

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6529261号
(P6529261)

(45) 発行日 令和1年6月12日 (2019.6.12)

(24) 登録日 令和1年5月24日 (2019.5.24)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
請求項の数 29 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-552348 (P2014-552348)	(73) 特許権者	509012625
(86) (22) 出願日	平成25年1月11日 (2013.1.11)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2015-512612 (P2015-512612A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(43) 公表日	平成27年4月30日 (2015.4.30)		サンフランシスコ ディーエヌエー
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/021306		ウェイ 1
(87) 国際公開番号	W02013/106765	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開日	平成25年7月18日 (2013.7.18)		園田・小林特許業務法人
審査請求日	平成28年1月8日 (2016.1.8)	(72) 発明者	バイス, カルロス
(31) 優先権主張番号	61/586,660		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(32) 優先日	平成24年1月13日 (2012.1.13)		80, サウス サンフランシスコ, デ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イーエヌエー ウェイ 1
前置審査		(72) 発明者	ブラウア, マシュー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			80, サウス サンフランシスコ, デ
			イーエヌエー ウェイ 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGFアンタゴニストで治療するための患者を同定するための生物学的マーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌を患っている患者が、VEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いかどうかを判定するためのデータを収集する方法であって、

(a) 患者へのVEGFアンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、Col4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の発現を検出すること、および

(b) 前記Col4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の発現レベルをCol4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の基準発現レベルと比較することを含み、基準レベルに対する、生体試料中の前記Col4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の発現のレベルの増大によって、VEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者が同定される、方法。

【請求項2】

癌を患っている患者に対するVEGFアンタゴニストの治療的有効性を最適化するためのデータを収集する方法であって、

(a) 患者へのVEGFアンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、Col4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の発現を検出すること、および

(b) 前記Col4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の発現レベルをCol4a2、ESM1、LAMA4、及びNid2の基準発現レベルと比較することを含み、

10

20

基準レベルに対する、生体試料中の前記C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現のレベルの増大によって、V E G Fアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者が同定される、方法。

【請求項3】

患者が、V E G Fアンタゴニストのいかなる投与よりも前にV E G Fアンタゴニストへの応答性について検査を受けた患者集団中に存在し、基準レベルが、前記患者集団における、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現の中央値レベルである、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

患者から得た生体試料中のC o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現が、m R N Aを測定することによって検出される、請求項1から3の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項5】

患者から得た生体試料中のC o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現が、血漿タンパク質レベルを測定することによって検出される、請求項1から3の何れか一項に記載の方法。

【請求項6】

生体試料が腫瘍組織である、請求項1から5の何れか一項に記載の方法。

【請求項7】

患者から得た生体試料において、A l k 1、C D 3 4、C D 1 0 5、C D 1 4 4、C o l 4 a 1、D 1 1 4、E F N B 2、E G F L 7、N G 2、N o t c h 1、N R P 1、N R P 2、R G S 5、S e m a 3 f、T S P 1、V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3、及びV I Mからなる群から選択される一以上の遺伝子の発現を検出することをさらに含む、請求項1から6の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項8】

V E G Fアンタゴニストが抗V E G F抗体である、請求項1から7の何れか一項に記載の方法。

【請求項9】

抗V E G F抗体がベバシズマブである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

患者が血管新生障害を有する、請求項1から9の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項11】

患者が、結腸直腸がん、乳がん、肺がん、神経膠芽細胞腫、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるがんを有する、請求項1から10の何れか一項に記載の方法。

【請求項12】

(c) 基準レベルに対する、生体試料中のC o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現のレベルの増大が検出される場合に、前記患者の治療のためにV E G Fアンタゴニストを選択することをさらに含む、請求項1から11の何れか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記V E G Fアンタゴニストが抗V E G F抗体である、請求項12に記載の方法。

40

【請求項14】

抗V E G F抗体がベバシズマブである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

療法が考慮される患者集団の、癌を患っている特定の患者に対する療法を選択するためのデータを収集する方法であって、

(a) 患者へのV E G Fアンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現を検出すること、

(b) 前記C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現レベルをC o l

50

4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の基準発現レベルと比較し、基準レベルに対する、生体試料中のC o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現のレベルの増大によって、V E G Fアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者が同定されること、および

(c) 患者が、V E G Fアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いと同定される場合は、療法としてV E G Fアンタゴニストを選択すること、または

(d) 患者が、V E G Fアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いと同定されない場合は、V E G Fアンタゴニストではない療法を選択することを含む、方法。

【請求項 16】

10

基準レベルが、患者集団における、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現の中央値レベルである、請求項 15に記載の方法。

【請求項 17】

患者から得た生体試料において、A l k 1、C D 3 4、C D 1 0 5、C D 1 4 4、C o l 4 a 1、D l 1 4、E F N B 2、E G F L 7、N G 2、N o t c h 1、N R P 1、N R P 2、R G S 5、S e m a 3 f、T S P 1、V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3、及びV I Mからなる群から選択される一以上の遺伝子の発現を検出することをさらに含む、請求項 15又は16に記載の方法。

【請求項 18】

(c) の療法が、抗腫瘍剤、化学療法剤、成長阻害剤、細胞傷害性薬物、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤である、請求項 15から17の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 19】

(d) の療法が、抗腫瘍剤、化学療法剤、成長阻害剤、細胞傷害性薬物、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤である、請求項 15から17の何れか一項に記載の方法。

【請求項 20】

血管新生障害を有する患者を同定するためのデータを収集する方法であって、

(a) 患者へのV E G Fアンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現を検出するステップ、および

30

(b) 前記C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現レベルを、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の基準レベルと比較するステップを含み、基準レベルに対する、生体試料中の前記C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現のレベルの増大によって、血管新生障害を有する患者が同定される、方法。

【請求項 21】

(c) 基準レベルに対する、生体試料中の前記C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現のレベルの増大が検出される場合に、前記患者の治療のためにV E G Fアンタゴニストを選択することをさらに含む、請求項 20に記載の方法。

40

【請求項 22】

基準レベルに対する、生体試料中の前記C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及びN i d 2の発現のレベルの変化が、アルゴリズム：

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

に従って、患者の試料に対するV D Vシグネチャースコア（V D V_i）を計算することによって決定され、

式中、n = 4であり、Z_{g = 1, i}、Z_{g = 2, i}、Z_{g = 3, i}、Z_{g = 4, i}が、

50

試料 i の各 C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 のそれぞれに対する発現値の標準化された z -スコアであり、

第 1 の定義された閾値より低い $V D V_i$ が、基準レベルに対する低下を示し、第 2 の定義された閾値を超える $V D V_i$ が、基準レベルに対する増大を示す、請求項 1 から 2 1 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 のそれぞれに対する発現値が、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 のそれぞれに対する $q R T-P C R$ の値である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

第 1 の定義された閾値が、 -4 から -0.5 であり、第 2 の定義された閾値が 0.5 から 4 である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

第 1 の定義された閾値が、 -4 から -1 であり、第 2 の定義された閾値が 1 から 4 である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

第 1 の定義された閾値が -4 から -1.5 であり、第 2 の定義された閾値が 1.5 から 4 である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

第 1 の定義された閾値が -4 から -2 であり、第 2 の定義された閾値が 2 から 4 である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 から 4 及び 6 から 2 7 の何れか一項に記載の方法に使用するためのキットであって、4 つ以上のポリヌクレオチドを含み、

4 つ以上のポリヌクレオチドは、患者から得た生体試料中の、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 の存在又は発現レベルの評価を可能にし、4 つ以上のポリヌクレオチドは、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 の相補体にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、キット。

【請求項 2 9】

請求項 1 から 3、5 から 2 2 及び 2 4 から 2 7 の何れか一項に記載の方法に使用するためのキットであって、4 つ以上の抗体又はその抗原結合断片を含み、

4 つ以上の抗体又はその抗原結合断片は、患者から得た生体試料中の、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 の存在又は発現レベルの評価を可能にし、4 つ以上の抗体又はその抗原結合断片は、C o l 4 a 2、E S M 1、L A M A 4、及び N i d 2 に特異的に結合する、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、V E G F アンタゴニスト、例えば抗 V E G F 抗体での治療の利益を享受する患者を同定するための方法を対象とする。

【背景技術】

【0002】

バイオマーカー（例えば血漿中の分泌タンパク質）の発現レベルを測定することは、例えば抗 V E G F 抗体などの V E G F アンタゴニストでの治療を含めた、特定の療法に応答する患者および患者集団を同定するのに有効な手段であり得る。

【0003】

どの患者がどの治療に応答するかを決定するため、および単剤として使用されようが他の薬剤と組み合わせられようが、V E G F アンタゴニスト療法を用いる患者にとって有効な治療レジメンにそうした決定を組み入れるための有効な手段が必要である。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストでの治療の利益を享受する患者を同定するための方法を提供する。これらの患者は、表1または表2に記載される遺伝子の発現レベルに基づいて同定される。

【0005】

したがって、本発明の一実施形態は、患者がVEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いかどうかを決定する方法であって、(a)患者へのVEGFアンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子の発現を検出すること、および(b)上記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを上記少なくとも1つの遺伝子の基準発現レベルと比較することを含み、基準レベルに対する、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現のレベルの変化によって、VEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者が同定される方法を提供する。

10

【0006】

本発明のさらなる実施形態は、患者に対するVEGFアンタゴニストの治療的有効性を最適化する方法であって、(a)患者へのVEGFアンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子の発現を検出すること、および(b)上記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを上記少なくとも1つの遺伝子の基準発現レベルと比較することを含み、基準レベルに対する、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現のレベルの変化によって、VEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者が同定される方法を提供する。

20

【0007】

上記の実施形態を参照すると、幾つかのさらなる実施形態では、患者は、VEGFアンタゴニストへの応答性について検査を受けた患者の集団に存在し、基準レベルは、患者集団における、上記少なくとも1つの遺伝子の発現の中央値レベルである。幾つかの実施形態では、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現のレベルの変化は、基準レベルに対して増大することである。幾つかの実施形態では、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現のレベルの変化は、基準レベルに対して低下することである。幾つかの実施形態では、患者から得た生体試料中の上記少なくとも1つの遺伝子は、mRNAを測定することによって検出される。幾つかの実施形態では、患者から得た生体試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現は、血漿タンパク質レベルを測定することによって検出される。幾つかの実施形態では、生体試料は腫瘍組織である。幾つかの実施形態では、方法は、患者の生体試料において、表1または表2に記載される少なくとも第2、第3、第4またはそれ以上の遺伝子の発現を検出することをさらに含む。幾つかの実施形態では、上記少なくとも1つの遺伝子は、Alk1、CD34、CD105、CD144、Col4a1、Col4a2、Dll4、EFNB2、EGFL7、ESM1、LAMA4、NG2、Nid2、Notch1、NRP1、NRP2、RGS5、Sema3f、TSP1、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3およびVIMからなる群から選択される。幾つかの実施形態では、VEGFアンタゴニストはベバシズマブなどの抗VEGF抗体である。幾つかの実施形態では、患者は血管新生障害を有する。幾つかの実施形態では、患者は、結腸直腸がん、乳がん、肺がん、神経膠芽細胞腫およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるがんを有する。

30

40

【0008】

また、上記の実施形態を参照すると、方法は、(c)基準レベルに対する、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現のレベルの変化が検出される場合に、患者の治療のためにVEGFアンタゴニストを選択することをさらに含むことができる。さらに方法は、(d)VEGFアンタゴニスト(例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体)を患者に投与することを含むことができる。

【0009】

本発明の別の実施形態は、療法が考慮される患者集団の特定の患者に対する療法を選択

50

するための方法であって、(a) 患者への V E G F アンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た生体試料において、表 1 または表 2 に記載される少なくとも 1 つの遺伝子の発現を検出すること、(b) 上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現のレベルを上記少なくとも 1 つの遺伝子の基準発現レベルと比較し、基準レベルに対する、患者の試料中の上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルの変化によって、V E G F アンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者が同定されること、および (c) 患者が、V E G F アンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いと同定される場合は、療法として V E G F アンタゴニストを選択すること、または (d) 患者が、V E G F アンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いと同定されない場合は、V E G F アンタゴニストではない療法を選択することを含む方法を提供する。

10

【0010】

幾つかの実施形態では、基準レベルは、患者集団における、上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現の中央値レベルである。幾つかの実施形態では、患者の試料中の上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現のレベルの変化は、基準レベルに対して増大することである。幾つかの実施形態では、患者の試料中の上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現のレベルの変化は、基準レベルに対して低下することである。幾つかの実施形態では、方法は、患者の生体試料において、表 1 または表 2 に記載される少なくとも第 2、第 3、第 4 またはそれ以上の遺伝子の発現を検出することをさらに含む。幾つかの実施形態では、(d) の療法は、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物およびそれらの組み合わせからなる群から選択される薬剤である。幾つかの実施形態では、方法は、(e) 患者が、V E G F アンタゴニストでの治療に応答する可能性が高いと同定される場合は、有効量の V E G F アンタゴニストを患者に投与することをさらに含む。幾つかの実施形態では、V E G F アンタゴニストはベバシズマブなどの抗 V E G F 抗体である。幾つかの実施形態では、方法は、有効量の少なくとも第 2 の薬剤を投与することをさらに含む。幾つかの実施形態では、第 2 の薬剤は、抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。

20

【0011】

本発明のさらなる実施形態は、V E G F アンタゴニストへの応答性を決定するためのバイオマーカーを同定する方法であって、(a) 患者への V E G F アンタゴニストの投与よりも前に患者から得た生体試料において、候補バイオマーカーの発現を検出すること、および (b) 候補バイオマーカーの発現を候補バイオマーカーの基準発現レベルと比較することを含み、基準レベルに対する、患者の試料中の候補バイオマーカーの発現のレベルの変化によって、V E G F アンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者のバイオマーカーとしての候補バイオマーカーが同定される方法を提供する。幾つかの実施形態では、基準レベルは、患者が V E G F アンタゴニストに反応する確度について検査を受けた患者集団における、上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現の中央値レベルである。幾つかの実施形態では、基準レベルは、前もって患者から得た試料中の上記少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルである。幾つかの実施形態では、患者は、V E G F アンタゴニストで以前に治療されており、現在、転移に見舞われている。幾つかの実施形態では、V E G F アンタゴニストはベバシズマブなどの抗 V E G F 抗体である。さらに方法は、(c) V E G F アンタゴニスト治療への応答性を決定するためのバイオマーカーとして使用するために、基準に対して発現のレベルが変化する候補バイオマーカーを選択することをさらに含むことができる。

30

40

【0012】

別の実施形態では、本発明は、患者の血管新生障害を診断するための方法であって、(a) 患者への V E G F アンタゴニストのいかなる投与よりも前に患者から得た試料において、表 1 もしくは表 2 に記載される少なくとも 1 つの遺伝子または上記の方法などの方法に従って同定されたバイオマーカーの発現レベルを検出するステップ、および (b) 上記少なくとも 1 つの遺伝子またはバイオマーカーの発現レベルを上記少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルと比較するステップを含み、基準レベルに対する、患者の試料中の上記少

50

なくとも1つの遺伝子の発現のレベルの変化によって、血管新生障害を有する患者が同定される方法を提供する。こうした方法は、(c)基準レベルに対する、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの変化が検出される場合に、患者の治療のためにVEGFアンタゴニストを選択することをさらに含むことができる。加えて、方法は、(d)VEGFアンタゴニストを患者に投与することをさらに含むことができる。加えて、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載のように、患者から試料を得るステップを含むことができる。さらに本明細書に記載の方法は、最適な治療レジメンを決定するために、本明細書に記載のように、がんを診断された患者について行うことができる。

【0013】

上記の実施形態のいずれかでは、基準レベルに対する、患者の試料中の上記少なくとも1つの遺伝子またはバイオマーカーの発現のレベルの変化は、アルゴリズム：

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

に従って、患者の試料に対するVDVシグネチャースコア(VDV_i)を計算することによって決定することができ、

式中、 $Z_{g=1,i}$ 、 $Z_{g=2,i}$ 、...、 $Z_{g=n,i}$ は、試料iの各遺伝子またはバイオマーカーg(g=1からg=n)に対する発現値の標準化されたzスコアであり、第1の定義された閾値より低いVDV_iは、基準レベルに対する低下を示し、第2の定義された閾値を超えるVDV_iは、基準レベルに対する増大を示す。幾つかの実施形態では、各遺伝子またはバイオマーカーg(g=1からg=n)に対する発現値は、各遺伝子g(g=1からg=n)に対するqRT-PCRの値である。幾つかの実施形態では、第1の定義された閾値は、-4から-0.5(例えば-4、-3.5、-3、-2.5、-2、-1.5、-1または-0.5)であり、第2の定義された閾値は、0.5から4(例えば0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5または4)である。幾つかの実施形態では、第1の定義された閾値は、-4から-1(例えば-4、-3.5、-3、-2.5、-2、-1.5または-1)であり、第2の定義された閾値は、1から4(例えば1、1.5、2、2.5、3、3.5または4)である。幾つかの実施形態では、第1の定義された閾値は、-4から-1.5(例えば-4、-3.5、-3、-2.5、-2または-1.5)であり、第2の定義された閾値は、1.5から4(例えば1.5、2、2.5、3、3.5または4)である。他の実施形態では、第1の定義された閾値は、-4から-2(例えば-4、-3.5、-3、-2.5または-2)であり、第2の定義された閾値は、2から4(例えば2、2.5、3、3.5または4)である。

【0014】

以下の発明を実施するための形態によって、これらおよび他の実施形態をさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】抗VEGFでmAb治療後72時間、7日および14日での、マウス腓神経内分泌腫瘍(PNET)細胞の微小血管密度(MVD)および増殖指数の決定についての組織学的解析およびグラフ解析を示す図である。抗VEGF治療後の様々な時間でのMECA-32染色による腫瘍血管密度の組織学的解析(左)およびKi67による増殖指数(右)の代表的な画像である(20X拡大率)。いずれの場合にも4~6個の腫瘍からの定量化を、平均+/-SEMとして下の棒グラフに示す。*P<0.05、NS=有意でない。

