al., Nature 362:841-844 (1993); およびGerber et al., Cancer Research, 60:6253-6258 (2000))。5×10⁶個のA673細胞を含む0.1mlのMatrigelを、ページヌードマウス(Harlan Sprague Dawley)の背側の側腹部に皮下注射して異種移植片を確立させた。アデノウイルス構築物を、7日毎に(1、7、および14日目に)1×10⁸プラーク形成単位(PFU)で腫瘍内に(IT)注射した。28ゲージの針および0.5mlのツベルクリンシリンジを使用して、腫瘍塊の側面および底面に直接注射した。アデノウイルス構築物は、アデノウイルス-ANGPTL4構築物(Ad-Angptl4)、コントロールとしてのアデノウイルス-LacZ構築物(Ad-LacZ)、またはアデノウイルス-ANGPTL3構築物(Ad-Angptl3)であった。腫瘍移植から種々の日数で腫瘍サイズを決定した。2日毎に腫瘍サイズを測定し、楕円体積の式($\pi/6 \times L \times W \times H$ (式中、L=長さ、W=幅、H=高さ); Tomayko & Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol., 24:148-154 (1989))を使用して腫瘍体積を計算した。図8に示すように、腫瘍サイズ(パネルA)および重量(パネルB)は、Ad-LacZまたはAd-Angptl3構築物と比較して、A673細胞およびアデノウイルス-ANGPTL4構築物(Ad-Angptl4)を注射したマウスで統計的に増加した(P<0.0001)。

【0259】

実施例2: ANGPTL4で処置した腫瘍の抗VEGF治療から回避する傾向

ANGPTL4は、抗血管形成薬(例えば、抗VEGF)(AVASTIN(登録商標)(Genentech, South San Francisco)など)で処置した腫瘍における腫瘍細胞増殖を刺激した。図8のパネルCを参照のこと。ヒトA673横紋筋肉腫細胞(HTB 1598)を、以前に記載のように培養した(Kim et al., Nature 362:841-844 (1993); およびGerber et al., Cancer Research, 60:6253-6258 (2000))。5×10⁶個のA673細胞を含む0.1mlのMatrigelを、ページヌードマウス(Harlan Sprague Dawley)の背側の側腹部に皮下注射して異種移植片を確立させた。アデノウイルス構築物を、7日毎に(1、7、14、21、28日目に)1×10⁸プラーク形成単位(PFU)で腫瘍内に(IT)注射した。アデノウイルス構築物は、アデノウイルス-ANGPTL4構築物(Ad-Angptl4)、コントロールとしてのアデノウイルス-LacZ構築物(Ad-LacZ)、またはアデノウイルス-ANGPTL3構築物(Ad-Angptl3)であった。マウスにAvastin(登録商標)(Genentech)を、5mg/kgの用量で1週間に2回腹腔内を処置した。28ゲージの針および0.5mlのツベルクリンシリンジを使用して、腫瘍塊の側面および底面に直接注射した。2日毎に腫瘍サイズを測定し、楕円体積の式($\pi/6 \times L \times W \times H$ (式中、L=長さ、W=幅、H=高さ); Tomayko & Reynolds, Cancer Chemother. Pharmacol., 24:148-154 (1989))を使用して腫瘍体積を計算した。図8のパネルCに示すように、腫瘍サイズは、AVASTIN(登録商標)治療と組み合わせたAd-LacZまたはAd-Angptl3構築物を含む細胞を注射したマウスと比較して、AVASTIN(登

録商標)で処置したにもかかわらず、A 6 7 3細胞およびアデノウイルス-A N G P T L 4構築物(A d - A n g p t l 4)を注射したマウスで増加した。

【0260】

実施例3：A N G P T L 4に結合する抗体は、腫瘍細胞増殖を阻害する

抗A N G P T L 4抗体がA N G P T L 4の生物活性(例えば、腫瘍細胞の増殖)を阻害する能力を試験した。1×10⁴腫瘍細胞(例えば、He L a - S 3、C a k i、U 8 7 M G、2 9 3、A 6 7 3、H M 7、およびC a l u 6)／ウェルを、10% F C Sを含む培地中の12ウェルプレートにプレートした。細胞を、5% C O₂加湿インキュベーター中にて37℃で一晩インキュベートした。培地を、5% F C Sと交換し(10% F C Sを含むC a l u 6細胞以外)、1、2、5、5、または10μg／mlの抗h A N G P T L 4抗体または抗D s c rをウェルに添加するか、抗体を添加しなかった。プレートを、37℃の5% C O₂加湿インキュベーター中に入れた。抗h A N G P T L 4抗体の添加から2または3日後に細胞を計数した。抗A N G P T L 4抗体は、He L a - S 3、C a k i U 8 7 M G、2 9 3、A 6 7 3、およびC a l u 6の細胞成長を阻害したが、H M 7細胞は阻害されなかった。図10のパネルAおよびBを参照のこと。

10

【0261】

実施例4：A N G P T L 4に結合する抗体の調製

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の産生技術は、当該分野で公知であり、本明細書中に記載されている。使用することができる抗原(または免疫原)には、本発明の精製タンパク質、タンパク質フラグメント、このようなタンパク質を含む融合タンパク質、ならびに細胞表面上に組換えタンパク質および／またはタンパク質フラグメントを発現する細胞が含まれる。当業者は、過度に実験することなく、抗原を選択することができる。

20

【0262】

B a l b／cなどのマウスを、フロイント完全アジュバント中に乳化した抗原で免疫化し、約1～100マイクログラムの量で皮下または腹腔内に注射した。あるいは、抗原をM P L - T D Mアジュバント(R i b i I m m u n o c h e m i c a l R e s e a r c h, H a m i l t o n, M o n t.)中に乳化し、動物の後足の足蹠に注射した。次いで、免疫化マウスを、10～12日後に、選択したアジュバント中で乳化したさらなる抗原で追加免疫する。その後、数週間、マウスを、さらなる免疫化注射で追加免疫することもできる。抗体を検出するためのE L I S Aアッセイ試験のための血清サンプルを、眼窩後出血によってマウスから定期的に得ることができる。

30

【0263】

適切な抗体価を検出した後、抗体に対して「陽性の」動物に、所与のリガンドの最終静脈内注射を用いて注射することができる。3～4日後、マウスを屠殺し、脾臓細胞を採取する。次いで、脾臓細胞を、A T C C番号C R L 1 5 9 7から利用可能なP 3 X 6 3 A g U. 1などの選択されたマウス骨髄腫細胞株に融合する(35%ポリエチレングリコールを使用する)。融合物はハイブリドーマ細胞を生成し、その後に、非融合細胞、骨髄腫細胞、および脾臓細胞ハイブリッドの増殖を阻害するためのH A T(ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレートにプレートすることができる。

40

【0264】

ハイブリドーマ細胞を、抗原に対する反応性についてE L I S Aでスクリーニングする。A N G P T L 4に対して所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」ハイブリドーマ細胞の決定は、当業者の範囲内である。

【0265】

陽性ハイブリドーマを同系B a l b／cマウスに腹腔内注射して、抗A N G P T L 4モノクローナル抗体を含む腹水を産生することができる。あるいは、ハイブリドーマ細胞を、組織培養フラスコまたはローラーボトル中で増殖させることができる。腹水中に産生されたモノクローナル抗体を、硫酸アンモニウム沈殿、その後のゲル排除クロマトグラフィ

50

によって精製することができる。あるいは、プロテインAまたはプロテインGへの抗体の結合に基づいたアフィニティークロマトグラフィーを使用することができる。

【0266】

例えば、ウサギポリクローナル抗体を、1、40、および70日目に大腸菌で生成された500 μ gの組換えヒトANGPTL4タンパク質(23~406)でのウサギの免疫化によって生成した。免疫化から80日後および120日後に血清を採取し、プロテインA Sephadexカラムによって抗体を精製した。

【0267】

実施例5：遮断抗体または中和抗体

本明細書中に記載の抗体を、当該分野で公知の種々の技術(例えば、ELISA)によって同定することができる。例えば、プレートを、目的のポリペプチド(例えば、ANGPTL4またはそのフラグメント)でコーティングし、このポリペプチド(例えば、ANGPTL4)に対して生成された抗体とインキュベートした(例えば、米国特許第6,348,350号、同第6,372,491号、および同第6,455,496号の説明を参照のこと)。結合した抗体を、種々の方法によって検出することができる。

【0268】

アンタゴニスト(例えば、遮断または中和)抗体を、競合アッセイおよび/または活性アッセイによって同定することができる。例えば、ANGPTL4の発現は、腫瘍細胞の増殖、移動、接着、または $\alpha_v\beta_5$ への結合を刺激する。ANGPTL4に対する遮断抗体または中和抗体の決定を、抗体が腫瘍細胞の増殖(例えば、図10のパネルAおよびBを参照のこと)、移動、接着(例えば、図12を参照のこと)、または $\alpha_v\beta_5$ への結合(US Biological, 37K, Swampscott, Massachusetts)(例えば、図13のパネルBおよびCを参照のこと)を遮断する能力によって示すことができる。例えば、A673横紋筋肉腫細胞をプレートし、抗ANGPTL4抗体、コントロール抗体、またはPBSと共にAd-hAngptl4で形質導入されたCOS7細胞由来の上清とインキュベートした。7日後細胞を、トリプシン処理し、計数することができる。細胞数を減少させる抗体を、遮断抗体または中和抗体と定義する。ANGPTL4はまた、腫瘍細胞の細胞移動を誘導し、血管形成促進因子であることが示されていた。例えば、Le Jan et al., American Journal of Pathology, 164(5):1521-1528(2003)を参照のこと。したがって、ANGPTL4に対する中和抗体を、腫瘍細胞移動アッセイおよび/または血管形成アッセイ(例えば、CAMアッセイ)においてANGPTL4と組み合わせて抗体を使用することによって同定することができる。

【0269】

腫瘍成長の遮断もしくは減少または癌細胞増殖の遮断または減少で使用するANGPTL4に対する遮断抗体および中和抗体を、上記の培養および/またはベージュ/ヌードマウス研究における腫瘍細胞の使用によって同定することができる。例えば、ヌードマウスに腫瘍細胞を注射することができる。腫瘍細胞が確立された種々の期間に、マウスに、種々の用量の遮断または中和ANGPTL4抗体、抗体コントロール、またはPBSを1週間に1回または2回腹腔内に注射することができる。腫瘍サイズを毎週測定することができ、研究終了時に、腫瘍を切り出して秤量することができる。マウス内の腫瘍成長を遮断するかまたは減少させる遮断または中和ANGPTL4抗体を同定する。

【0270】

腫瘍成長を遮断するかまたは減少させるか、癌細胞増殖を遮断するかまたは減少させるANGPTL4抗体と抗血管形成薬との組み合わせを、上記の培養および/またはベージュ/ヌードマウス研究における腫瘍細胞の使用によって同定することができる。上記のように、ヌードマウスに腫瘍細胞を注射することができる。腫瘍細胞が確立された種々の期間に、マウスに、種々の用量のANGPTL4アンタゴニストと抗癌薬(例えば、抗VEGF抗体などの抗血管形成薬)との組み合わせ、またはANGPTL4アンタゴニスト、抗癌薬、抗体コントロール、もしくはPBSを1週間に1回または2回腹腔内に注射する

ことができる。腫瘍サイズを毎週測定することができ、研究終了時に、腫瘍を切り出して秤量することができる。コントロールまたは単剤のみと比較して、マウス内の腫瘍成長を遮断するかまたは減少させるか、腫瘍成長の遮断または減少を増強するANGPTL4抗体と抗癌薬との併用療法を同定する。