【図1B】RIP-TβAgモデルにおける、腫瘍量への抗VEGFの効果のキネティクスを示すグラフである。抗VEGFで治療したマウスの腫瘍量(赤色のバー)は、研究の21日ではコントロールで治療したマウス(黒色のバー)より有意に低い、14日ではそうではない。*p<0.05(t検定)、n=5~8マウス/群/時点。

【図1C】VEGFアンタゴニストでの治療に应答した、VDV遺伝子の発現レベルの変化を示すグラフである。遺伝子（赤線として示す）の発現レベルは、全遺伝子（灰色のヒストグラム）と比べて有意に低下する。赤の破線は、これらの選択された遺伝子の平均変化を示す。黒色の破線は、残りの遺伝子に対する平均フォールドチェンジを示す。

【図1D】qPCRで評価した場合の、VEGFアンタゴニストでの治療に应答した、遺伝子の垂群における遺伝子発現レベルの変化を示すグラフである。バーは、3つの独立した生物学的反復の発現の平均を表す。エラーバー = $\log_2$ 標準偏差。

【図2A】確立された皮下乳がん腫瘍モデル（MDA-MB-231）における、VEGF遮断に应答した、VDV遺伝子の変化を示すグラフのセットである。腫瘍試料は、抗VEGFまたはコントロール治療の24時間後に収集した。VDVシグネチャーの遺伝子（赤線）は、間質において全遺伝子（灰色のヒストグラムとして示す）と比べて有意に低下するが（上のグラフ、マウスチップ、 $p < 0.0001$ ）、腫瘍細胞ではそうではない（下のグラフ、ヒトチップ、有意差なし）。個々のproxVDV転写産物のフォールドチェンジは、マイクロアレイ密度プロット中にブラックレターで注釈をつける。各治療コホートについて $n = 5 \sim 10$ 例。

10

【図2B】同所性の（頭蓋内）U87神経膠芽細胞腫モデルにおける、VEGF遮断に应答した、VDV遺伝子の変化を示すグラフのセットである。腫瘍試料は、抗VEGFまたはコントロール治療の13～42日後に収集した。VDVシグネチャーの遺伝子（赤線）は、全遺伝子（灰色のヒストグラムとして示す）と比べて、間質において有意に低下するが（上のグラフ、マウスチップ、 $p < 0.0105$ ）、腫瘍細胞ではそうではない（下のグラフ、ヒトチップ、有意差なし）。個々のproxVDV転写産物のフォールドチェンジは、マイクロアレイ密度プロット中にブラックレターで注釈をつける。各治療コホートについて $n = 5 \sim 10$ 例。

20

【図2C】皮膚創傷への抗VEGF局所適用の際にダウンレギュレーションが観察され（上のグラフ、 $p = 0.0125$ ）、組換えVEGFを12時間適用したときに、逆のアップレギュレーションが観察される（ $p < 0.0001$ ）ことを示すグラフのセットである。個々のproxVDV転写産物のフォールドチェンジは、ブラックレターで注釈をつける。

【図2D】VEGFシグナル伝達がVDV遺伝子の発現を誘導することを示す、組織学的データおよびグラフを提供する図である。VDV遺伝子シグネチャーの抗VEGFダウンレギュレーション（右、上のグラフ、 $p < 0.0001$ ）とは対照的に、抗D114治療は、MDA-MB-231モデルにおいて、大部分のVDV遺伝子のアップレギュレーションを48時間後に引き起こし（右、下のグラフ、 $p < 0.0001$ ）、これは、コントロール治療と比較した場合の、CD31/PECAMに対する免疫蛍光染色による過剰血管新生顕性と一致する（左）。個々のproxVDV転写産物のフォールドチェンジは、ブラックレターで注釈をつける。各治療コホートについて $n = 5 \sim 10$ 例。

30

【図3】大部分のproxVDV遺伝子は、インビトロでrVEGFによって明らかにアップレギュレーションされないことを示すヒートマップである。HUVECのrVEGF刺激の遺伝子発現解析である。H（時間）は、rVEGF刺激の長さを示す。ここに示すヒートマップは、選択されたVDVプローブに対するマイクロアレイ発現解析の結果を強調する。暗青色は、最大の相対的ダウンレギュレーションを表し、暗赤色は、最大度の転写産物のアップレギュレーションを表す。ProxVDV遺伝子は、インビトロでrVEGFによって顕著に調節されない。しかし、まだ特徴付けられていないVDV遺伝子的小集団（EHD3、PCHD17およびTHBD）は、HUVECのrVEGF刺激の際に強くアップレギュレーションされるように思われる。各時点の発現データは、3つの独立した反復に由来する。

40

【図4A】proxVDV遺伝子のESM1は、腫瘍関連血管構造で特異的に発現するインビボでのVEGFの標的であることを示す、インサイツハイブリダイゼーション（ISH）の画像である。上部の写真（左および右）：センスオリゴを用いたISHの陰性コントロールは、意味のあるバックグラウンド（非特異的染色）を示さない。下部の写真は、

50

抗VEGFまたはコントロールで治療した動物由来のHM7腫瘍切片における、ESM1 mRNAの発現（アンチセンスオリゴを用いたISHによる）を示す。黒色の矢印は、コントロールで治療した腫瘍のスライド（下部の写真の左のスライド）において、ESM1 mRNAの血管発現が強い幾つかの領域（褐色染色）を示す。それとは対照的に、ESM1は、抗VEGFで治療した動物由来の腫瘍スライドにおいてほとんど検出不可能であった（下部の写真、右）。すべてスライドはまた、ヘマトキシリンエオシン（H&E）で対比染色した。

【図4B】コントロールおよび抗VEGFで治療した動物由来の腫瘍スライドにおける、ESM1（ISH）染色の定量化を示すグラフである。n = 10。

【図4C】コントロールおよび抗VEGFで治療した動物由来の腫瘍スライドにおける、MECA32（PLVAP）染色の定量化を示すグラフである。n = 10。

【図4D】MDA-MB-231腫瘍におけるVEGF経路阻害剤のインビボ活性に関する証拠を示す、組織学的画像セットおよび対応する定量的なグラフである。抗VEGF mAb、スニチニブまたはアキシチニブのインビボでの治療は、治療後72時間で腫瘍のMVDを効率的に低減する。MDA-MB-231腫瘍を担持する動物は、材料および方法で示すように72時間治療し、次いで腫瘍を収集して、組織学的解析および遺伝子発現解析を行った。上部の画像：MECA-32（PLVAP）およびCD31染色（赤色）による腫瘍血管密度。核は、DAPI（青色）で対比染色した。画像は、20X拡大率で撮った。下部のグラフは、各治療群の8つの腫瘍からの定量化（平均+/-SEMとして示す）を示す。* P < 0.05。

【図4E】インビボでのVEGF遮断またはVEGFR-2下流のシグナル伝達の阻害は、proxVDV遺伝子の一貫性があるダウンレギュレーションを誘導することを示すグラフのセットである。VEGF阻害剤およびVEGFR-2阻害剤（スニチニブおよびアキシチニブ）で治療してから8時間（下部パネル）、16時間（中央パネル）または72時間（上部パネル）後に収集した400mm³ MDA-MB-231異種移植腫瘍における遺伝子発現のqRT-PCR解析である。値は、コントロール治療の平均遺伝子発現と比較したときの、VEGF/VEGFR-2阻害剤によって誘導される相対的遺伝子発現における平均log₂フォールドチェンジを表す。E-cadherinおよびCD45などの非血管マーカーは、これらの阻害剤に反応して有意に変化しない。下部パネル（治療後8時間）は、アキシチニブおよびスニチニブが、この特定の時点で明らかな活性がなかったもので、抗VEGF治療のみを示す。遺伝子発現データは、各治療について8つの生物学的反復の平均を表す。エラーバーは標準偏差を表す。

【図5A】複数のVEGF経路阻害剤による一貫性があるproxVDVダウンレギュレーションを示すグラフである。VEGF阻害剤およびVEGFR-2阻害剤（スニチニブおよびアキシチニブ）で治療してから8時間、16時間または72時間後に収集したMDA-MB-231異種移植腫瘍における遺伝子発現解析である。値は、コントロール治療と比較した、VEGF/VEGFR-2阻害剤によって誘導される相対的遺伝子発現における、log₂フォールドチェンジの平均を表す。遺伝子発現データは、各治療について8つの生物学的反復のlog₂平均を表す。エラーバーは標準偏差を表す。

【図5B】ブタクサまたは抗VEGF mAbで治療したMDA-MB-231異種移植腫瘍から選別した内皮細胞における、qRT-PCRによるproxVDV遺伝子の発現の定量化を示すグラフである。値は、3反復のlog₂フォールドチェンジの平均を表す。エラーバーは標準偏差を表す。

【図6】新たにFACSで単離されたTAEC対GFPMDA-MB-231腫瘍細胞におけるVDV転写産物のエキスビボでの富化発現解析による、腫瘍関連内皮細胞（TAEC）でのVDVマーカーの富化を示すグラフである。TAEC対腫瘍細胞の相対的遺伝子発現を、選択した遺伝子のqRT-PCRによって測定した。検査したすべてVDV遺伝子は、TAECで非常に富化していた（25~200倍）。対照的に、Zeb1 mRNAの発現（上皮マーカー）は、TAECで低下し、腫瘍細胞で富化していた。値は、TAECを腫瘍細胞と比較したときの、相対的log₂フォールド遺伝子富化の平均を表す

10

20

30

40

50

。T A E C細胞は、C D 3 1陽性、C D 4 5陰性およびG F P陰性細胞として選別した。腫瘍細胞はG F P陽性で選別した。遺伝子発現データは、各F A C Sソーティング実験についてプールされていた6つの腫瘍の平均を表す。q R T P C Rは3重で行った。エラーバーは標準偏差を表す。

【図7】19人の炎症性乳がん患者由来の生検試料における遺伝子発現の変化（治療後対治療前）を示すグラフである。V D Vシグネチャーの遺伝子（赤線）は、全遺伝子（灰色のヒストグラム）と比べて有意に低下する。 $p = 0.0275$ 。

【図8A】N O 1 6 9 6 6試験での利用可能な治療前のm R N Aを有する103人の結腸直腸がん患者の無増悪生存（上部）および全生存（下部）を示すグラフのセットである。

【図8B】血管新生F l u i d i g m q R T - P C Rチップを用いて、22種のV D V遺伝子の遺伝子発現を定量化するための実験概要の概略図である。

【図8C】結腸がん試料における22種のV D V遺伝子の発現レベルの相関を示すグラフである。

【図8D】22種の遺伝子のV D Vシグネチャーが、進行した結腸直腸がんの患者に対するベバシズマブ（b e v）治療の効果を層別化することを示すグラフのセットである。X E L O X（黒色）またはX E L O X + ベバシズマブ（M u l l e n ら、C e l l . 1 4 7（3）：565～576、2011）で治療した「V D V - 高」患者（実線）対「V D V - 低」患者（破線）の無増悪生存（上部）または全生存（下部）を示す。P F S（上部）のV D V遺伝子セットの効果は発現レベルで層別化し（相互作用 $p = 0.036$ ）、O S（下部）のV D V遺伝子セットの効果は発現レベルで層別化した（相互作用 $p = 0.37$ ）。

【図9A】完全なV D Vシグネチャー「V D V」（x軸）と保存の臨床材料を調べるのに使用された22種の遺伝子の代表的なサブセット「V D V - 22」（y軸）の間の一致を検証するグラフのセットである。普及試料セットは、転移性のファーストライン試験設定（N O 1 6 9 6 6に匹敵する）にふさわしいと思われる患者由来の保存試料と共に示される。保存試料は、I l l u m i n a D A S Lビーズアレイで全ゲノムのR N A発現について評価した。N S C L C = 非小細胞肺癌、B R = 乳房、C R C = 結腸直腸がん。

【図9B】V E G F - A発現レベルによる、N O 1 6 9 6 6患者の層別化を示すグラフのセットである。P F S（上部）、相互作用 $p = 0.76$ 、およびO S（下部）、相互作用 $p = 0.33$ 。

【図9C】C D 3 1の発現レベルによる、N O 1 6 9 6 6患者の層別化を示すグラフのセットである。P F S（上部）、相互作用 $p = 0.15$ 、およびO S（下部）、相互作用 $p = 0.99$ 。

【発明を実施するための形態】

【0016】

I. 緒言

本発明は、V E G Fアンタゴニスト、例えば抗V E G F抗体での治療に感受性または応答性の患者をモニタリングおよび／または同定するための方法および組成物を提供する。本発明は、V E G Fアンタゴニスト（抗V E G F抗体など）で治療する前の、表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの決定が、V E G Fアンタゴニスト、例えば抗V E G F抗体での治療に感受性または応答性の患者を同定するのに有用であるという発見に基づく。場合によっては、次いで、V E G Fアンタゴニスト療法を患者のために選択することができ、さらに、V E G Fアンタゴニスト療法を場合によっては患者に施すことができる。

【0017】

II. 定義

用語「バイオマーカー」および「マーカー」は本明細書で互換的に使用されて、D N A系、R N A系、タンパク質系、炭水化合物系または糖脂質系の分子マーカーを指す。対象または患者の試料中のそれらの発現または存在は、標準的な方法（または本明細書に開示

される方法)によって検出することができ、V E G Fアンタゴニストに対する哺乳類対象の応答性または感受性をモニタリングするのに有用である。そうしたバイオマーカーには、これらに限定されないが、表1および表2に記載される遺伝子が含まれる。そうしたバイオマーカーの発現は、V E G Fアンタゴニストに感受性または応答性の患者から得た試料において、(例えば、V E G Fアンタゴニストへの応答性について検査を受けた患者の群/集団由来の試料中のバイオマーカーの中央発現レベル; 先の時点で前もって個体から得た試料中のそのレベル; または原発腫瘍状態でV E G Fアンタゴニスト(抗V E G F抗体など)を用いる前治療を受け、現在転移に見舞われている可能性がある患者由来の試料中のそのレベルを含めた)基準レベルより高いまたはより低いと決定することができる。上記少なくとも1つの遺伝子、例えば表1および表2に記載される遺伝子などの基準発現レベルより大きいまたはその基準発現レベル未満の発現レベルを有する個体は、V E G Fアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い対象/患者として同定することができる。例えば、基準レベル(上記の中央値レベルなど)と比べて(すなわち、より高いまたはより低い)最大50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%の遺伝子発現レベルを示すそうした対象/患者は、抗V E G F抗体などのV E G Fアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い対象/患者として同定することができる。

10

【0018】

用語「試料」および「生体試料」は互換的に使用されて、体液、体組織(例えば腫瘍組織)、細胞または他の供給源を含めた、個体から得た任意の生体試料を指す。体液は、例えばリンパ液、血清、新鮮全血、末梢血単核球、凍結全血、(新鮮または凍結を含めた)血漿、尿、唾液、精液、滑液および髄液である。試料には、胸部組織、腎組織、結腸組織、脳組織、筋組織、滑液膜組織、皮膚、毛包、骨髄および腫瘍組織も含まれる。組織生検物および体液を哺乳動物から得る方法は当技術分野で周知である。

20

【0019】

V E G Fアンタゴニストでの治療に対する患者の「有効な応答」または患者の「応答性」もしくは「感受性」は、抗V E G F抗体などのV E G Fアンタゴニストでの治療由来のまたはその治療の結果としての血管新生障害の危険性があるか、またはその障害を患っている患者にもたらされる、臨床的または治療的利益を指す。そうした利益には、このアンタゴニストでの治療由来のまたはその治療の結果としての、患者の細胞応答もしくは生物学的応答、完全奏効、部分奏効、安定(進行または再発がない)または晩期再発を伴う応答が含まれる。例えば、有効な応答は、表1または表2に記載されるバイオマーカーの1つまたは複数を発現すると診断された患者において、それらのバイオマーカーの1つまたは複数を発現しない患者に対する、腫瘍サイズの低減または無増悪生存であり得る。遺伝子バイオマーカー(複数可)の発現は、そうした有効な応答を効率的にまたは高感度で予測する。

30

【0020】

本明細書で使用する「アンタゴニスト」は、それらが結合する分子の生物活性を阻害または低減する化合物または薬剤を指す。アンタゴニストには、V E G Fに結合し、場合によっては別の分子にコンジュゲートまたは融合した、抗体、合成または天然配列のペプチド、イムノアドヘシンおよび小分子アンタゴニストが含まれる。「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活性を阻害または低減する抗体である。

40

【0021】

本明細書で使用する場合、「アゴニスト抗体」は、目的のポリペプチドの機能活性の少なくとも1つを部分的または完全に模倣する抗体である。

【0022】

本明細書では、用語「抗体」は広い意味で使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体(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断片を、特にカバーする。

50

【0023】

「単離」抗体は、その自然環境の成分から同定され、分離および／または回収された抗体である。その自然環境の夾雑成分とは、その抗体に関する研究、診断または治療的使用を妨げるであろう物質であり、酵素、ホルモンおよび他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含み得る。幾つかの実施形態では、抗体は、（１）例えばローリー法によって測定されたときに抗体の９５重量％を超えるまで、幾つかの実施形態では９９重量％を超えるまで、（２）例えばスピニングカップシーケネーター（spinning cup sequenator）を使用してN末端アミノ酸配列もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るのに十分な程度まで、または（３）例えばクマシーブルー染色もしくは銀染色を使用して、還元もしくは非低減条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで、精製される。単離抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれ、これは、抗体の自然環境の少なくとも１つの成分が存在しないためである。しかし通常は、単離抗体は、少なくとも１つの精製ステップによって調製される。