【0271】

実施例6：ANGPTL4改変体 製造者のプロトコールにしたがって標準的な変異誘発キット（例えば、QuickChange XL部位特異的変異誘発キット（Invitrogen, Carlsbad, California））を使用して、変異ANGPTL4を作製した。2つのアミノ酸配列ヒトANGPTL4配列中の2つのアミノ酸を置換した（例えば、図2を参照のこと）。162位および164位を置換し（R162GおよびR164E）、RKRがGKEに変化した。ANGPTL4タンパク質（L280プラスミド、aa1~406）または変異ANGPTL4を、一過性にトランスフェクトしたCOS-7細胞の上清から単離した。精製するために、上清をニッケルカラムにロードした。抗FLAG-HRP抗体を使用したウェスタンブロットによってタンパク質を検出した。図3のパネルBを参照のこと。置換して変異ANGPTL4を未変性または野生型ANGPTL4タンパク質と比較した場合、変異ANGPTL4は、ウェスタンブロッティングによって未変性のANGPTL4よりも分子量が高いことが見出された。未変性タンパク質の162位および164位でのRKRからGKEへの置換により、ANGPTL4のタンパク質分解が防止された。

【0272】

実施例7：ANGPTL4は $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに結合する

アンジオポエチンは、そのフィブリノーゲン（FBN）様ドメインを介した内皮細胞特異性チロシンキナーゼ受容体Tie2への結合によって血管形成を調節する分泌性因子である。分泌性リガンドファミリー中に存在するコイルドコイルドメインは、リガンドオリゴマー形成に必要であることが見出された（例えば、Procopio et al., J. Biol. Chem., 274:30196-201 (1999)を参照のこと）。

【0273】

アンジオポエチンと同様に、ANGPTL3およびANGPTL4は分泌性糖タンパク質であり、それぞれ、N末端シグナルペプチド、その後のコイルドコイルドメイン、およびC末端FBN様ドメインからなる。ANGPTL3はFBN様ドメインを介して $\alpha_v\beta_3$ に結合すると確定した。本発明者らは、ANGPTL4は $\alpha_v\beta_5$ に結合すると確定した。 $\alpha_v\beta_5$ インテグリンで安定にトランスフェクトされた293~1953細胞株を、ANGPTL4コーティングプレートへの結合能力または接着能力について試験した。細胞を採取し、PBS、1%BSA、1mM CaCl_2 、および1mM MgCl_2 を含む無血清培地にて 10^5 細胞/mlに希釈した。細胞を、抗インテグリン $\alpha_v\beta_5$ 抗体（MAB1961（Chemicon, Temecula, CA））またはペプチドを含めるか含めずに37℃で15分間プレインキュベートした。組換えmANGPTL4、BSA、またはビトロネクチン（1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を、Nunc Maxisorp 96ウェル平底マイクロタイタープレート上に4℃で一晩コーティングし、200 μl の3%BSAを含むリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）（pH7.4）にて37℃で1.5時間ブロッキングした。細胞懸濁液（ 5×10^4 細胞/100 μl /ウェル（ $5 \times 10^5/\text{ml}$ ））を、コーティングしたウェルに添加し、プレートを37℃で5.5時間インキュベートした。非接着細胞を、PBS洗浄によって除去し、細胞付着を、200 μl のCyQuant GD Dye（Molecular Probes（Invitrogen detection Technologies（Carlsbad, California））（1:400）/細胞溶解緩衝液の添加によって測定し、2~5分間インキュベートした。480nmの励起および520nmの放射極大を使用してサンプルの蛍光を測定した。LandegrenのPNAG法を使用することもできる（例えば、Landegren, J. Immunol. Methods, 67:379-388 (1984)を参照のこと）。 $\alpha_v\beta_5$ を発現する

細胞は、BSA（負のコントロール）と比較して、ANGPTL4およびビトロネクチン（US Biological, Swampscott, Massachusetts）（正のコントロール）への接着を示した。図11を参照のこと。

【0274】

$\alpha_v\beta_5$ インテグリンがANGPTL4細胞接着を媒介するのに十分であるかどうかを決定するために、遮断抗体を、細胞接着アッセイにおけるその接着阻害能力について試験した。機能的遮断抗体（抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体（MAB1961（Chemicon, Temecula, CA））または抗hANGPTL4抗体）を、293～1953細胞に添加し、その後タンパク質コーティングしたウェル（BSA（1）、ビトロネクチン（2）、またはANGPTL4（3））とインキュベートした。図12を参照のこと。抗 $\alpha_v\beta_5$ および抗ANGPTL4抗体により、ANGPTL4の細胞接着活性が破壊された。

【0275】

さらなる実験を行ってANGPTL4が $\alpha_v\beta_5$ に結合することを確認した。ELISA実験を行ってmANGPTL4、IgG-hANGPTL4-N末端（1～183）、および／またはIgG-hANGPTL4-C末端（184～406）が $\alpha_v\beta_5$ （US Biological, 37K, Swampscott, Massachusetts）コーティングプレートに結合するかどうかを検出した。100 μ l／ウェルのコーティング緩衝液を含むインテグリン $\alpha_v\beta_5$ 希釈剤（1 μ g／mlコーティング緩衝液（50mM炭酸塩／重炭酸塩、pH9.6））を、4℃で一晩インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液（PBS（pH7.4）、0.05%Tween-20）で3回洗浄し、100 μ l／ウェルの遮断緩衝液（PBS（pH7.4）、0.5%BSA）を、穏やかに震盪しながら室温で1時間添加した。種々の量（0、0.070 μ g、0.22 μ g、0.66 μ g、2 μ g、または6 μ g）のサンプル、mANGPTL4、IgG-hANGPTL4-N末端（1～183）、および／またはIgG-hANGPTL4-C末端（184～406）を、サンプル緩衝液（0.5%BSA、50mM Tris（pH7.4）、0.05%Tween20、1mM MnCl₂、50 μ M CaCl₂、50 μ M MgCl₂、100mM NaCl）中で調製し、30分間インキュベートした。サンプルをプレートに添加し（100 μ l／ウェル、上記でインキュベートした量）、穏やかに震盪しながら室温で2時間インキュベートした。プレートを緩衝液で洗浄し、100 μ l／ウェル抗Flag-西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）（100ng／ml）（Jackson, #109-036-098）を含むアッセイ緩衝液（PBS（pH7.4）、0.5%BSA、0.05%Tween20）を添加し、穏やかに震盪しながら室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄した。100 μ l／ウェルのテトラメチルベンジジン（TMB）（Moss, Inc.）を添加し、室温で良好に発色するまでプレート中でインキュベートした。100 μ l／ウェルの停止液（1M H₃PO₄）を添加して、反応を停止させた。プレートを、630nmで読み取った。mANGPTL4、IgG-hANGPTL4-N末端、およびIgG-hANGPTL4-C末端は $\alpha_v\beta_5$ コーティングプレートに結合したが、IgG-hANGPTL4-C末端がプレートにわずかにより結合した。図13のパネルAを参照のこと。

【0276】

抗ANGPTL4抗体は、 $\alpha_v\beta_5$ コーティングプレートへのANGPTL4の結合を阻害する。ELISA実験を行った。100 μ l／ウェルのコーティング緩衝液を含むインテグリン $\alpha_v\beta_5$ 希釈剤（1 μ g／mlコーティング緩衝液（50mM炭酸塩／重炭酸塩、pH9.6））を、4℃で一晩インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液（PBS（pH7.4）、0.05%Tween-20）で3回洗浄し、100 μ l／ウェルの遮断緩衝液（PBS（pH7.4）、0.5%BSA）を、穏やかに震盪しながら室温で1時間添加した。0.6 μ g～6.0 μ gのサンプル、mANGPTL4、IgG-hANGPTL4-N末端（1～183）、および／またはIgG-hANGPTL4-C末端（184～406）を、サンプル緩衝液（0.5%BSA、50mM Tris（pH7.4）、0.05%Tween20、1mM MnCl₂、50 μ M CaCl₂、5

10

20

30

40

50

0 μ M MgCl₂、100mM NaCl) 中で抗ANGPTL4抗体 (1.5 μ g) または抗Dscr (1.5 μ g) と30分間インキュベートした。インキュベーション後、100 μ l / ウェルのサンプル+/-抗体をプレートと穏やかに震盪しながら室温で2時間インキュベートした。プレートを緩衝液で洗浄し、100 μ l / ウェル抗Flag-HRP (100ng/ml) を含むアッセイ緩衝液 (PBS (pH7.4)、0.5% BSA、0.05% Tween 20) を添加し、穏やかに震盪しながら室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、100 μ l / ウェルのTMBを添加し、室温で良好に発色するまでプレート中でインキュベートした。100 μ l / ウェルの停止液 (1M H₃PO₄) を添加して、反応を停止させた。プレートを、630nmで読み取った。抗ANGPTL4抗体は、抗Dscr抗体、5G7モノクローナル抗体、または培地と比較して、 $\alpha_v\beta_5$ コーティングプレートに結合するmANGPTL4、IgG-hANGPTL4-N末端、およびIgG-hANGPTL4-C末端の量を減少させた。図13のパネルBを参照のこと。

10

【0277】

別の実験では、ANGPTL4およびインテグリン $\alpha_v\beta_5$ の結合を、ELISAによって示した。この実験では、80 μ l / ウェルのhANGPTL4-C末端、ビトロネクチン、またはBSA (5 μ g/ml) を、コーティング緩衝液 (50mM炭酸塩/重炭酸塩、pH9.6) 中のプレートに添加し、4℃で一晩インキュベートした。プレートを洗浄し (洗浄緩衝液: PBS (pH7.4)、0.05% Tween-20)、100 μ l / ウェルのいずれかの培地を有する遮断緩衝液 (PBS (pH7.4)、0.5% BSA)、抗hANGPTL4抗体 (15 μ g / 100 μ l)、または抗Dscr抗体 (15 μ g / 100 μ g) を添加し、穏やかに震盪しながら室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、 $\alpha_v\beta_5$ 100 μ l (3~9 μ g/ml) を添加し、穏やかに震盪しながら室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、1 μ g/ml (1000倍) の抗 $\alpha_v\beta_5$ 抗体 (Chemicon) (5 μ g / 100 μ l) を、アッセイ緩衝液 (PBS (pH7.4)、0.5% BSA、0.05% Tween 20) 中に添加し、穏やかに震盪しながら室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、100 μ l / ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 抗マウス (5000倍) をアッセイ緩衝液に添加した。プレートを洗浄し、100 μ l / ウェルのテトラメチルベンジジン (TMB) を添加し、室温で良好に発色するまでプレート中でインキュベートした。100 μ l / ウェルの1M H₃PO₄で反応を停止させ、プレートを、630nmで読み取った。 $\alpha_v\beta_5$ はANGPTL4 (レーン1) およびビトロネクチン (レーン4) コーティングプレートに結合する。結合は、抗ANGPTL4抗体 (レーン2) で遮断されるが、コントロール抗体である抗Dscrを使用する場合 (レーン3) またはコントロールタンパク質をプレート上にコーティングする場合 (レーン5)、遮断されない。図13のパネルCを参照のこと。

20

30

【0278】

したがって、これらの所見は、組換えANGPTL4が $\alpha_v\beta_5$ インテグリンに特異的に結合することを証明する。

【0279】

明細書は、当業者が本発明を実施可能にするのに十分であると見なされる。本明細書に記載の実施例および実施形態は例示のみを目的とすると理解される。寄託物が本発明の特定の態様の一例であることが意図され、機能的に等価な任意の構築物が本発明の範囲内に含まれるので、本発明は、寄託した構築物によってその範囲が制限されない。本明細書中の材料の寄託は、明細書が本発明の任意の態様 (最良の形態が含まれる) を実施するのに不適切であることを認めず、示される特定の例に特許請求の範囲が制限されとも解釈されない。実際、本明細書中に示し、且つ説明した事項に加えて、上記説明から本発明の種々の修正形態が当業者に明らかであり、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれる。本明細書中に引用された全ての刊行物、特許、および特許出願は、全ての目的のためにその全体が本明細書中で参考として援用される。