10

【0024】

「天然抗体」は、通常、２つの同一の軽（L）鎖および２つの同一の重（H）鎖からなる、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各軽鎖は１つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変動する。各重鎖と軽鎖は、規則的間隔の鎖内ジスルフィド結合も有する。各重鎖は一端に可変ドメイン（V_H）を有し、その後に幾つかの定常ドメインが続く。各軽鎖は一端に可変ドメイン（V_L）を、そのもう一方の端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第１定常ドメインと整列しており、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖および重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

20

【0025】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖の可変ドメインは「V_H」と称することができる。軽鎖の可変ドメインは「V_L」と称することができる。これらのドメインは、一般に抗体の最も可変な部分であり、抗原結合部位を含む。

【0026】

用語「可変」は、可変ドメインのある部分が、抗体間で配列が広範に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合および特異性において使用されるという事実を指す。しかし、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等に分布しているわけではない。可変性は、軽鎖と重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域（HVR）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た部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインは、βシート構造に連結し、時としてβシート構造の一部を形成するループを形成する３つのHVRにより連結された、大部分がβシート配置の形をとる、４つのFR領域をそれぞれ含む。各鎖のHVRは、FR領域に近接して結合され、他の鎖のHVRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第５版、National Institute of Health、Bethesda、MD（１９９１）を参照されたい）。定常ドメインは抗原への抗体の結合に直接的に関与しないが、抗体依存性細胞傷害での抗体の関与など、様々なエフェクター機能を示す。

30

40

【0027】

任意の脊椎動物種由来の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる、明らかに異なる２つのタイプのうちの１つに割り当てることができる。

【0028】

抗体（免疫グロブリン）は、その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて種々のクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンの５つの主要なクラス：IgA、IgD

50

、I g E、I g G および I g M が存在し、これらの幾つかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁ および I g A₂ にさらに分類することができる。免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの種々のクラスのサブユニット構造および 3 次元配置は周知であり、一般に、例えば A b b a s ら、C e l l u l a r a n d M o l . I m m u n o l o g y、第 4 版（W. B. S a u n d e r s , C o . , 2 0 0 0）に記載されている。抗体は、1 種または複数の他のタンパク質またはペプチドとの抗体の共有または非共有結合によって形成される、大きな融合分子の一部でもよい。

【0029】

用語「完全長抗体」「インタクト抗体」および「全抗体」は、本明細書で互換的に使用され、以下で定義される抗体断片ではなく、その実質的にインタクトな形態の抗体を指す。この用語は、F c 領域を含む重鎖を有する抗体を特に指す。

【0030】

本明細書において「ネイキッド抗体」は、細胞傷害性部分または放射標識にコンジュゲートされていない抗体である。

【0031】

「抗体断片」は、インタクト抗体の一部からなり、好ましくはその抗原結合領域からなる。抗体断片の例としては、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片および F v 断片；ダイアボディ；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0032】

抗体のパパイン消化によって、「F a b」断片と呼ばれる 2 つの同一の抗原結合性断片がもたらされ、それぞれ、単一の抗原結合部位と、その名前が容易に結晶化するその能力を反映する残りの「F c」断片とを有する。ペプシン処理によって、2 つの抗原結合部位を有し、抗原となおも架橋結合することができる、F (a b ')₂ 断片が得られる。

【0033】

「F v」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一実施形態では、2 本鎖 F v 種は、強い非共有結合の、1 つの重鎖可変ドメインと 1 つの軽鎖可変ドメインとの二量体から成る。単鎖 F v (s c F v) 種では、軽鎖および重鎖が 2 本鎖 F v 種におけるものに類似した「二量体」構造中で会合することができるように、1 つの重鎖可変ドメインと 1 つの軽鎖可変ドメインとが可動性のペプチドリinker によって共有結合することができる。各可変ドメインの 3 つの H V R が相互作用して、V H - V L 二量体の表面上の抗原結合部位を定めるのはこの配置においてである。集散的に、6 つの H V R が抗原結合特異性を抗体に与える。しかし、単一の可変ドメイン（または抗原に対して特異的な 3 つの H V R のみを含む F v の半分）でさえ、完全な結合部位よりも低い親和性においてではあるが、抗原を認識しかつ抗原に結合する能力を有する。

【0034】

F a b 断片は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第 1 定常ドメイン（C H 1）も含む。F a b ' 断片は、抗体ヒンジ領域からの 1 つまたは複数のシステインを含む重鎖の C H 1 ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加する点で F a b 断片とは異なる。F a b ' - S H は、本明細書では、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有する F a b ' の名称である。F (a b ')₂ 抗体断片は、元々は、その間にヒンジシステインを有する F a b ' 断片対として生成された。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0035】

「単鎖 F v」または「s c F v」抗体断片は、抗体の V H ドメインおよび V L ドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、s c F v ポリペプチドは、s c F v が抗原の結合に対して所望の構造を形成するのを可能にするポリペプチドリinker を、V H ドメインと V L ドメインの間にさらに含む。s c F v の総説とし

10

20

30

40

50

ては、例えば、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、Rosenburg and Mooreら編（Springer-Verlag、New York：1994）、269～315頁を参照されたい。

【0036】

用語「ダイアボディ」は、同一ポリペプチド鎖（VH-VL）内で軽鎖可変ドメイン（VL）に連結された重鎖可変ドメイン（VH）を含む、2つの抗原結合部位を有する抗体断片を指す。2つのドメイン間の対形成を同一鎖で可能にするには短すぎるリンカーを使用して、これらのドメインを別の鎖の相補的なドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を作出する。ダイアボディは二価でもよいし、二重特異性でもよい。ダイアボディは、例えば、EP404,097；WO1993/01161；Hudsonら、Nat. Med. 9：129～134（2003）；およびHollingerら、PNAS USA 90：6444～6448（1993）にさらに十分に説明されている。トリアボディおよびテトラボディもまた、Hudsonら、Nat. Med. 9：129～134（2003）に記載されている。

【0037】

本明細書で使用する用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体集団由来の抗体を指す。すなわち、少量で存在し得る起こり得る突然変異、例えば自然発生的な突然変異を除いて、集団を構成する個々の抗体が同一である。したがって、修飾語句「モノクローナル」は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の特質を示す。ある種の実施形態では、そうしたモノクローナル抗体は、典型的には、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含む方法によって得られた標的結合ポリペプチド配列を含有する抗体を含む。例えば、選択方法は、ハイブリドーマクローン、ファージクローンまたは組換えDNAクロンのプールなどの複数のクローンから唯一のクローンを選択することであり得る。選択された標的結合配列は、例えば標的に対する親和性を改善する、標的結合配列をヒト化する、細胞培養でのその産生を改善する、インビボでのその免疫原性を低減する、多重特異性抗体を作出するなどのためにさらに改変することができること、および改変された標的結合配列を含む抗体も本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体の調製とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体調製物は、他の免疫グロブリンの混入が典型的にはないという点において有利である。

【0038】

修飾語句「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られたという抗体の特質を示し、任意の特定の方法によって抗体を産生することを必要とすると解釈されるべきでない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、以下を含めた種々の技法によって作製することができる。例えば、ハイブリドーマ法（例えば、KohlerおよびMilstein、Nature、256：495～97（1975）；Honjoら、Hybridoma、14（3）：253～260（1995）、Harlowら、Antibodies：A Laboratory Manual、（Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版 1988）；Hammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563～681（Elsevier、N. Y.、1981））、組換えDNA法（例えば米国特許第4,816,567号を参照されたい）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clacksonら、Nature、352：624～628（1991）；Marksら、J. Mol. Biol. 222：581～597（1992）；Sidhuら、J. Mol. Biol. 338（2）：299～310（2004）；Leeら、J. Mol. Biol. 340（5）：1073～1093（2004）；Fellouse、PNAS USA 101（34）：12467～12

472 (2004) ; および Lee ら、J. Immunol. Methods 284 (1-2) : 119~132 (2004) を参照されたい)、およびヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座または遺伝子の一部またはすべてを有するヒトまたはヒト様抗体を動物で産生するための技術 (例えば、WO1998/24893 ; WO1996/34096 ; WO1996/33735 ; WO1991/10741 ; Jakobovits ら、PNAS USA 90 : 2551 (1993) ; Jakobovits ら、Nature 362 : 255~58 (1993) ; Bruggemann ら、Year in Immunol. 7 : 33 (1993) ; 米国特許第5, 545, 807号 ; 第5, 545, 806号 ; 第5, 569, 825号 ; 第5, 625, 126号 ; 第5, 633, 425号 ; および第5, 661, 016号 ; Marks ら、Bio/Technology 10 : 779~783 (1992) ; Lonberg ら、Nature 368 : 856~859 (1994) ; Morrison、Nature 368 : 812~813 (1994) ; Fishwild ら、Nature Biotechnol. 14 : 845~851 (1996) ; Neuberger、Nature Biotechnol. 14 : 826 (1996) ; ならびに Lonberg および Huszar、Intern. Rev. Immunol. 13 : 65~93 (1995) を参照されたい)。

10

【0039】

本明細書では、モノクローナル抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖 (複数可) の残部が、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同な「キメラ」抗体、ならびに所望の生物活性を示す限りそうした抗体の断片を、特に含む (例えば米国特許第4, 816, 567号および Morrison ら、PNAS USA 81 : 6851~6855 (1984))。キメラ抗体には、抗体の抗原結合領域が、例えば目的の抗原でマカクザルを免疫することによって産生された抗体に由来する、PRIMATIZED (登録商標) 抗体が含まれる。

20

【0040】

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に由来する最小の配列を含むキメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、レシピエントのHVRからの残基が、マウス、ラット、ウサギまたは所望の特異性、親和性および／もしくは能力を有する非ヒト霊長類などの非ヒト種 (ドナー抗体) のHVRからの残基に置き換えられたヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられる。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に見られない残基を含むことができる。こうした修飾を行って、抗体の性能をさらに改良することができる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、高頻度可変ループのすべてもしくは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべてもしくは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、場合によっては、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである、免疫グロブリンの定常領域 (Fc) の少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、例えば、Jones ら、Nature 321 : 522~525 (1986) ; Riechmann ら、Nature 332 : 323~329 (1988) ; および Presta、Curr. Op. Struct. Biol. 2 : 593~596 (1992) を参照されたい。例えば、Vaswani および Hamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1 : 105~115 (1998) ; Harris、Biochem. Soc. Transactions 23 : 1035~1038 (1995) ; Hurler および Gross、Curr. Op. Biotech. 5 : 428~433 (1994) ; および米国特許第6, 982, 321号および第7, 087, 409号も参照されたい。

30

40

【0041】

50

「ヒト抗体」は、ヒトで産生された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有する抗体、および／または本明細書で開示されるようなヒト抗体を作製するための技法のうちのいずれかを使用して作製された抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒトの抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含めた当技術分野で既知の様々な技法を使用して産生することができる。HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、227:381(1991)；Marksら、J. Mol. Biol.、222:581(1991)。Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss、77頁(1985)；Boernerら、J. Immunol.、147(1):86～95(1991)に記載されている方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。van Dijkおよびvan de Winkel、Curr. Opin. Pharmacol.、5:368～74(2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原暴露にตอบสนองしてそうした抗体を産生するように改変されているが、その内在性の遺伝子座は無能にされているトランスジェニック動物、例えば免疫化されたゼノマウスに抗原を投与することによって調製することができる(XENOMOUSE(商標)技術に関しては、例えば米国特許第6,075,181号および第6,150,584号を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体に関しては、例えばLiら、PNAS USA、103:3557～3562(2006)も参照されたい。

【0042】

本明細書で使用する場合、用語「高頻度可変領域」、「HVR」または「HV」は、配列において高頻度可変であり、かつ／または構造的に定まったループを形成する、抗体可変ドメイン領域を指す。一般に、抗体は6つのHVRを含み、VHに3つ(H1、H2、H3)およびVLに3つ(L1、L2、L3)である。天然抗体では、H3およびL3は、6つのHVRのうちで最大の多様性を示し、特にH3は、優れた特異性を抗体に与える際に独特の役割を果たすと考えられている。例えば、Xuら、Immunity 13:37～45(2000)；JohnsonおよびWu、Methods in Molecular Biology 248:1～25(Lo編、Human Press、Totowa、NJ、2003)を参照されたい。実際、重鎖のみからなる、天然に存在するラクダ科の抗体は、軽鎖がない状態で機能的かつ安定である。例えば、Hamers-Castermanら、Nature 363:446～448(1993)およびSheriffら、Nature Struct. Biol. 3:733～736(1996)を参照されたい。

【0043】

幾つかのHVRの描写が使用されており、それらは本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)であるHVRは、配列可変性に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991))。Chothiaは、代わりに、構造的なループの位置に言及している(ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol. 196:901～917(1987))。AbM HVRは、KabatのCDRとChothiaの構造的なループとの間の折衷に相当し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されている。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の解析に基づく。これらのHVRのそれぞれに由来する残基を以下に示す。

ループ Kabat AbM Chothia 接触

L1 L24-L34 L24-L34 L26-L32 L30-L36

L2 L50-L56 L50-L56 L50-L52 L46-L55

L3 L89-L97 L89-L97 L91-L96 L89-L96

H1 H31-H35B H26-H35B H26-H3 H30-H35B (Kabatの番号付け)

H1 H31-H35 H26-H35 H26-H32 H30-H35 (Chothiaの番号付け)

H2 H50-H65 H50-H58 H53-H55 H47-H58

H3 H95-H102 H95-H102 H96-H101 H93-H101

【0044】

HVRは、以下のような「拡大HVR」を含むことができる：VLの24～36または24～34（L1）、46～56または50～56（L2）および89～97または89～96（L3）、ならびにVHの26～35（H1）、50～65または49～65（H2）および93～102、94～102または95～102（H3）。可変ドメイン残基は、これらの拡大HVRのそれぞれを定めることを目的として、Kabatra、上記、に従って番号付けされる。

10

【0045】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書に定義されるHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0046】

表現「Kabataの可変ドメイン残基の番号付け」または「Kabataのアミノ酸位置の番号付け」およびそれらの変形は、Kabatra、上記、における、抗体の編集の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインについて使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用すると、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはHVRの短縮または可変ドメインのFRもしくはHVRへの挿入に相当する、より少ないまたはさらなるアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後ろに単一アミノ酸の挿入（Kabataによる残基52a）、および重鎖FRの残基82の後ろに挿入された残基（例えば、Kabataによる残基82a、82bおよび82c）を含み得る。Kabataの残基番号付けは、「標準的」Kabata番号付け配列と、抗体配列の相同領域でアライメントすることによって、所与の抗体について決定することができる。

20

【0047】

「親和性成熟」抗体は、これらの1つまたは複数のHVRに1つまたは複数の改変を有し、こうした改変が、それらの改変（複数可）を保有しない親抗体と比較して抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす抗体である。一実施形態では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル濃度さらにはピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野で既知の手順によって産生される。例えば、Marksら、Bio/Technology 10:779～783（1992）は、VHドメインおよびVLドメインのシャッフリングによる親和性熟成を記載している。HVRおよび／またはフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、例えば、Barbasら、Proc Natl Acad Sci USA 91:3809～3813（1994）；Schierら、Gene 169:147～155（1995）；Yeltonら、J. Immunol. 155:1994～2004（1995）；Jacksonら、J. Immunol. 154（7）:3310～9（1995）；およびHawkinsら、J. Mol. Biol. 226:889～896（1992）によって記載されている。

30

【0048】

「成長阻害性」抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を阻止または低減する抗体である。

40

【0049】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞の断片化および／または（アポトーシス小体と呼ばれる）膜小胞の形成などの標準的なアポトーシスアッセイによって決定されるようなプログラム細胞死を誘導する抗体である。

【0050】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列Fc領域またはアミノ酸配列変異型Fc領域）に起因し得る生物活性を指し、抗体のアイソタイプによって異なる。

50

抗体のエフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えばB細胞受容体）のダウンレギュレーションならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0051】

本明細書での用語「Fc領域」は、天然配列Fc領域および変異型Fc領域を含めた、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される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界部位は変動する可能性が高いが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、位置Cys226またはPro230のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン（EU番号付けシステムによれば残基447）は、例えば、抗体の産生もしくは精製の間に、または抗体の重鎖をコードする核酸を組換えで操作することによって、除去することができる。したがって、インタクトな抗体の組成物は、すべてのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団、およびK447残基を有する抗体とK447残基を有さない抗体の混合物を有する抗体集団を含むことができる。

10

【0052】

本明細書で別段指示がない限り、免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、Kabattら、上記、のEUインデックスの番号付けである。「KabattのEUインデックス」は、ヒトIgG1EU抗体の残基番号付けを指す。

【0053】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q結合、CDC、Fc-受容体結合、ADCC、食作用、細胞表面受容体（例えばB細胞受容体、BCR）のダウンレギュレーションなどが挙げられる。そうしたエフェクター機能は、一般に、Fc領域を結合ドメイン（例えば抗体可変ドメイン）と組み合わせる必要があり、例えば本明細書の定義で開示されるような様々なアッセイを使用して評価することができる。

20

【0054】

「天然配列Fc領域」は、自然界に見られるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域には、天然配列ヒトIgG1Fc領域（非AアロタイプおよびAアロタイプ）、天然配列ヒトIgG2Fc領域、天然配列ヒトIgG3Fc領域および天然配列ヒトIgG4Fc領域、ならびに天然に存在するそれらの変異型が含まれる。

30

【0055】

「変異型Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸の修飾、好ましくは1つまたは複数のアミノ酸置換（複数可）によって天然配列Fc領域のアミノ酸配列と異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異型Fc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域に約1から約10のアミノ酸置換、好ましくは約1から約5のアミノ酸置換を有する。本明細書の変異型Fc領域は、好ましくは、天然配列Fc領域および／または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の相同性、最も好ましくは、それらと約90%の相同性、より好ましくは、それらと約95%の相同性を保有する。