40

50

【 図 1 A 】

SEQ. ID NO:1:

GCCGAGCTGA GCGGATCCTC ACATGACTGT GATCGGATTC TTTCAGCGG 50
CTTCTGCAAC CAAGCGGGTC TTACCCCGG TCCTCCGCGT CTCCAGTCT 100
CGACACTGGA ACCCCAGAGT CCCCAGAGT CCCCAGATCC CGCTCCAG 150
GCTACCTAAG AGGATGAGCG GTGCTCCGAC GCGCGGGGCA GCGCTGATGC 200
TCTGCGCGCG CACCGCCGTC TACTGAGCG CTCAGGCGCG ACCCGTGAG 250
TCCAAGTCGC CGCGCTTTGC GTCTTGAGAC GAGATGAATG TCCTGCGCGCA 300
CGGACTCTTG CAGCTGCGCC AGGGGCTGCG CGAACACGCG GAGCGCACCC 350
GCAGTCAGCT GAGCGCGCTG GAGCGCGGCC TGAGCGCGTG CGGTCGCGC 400
TGTGAGGAA CGAGGGGTC CACCGACCTC CCGTTAGCCC CTGAGAGCG 450
GCTGAGCCCT GAGGTCTTTC ACAGCCTGCA GACACAACTC AAGGCTCAGA 500
ACAGCAGGAT CCAGCAACTC TTCCACAAGG TGGCCGACGA GCAGCGGCAC 550
CTGGAGAAGC AGCACCTGCG AATTGAGCAT CTGCAAGGCC AGTTTGGCCT 600
CCTGGACCAC AAGCACCTAG ACCATGAGGT GGCCAGCGCT GCCGGAAGAA 650
AGAGGCTGCG CGAGATGCGC GAGCAGTTG ACCCGGCTCA CAATGTCAGC 700
CGCCTGCACC GGCTGCCAG GATTGCGCAG GAGCTGTTC AGTTTGGGA 750
GAGGCGAGGT GGACTATTTC AATCCAGCC TCAGGGGTCT CGGCCATTTT 800
TGTTGAACTG CAAGATGACC TCAGATGGAG GCTGAGCAGT AATTGAGAG 850
CGCCACGATG GCTCAGTGA CTCAACCGG CCGTGGGAG CCTACAAGGC 900
GGGGTTGGG GATCCCCACG GCGAGTCTG CTGGGTCCTG GAGAAGGTGC 950
ATAGCATCAC GGGGACCGC AACAGCCGCC TGGCCGTGCA GCTCGGGAC 1000
TGGGATGGCA ACGCCGAGTT GCTGCACTC TCCGTGACCC TGGGTGGCGA 1050
GGACACGGCC TATAGCCTGC AGCTCACTGC ACCCGTGGCC GGCCAGCTGG 1100
GCGCCACCAC CGTCCCAACC AGCGGCTCTT CCGTACCTTT CTCCTACTGG 1150
GACCAGGATC ACGACCTCG CAGGGACAAG AACTGGGCGCA AGAGCCTCTC 1200

FIG._1A

【 図 1 B 】

TGGAGGCTGG TGGTTTGGCA CCTGAGCCA TTCCAACCTC AACGGCCAGT 1250
ACTTCCGCTC CATCCACAG CAGCGGCAGA AGCTTAAGAA GGAATCTTC 1300
TGSAAAGACT GCGGGGCGG CTACTCCCG CTGACGCCA CCACCATGTT 1350
GATCCAGCCC ATGGCAGCAG AGGCAGCTC CTAGCGTCTT GGCTGGGCT 1400
GGTCCGAGG CCACGAAAGA CGTGACTCT TGGCTCTGCC CGAGGATGTG 1450
GCCGTTCCTT GCCTGGGCG GGGCTCCAAG GAGGGGCCAT CTGGAACCTT 1500
GTGGACAGAG AAGAAGACCA CGACTGGAGA AGCCCCCTTT CTGAGTGACG 1550
GGGGGCTGCA TCCCTTCCCT CCTGAGATCG AGGCTGCAGG ATATGCTCAG 1600
ACTCTAGAGG CGTGGACCAA GGGGCATGGA GCTTACTCC TTGCTGGCCA 1650
GGGAGTTGGG GACTCAGAGG GACCACTTGG GGCCAGCCAG ACTGGCCTCA 1700
ATGGCGGACT CAGTCACATT GACTGACGGG GACCAGGGCT TGTGTGGGTC 1750
GAGAGCGGCC TCATGGTGCT GGTGCTGTTG TGTGTAGTTC CCTGGGGAC 1800
ACAAGCAGGC GCCAATGGTA TCTGGGCGGA GCTCAGAGG TTCTTGGAA 1850
AAAAGCAACC TCAGAACAC 1869

FIG._1B

【 図 2 A 】

SEQ. ID NO:2:

Met Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Ala Ala Leu Met Leu Cys Ala
1 5 10 15
Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Gln Gly Gly Pro Val Gln Ser
20 25 30
Lys Ser Pro Arg Phe Ala Ser Trp Asp Glu Met Asn Val Leu Ala
35 40 45
His Gly Leu Leu Gln Leu Gly Gln Gly Leu Arg Glu His Ala Glu
50 55 60
Arg Thr Arg Ser Gln Leu Ser Ala Leu Glu Arg Arg Leu Ser Ala
65 70 75
Cys Gly Ser Ala Cys Gln Gly Thr Glu Gly Ser Thr Asp Leu Pro
80 85 90
Leu Ala Pro Glu Ser Arg Val Asp Pro Glu Val Leu His Ser Leu
95 100 105
Gln Thr Gln Leu Lys Ala Gln Asn Ser Arg Ile Gln Gln Leu Phe
110 115 120
His Lys Val Ala Gln Gln Gln Arg His Leu Glu Lys Gln His Leu
125 130 135
Arg Ile Gln His Leu Gln Ser Gln Phe Gly Leu Leu Asp His Lys
140 145 150
His Leu Asp His Glu Val Ala Lys Pro Ala Arg Arg Lys Arg Leu
155 160 165
Pro Glu Met Ala Gln Pro Val Asp Pro Ala His Asn Val Ser Arg
170 175 180
Leu His Arg Leu Pro Arg Asp Cys Gln Glu Leu Phe Gln Val Gly
185 190 195
Glu Arg Gln Ser Gly Leu Phe Glu Ile Gln Pro Gln Gly Ser Pro
200 205 210
Pro Phe Leu Val Asn Cys Lys Met Thr Ser Xaa Gly Gly Trp Thr
215 220 225
Val Ile Gln Arg Arg His Asp Gly Ser Val Asp Phe Asn Arg Pro
230 235 240

FIG._2A

【 図 2 B 】

Trp Glu Ala Tyr Lys Ala Gly Phe Gly Asp Pro His Gly Glu Phe
245 250 255
Trp Leu Gly Leu Glu Lys Val His Ser Ile Thr Gly Asp Arg Asn
260 265 270
Ser Arg Leu Ala Val Gln Leu Arg Asp Trp Asp Gly Asn Ala Glu
275 280 285
Leu Leu Gln Phe Ser Val His Leu Gly Gly Glu Asp Thr Ala Tyr
290 295 300
Ser Leu Gln Leu Thr Ala Pro Val Ala Gly Gln Leu Gly Ala Thr
305 310 315
Thr Val Pro Pro Ser Gly Leu Ser Val Pro Phe Ser Thr Trp Asp
320 325 330
Gln Asp His Asp Leu Arg Arg Asp Lys Asn Cys Ala Lys Ser Leu
335 340 345
Ser Gly Gly Trp Phe Gly Thr Cys Ser His Ser Asn Leu Asn
350 355 360
Gly Gln Tyr Phe Arg Ser Ile Pro Gln Gln Arg Gln Lys Leu Lys
365 370 375
Lys Gly Ile Phe Trp Lys Thr Trp Arg Gly Arg Tyr Tyr Pro Leu
380 385 390
Gln Ala Thr Thr Met Leu Ile Gln Pro Met Ala Ala Glu Ala Ala
395 400 405
Ser
406