40

【0056】

用語「Fc領域含有抗体」は、Fc領域を含む抗体を指す。Fc領域のC末端リジン（EU番号付けシステムによれば残基447）は、例えば抗体の精製の間に、または抗体をコードする核酸を組換えで操作することによって、除去することができる。したがって、本発明によるFc領域を有する抗体を含む組成物は、K447を有する抗体、すべてのK447が除去された抗体、またはK447残基を有する抗体とK447残基を有さない抗体との混合物を含むことができる。

【0057】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。幾

50

つかの実施形態では、FcRは、天然ヒトFcRである。幾つかの実施形態では、FcRは、IgG抗体（γ受容体）に結合するFcRであり、これには、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIサブクラスの受容体が含まれ、そうした受容体の対立遺伝子変異型および選択的スプライシングを受けた形態が含まれる。FcγRII受容体には、FcγRIIA（「活性化受容体」）およびFcγRIIB（「阻害性受容体」）が含まれ、これらは、主にそれらの細胞質ドメインが異なる類似したアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcγRIIAは、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）をその細胞質ドメインに含む。阻害性受容体FcγRIIBは、免疫受容阻害性チロシンモチーフ（ITIM）をその細胞質ドメインに含む（例えばDaeron、Annu. Rev. Immunol. 15:203~234（1997）を参照されたい）。FcRは、例えばRavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol. 9:457~92（1991）；Capelら、Immunomethods 4:25~34（1994）；およびde Haasら、J. Lab. Clin. Med. 126:330~41（1995）に概説されている。将来同定されるものを含めた他のFcRは、本明細書の用語「FcR」に包含される。

10

【0058】

用語「Fc受容体」または「FcR」には新生児受容体、FcRnも含まれ、これは、母親由来のIgGの胎児への移入（Guyerら、J. Immunol. 117:587（1976）およびKimら、J. Immunol. 24:249（1994））、および免疫グロブリンの恒常性の調節に参与する。FcRnへの結合を測定する方法は、既知である（例えばGhetieおよびWard、Immunology Today、18（12）:592~8（1997）；Ghetieら、Nature Biotechnology、15（7）:637~40（1997）；Hintonら、J. Biol. Chem.、279（8）:6213~6（2004）；WO2004/92219（Hintonら）を参照されたい）。

20

【0059】

ヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドのヒトFcRnへのインビボでの結合および血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウスもしくはトランスフェクトされたヒト細胞系統で、または変異型Fc領域を有するポリペプチドが投与された霊長類でアッセイすることができる。WO2000/42072（Presta）は、FcRへの結合が改善されたまたは減少した変異型抗体を記載している。例えばShieldsら、J. Biol. Chem. 9（2）:6591~6604（2001）も参照されたい。

30

【0060】

「ヒトエフェクター細胞」は、1種または複数のFcRを発現し、エフェクター機能を遂行する白血球である。ある種の実施形態では、この細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能（複数可）を遂行する。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核球（PBMC）、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る。エフェクター細胞は、天然供給源から、例えば血液から単離することができる。

40

【0061】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」または「ADCC」は、ある種の細胞傷害性細胞（例えばNK細胞、好中球およびマクロファージ）に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌Igが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、続いて標的細胞を細胞毒で死滅させることができるようにする、細胞傷害の形態を指す。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞はFcγRIIIのみを発現するが、単球はFcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、RavetchおよびKinet、Annu. Rev. Immunol. 9:457~92（1991）の464頁の表3に概説されている。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,3

50

37号または米国特許第6,737,056号(Presta)に記載されているアッセイなどのインビトロでのADCCアッセイを行うことができる。そうしたアッセイに有用なエフェクター細胞には、PBMCおよびNK細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性は、例えばClynesら、PNAS(USA)95:652~656(1998)に開示されているものなどの動物モデルで、インビボで評価することができる。

【0062】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体システムの第1の成分(C1q)が、コグネイト抗原に結合している(適切なサブクラスの)抗体に結合することにより惹起される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されているようなCDCアッセイを行うことができる。Fc領域のアミノ酸配列が改変され(変異型Fc領域を有するポリペプチド)、およびC1q結合能力が増大または低下したポリペプチド変異型が、米国特許第6,194,551B1号およびWO1999/51642に記載されている。例えば、Idusogieら、J. Immunol. 164:4178~4184(2000)も参照されたい。

【0063】

「結合親和性」は、一般に、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)の間の非共有相互作用の総計の強度を指す。別段指示がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原の)間の1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(Kd)で表すことができる。親和性は、本明細書に記載の方法を含めた、当技術分野で既知の慣用法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般にゆっくりと抗原に結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般に抗原により速く結合し、より長く結合したままという傾向がある。結合親和性を測定する種々の方法が当技術分野で知られており、それらのいずれかを本発明の目的に使用することができる。結合親和性を測定するための特定の例示的かつ代表的な実施形態を以下に記載する。

【0064】

一実施形態では、本発明による「Kd」または「Kd値」は、以下のアッセイによって記載されるように、Fab型の目的の抗体およびその抗原を用いて行われる放射標識性抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、一連の漸増量の非標識抗原の存在下で、最小の濃度の(^{125}I)標識抗原でFabを平衡化し、次いで抗Fab抗体コーティングプレートで結合抗原を捕獲することによって測定される(例えばChenら、J. Mol. Biol. 293:865~881(1999)を参照されたい)。アッセイ条件を確立するために、50mM炭酸ナトリウム(pH9.6)に入れた5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の捕獲抗Fab抗体(Cappel Labs)で、マイクロタイタープレート(DYNEX Technologies, Inc.)を一晩コーティングし、続いて2%(w/v)ウシ血清アルブミンを含むPBSを用いて、室温(約23°C)で2から5時間ブロッキングする。非吸着プレート(Nunc #269620)中で、100pMまたは26pMの[^{125}I] - 抗原を目的のFabの段階希釈物と混合する(例えば、Prestaら、Cancer Res. 57:4593~4599(1997)における抗VEGF抗体、Fab-12の評価に相当する)。次いで、目的のFabを、一晩インキュベートする。しかし、インキュベーションは、平衡に達するのを確実にするために、さらに長い期間(例えば約65時間)続けることができる。その後、この混合物を捕獲プレートに移して、室温で(例えば1時間)インキュベートする。次いで、この溶液を除去し、プレートを、0.1%TWEEN-20(商標)界面活性剤を含むPBSで8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μl /ウェルの閃光物質(MICROSCINT-20(商標)、Packard)を添加し、このプレートを、T

10

20

30

40

50

OPCOUNT（商標） γ カウンター（Packard）で10分間計測する。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度を選択して、競合的結合アッセイで使用する。

【0065】

別の実施形態によれば、 K_d または K_d 値は、約10応答単位（RU）で固定化された抗原CM5チップと共にBIACORE（登録商標）2000またはBIACORE（登録商標）3000装置（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を25℃で使用する、表面プラズモン共鳴アッセイを使用することによって測定される。簡単に述べると、供給業者の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIAcore Inc.）を活性化する。抗原を、10mM酢酸ナトリウム、pH4.8を用いて5 μ g/ml（約0.2 μ M）に希釈してから、約10応答単位（RU）の結合タンパク質を得るように、5 μ l/分の流速で注入する。抗原の注入に続いて、1Mエタノールアミンを注入して、未反応基をブロックする。キネティクス測定のために、Fabの2倍階段希釈物（0.78nMから500nM）を、0.05%TWEEN20（商標）界面活性剤を含むPBS（PBST）に、約25 μ l/分の流速で25℃で注入する。会合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）は、単純一対一ラングミュア結合モデル（BIAcore（登録商標）評価ソフトウェアバージョン3.2）を使用して、会合センサーグラムおよび解離センサーグラムを同時に適合させることにより計算する。平衡解離定数（ K_d ）は、 k_{off}/k_{on} 比として計算する。例えばChenら、J. Mol. Biol. 293: 865~881（1999）を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによるオン速度が、 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合は、ストップフローを備えた分光光度計（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（Thermo Spectronic）などの分光計で測定されるような、PBS、pH7.2に入れた20nM抗抗原抗体（Fab形態）の25℃での蛍光放射強度（励起=295nm；放射=340nm、16nmのバンドパス）の増大または低下を漸増濃度の抗原の存在下で測定する蛍光クエンチング法を使用して、オン速度を決定することができる。

【0066】

本発明による「オン速度」、「会合の速度」、「会合速度」または「 k_{on} 」は、BIACORE（登録商標）2000またはBIACORE（登録商標）3000システム（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を使用して、上記のように決定することもできる。

【0067】

本明細書で使用する場合、用語「実質的に類似」または「実質的に同一」は、2つの数値間の差が、前記値（例えば K_d 値）によって測定された生物学的特徴に関して、ほとんどまたは全く生物学的および/または統計的有意性がないと当業者が見なすような、2つの数値（例えば、一方は本発明の抗体と関係があり、他方は基準/比較抗体と関係がある）間の十分に高い程度の類似性を意味する。前記2つの値の間の差は、基準/比較値に応じて、例えば約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満および/または約10%未満である。

【0068】

本明細書で使用する場合、フレーズ「実質的に低減した」または「実質的に異なる」は、2つの数値間の差が、前記値（例えば K_d 値）によって測定された生物学的特徴に関して、統計的有意性があると当業者が見なすような、2つの数値（一般に、一方はある分子と関係があり、他方は基準/比較分子と関係がある）間の十分に高い程度の差を意味する。前記2つの値の間の差は、基準/比較分子の値に応じて、例えば約10%より大きい、約20%より大きい、約30%より大きい、約40%より大きい、および/または約50%より大きい。

【0069】

ある種の実施形態では、本明細書で有用なヒト化抗体は、IgG Fcのアミノ酸改変をさらに含み、野生型のIgG Fcを有する抗体と比較して、ヒトFcRnに対して、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、より好ましくは100倍、好ましくは少なくとも125倍、さらにより好ましくは少なくとも150倍から約170倍増大した結合親和性を示す。

【0070】

「障害」または「疾患」は、本発明の物質／分子または方法での治療の利益を享受するであろう任意の状態である。これは、問題になっている障害に哺乳動物を罹りやすくする病態を含めた、慢性および急性の障害または疾患を含む。本明細書で治療される障害の非限定例としては、悪性腫瘍および良性腫瘍；非白血病およびリンパ系悪性腫瘍；ニューロン障害、グリア障害、星状細胞障害、視床下部および他の腺の障害、マクロファージ障害、上皮障害、間質および割腔の障害；ならびに炎症性障害、免疫性障害および他の血管新生障害が挙げられる。

10

【0071】

用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」は、ある程度の異常細胞増殖を伴う障害を指す。一実施形態では、細胞増殖性障害はがんである。一実施形態では、細胞増殖性障害は血管新生である。

【0072】

本明細書で使用する場合、「腫瘍」は、悪性または良性にかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長および増殖を、ならびにすべての前がん性およびがん性の細胞および組織を指す。用語「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」および「腫瘍」は、本明細書で言及する場合、相互排他的でない。

20

【0073】

用語「がん」および「がん性」は、制御されていない細胞増殖を典型的には特徴とする、哺乳動物の生理的状态を指すか、または説明する。がんの例としては、これらに限定されないが、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病が挙げられる。そうしたがんのより具体的な例としては、扁平上皮がん、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がんおよび肺の扁平上皮がんを含む）、腹膜のがん、肝細胞がん、胃がんまたは腹部がん（胃腸がんを含む）、膵臓がん、神経膠芽細胞腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、ヘパトーム、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓がんまたは腎がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝がんおよび様々なタイプの頭頸部がん、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（NH L）；小リンパ球性（S L）NH L；中悪性度／濾胞性NH L；中悪性度びまん性NH L；高悪性度免疫芽細胞性NH L；高悪性度リンパ芽球性NH L；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NH L；巨大腫瘤病変NH L；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む）；慢性リンパ性白血病（CL L）；急性リンパ芽球性の白血病（ALL）；ヘアリーセル白血病；慢性骨髄芽球性白血病；および移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（脳腫瘍に付随するものなど）およびメイグス症候群に付随する異常な血管増殖、が挙げられる。

30

40

【0074】

用語「抗腫瘍性組成物」または「抗がん組成物」または「抗がん剤」は、少なくとも1つの活性な治療剤、例えば「抗がん剤」を含む、がんを治療する際に有用な組成物を指す。治療剤（抗がん剤）の例としては、これらに限定されないが、例えば、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物、放射線療法で使用する薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤およびがんを治療するための他の薬剤、例えば抗HER-2抗体、抗CD20抗体、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阻害剤）、HER1／EGFR阻害剤（例えばエルロチニブ（Tarceva（商標））、血小板由来の成長因子阻害剤（例えばGleevec（商標）（メシル酸イマチニブ））、COX-2阻害剤（例えばセレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、

50

以下の標的、E r b B 2、E r b B 3、E r b B 4、P D G F R- β 、B l y S、A P R I L、B C M A V E G FまたはV E G F受容体（複数可）の1種または複数に結合するアンタゴニスト（例えば中和抗体）、T R A I L/A p o 2、ならびに他の生理活性剤および有機化合物剤などが挙げられる。それらの組み合わせも本発明に含まれる。

【0075】

「血管新生因子または血管新生剤」は、血管の発達を刺激する、例えば血管新生、内皮細胞の成長、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。例えば血管新生因子には、これらに限定されないが、例えば、V E G FおよびV E G Fファミリーのメンバー、P l G F、P D G Fファミリー、線維芽細胞成長因子ファミリー（F G F）、T I Eリガンド（アンジオポエチン）、エフリン、D e l-1、線維芽細胞成長因子：酸性（a F G F）および塩基性（b F G F）、フォリスタチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-C S F）、肝細胞成長因子（H G F）／散乱係数（S F）、インターロイキン-8（I L-8）、レプチン、ミッドカイン、胎盤成長因子、血小板由来の内皮細胞成長因子（P D-E C G F）、血小板由来の成長因子、特にP D G F-B BまたはP D G F R- β 、プレイオトロフィン（P T N）、プログラニュリン、プロリフェリン、トランスフォーミング成長因子- α （T G F- α ）、トランスフォーミング成長因子- β （T G F- β ）、腫瘍壊死因子- α （T N F- α ）、血管内皮成長因子（V E G F）／血管透過性因子（V P F）などが含まれる。また、創傷の治癒を速める因子、例えば、成長ホルモン、インスリン様成長因子-I（I G F-I）、V I G F、上皮成長因子（E G F）、C T G Fおよびそのファミリーのメンバー、ならびにT G F- α およびT G F- β も含まれるであろう。K l a g s b r u nおよびD ' A m o r e、*Annu. Rev. Physiol.*、53：217～39（1991）；S t r e i tおよびD e t m a r、*Oncogene*、22：3172～3179（2003）；F e r r a r a&A l i t a l o、*Nature Medicine* 5（12）：1359～1364（1999）；T o n i n iら、*Oncogene*、22：6549～6556（2003）（例えば既知の血管新生因子を列挙している表1）；ならびにS a t o、*Int. J. Clin. Oncol.*、8：200～206（2003）を参照されたい。

【0076】

本明細書で使用する用語「V E G F」は、L e u n g r a、*Science*、246：1306（1989）およびH o u c k r a、*Mol. Endocrin.*、5：1806（1991）によって記載されているような、165アミノ酸のヒト血管内皮細胞成長因子および関連する121、189および206アミノ酸のヒト血管内皮細胞成長因子を、それらの天然に存在する対立遺伝子形態およびプロセッシングを受けた形態と共に指す。用語「V E G F」は、マウス、ラットまたは霊長類などの非ヒト種由来のV E G Fも指す。特定の種由来のV E G Fを、ヒトV E G Fに対するh V E G F、マウスV E G Fに対するm V E G Fなどのような用語で示すこともある。用語「V E G F」は、165アミノ酸のヒト血管内皮細胞成長因子のアミノ酸8から109または1から109を含有する、トランケートされた形態のポリペプチドを指すのにも使用される。任意のそうしたV E G F形態への言及は、例えば「V E G F（8～109）」、「V E G F（1～109）」または「V E G F₁₆₅」で、本出願中で識別することができる。「トランケートされた」天然V E G Fに対するアミノ酸位置は、天然V E G F配列で示される通りに番号がつけられる。例えば、トランケートされた天然V E G Fでのアミノ酸位置17（メチオニン）も、天然V E G Fでの位置17（メチオニン）である。トランケートされた天然V E G Fは、天然V E G Fに匹敵する、K D R受容体およびF l t-1受容体に対する結合親和性を有する。好ましい実施形態によれば、V E G FはヒトV E G Fである。

【0077】

「V E G Fアンタゴニスト」は、V E G Fもしくは1種もしくは複数のV E G F受容体またはそれらをコードする核酸へのその結合を含め、V E G F活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減または干渉することができる分子を指す。好ましくは、V E G Fアンタゴニストは、V E G FまたはV E G F受容体に結合する。V E G Fアンタゴニストには、抗V E

VEGF抗体およびそれらの抗原結合性断片、VEGFおよびVEGF受容体に結合し、リガンド-受容体相互作用を遮断するポリペプチド（例えばイムノアドヘシン、ペプチボディ）、抗VEGF受容体抗体およびVEGF受容体アンタゴニスト、例えばVEGFRチロシンキナーゼの小分子阻害剤、VEGFに結合するアプタマー、およびVEGFまたはVEGF受容体をコードする核酸配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸（例えばRNAi）が含まれる。好ましい一実施形態によれば、VEGFアンタゴニストは、インビトロで、VEGFに結合し、VEGF誘導性内皮細胞増殖を阻害する。好ましい一実施形態によれば、VEGFアンタゴニストは、非VEGFまたは非VEGF受容体よりも高い親和性で、VEGFまたはVEGF受容体に結合する。好ましい一実施形態によれば、VEGFアンタゴニストは、1 μMから1 pMの間のK_dで、VEGFまたはVEGF受容体に結合する。他の好ましい実施形態によれば、VEGFアンタゴニストは、500 nMから1 pMの間で、VEGFまたはVEGF受容体に結合する。