FIG._2B

【図 3】

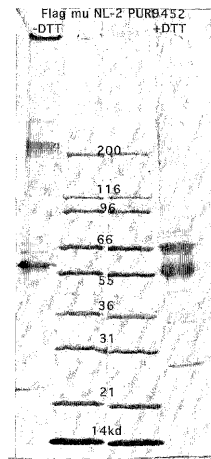


FIG. 3A

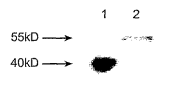


FIG. 3B

【図 4 A】

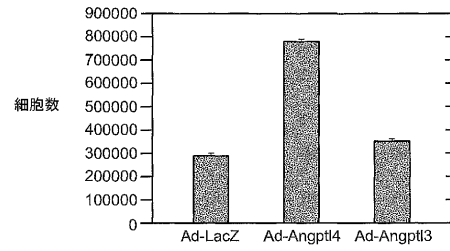


FIG. 4A

【図 4 B】

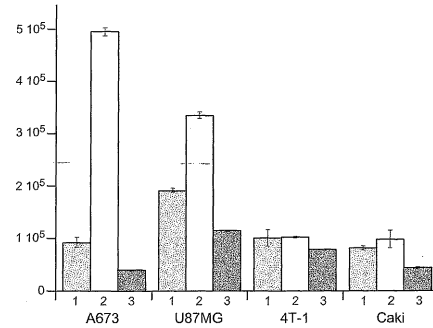


FIG. 4B

【図 4 C】

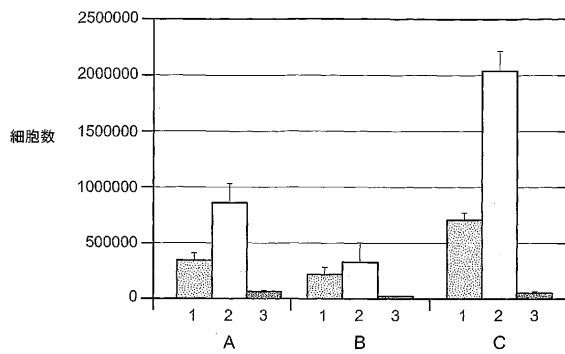


FIG. 4C

【図 6 A】

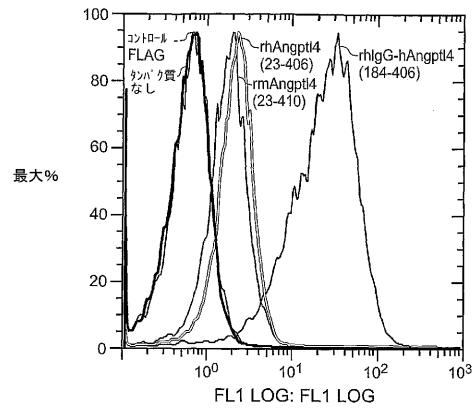


FIG. 6A

【図 5】

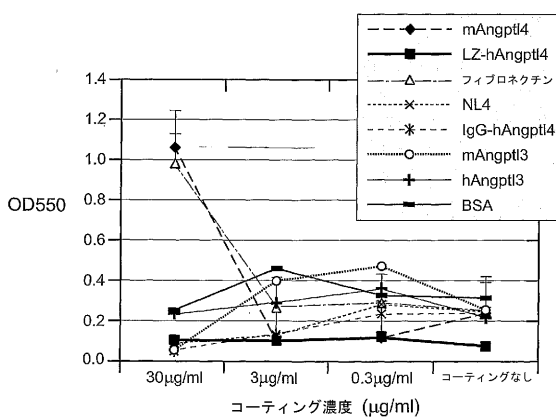
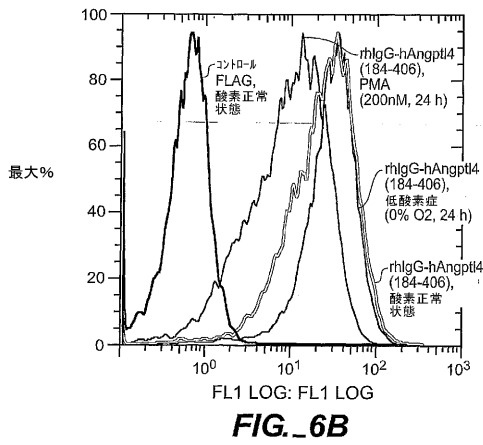
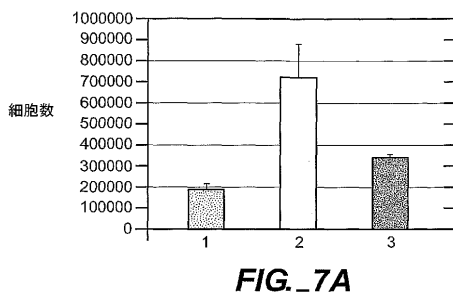