10

【0078】

好ましい実施形態によれば、VEGFアンタゴニストは、抗体、ペプチボディ、イムノアドヘシン、小分子またはアプタマーなどのポリペプチドから選択される。好ましい実施形態では、抗体は、AVASTIN（登録商標）抗体などの抗VEGF抗体、または抗VEGFR2もしくは抗VEGFR3抗体などの抗VEGF受容体抗体である。VEGFアンタゴニストの他の例としては、VEGF-Trap、Mucagen、PTK787、SU11248、AG-013736、Bay439006（ソラフェニブ）、ZD-6474、CP632、CP-547632、AZD-2171、CDP-171、SU-14813、CHIR-258、AEE-788、SB786034、BAY579352、CDP-791、EG-3306、GW-786034、RWJ-417975/CT6758およびKRN-633が挙げられる。

20

【0079】

「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。好ましくは、本発明の抗VEGF抗体は、VEGF活性が関与する疾患または状態をターゲティングおよび干渉する際の治療剤として使用することができる。抗VEGF抗体は、通常、VEGF-BまたはVEGF-Cなどの他のVEGF相同体にも、PLGF、PDGFまたはbFGFなどの他の成長因子にも結合しない。好ましい抗VEGF抗体は、ハイブリドーマATCC HB10709により産生されるモノクローナル抗VEGF抗体A4.6.1と同一のエピトープに結合するモノクローナル抗体である。より好ましくは、抗VEGF抗体は、Prestaら、(1997) Cancer Res. 57:4593~4599に従って生成される組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体であり、これには、これらに限定されないが、ベバシズマブ（BV；AVASTIN（登録商標））として知られる抗体が含まれる。別の実施形態によれば、使用することができる抗VEGF抗体には、これらに限定されないが、WO2005/012359に開示されている抗体が含まれる。一実施形態によれば、抗VEGF抗体は、WO2005/012359の図24、25、26、27および29に開示されている抗体（例えばG6、G6-23、G6-31、G6-23.1、G6-23.2、B20、B20-4およびB20-4.1）のうちのいずれか1つの可変重鎖領域および可変軽鎖領域を含む。別の好ましい実施形態では、ラニズマブとして知られる抗VEGF抗体は、糖尿病性神経症およびAMDなどの眼疾患に対して投与されるVEGFアンタゴニストである。

30

40

【0080】

「rhumAb VEGF」または「AVASTIN（登録商標）」としても知られる抗VEGF抗体「ベバシズマブ（BV）」は、Prestaら（1997）Cancer Res. 57:4593~4599に従って生成される組換えヒト化抗VEGFモノクローナル抗体である。これは、ヒトVEGFがその受容体へ結合するのを遮断するマウス抗hVEGFモノクローナル抗体A.4.6.1由来の、変異したヒトIgG1フレームワーク領域および抗原結合相補性決定領域を含む。フレームワーク領域の大部分を含む、ベバシズマブのアミノ酸配列の約93%は、ヒトIgG1に由来し、その配列の約7%は

50

、マウス抗体A4.6.1に由来する。ベバシズマブは約149,000ダルトンの分子量を有し、グリコシル化されている。他の抗VEGF抗体には、米国特許第6884879号およびWO2005/044853に記載されている抗体が含まれる。

【0081】

抗VEGF抗体ラニズマブすなわちLUCENTIS（登録商標）抗体またはrhufab V2は、ヒト化親和性成熟抗ヒトVEGF Fab断片である。ラニズマブは、大腸菌（*Escherichia coli*）発現ベクターでの標準的な組換え技術方法および細菌発酵によって生産される。ラニズマブは、グリコシル化されておらず、約48,000ダルトンの分子量を有する。WO98/45331およびUS20030190317を参照されたい。

10

【0082】

血管新生の調節障害は、異常な血管新生につながる可能性があり、すなわち疾患状態における新しい血管の過剰な、不十分な、またはそれ以外の不適切な成長（例えば、医学的見地から望ましくない血管新生の位置、タイミング、または発生）の場合に、または疾患状態、すなわち血管新生障害を引き起こすような、異常な血管新生につながる可能性がある。過剰な、不適切なまたは制御されていない血管新生は、疾患状態の悪化の一因となるかまたは疾患状態を引き起こす新しい血管成長が存在するときに生じる。新しい血管は、疾患組織に栄養を与え、正常組織を破壊し得、がんの場合には、新しい血管は、腫瘍細胞を循環中に抜け出させ、他の器官に定着させ得る（腫瘍転移）。異常な血管新生（すなわち血管新生障害）を伴う疾病状態には、非腫瘍性状態と腫瘍性状態の両方が含まれ、これらには、例えばがん、特に血管新生化した固体腫瘍および転移性腫瘍（結腸がん、乳がん、肺がん（特に小細胞肺がん）、脳腫瘍（特に神経膠芽細胞腫）または前立腺がんを含む）、望ましくないまたは異常な肥大、関節炎、リウマチ性関節炎（RA）、炎症性腸疾患またはIBD（クローン病および潰瘍性大腸炎）、乾癬、乾癬プラーク、類肉腫症、アテローム性動脈硬化症、アテローム斑、糖尿病性網膜症および未熟児網膜症を含めた他の増殖網膜症、後水晶体線維増殖症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性症、糖尿病黄斑浮腫、角膜血管新生、角膜移植血管新生、角膜移植後拒絶反応、網膜／脈絡膜血管新生、虹彩前面の血管新生（ルベオシス）、眼の血管新生性疾患、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（グレーブス病を含む）、慢性炎症、肺炎症、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（例えば急性卒中／閉鎖性頭部損傷／外傷に付随する）、滑液炎症、骨化性筋炎、肥大性骨形成、骨関節炎（OA）、難治性腹水、多嚢胞卵巣、子宮内膜症、第三腔体液疾患（3rd spacing of fluid disease）（臍炎、コンパートメント症候群、熱傷、腸疾患）、子宮筋腫、早期分娩、IBDなどの慢性炎症、腎臓同種移植片拒絶、炎症性腸疾患、ネフローゼ症候群、望ましくないまたは異常な組織腫瘍成長（非がん）、血友病関節症、肥厚性癬痕、毛髪成長阻害、オースラー・ウェーバー症候群、化膿性肉芽腫、後水晶体線維増殖症、強皮症、トラコーマ、血管接着、滑膜炎、皮膚炎、子癇前症、腹水症、心膜液貯留（心外膜炎に付随するものなど）ならびに胸水貯留が含まれる。

20

30

【0083】

本明細書で使用する場合、「治療」は、治療される個体または細胞の自然経過を変化させようとする臨床的介入を指し、予防のためまたは臨床病理の過程において行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理的帰結の減少、転移の防止、疾患進行速度の低下、疾病状態の回復または緩和、および寛解または改善した予後が含まれる。幾つかの実施形態では、本発明の抗体は、疾患または障害の発達を遅らせるために使用される。

40

【0084】

「有効量」は、必要な投薬量および期間での、所望の治療的または予防的結果を達成するのに有効な量を指す。

【0085】

本発明の物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾

50

病状態、年齢、性別および体重ならびに物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストが個体において所望の応答を惹起する能力などの要因に従って変動し得る。治療有効量は、治療的有益効果が、物質／分子、アゴニストまたはアンタゴニストの任意の毒性効果または有害効果を上回るものでもある。用語「治療有効量」は、哺乳動物（別名、患者）において疾患または障害を「治療する」のに有効な、本発明の抗体、ポリペプチドまたはアンタゴニストの量を指す。がんの場合には、治療有効量の薬物は、がん細胞の数を減少する、腫瘍サイズもしくは重量を低減する、末梢器官へのがん細胞の浸潤を阻害する（すなわち、ある程度緩徐し、好ましくは止める）、腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度緩徐し、好ましくは止める）、腫瘍成長をある程度阻害する、および／またはがんに伴随する症状の1つもしくは複数にある程度やわらげることができる。薬物が既存のがん細胞の成長を防止および／または既存のがんを死滅させることができる限り、薬物は、細胞分裂停止性および／または細胞傷害性である。一実施形態では、治療有効量は成長阻害量である。別の実施形態では、治療有効量は、患者の生存を延ばす量である。別の実施形態では、治療有効量は、患者の無増悪生存期間を改善する量である。

【0086】

「予防有効量」は、必要な投薬量および期間での、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を指す。典型的には、必ずしもそうではないが、予防的用量は、疾患に先立ってまたは疾患の初期段階で対象において使用されるので、予防有効量は治療有効量より少ない。

【0087】

本明細書で使用する用語「細胞傷害性薬物」は、細胞機能を阻害するもしくは妨げる、および／または細胞破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位元素（例えば At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} および Lu の放射性同位元素）、化学療法剤、例えばメトトレキサート、アドリアミシン（*adriamycin*）、ビンカルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤、核酸分解酵素などの酵素およびその断片、抗生物質、ならびに細菌、真菌、植物もしくは動物起源の小分子毒素または酵素的に活性な毒素などの毒素（それらの断片および／または変異型を含む）、ならびに以下に開示される様々な抗腫瘍性または抗がん性の薬剤を含むことが意図される。他の細胞傷害性薬物は、以下に記載される。殺腫瘍性の薬剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0088】

「化学療法剤」は、がんの治療で有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミドなどのアルキル化剤；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のスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパおよびウレドーパなどのアジリジン；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（*triethylene*）チオホスホラミドおよびトリメチロロメラミン（*trimethylolmelamine*）を含めたエチレンイミンおよびメチラメラミン（*methylmelamine*）；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）； δ -9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（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（合成アナログのトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン（*scopolactin*）および9-アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼルシンおよびビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（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；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミ

10

20

30

40

50

ド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチンおよびラニムスチン (ranimnustine) などのニトロソウレア (nitrosureas)；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 1 I およびカリケアマイシン ω 1 I (例えば Agnew, Chem Intl. Engl 編、33:183~186 (1994) を参照されたい) などの抗生物質；ジネミシン A を含めたジネミシン；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン (acclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン (chromomycins)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN (登録商標) ドキソルビシン (モルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、2-ピロリノードキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン C などのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび 5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗薬；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸アナログ；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ；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のピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、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のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸 (frolinic acid) などの葉酸補充薬；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；ビスアントレン；エダトラキセート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルニチン (elfornithine)；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；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)；マイタンシンおよびアンサマイトシンなどのマイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (登録商標) 多糖類複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (特に T-2 毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン A および アングイジン)；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；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；チオテパ；タキソイド、例えば TAXOL (登録商標) パクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、ABRAXANE (商標) パクリタキセルのクレモール無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) および TAXOTERE (登録商標) ドキセタキセル (doxetaxel) (Rhone-

10

20

30

40

50

Poulenc Rorer、Antony、France)；クロランブシル(chlorambucil)；ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標))；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金アナログ；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；ビンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボビン(leucovorin)；ピノレルビン(NAVELBINE(登録商標))；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタビン(XELODA(登録商標))；上記のいずれかの医薬的に許容可能な塩、酸または誘導体；なら
10
びに上記の2つ以上の組み合わせ、例えば、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾロンの組み合わせ療法の省略形であるCHOP、および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(ELOXATIN(商標))での治療レジメンの省略形であるFOLFOXなどが挙げられる。さらなる化学療法剤には、抗体薬物コンジュゲートとして有用な細胞傷害性薬物、例えば、マイタンシノイド(例えばDM1)ならびにオーリスタチンMMAEおよびMMAFなどが含まれる。

【0089】

「化学療法剤」には、がんの成長を促進し得るホルモンの効果を調節、低減、遮断または阻害するように働き、全身性または全身治療の形態であることが多い、「抗ホルモン剤」も含まれる。化学療法剤は、それ自体ホルモンでもよい。例としては、抗エストロゲン
20
および選択的エストロゲン受容体モジュレーター(SERM)、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、EVIISTA(登録商標)ラロキシフェン、ドロキシフェン、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、LY117018、オナプリストンおよびFARESTON(登録商標)トレミフェン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター(ERD)；卵巣を抑制または活動停止するように機能する薬剤、例えば黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えばLUPRON(登録商標)およびELIGARD
30
(登録商標)酢酸リュープロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリンおよびトリプテリン(tripterelin)；他の抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミドおよびピカルタミド；および副腎でのエストロゲン産生を調節するアロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)酢酸メゲストロール、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、フォルメスタニー(formestane)、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ボロゾール、FEMARA(登録商標)レトロゾールおよびARIMIDEX(登録商標)アナストロゾールなどが挙げられる。加えて、化学療法剤のそうした定義には、ビスホスホネート、例えばクロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)またはOSTAC(登録商標))、DIDROCAL(登録商標)エチドロネート、NE-58095、ZOMETA(登録商標)ゾレドロン酸／ゾレドロネート、FOSAMAX(登録商標)アレンドロネート、AREDIA(登録商標)パミドロネート、SKELED(登録商標)チルドロネートまたはACTONEL(登録商標)リセドロネート；ならびに
40
トロキサシタビン(1, 3-ジオキサ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、異常細胞増殖に関与するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC- α 、Raf、H-Rasおよび上皮成長因子受容体(EGFR)など；THERATOPE(登録商標)ワクチンおよび遺伝子療法ワクチンなどのワクチン、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；LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤；ABARELIX(登録商標)r-mRH；トシル酸ラパチニブ(GW572016としても知られるErbB-2およびEGFRの二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)；ならびに上記のいずれかの医薬的に許容可能な塩、酸または誘導体が含まれる。

10

20

30

40

50

【0090】

本明細書で使用する場合、「増殖阻害剤」は、インビトロまたはインビボのいずれかで、細胞（例えばRobo4を発現する細胞）の成長および／または増殖を阻害する化合物または組成物を指す。したがって、増殖阻害剤は、S期でRobo4を発現する細胞の割合を有意に低減するものでもよい。増殖阻害剤の例としては、細胞周期の進行を（S期以外の所で）遮断する薬剤、例えばG1停止およびM期停止を誘導する薬剤が挙げられる。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）、タキサンおよびトポイソメラーゼII阻害剤、例えばアントラサイクリン抗菌剤ドキソルビシン（（8S-シス）-10-[(3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ- α -L-リキソヘキソピラノシル(hexapyranosyl))オキシ]-7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5, 12-ナフタセンジオン)、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が含まれる。G1を停止させる薬剤はS期停止にも波及し、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジ、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシルおよびara-Cである。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer、MendelsohnおよびIsrael編、第1章、表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」、Murakamiら(WB Saunders: Philadelphia、1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセル）は、両方ともイチイに由来する抗がん薬である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb)の半合成アナログである。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の構築を促進し、脱重合を防止することにより微小管を安定化し、このことによって、細胞の有糸分裂が阻害されることになる。

10

20

【0091】

本明細書で使用する場合、用語「患者」は、治療が望まれる任意の単一の動物、より好ましくは（例えばイヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、動物園の動物、ウシ、ブタ、ヒツジおよび非ヒト霊長類のような非ヒト動物を含めた）哺乳動物を指す。最も好ましくは、本明細書での患者はヒトである。

30

【0092】

本明細書での「対象」は、血管新生障害の1種または複数の徴候、症状または他の指標に見舞われているまたは見舞われた、治療に適格な患者を含めた、任意の単一のヒト対象である。対象として含まれることが意図されるものは、疾患のいかなる臨床徴候も示さない、臨床研究試験に関与する任意の対象、または疫学的研究に関与する対象、またはコントロールとして一度使用された対象である。対象は、VEGFアンタゴニストを用いて以前に治療されていてもよいし、そのような治療がされていなくてもよい。対象は、本明細書の治療が開始されるときに使用される第2の医薬に対してナイーブでもよく、すなわち、対象は、「ベースライン」（すなわち、本明細書の治療方法において、アンタゴニストの最初の用量を投与する前の設定時点、例えば治療を開始する前に対象をスクリーニングする日）において、例えば抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物で以前に治療されていなくてもよい。そうした「ナイーブ」対象は、そうした第2の医薬での治療の候補であると一般に見なされる。

40

【0093】

表現「有効量」は、血管新生障害を治療するのに有効な医薬の量を指す。

【0094】

用語「医薬製剤」は、医薬の生物活性が有効であることを可能にするような形態であり、製剤が投与されることになる対象に対して許容されない毒性があるさらなる成分を含まない、無菌調製物を指す。

50

【0095】

「無菌」製剤は、無菌的であり、またはすべての生きた微生物およびそれらの胞子を含まない。

【0096】

「添付文書」は、適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌、パッケージ化された製品と組み合わされる他の治療的製品、および／またはそうした治療的製品もしくは医薬などの使用に関する警告についての情報などを含む、治療的製品または医薬の商業的パッケージに慣例上含まれる指示書を指すのに使用される。

【0097】

「キット」は、少なくとも1つの試薬、例えば血管新生障害の治療のための医薬または本発明のバイオマーカー遺伝子もしくはタンパク質を特異的に検出するプローブを含む、任意の製造品（例えばパッケージまたは容器）である。製造品は、好ましくは、本発明の方法を行うためのユニットとして宣伝され、流通され、または販売される。

10

【0098】

医薬（複数可）に対する非応答において、1種または複数の医薬での以前のまたは現在の治療から「臨床的に許容されない高いレベルの毒性」に見舞われている対象は、経験豊かな臨床医が重大と見なす、その毒性に付随する1種または複数の負の副作用または有害事象、例えば、重篤な感染症、うっ血性心不全、（多発性硬化症に至る）脱髄、重大な過敏症、神経病理学的な事象、高度の自己免疫、がん、例えば子宮内膜がん、非ホジキンリンパ腫、乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がんまたは黒色腫、結核（TB）などに見舞われる

20

【0099】

「負の副作用の危険性を低減する」とは、以前に投与された医薬での同一患者または別の患者の治療に起因して観察された危険性よりも低い程度まで、本明細書のアンタゴニストでの治療に起因する副作用の危険性を低減することを意味する。そうした副作用には、毒性に関する上記のもの、好ましくは、感染症、がん、心不全または脱髄が含まれる。

【0100】

「相関する」または「相関すること」とは、第1の解析またはプロトコルの成績および／または結果を第2の解析またはプロトコルの成績および／または結果と任意の方法で比較することを意味する。例えば、第1の解析もしくはプロトコルの結果を、第2の解析またはプロトコルを実施する際に使用してもよいし、および／または第1の解析もしくはプロトコルの結果を、第2の解析もしくはプロトコルを行うべきかどうかを決定するのに使用してもよい。本明細書の様々な実施形態に関しては、解析アッセイの結果を、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストを使用する特定の治療レジメンを行うべきかどうかを決定するのに使用してもよい。

30

【0101】

本明細書で使用する場合、単語「標識」は、核酸プローブまたは抗体などの試薬に直接的または間接的にコンジュゲートまたは融合され、それがコンジュゲートまたは融合された試薬を検出しやすくする、化合物または組成物を指す。標識は、それ自体検出可能でもよく（例えば放射性同位元素標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物または組成物の化学的変化を触媒してもよい。この用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に結合させる（すなわち物理的に連結させる）ことによるプローブまたは抗体の直接標識、および直接的に標識された別の試薬と反応させることによるプローブまたは抗体の間接標識を包含することが意図される。間接標識の例としては、蛍光標識された二次抗体による一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出することができるような、ビオチンによるDNAプローブの末端標識が含まれる。

40

【0102】

用語「発現のレベル」または「発現レベル」は互換的に使用され、生体試料中のポリヌクレオチドまたはアミノ酸産物またはタンパク質の量を一般に指す。「発現」は、遺伝子にコードされた情報が、細胞中に存在し、細胞中で作動する構造に変換されるプロセスを

50

一般に指す。したがって本発明によれば、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチドへの転写、タンパク質への翻訳、またはタンパク質の翻訳後修飾さえ指し得る。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたタンパク質または翻訳後修飾されたタンパク質の断片も、それらが、選択的スプライシングまたは分解転写産物によって生成される転写産物に由来しようと、例えばタンパク質分解によるタンパク質の翻訳後プロセッシングに由来しようと、発現したと見なされるものとする。「発現遺伝子」には、mRNAとしてポリヌクレオチドへ転写され、次いで、タンパク質に翻訳されるものが含まれ、およびRNAに転写されるが、タンパク質に翻訳されないもの（例えばトランスファーRNAおよびリボソームRNA）も含まれる。

【0103】

本明細書で使用する場合、用語「共変量」は、患者に関するある種の変数または情報を指す。臨床エンドポイントは、回帰モデルにおいてしばしば考慮され、この場合、エンドポイントは従属変数に相当し、バイオマーカーは主変数または標的独立変数（リグレッサー）に相当する。臨床データプールからさらなる変数が考慮される場合は、それらは（臨床的）共変量として示される。

【0104】

用語「臨床的共変量」は、一般にベースラインで利用可能な、患者についてのすべての臨床情報を説明するのに本明細書で使用する。こうした臨床的共変量は、性別、年齢などの人口統計学的情報、他の既往情報、合併症、併用療法、身体検査の結果、得られた一般的な実験室パラメーター、血管新生障害の既知の特性、臨床疾患の病期分類、前治療のタイミングおよび結果、病歴、ならびに治療に対する臨床応答と関係があり得るすべての類似した情報を含む。

【0105】

本明細書で使用する場合、用語「生分析」または「未調整分析」は、考慮されるバイオマーカーの他に、さらなる臨床的共変量が、独立因子としても階級化共変量としても回帰モデルで使用されない回帰分析を指す。

【0106】

本明細書で使用する場合、用語「共変量によって調整済み」は、考慮されるバイオマーカーの他に、さらなる臨床的共変量が、独立因子または階級化共変量のいずれかとして回帰モデルで使用される回帰分析を指す。

【0107】

本明細書で使用する場合、用語「一変量」は、独立変数として、標的バイオマーカーのうちの1つのみがモデルの一部である、回帰モデルまたはグラフィックアプローチを指す。こうした一変量モデルは、さらなる臨床的共変量を用いて、およびそれを用いずに考慮することができる。

【0108】

本明細書で使用する場合、用語「多変量」は、独立変数として、1つを超える標的バイオマーカーがモデルの一部である、回帰モデルまたはグラフィックアプローチを指す。こうした多変量のモデルは、さらなる臨床的共変量を用いて、およびそれを用いずに考慮することができる。

【0109】

III. VEGFアンタゴニストに応答性の患者を同定するための方法

本発明は、VEGFアンタゴニスト（例えば抗VEGF抗体）療法に応答性である可能性が高い患者を同定および／またはモニタリングするための方法を提供する。本方法は、特に、VEGFアンタゴニスト（例えば抗VEGF抗体）の患者への投与が有効である確度を高めるのに有用である。本方法は、患者由来の生体試料中の1種または複数の遺伝子バイオマーカーの発現の検出であって、1種または複数のそうしたバイオマーカーの発現が、患者が抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに感受性であるか、または応答性であるかの指標となる発現の検出を含む。より詳細には、患者由来の試料中の、表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、1

10

20

30

40

50

2、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22または23種の遺伝子の発現が、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに患者が応答性であるか、または感受性であるかをモニタリングするのに有用である。幾つかの実施形態では、以下の群：Alk1、CD34、CD105、CD144、Col4a1、Col4a2、Dll4、EFNB2、EGFL7、ESM1、LAMA4、NG2、Nid2、Notch1、NRP1、NRP2、RGS5、Sema3f、TSP1、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3およびVIMから選択される少なくとも1つの遺伝子の発現が、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに患者が応答性であるか、または感受性であるかをモニタリングするのに有用である。本方法は、場合によっては、患者に投与するためのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の選択をさらに含むことができ、場合によっては、患者へのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の投与をさらに含むことができる。

10

【0110】

開示される方法およびアッセイは、患者を治療するための適切なまたは有効な療法を評価するのに有用なデータおよび情報を得るための、簡便、効率的かつ潜在的に費用効率が低い手段を提供する。例えば、患者は、VEGFアンタゴニストで治療する前に組織試料（例えば腫瘍生検物または血液検体）を提供することができ、様々なインビトロでのアッセイを通して試料を調査して、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに患者の細胞が感受性であるかどうかを決定することができる。

【0111】

20

本発明は、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに対する患者の感受性または応答性をモニタリングするための方法を提供する。本方法は、遺伝子またはタンパク質の発現を検出するアッセイ（PCRおよび酵素免疫アッセイなど）および適切な活性を検出する生化学的アッセイを含めた、種々のアッセイ形式で行うことができる。試料中のそうしたバイオマーカーの発現または存在の決定は、試料を提供する患者が、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストの生物学的効果に感受性であることの予測となる。本明細書の出願人らの発明は、患者由来の試料中の、表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子の発現の変化（すなわち、増大または低下）が、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに対するそうした患者の観察された治療有効性と相関するということである。実施例1は、表2の遺伝子のレベルの増大がそうした治療有効性と相関することを示し、それにより、様々な実施形態で、本明細書に記載の方法におけるそうしたレベルの検出が、本発明に含まれる。他の実施形態では、本発明は、表1または表2の遺伝子の発現解析のためのテストパネル、例えば、これらの遺伝子またはそれらのサブセット（例えば表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子）に対して特異的なプローブを含むテストパネルを含む。そうしたテストパネルは、例えば、この解析で使用するために、マイクロチップアレイ上にプローブを含むことができる。

30

【0112】

40

本発明の方法によれば、特定の個体（例えば患者）がVEGFアンタゴニストでの治療に応答すると思われる確度は、表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを検出し、その遺伝子の発現レベルを基準発現レベルと比較することによって決定することができる。例えば、基準発現レベルは、VEGFアンタゴニストへの応答性について検査を受けた患者の群／集団における上記少なくとも1つの遺伝子の中央発現レベルでもよい。幾つかの実施形態では、基準発現レベルは、先の時点で前もって個体から得た試料中の上記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルである。他の実施形態では、個体は、VEGFアンタゴニストでの前治療を原発腫瘍状態で受けた患者である。幾つかの実施形態では、個体は、転移に見舞われている患者である。表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子の基準発現レベルより大きいまたは小さい発現レベルを有する個体は

50

、VEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い対象／患者として同定される。中央値と比べて（すなわち、より高いまたはより低い）最大50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%の遺伝子発現レベルを示す対象／患者は、VEGFアンタゴニストでの治療に応答する可能性が高い患者として同定される。遺伝子発現レベルは、表1または表2に記載される遺伝子の少なくとも1つ、または表1もしくは表2に記載される遺伝子の任意の線形結合（例えば、平均、加重平均または中央値）を使用して、当技術分野で知られている方法、例えばSokal R. R. およびRhoif, F. J. (1995)「Biometry: the principles and practice of statistics in biological research」W. H. Freeman and Co. New York, NY. に記載されている方法を使用して、決定することができる。上記のように、本方法は、場合によっては、患者に投与するためのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の選択をさらに含むことができ、場合によっては、患者へのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の投与をさらに含むことができる。

【0113】

上記の方法のいずれかでは、特定のセットの遺伝子の発現が中心平均値に対して集団的に過剰発現または低発現する程度に関する定量的な情報を提供する、VDVシグネチャスコア (VDV_i) を計算することができる。例えば、 VDV_i は、VDV遺伝子のすべて（例えば表1または表2を参照されたい）が解析された各試料*i*について計算することができ、これは、解析されたVDV遺伝子の全体にわたるzスコアの加重平均を表し、アルゴリズム：

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

によって与えられ、式中、 $Z_{g=1,i}$ 、 $Z_{g=2,i}$ 、...、 $Z_{g=n,i}$ は、試料*i*の各遺伝子またはバイオマーカー*g* ($g=1$ から $g=n$) に対する発現値の標準化されたzスコアであり、第1の定義された閾値より低い VDV_i は、基準レベルに対して低下すること（例えば集団的な低発現）を示し、第2の定義された閾値を超える VDV_i は、基準レベルに対して増大すること（例えば集団的な過剰発現）を示す。各遺伝子またはバイオマーカー*g* ($g=1$ から $g=n$) に対する発現値は、例えば各遺伝子*g*またはバイオマーカー ($g=1$ から $g=n$) に対するqRT-PCRの値でもよい。第1の定義された閾値は、-4から-0.5（例えば-4、-3.5、-3、-2.5、-2、-1.5、-1または-0.5）でもよく、第2の定義された閾値は、0.5から4（例えば0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5または4）でもよい。ある場合では、第1の定義された閾値は、-4から-1（例えば-4、-3.5、-3、-2.5、-2、-1.5または-1）でもよく、第2の定義された閾値は、1から4（例えば1、1.5、2、2.5、3、3.5または4）でもよい。他の場合では、第1の定義された閾値は、-4から-1.5（例えば-4、-3.5、-3、-2.5、-2または-1.5）でもよく、第2の定義された閾値は、1.5から4（例えば1.5、2、2.5、3、3.5または4）でもよい。あるいは、第1の定義された閾値は、-4から-2（例えば-4、-3.5、-3、-2.5または-2）でもよく、第2の定義された閾値は、2から4（例えば2、2.5、3、3.5または4）でもよい。

【0114】

一態様では、本発明は、血管新生障害の患者が抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストでの治療に応答するかどうかをモニタリングする方法であって、任意のVEGFアンタゴニストが患者へ投与される前に得られた患者由来の試料において、バイオマーカーとして、表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子（例えばAlk1、CD3

4、CD105、CD144、Col4a1、Col4a2、D114、EFNB2、EGFL7、ESM1、LAMA4、NG2、Nid2、Notch1、NRP1、NRP2、RGS5、Sema3f、TSP1、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3およびVIMのうちの少なくとも1つの発現を評価することを含む方法を提供する。基準レベル（上記を参照されたい）に対する、表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子の発現の変化（すなわち増大または低下）は、患者が、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストでの治療に応答することを示す。

【0115】

別の実施形態では、本発明は、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに対する患者の感受性または応答性をモニタリングする方法を提供する。本方法は、表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子の遺伝子発現を患者の試料から評価すること、および抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに対する患者の感受性または応答性を予測することを含み、ここでは、表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子の発現の変化（すなわち増大または低下）がVEGFアンタゴニストを用いる有効な治療に対する患者の感受性または応答性と相関する。本方法によれば、生体試料は、任意のVEGFアンタゴニストを投与する前に患者から得られ、表1または表2に記載される少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子の発現産物がこの試料に存在するかどうかを評価するためにアッセイにかけられる。基準レベル（例えば上記を参照されたい）に対して、表1または表2に記載される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の遺伝子の発現が変化（すなわち増大または低下）する場合は、患者は、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストでの治療に感受性または応答性であると決定される。上記のように、本方法は、場合によっては、患者に投与するためのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の選択をさらに含むことができ、場合によっては、患者へのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の投与をさらに含むことができる。

【0116】

生物システムはいくらか可変性があり、必ずしも完全に予測可能とは限らず、そのため、多くの優れた診断検査または治療薬が時折効果的でないことを、医療分野の、特に診断検査および治療薬を用いる治療の適用に係る当業者なら認識するであろう。したがって、検査結果、患者の状態および病歴ならびに主治医自身の経験に基づいて、個々の患者に対する最も適切な治療方針を決定するのは、最終的に主治医の判断にかかっている。例えば、特に、他の明らかな治療選択のすべてまたは多くが失敗した場合、または別の治療と共に与えるときにいくらかの相乗作用が予測される場合に、診断検査のデータまたは他の判定基準からのデータに基づいて、患者がVEGFアンタゴニストに特に感受性であると予想されないときでさえ、医師が、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストで患者を治療することを選択する場合さえあり得る。

【0117】

さらに明示された実施形態では、本発明は、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストでの治療に対する患者の感受性を予測する、またはVEGFアンタゴニストでの治療に患者が効果的に応答するかどうかを予測する方法であって、本明細書で同定された試料中で発現する遺伝子バイオマーカーの1種または複数のレベルを評価すること、およびVEGFアンタゴニストによる障害に対する患者の感受性を予測することと含み、これらの遺伝子バイオマーカーの1種または複数の発現レベルが、VEGFアンタゴニストでの治療への有効な応答に対する患者の高感受性と相関する方法を提供する。

【0118】

本発明は、その発現レベルがVEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに対する特定の患者の感受性または応答性を予測するバイオマーカーを同定する方法であって、(a) VEGFアンタゴニストに対して様々な感受性を示す、細胞パネル中の候補バイオマーカーの発現レベルを測定すること、および(b)細胞中の前記候補バイオマーカーの発現レベル、血清陽性、または存在と、VEGFアンタゴニストに対する患者の感受性または応答性との間の相関を特定することを含み、相関が、前記バイオマーカーの発現レベル、血清陽性または存在がVEGFアンタゴニストによる治療に対する患者の応答性を予測することを示す方法をさらに提供する。本方法の一実施形態では、細胞パネルは、患者または実験動物モデルに由来する試料から調製される試料のパネルである。追加的な実施形態では、細胞パネルは、マウス異種移植の細胞系統のパネルであり、応答性は、例えば、応答性の分子マーカー、例えばAlk1、CD34、CD105、CD144、Col4a1、Col4a2、D114、EFNB2、EGFL7、ESM1、LAMA4、NG2、Nid2、Notch1、NRP1、NRP2、RGS5、Sema3f、TSP1、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3およびVIMの少なくとも1つをモニタリングすることによって決定することができる。

10

【0119】

本発明はまた、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストに対する感受性または応答性をモニタリングするのに有用なバイオマーカーを同定する方法であって、(a)任意の用量のVEGFアンタゴニストが患者へ投与される前に得られた血管新生障害の患者由来の試料において、候補バイオマーカーのレベルを測定することを含み、コントロールに

20

【0120】

試料は、血管新生障害を患っていることが疑われるか、もしくは血管新生障害を患っていると診断され、それ故に治療を必要としていると思われる患者から、またはいかなる障害も疑われない正常な個体から、取得することができる。マーカー発現の評価については、患者の試料、例えば細胞またはこれらの細胞によって産生されたタンパク質もしくは核酸を含むものを本発明の方法で使用することができる。本発明の本方法では、バイオマーカーのレベルは、試料、好ましくは、組織試料(例えば腫瘍組織試料、生検物など)中のマーカー量(例えば絶対量または濃度)を評価することによって決定することができる。加えて、バイオマーカーのレベルは、検出可能なレベルのバイオマーカーを含む体液または排泄物において評価することができる。本発明で試料として有用な体液または分泌物には、例えば血液、尿、唾液、便、胸膜液、リンパ液、痰、腹水、前立腺液、脳脊髄液(CSF)または任意の他の体分泌液またはそれらの誘導体が含まれる。血液という単語は、全血、血漿、血清または血液の任意の誘導体を含むことを意図する。そうした体液または排泄物におけるバイオマーカーの評価は、侵襲的サンプリング法が不適切なまたは不都合な状況で、好ましいこともあり得る。しかし、体液試料の場合には、本明細書で検査試料は、好ましくは、血液、滑液膜組織または滑液、最も好ましくは血液である。

30

40

【0121】

試料は、凍結物、新鮮物、固定(例えばホルマリン固定)物、遠心分離物および/または包埋(例えばパラフィン包埋)物などでもよい。当然ながら、細胞試料は、試料中のマーカーの量を評価するのに先立って、種々の周知の採取後の調製法および保存法(例えば核酸および/またはタンパク質抽出、固定、保存、凍結、限外濾過、濃縮、蒸発、遠心分離など)にかけることができる。同様に、生検物も、採取後の調製法および保存法、例えば固定にかけることができる。

【0122】

上記のように、すべての方法は、場合によっては、患者に投与するためのVEGFアンタゴニスト(例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体)の選択をさらに含むことができ