FIG. 5

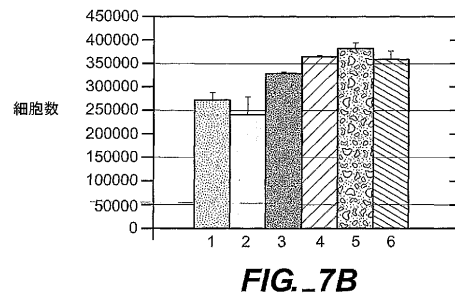
【図 6 B】



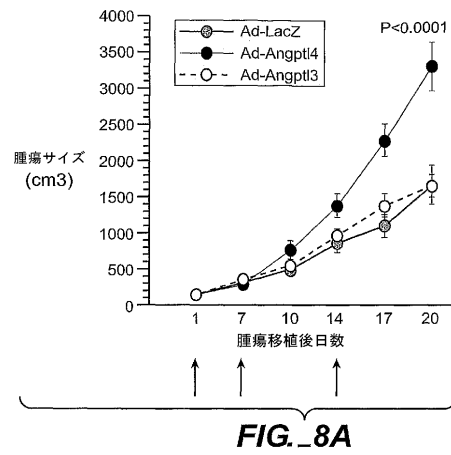
【図 7 A】



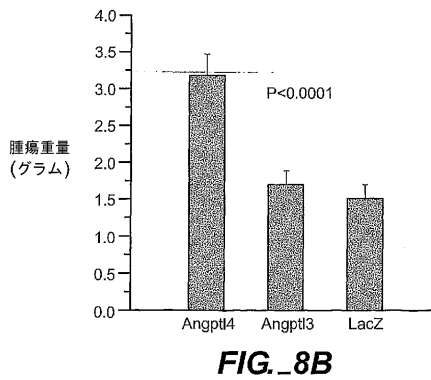
【図 7 B】



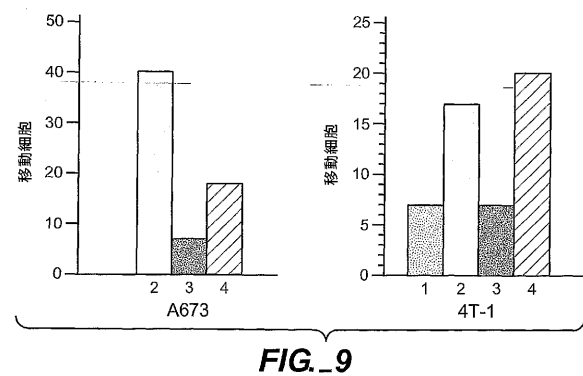
【図 8 A】



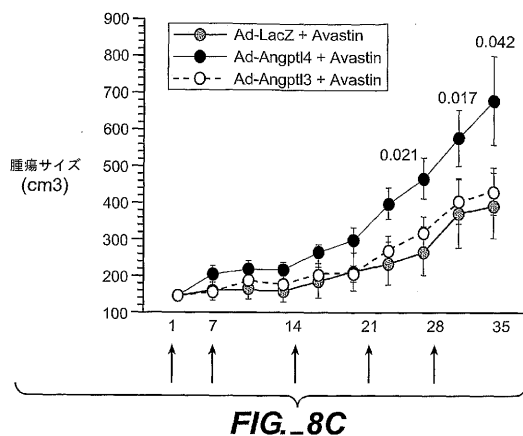
【図 8 B】



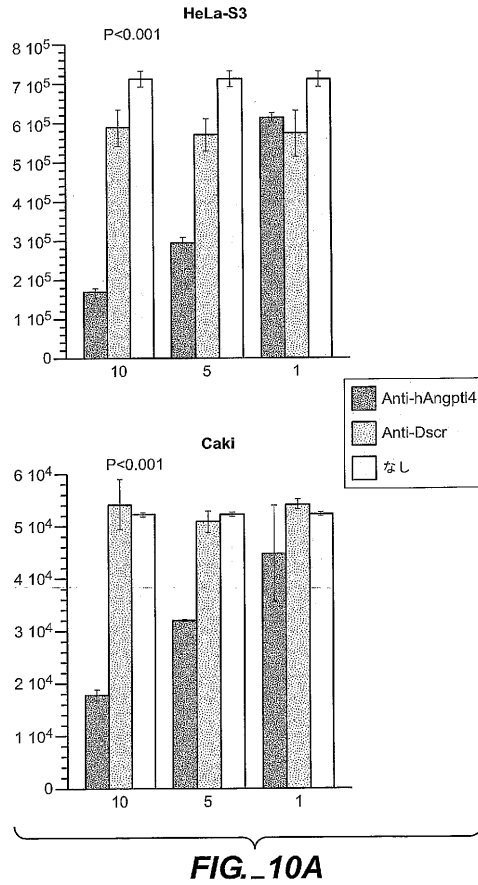
【図 9】



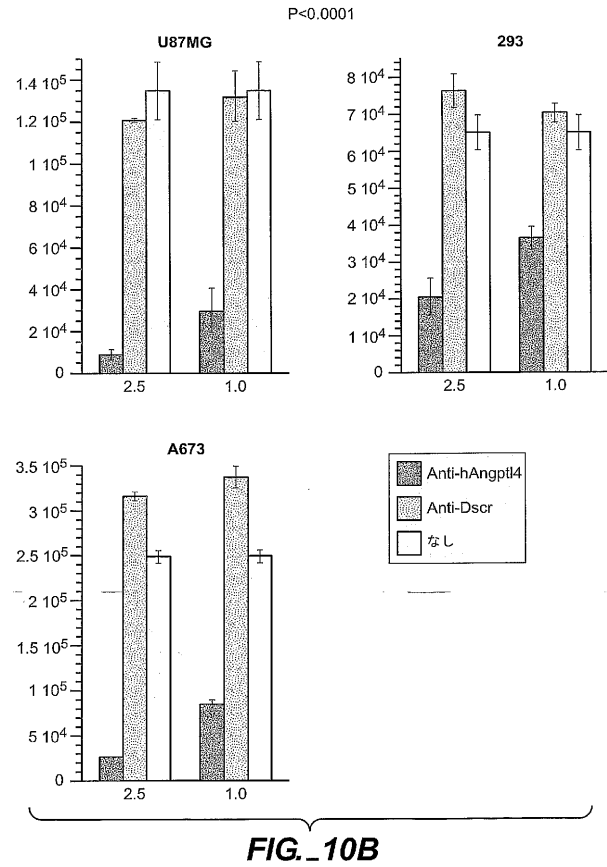
【図 8 C】



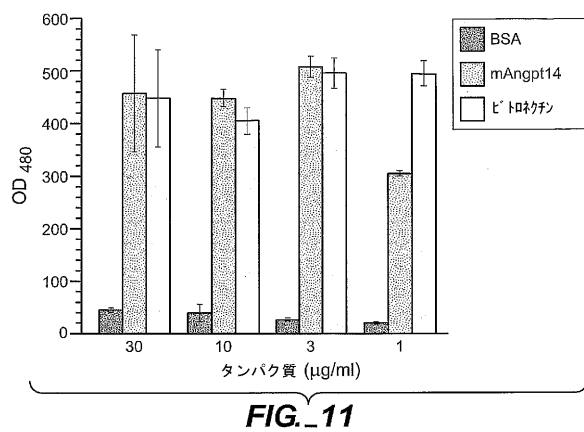
【図 10 A】



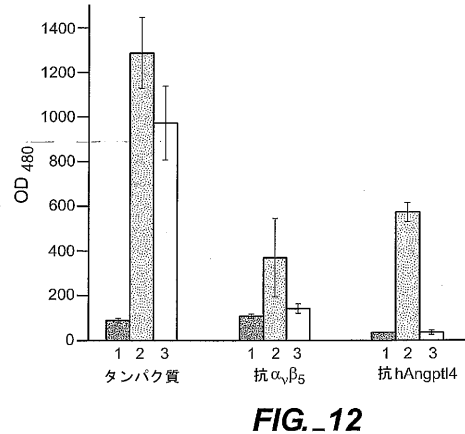
【図 10 B】



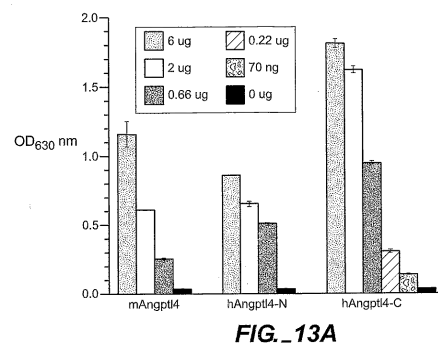
【図 11】



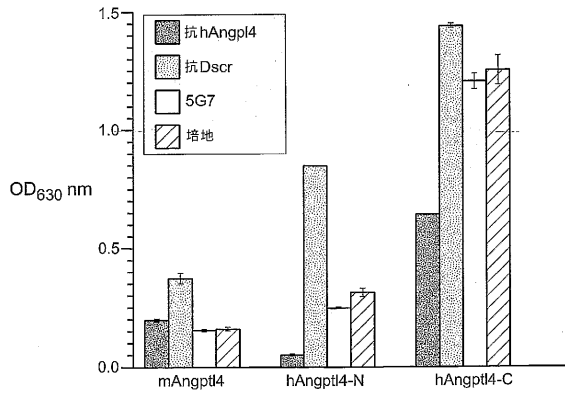
【図 12】



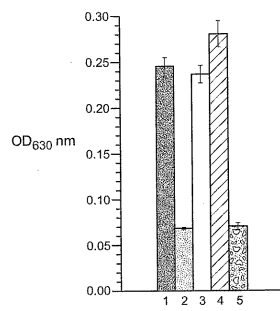
【図 13 A】



【図 1 3 B】

**FIG._13B**

【図 1 3 C】

**FIG._13C**

【配列表】

2012017331000001.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 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
	A 6 1 K 31/7105	
	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 16/18	

(72)発明者 ナポレオン フェラーラ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 9, サンフランシスコ, パシフィック アベニュー 2 0 9 0, ナンバー 7 0 4

(72)発明者 ハンスーピーター ゲルバー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, テネシー ストリート 1 1 2 1 ナンバー 5

(72)発明者 シャオ ファン リャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 5, レッドウッド シティ, ペリカン レーン 2 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 GA11 HA01 HA17
 4C084 AA20 AA24 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB271 ZC751
 4C085 AA14 BA77 CC08 EE03
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 NA05 ZB26 ZB27 ZC75
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 FA71 FA74

【外国語明細書】
2012017331000001.pdf