50

、場合によっては、患者へのVEGFアンタゴニスト（例えばベバシズマブなどの抗VEGF抗体）の投与をさらに含むことができる。

【0123】

A. 遺伝子発現の検出

本明細書に記載の遺伝子バイオマーカーは、当技術分野で既知の任意の方法を使用して検出することができる。例えば、哺乳動物由来の組織または細胞試料は、ノーザン、ドットブロットまたはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析、アレイハイブリダイゼーション、RNAseプロテクションアッセイを使用して、またはDNAマイクロアレイスナップショットを含めた、市販品として入手可能なDNA SNPチップマイクロアレイを使用して、例えば目的の遺伝子バイオマーカー由来のmRNAまたはDNAについて好都合にはアッセイすることができる。例えば定量的PCRアッセイなどのリアルタイムPCR（RT-PCR）アッセイが当技術分野で周知である。本発明の例示的实施形態では、生体試料中の目的の遺伝子バイオマーカー由来のmRNAを検出するための方法は、少なくとも1つのプライマーを使用して逆転写によって試料からcDNAを生成すること、およびそのようにして生成されたcDNAを増幅すること、および増幅cDNAの存在を検出することを含む。加えて、そうした方法は、（例えば、アクチンファミリーメンバーなどの「ハウスキーピング」遺伝子の比較コントロールmRNA配列のレベルを同時に調査することによって）生体試料中のmRNAレベルを決定することを可能にする1つまたは複数のステップを含むことができる。場合によっては、増幅cDNAの配列を決定することができる。

【0124】

1. 核酸の検出

特定の一実施形態では、表1または表2に記載される遺伝子の発現は、RT-PCR技術によって行うことができる。PCRに使用されるプローブは、検出可能なマーカー、例えば放射性同位元素、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレートまたは酵素などで標識することができる。そうしたプローブおよびプライマーを使用して、試料において、表1または表2に記載される発現遺伝子の存在を検出することができる。当業者なら理解するように、非常に多くの異なるプライマーおよびプローブを、本明細書に提供する配列に基づいて調製することができ、表1もしくは表2に記載される発現遺伝子の増幅、クローニング、ならびに／または存在および／もしくはレベルを決定するために効果的に使用することができる。

【0125】

他の方法には、マイクロアレイ技術によって、組織または細胞試料の、表1または表2に記載される遺伝子の少なくとも1つに由来するmRNA（例えばAlk1、CD34、CD105、CD144、Col4a1、Col4a2、Dl14、EFNB2、EGFL7、ESM1、LAMA4、NG2、Nid2、Notch1、NRP1、NRP2、RGS5、Sema3f、TSP1、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3およびVIMのmRNA）を調査または検出するプロトコルが含まれる。核酸マイクロアレイを使用して、検査およびコントロールの組織試料由来の検査およびコントロールのmRNA試料を逆転写し、標識して、cDNAプローブを生成する。次いで、このプローブを、固体支持体上に固定化された核酸アレイにハイブリダイズする。アレイは、アレイの各メンバーの配列および位置が分かるように構成する。例えば、ある種の疾病状態で発現する可能性がある遺伝子を選択したものを固体支持体上に配列する。特定のアレイメンバーとの標識プローブのハイブリダイゼーションは、プローブが由来する試料がその遺伝子を発現することを示す。疾患組織の差次的遺伝子発現解析は、有用な情報を提供し得る。マイクロアレイ技術は、核酸ハイブリダイゼーション法およびコンピュータ技術を利用して、単一の実験で、何千もの遺伝子のmRNA発現プロファイルを評価する（例えばWO2001/75166を参照されたい）。アレイ製作の議論については、例えば米国特許第5,700,637号、米国特許第5,445,934号および米国特許第5,807,522号、Lockart、Nature Biotechnology、14:1675

～1680 (1996) ; および Cheung ら、Nature Genetics 21 (補遺) : 15～19 (1999) を参照されたい。

【0126】

加えて、EP1753878に記載されているマイクロアレイを利用するDNAプロファイリングおよび検出方法を用いることができる。本方法は、ショートタンデムリピート (STR) 解析およびDNAマイクロアレイを利用して、種々のDNA配列を迅速に同定かつ区別する。一実施形態では、標識STRの標的配列を、相補的プローブを保持するDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせる。こうしたプローブは、見込まれるSTRの範囲をカバーするために、長さが様々である。DNAハイブリッドの標識された一本鎖領域は、ハイブリダイゼーション後の酵素消化を利用して、マイクロアレイ表面から選択的に除去する。未知の標的における反復数は、マイクロアレイにハイブリダイズしたままの標的DNAのパターンに基づいて推定される。

10

【0127】

マイクロアレイプロセッサの一例は、Affymetrix GENECHIP (登録商標) システムであり、これは市販品として入手可能であり、ガラス表面上でオリゴヌクレオチドを直接合成することによって制作されたアレイを含む。当業者に知られているような他のシステムを使用してもよい。

【0128】

RT-PCRまたは別のPCRベース方法以外のバイオマーカーのレベルを決定する他の方法には、プロテオミクス法、および分子レベルでの患者の応答に基づいて血管新生障害を治療するのに必要な、個別化された遺伝子プロファイルが含まれる。本明細書の特殊化したマイクロアレイ、例えばオリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはcDNAマイクロアレイは、1種または複数の抗VEGF抗体に対する感受性または抵抗性のいずれかと相関する発現プロファイルを有する1種または複数のバイオマーカーを含むことができる。本発明で使用するために、核酸を検出するのに使用することができる他の方法は、例えばRNAseqなどのRNAベースの遺伝子解析を含めた、ハイスループットRNA配列発現解析を含む。

20

【0129】

上記の技法を適用する際の案内を提供するのに、多くの参考文献が利用可能である (Kohler ら、Hybridoma Techniques (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980) ; Tijssen、Practice and Theory of Enzyme Immunoassays (Elsevier, Amsterdam, 1985) ; Campbell、Monoclonal Antibody Technology (Elsevier, Amsterdam, 1984) ; Hurrell、Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications (CRC Press, Boca Raton, FL, 1982) ; および Zola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、147～158頁 (CRC Press, Inc.、1987))。ノーザンブロット解析は、当該技術分野で周知の従来型の技法であり、例えば、Molecular Cloning, a Laboratory Manual、第2版、1989、Sambrook、Fritsch、Maniatis、Cold Spring Harbor Press、10 Skyline Drive、Plainview、NY 11803-2500に記載されている。遺伝子および遺伝子産物の状態を評価するための典型的なプロトコールは、例えば Ausubel ら編、1995、Current Protocols In Molecular Biology、ユニット2 (Northern Blotting)、4 (Southern Blotting)、15 (Immunoblotting) および18 (PCR Analysis) に見られる。

30

40

【0130】

2. タンパク質の検出

50

例えば、A l k 1、C D 3 4、C D 1 0 5、C D 1 4 4、C o l 4 a 1、C o l 4 a 2、D l l 4、E F N B 2、E G F L 7、E S M 1、L A M A 4、N G 2、N i d 2、N o t c h 1、N R P 1、N R P 2、R G S 5、S e m a 3 f、T S P 1、V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3およびV I Mの少なくとも1つなどのタンパク質バイオマーカーの検出に関しては、様々なタンパク質アッセイが利用可能であり、これらには、例えば抗体ベースの方法ならびに質量分光法および当技術分野で既知の他の類似した手段が含まれる。抗体ベースの方法の場合は、例えば、試料を、抗体-バイオマーカー複合体が形成するのに十分な条件下で前記バイオマーカーに対して特異的な抗体と接触させ、次いで、前記複合体を検出することができる。タンパク質バイオマーカーの存在の検出は、血漿または血清を含めた多種多様の組織および試料をアッセイするための幾つかの方法で、例えばウェスタンブロット法（免疫沈降法と共にまたは無しで）、二次元SDS-PAGE法、免疫沈降法、蛍光活性化セルソーティング法（FACS）、フローサイトメトリ法およびELISA法によって達成することができる。そうしたアッセイ形式を使用する幅広いイムノアッセイ法が利用可能であり、例えば米国特許第4,016,043号、第4,424,279号および第4,018,653号を参照されたい。これらには、非競合型の単一部位および二部位または「サンドイッチ」アッセイ、ならびに伝統的な競合的結合アッセイの両方が含まれる。これらのアッセイは、標的バイオマーカーへの標識抗体の直接結合も含む。

10

【0131】

サンドイッチアッセイは、中でも最も有用で、一般に使用されているアッセイである。サンドイッチアッセイ法の幾つかの変形が存在し、すべてが本発明に包含されることが意図される。簡単に述べると、典型的なフォワードアッセイでは、未標識抗体を固体基板に固定し、検査試料をその結合分子に接触させる。適切なインキュベーション時間、すなわち抗体-抗原複合体を形成させるのに十分な時間の後、次いで、検出可能なシグナルを生成可能なレポーター分子で標識された、抗原に特異的な二次抗体を添加し、別の抗体-抗原-標識抗体複合体を形成させるのに十分な時間インキュベートする。いかなる未反応物質も洗い流し、レポーター分子によって生成されたシグナルを観察することによって、抗原の存在を決定する。結果は、可視シグナルの単純な観察による定性的なものでもよい、既知の量のバイオマーカーを含むコントロール試料と比較して定量化してもよい。

20

【0132】

フォワードアッセイの変形には、試料と標識抗体の両方を結合抗体に同時に添加する同時アッセイが含まれる。容易に明らかになるような任意の軽微な変異を含めたこうした技法は、当業者に周知である。典型的なフォワードサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーに特異性を有する一次抗体は、共有結合的または受動的のいずれかで固体表面に結合させる。固体表面は、典型的にはガラスまたはポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンである。固体支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートのディスクの形態、またはイムノアッセイを行うのに適した任意の他の表面の形態でもよい。結合方法は、当技術分野で周知であり、一般に架橋共有結合または物理的吸着からなり、ポリマー-抗体複合体は、検査試料の調製中に洗浄される。次いで、検査試料の一定量を固相複合体に添加し、十分な時間（例えば、2〜40分、またはより好都合には一晩）、適切な条件下（例えば、25℃から32℃など（両数値を含む）、室温から40℃）でインキュベートし、抗体に存在する任意のサブユニットを結合させる。インキュベーション時間に続いて、抗体サブユニット固相を洗浄し、乾燥させ、バイオマーカーの一部に特異的な二次抗体と共にインキュベートする。二次抗体は、分子マーカーへの二次抗体の結合を示すのに使用されるレポーター分子に結合している。

30

40

【0133】

代替方法は、試料中の標的バイオマーカーを固定化し、次いでレポーター分子で標識されていても、標識されていなくてもよい特異的な抗体に、固定化された標的を曝露することを含む。標的の量およびレポーター分子のシグナル強度に応じて、結合した標的を、抗

50

体を用いた直接標識によって検出することができる。あるいは、一次抗体に特異的な二次標識抗体を、標的—一次抗体複合体に曝露して、標的—一次抗体—二次抗体三重複合体を形成する。この複合体を、レポーター分子によって放射されるシグナルで検出する。本明細書で使用する場合、「レポーター分子」は、その化学的性質によって、抗原結合抗体の検出を可能にする分析的に同定可能なシグナルをもたらす分子を意味する。このタイプのアッセイで最も一般的に使用されるレポーター分子は、酵素、フルオロフォアまたは放射性核種含有分子（すなわち放射性同位元素）および化学発光分子のいずれかである。

【0134】

酵素イムノアッセイの場合は、一般にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸によって、酵素を二次抗体にコンジュゲートする。しかし、容易に認識されるように、多種多様の異なるコンジュゲーション法が存在し、それらは、当業者が容易に利用可能である。一般に使用される酵素には、中でも、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコース酸化酵素、 β -ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼが含まれる。特異的酵素と共に使用される基質は、対応する酵素による加水分解時に検出可能な色調変化をもたらすために、一般に選択される。適切な酵素の例としては、 β -ガラクトシダーゼおよびペルオキシダーゼが挙げられる。上記の発色基質の代わりに、蛍光産物を発生させる、蛍光発生基質を用いることも可能である。すべての場合で、酵素—標識抗体を一次抗体—分子マーカー複合体に添加し、結合させ、次いで過剰な試薬を洗い流す。次いで、適切な基質を含む溶液を抗体—抗原—抗体複合体に添加する。基質は、二次抗体に連結された酵素と反応し、定性的な可視シグナルを生じさせ、このシグナルは、通常分光光度的にさらに定量化して、試料中に存在したバイオマーカーの量の指標を与えることができる。代わりに、蛍光化合物、例えばフルオレセインおよびローダミンを、それらの結合能力を変化させないで、化学的に抗体に結合させてもよい。特定の波長の光を用いた照明によって活性化されたときに、蛍光色素標識抗体は光エネルギーを吸収し、分子中に励起状態を誘発し、続いて、光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色の光を放射する。EIAと同様に、蛍光標識された抗体は、一次抗体—分子マーカー複合体へ結合することができる。未結合の試薬を洗い流した後、次いで、残存三重複合体を適切な波長の光にあてて、観察される蛍光によって、目的の分子マーカーの存在が示される。免疫蛍光法およびEIA法は、両方とも当技術分野で非常によく確立されている。しかし、他のレポーター分子、例えば放射性同位元素分子、化学発光分子または生物発光分子を用いることもできる。

【0135】

B. キット

バイオマーカーの検出で使用するために、キットまたは製造品も本発明によって提供される。そうしたキットは、血管新生障害の対象がVEGFアンタゴニストに対して実際上応答性であるかどうかを決定するのに使用することができる。こうしたキットは、バイアル、チューブなどの1つまたは複数の容器手段を厳重に閉じ込めて収容するように区分された運搬手段を含むことができ、各容器手段は、本方法で使用される別々の要素のうちの1つを含む。例えば、容器手段のうちの1つは、検出可能な程度に標識された、または検出可能な程度に標識可能なプローブを含むことができる。そうしたプローブは、抗体またはタンパク質もしくはメッセージに対してそれぞれ特異的なポリヌクレオチドでもよい。キットが、標的核酸を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合は、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチド（複数可）を含む容器、および／またはレポーター分子、例えば酵素標識、蛍光標識もしくは放射性同位元素標識に結合したデオチン結合タンパク質などのレポーター手段、例えばアビジンもしくはストレプトアビジンを含む容器を有することができる。

【0136】

そうしたキットは、上記の容器、ならびにバッファー、希釈剤、フィルター、針、注射器および使用のための指示を伴う添付文書を含めた、商業的および使用者の観点から望ましい材料を含有する、1つまたは複数の他の容器を典型的には含む。ラベルは、組成物が特定の用途に使用されることを示すように容器上に存在してもよく、インビボまたはイン

ビトロのいずれかでの使用のための指示、例えば上記のものを示してもよい。

【0137】

本発明のキットは、幾つかの実施形態を有する。典型的な実施形態は、容器、前記容器上のラベルおよび前記容器に含まれた組成物を含むキットであり、組成物は、タンパク質または自己抗体バイオマーカーに結合する一次抗体を含み、前記容器上のラベルは、組成物が、試料中のそうしたタンパク質または抗体の存在を評価するのに使用することができることを示し、キットは、特定の試料タイプ中のバイオマーカータンパク質の存在を評価するために抗体を使用することについての指示書を含む。キットは、試料を調製し、試料に抗体をアプライするための一連の指示書および材料をさらに含むことができる。キットは、一次抗体および二次抗体の両方を含むことができ、二次抗体は、標識、例えば酵素標識にコンジュゲートされている。

10

【0138】

別の実施形態は、容器、前記容器上のラベルおよび前記容器に収容された組成物を含むキットであり、組成物は、表1または表2に記載されるバイオマーカーの相補体にストリンジент条件下でハイブリダイズする1種または複数のポリヌクレオチドを含み、前記容器上のラベルは、組成物が、試料中の、表1または表2に記載されるバイオマーカーの存在を評価するのに使用できることを示し、キットは、特定の試料タイプ中のバイオマーカーRNAまたはDNAの存在を評価するためにポリヌクレオチド（複数可）を使用することについての指示書を含む。

【0139】

20

キットの他の任意成分には、1種または複数のバッファー（例えばブロッキングバッファー、洗浄バッファー、基質バッファーなど）、他の試薬、例えば酵素標識によって化学的变化を受ける基質（例えば色素原）、エпитープ回収溶液、コントロール試料（陽性および／または陰性コントロール）、コントロールスライド（複数可）などが含まれる。キットは、キットを使用して得られた結果を解釈することについての指示書を含むこともできる。

【0140】

抗体ベースのキットに関するさらなる特定の実施形態では、キットは、例えば、（1）バイオマーカータンパク質に結合する（例えば固体支持体に付着させられた）一次抗体、および場合によっては、（2）タンパク質または一次抗体のいずれかに結合し、かつ検出可能な標識にコンジュゲートされた第2の異なる抗体を含むことができる。

30

【0141】

オリゴヌクレオチドベースのキットに関しては、キットは、例えば、（1）オリゴヌクレオチド、例えば、バイオマーカータンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズする、検出可能な程度に標識されたオリゴヌクレオチド、または（2）バイオマーカー核酸分子を増幅するのに有用な1組のプライマーを含むことができる。キットは、例えば緩衝剤、防腐剤またはタンパク質安定化剤を含むこともできる。キットは、検出可能な標識を検出するのに必要な成分（例えば酵素または基質）をさらに含むことができる。キットは、アッセイされ、かつ検査試料と比較され得る、コントロール試料または一連のコントロール試料を含むこともできる。キットの各成分は、個々の容器内に封入することができ、様々な容器のすべてを、キットを使用して行われるアッセイの結果を解釈することについての指示書と共に、単一パッケージ内に入れることができる。

40

【0142】

C. 統計

本明細書で使用する場合、予測ルールの一般的な形態は、応答または非応答を予測するための、またはより一般的には、適切に定義された臨床エンドポイントの点から利益または利益の欠如を予測するための臨床的共変量を潜在的に含む、1つまたは複数のバイオマーカーの関数の仕様にある。

【0143】

予測ルールの最も単純な形態は、共変量を有さない一変量モデルからなり、予測は、カ

50

ットオフまたは閾値によって決定される。これは、特定のカットオフ c およびバイオマーカー測定値 x についてのヘビサイド関数の点から表すことができ、二値予測 A または B が作られることになり、次いで、 $H(x - c) = 0$ ならば A を予測し、 $H(x - c) = 1$ ならば B を予測する。

【0144】

これは、予測ルールで一変量バイオマーカー測定値を使用する最も単純な方法である。そうした単純なルールが十分である場合は、そのルールによって、効果の方向性、すなわち、高いまたは低い発現レベルが患者にとって有利であるかどうかを単純に特定することが可能になる。

【0145】

臨床的共変量を考慮する必要がある場合、および／または複数のバイオマーカーが多変量の予測ルールで使用される場合は、状況はより複雑になり得る。以下の2つの仮説例は、関係する問題点を例示する。

【0146】

共変量調整（仮説例）：

バイオマーカー X に関して、高発現レベルが悪い臨床応答と関係があることが、臨床試験集団で見られる（一変量解析）。より厳密な解析によって、2つのタイプの臨床応答がこの集団中に存在し、その第1の群が第2の群より応答が悪く、同時に、第1の群についてのバイオマーカーの発現が、少なくとも1用量のVEGFアンタゴニストの投与後に一般に高いことが示される。調整された共変量解析によって、各群について、臨床的利益と臨床応答との関係が逆転すること、すなわち、群内でより低い発現レベルが、よりよい臨床応答と関係があることが明らかになる。全体的な反対の効果は、共変量タイプによってマスクされ、予測ルールの一部としての共変量を調整した解析は方向性を逆転させた。

【0147】

多変量予測（仮説例）：

バイオマーカー X に関して、高発現レベルが悪い臨床応答とわずかに関係があることが、臨床試験集団において見出される（一変量解析）。第2のバイオマーカー Y に関して、類似した観察が一変量解析によって行われた。 X と Y の組み合わせによって、両方のバイオマーカーが低い場合に優れた臨床応答が見られることが明らかになった。これにより、両方のバイオマーカーがあるカットオフよりも低い場合に利益を予測するためのルールが作られる（ヘビサイド予測関数のAND-接続）。この組み合わせルールに関しては、一変量の意味における単純なルールはもはやあてはまらず、例えば、 X の発現レベルが低くても、よりよい臨床応答を自動的に予測しない。

【0148】

これらの単純な例は、共変量を有するおよび有さない予測ルールが、各バイオマーカーの一変量レベルで判断できないことを示す。複数のバイオマーカーの組み合わせと共変量による潜在的な調整は、単一のバイオマーカーに対して単純な関係を割り当てさせない。マーカー遺伝子、特に血清のマーカー遺伝子は、他の臨床的共変量を含む可能性がある複数のマーカーの予測モデルで使用され得るので、そうしたモデル内の単一のマーカー遺伝子の有益効果の方向性は単純な方法で決定することができず、一変量解析で見出された方向性、すなわち単一のマーカー遺伝子について説明される状況と矛盾する可能性がある。

【0149】

臨床医は、当技術分野で既知の幾つかの方法のうちのいずれかを使用して、VEGFアンタゴニストの特定の投薬計画の有効性を測定することができる。例えば、療法に対する相対的な有効な応答性を決定するために、インビボでの撮像（例えばMRI）を使用して、腫瘍サイズを決定し、任意の転移を特定することができる。最適な所望の応答（例えば治療応答）を提供するために、投薬レジメンを調整することができる。例えば、1用量を投与してもよいし、幾つかの分割用量を経時的に投与してもよいし、治療状況の緊急性により示される通りに、用量を比例的に低減または増大させてもよい。

【0150】

当分野で通常の技術を有する医師は、特定のアンタゴニストタイプなどの要因に応じて、必要とされる有効量の医薬組成物を容易に決定および処方することができる。例えば、医師は、所望の治療的効果を達成するために必要とされるよりも低いレベルで医薬組成物に用いられるそうしたアンタゴニスト、例えば抗VEGF抗体の用量で開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に投薬量を増大させることができる。アンタゴニストの所与の用量のまたは治療レジメンの有効性は、例えば、有効性の標準的な尺度を使用して患者の徴候および症状を評価することによって、決定することができる。

【0151】

さらに別の実施形態では、対象は、抗VEGF抗体などの同一のアンタゴニストで少なくとも2回治療される。したがって、初回および2回目のアンタゴニストの曝露は、好ましくは同一のアンタゴニストを用い、より好ましくはすべてのアンタゴニストの曝露は同一のアンタゴニストを用いる。すなわち、最初の2つの曝露に関する、好ましくはすべて曝露に関する治療は、1つのタイプのVEGFアンタゴニスト、例えば抗VEGF抗体などの、VEGFに結合するアンタゴニストを用い、例えばすべてベバシズマブを用いる。

【0152】

本明細書に記載されるすべての本発明の方法では、アンタゴニスト（VEGFに結合する抗体など）は、ネイキッド抗体のようにコンジュゲートされていなくてもよいし、さらなる有効性のために、例えば半減期を改善するために、別の分子でコンジュゲートされていてもよい。

【0153】

本明細書の好ましいアンタゴニスト抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体、より好ましくは抗VEGF抗体、最も好ましくはベバシズマブである。

【0154】

別の実施形態では、VEGFアンタゴニスト（例えば抗VEGF抗体）は、対象に投与される唯一の医薬である。

【0155】

一実施形態では、アンタゴニストは、約100もしくは400mgの用量で、1、2、3もしくは4週毎に投与される、または約1、3、5、10、15もしくは20mg/kgの用量で、1、2、3もしくは4週毎に投与される、抗VEGF抗体である。この用量は、注入のように、単回用量としてまたは複数回用量として（例えば2または3用量）投与することができる。

【0156】

さらに別の態様では、本発明は、診断ステップの後に、血管新生障害の対象にVEGFアンタゴニスト（例えば抗VEGF抗体）の投与を続けるかどうかを判定する方法であって、1回目のアンタゴニストを投与した後に、撮像法、例えばX線撮影および／またはMRIを使用して、腫瘍サイズの低減を測定し、2回目のアンタゴニストを投与した後に、撮像法、例えばX線撮影および／またはMRIを使用して、対象の腫瘍サイズの低減を測定することを含み、1回目および2回目の対象の画像所見を比較し、スコアが1回目よりも2回目で小さい場合は、アンタゴニストの投与を続ける方法を提供する。

【0157】

さらに別の実施形態では、応答レベルが血管新生障害を治療するのに有効であることを決定するために、投与ステップの後に、治療に対する対象の応答を検査するステップが治療方法に含まれる。例えば、投与後に画像（X線検査および／またはMRI）スコアを検査し、それを投与前に得たベースライン画像結果と比較して、スコアが変化したか、およびどの程度変化したかを測定することによって、治療が有効であるかどうかを決定するステップが含まれる。この検査は、投与後に、予定されたまたは予定されていない様々な時間間隔で反復して、任意の部分的または完全な寛解が維持されていることを決定することができる。あるいは、本明細書の方法は、上記のように、血管新生障害に関する1種または複数のバイオマーカーまたは症状が存在するかどうかを確かめるために、投与前に対象を検査するステップを含む。

【0158】

本発明の一実施形態では、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニスト以外の他の医薬は、血管新生障害を治療するために対象に投与されない。

【0159】

本明細書の方法のいずれかでは、VEGFアンタゴニストは、有効量の第2の医薬と組み合わせて投与することができる（この場合、VEGFアンタゴニスト（例えば抗VEGF抗体）が第1の医薬である）。適切な第2の医薬には、例えば抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0160】

すべてのこれらの第2の医薬は、互いに組み合わせて、または単独で、第1の医薬と共に使用することができ、したがって、本明細書で使用する表現「第2の医薬」は、第1の医薬に加えてそれが唯一の医薬であることを意味しない。したがって、第2の医薬は、単一の医薬である必要はなく、1つより多いそうした薬物を構成しても含んでもよい。

10

【0161】

本明細書に記載されるこれらの第2の医薬は、一般に、上記で使用したのと同じの投薬量および投与経路で使用するか、またはこれまでに用いられた投薬量の約1～99%で使用する。そうした第2の医薬が仮にも使用される場合は、それによって引き起こされる副作用を失くすまたは低減するために、好ましくは、それらは、特に第1の医薬を用いた初回の投薬の後の引き続く投薬において、第1の医薬が存在しない場合よりも低い量で使用する。

20

【0162】

本明細書に記載の再治療に関しては、第2の医薬が、アンタゴニストの曝露と共に有効量で投与される場合は、第2の医薬は、任意の曝露と共に、例えば1回の曝露のみまたは1回より多い曝露と共に投与することができる。一実施形態では、第2の医薬は、初回曝露と共に投与される。別の実施形態では、第2の医薬は、初回および2回目の曝露と共に投与される。さらに別の実施形態では、第2の医薬は、すべての曝露と共に投与される。プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロンおよびシクロホスファミドなどの副作用がある薬剤への対象の暴露を低減するために、ステロイドなどの初回曝露の後に、そうした第2の医薬の量を低減するまたは無くするのが好ましい。

【0163】

第2の医薬の組み合わせ投与には、別々の製剤または単一の医薬製剤を使用する同時投与（併用投与）およびいずれかの順番での連続投与が含まれ、好ましくは、両方（またはすべて）の活性薬剤（医薬）が、それらの生物活性を同時に発現する期間が存在する。

30

【0164】

本明細書のアンタゴニストは、非経口、局所、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内および／または病巣内投与を含めた、任意の適切な手段で投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内（i. v.）、動脈内、腹腔内または皮下投与が含まれる。髄腔内投与も企図される。加えて、アンタゴニストは、例えばアンタゴニストの用量を漸減させて、パルス注入によって適切に投与することができる。好ましくは、投薬は静脈内または皮下で投じられ、より好ましくは静脈内注入（複数可）によって投じられる。

40

【0165】

複数のアンタゴニスト曝露が提供される場合は、各曝露は、同一または異なる投与手段を使用して提供されてもよい。一実施形態では、各曝露は静脈内投与による。別の実施形態では、各曝露は、皮下投与によって与えられる。さらに別の実施形態では、曝露は、静脈内投与と皮下投与の両方によって与えられる。

【0166】

一実施形態では、抗VEGF抗体などのアンタゴニストは、静脈内プッシュまたは静脈内ボラスよりはむしろ緩徐静脈内注入として投与される。例えば、プレドニゾロンまたはメチルプレドニゾロンなどのステロイド（例えば約80～120mg i. v.、より具体的には約100mg i. v.）は、抗VEGF抗体の任意の注入の約30分前に投

50

与される。例えば、抗VEGF抗体は、専用ラインを介して注入される。

【0167】

抗VEGF抗体への多用量暴露の初回用量、または曝露が1用量のみを要する場合の単回用量に関しては、そうした注入は、好ましくは約50mg/時間の速度で開始される。これは、例えば、約30分毎に約50mg/時間の速度で最大約400mg/時間まで増大させるなど、段階的に増大させてもよい。しかし、対象が注入関連反応に見舞われている場合は、注入速度は、好ましくは、例えば現在の速度の半分に、例えば100mg/時間から50mg/時間に減速する。好ましくは、抗VEGF抗体のそうした用量（例えば約1000mgの総用量）の注入は、約255分（4時間15分）で完了する。場合によっては、対象は、アセトアミノフェン/パラセタモール（例えば約1g）およびジフェンヒドラミンHCl（例えば約50mgまたは等価用量の類似薬剤）の予防的治療を、注入の約30から60分前に経口で受ける。

10

【0168】

全曝露を達成するのに1回より多い抗VEGF抗体の注入（用量）が与えられる場合、本注入実施形態における第2のまたは引き続く抗VEGF抗体注入は、初回注入より高い速度で、例えば約100mg/時間で、好ましくは開始される。この速度は、例えば、最大約400mg/時間まで、約30分毎に約100mg/時間の速度で増大させるなど、段階的に増大させてもよい。注入関連反応に見舞われる対象は、好ましくは、注入速度をその速度の半分に、例えば100mg/時間から50mg/時間に減速させる。好ましくは、抗VEGF抗体のそうした第2のまたは引き続く用量（例えば約1000mgの全用量）の注入は、約195分（3時間15分）までに完了する。

20

【0169】

好ましい実施形態では、アンタゴニストは抗VEGF抗体であり、約0.4から4グラムの用量で投与され、より好ましくは、抗体は、約0.4から1.3グラムの用量で、1から4用量の頻度で、約1カ月の期間内に投与される。さらにより好ましくは、用量は、約500mgから1.2グラムであり、他の実施形態では、約750mgから1.1グラムである。そうした態様では、アンタゴニストは、好ましくは2から3用量で投与され、かつ/または約2から3週の期間内に投与される。

【0170】

一実施形態では、対象は、血管新生障害を治療するためのいかなる薬物（複数可）も以前に投与されたことがない。別の実施形態では、対象または患者は、血管新生障害を治療するための1種または複数の医薬（複数可）を以前に投与されている。さらなる実施形態では、対象または患者は、以前に投与された医薬の1種または複数に応答性でなかった。対象が非応答性であり得るそうした薬物には、例えば抗腫瘍剤、化学療法剤、細胞傷害性薬物、および/または増殖阻害剤が含まれる。より詳細には、対象が非応答性であり得る薬物には、抗VEGF抗体などのVEGFアンタゴニストが含まれる。さらなる態様では、そうしたアンタゴニストには、抗体またはイムノアドヘシンが含まれ、したがって、対象が以前に非応答性であった本発明の1種または複数の抗体またはイムノアドヘシンを用いる再治療が企図される。

30

【0171】

IV. アンタゴニストでの治療

アンタゴニストでの治療に最も応答性または感受性の患者集団が一旦同定されれば、単独または他の医薬と組み合わせた、本明細書でのこのアンタゴニストでの治療は、血管新生障害の改善をもたらす。例えばそうした治療は、腫瘍サイズの低減または無増悪生存をもたらすことができる。さらに、本明細書のアンタゴニストと少なくとも1つの第2の医薬（複数可）の組み合わせでの治療は、好ましくは、相加的な、より好ましくは相乗的な（または相加的より大きい）、治療的利益を患者へもたらす。好ましくは、本組み合わせ方法では、第2の医薬の少なくとも1回の投与と本明細書のアンタゴニストの少なくとも1回の投与の間のタイミングは、約1カ月以下、より好ましくは約2週間またはそれ以下である。本明細書に記載されるようなVEGFアンタゴニストの投与は、場合によっては

40

50

本発明に含まれる。したがって、さらなる実施形態では、本発明は、V E G Fアンタゴニストの投与（例えばペバシズマブなどの抗V E G F抗体）によって、患者のがん（例えば結腸直腸がん、乳がん、肺がんまたは神経膠芽細胞腫）を治療する方法であって、患者が本明細書に記載の方法によって、そうした治療の利益を享受するものとして同定されるまたは同定されている方法を提供する。

【0172】

患者がアンタゴニストに応答性の可能性が高いという診断後に、前記患者へ治療有効量のV E G Fアンタゴニストを投与する正確な方式は、主治医の裁量によることを医療分野の当業者なら理解されよう。投薬量、他の薬剤との組み合わせ、タイミングおよび投与頻度などを含めた投与様式は、患者がそうしたアンタゴニストに応答性の可能性が高いという診断、ならびに患者の状態および病歴に影響を受ける可能性がある。したがって、アンタゴニストに比較的非感受性であると予想される、血管新生障害と診断された患者でさえ、特にアンタゴニストに対する患者の応答性を変化させ得る薬剤を含めた他の薬剤と組み合わせたそのアンタゴニストでの治療の利益をなお享受し得る。

10

【0173】

アンタゴニストを含有する組成物は、優れた医療行為に矛盾しない様式で、製剤化され、用量決定され、投与される。これに関連して考慮する要因には、治療される血管新生障害の特定のタイプ、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、血管新生障害の原因、薬剤送達部位、起こり得る副作用、アンタゴニストのタイプ、投与方法、投与スケジュールおよび医師に知られている他の要因が含まれる。投与されるアンタゴニストの有効量は、そうした考慮事項に左右される。

20

【0174】

一般的な案として、用量毎に非経口的に投与されるアンタゴニストの有効量は、1または複数の投薬量で、約20mgから約5000mgの範囲である。抗V E G F抗体などの抗体に関する例示的投薬レジメンは、1、2、3または4週毎に100または400mgを含むか、または1、2、3または4週毎に約1、3、5、10、15または20mg/kgの用量を投与する。この用量は、注入のように、単回用量としてまたは複数回用量（例えば2または3用量）として投与することができる。

【0175】

しかし、上記のように、アンタゴニストのこれらの提案量は、非常に多くの治療的裁量にかけられる。適切な用量およびスケジュールを選択する際の重要な要因は、前述のように、得られる結果である。幾つかの実施形態では、アンタゴニストは、血管新生障害の最初の徴候、診断、出現または発生にできるだけ近接して投与される。

30

【0176】

アンタゴニストは、非経口、局所、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内および／または病巣内投与を含めた、任意の適切な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内または皮下投与が含まれる。髄腔内投与も企図される。加えて、アンタゴニストは、例えばアンタゴニストの用量を漸減させて、パルス注入によって適切に投与することができる。最も好ましくは、投薬は静脈内注射によって行われる。

【0177】

上記のように、本明細書のアンタゴニストと共に第2の医薬を投与することができる。組み合わせ投与には、別々の製剤または単一の医薬製剤を使用する同時投与、およびいずれかの順番での連続投与が含まれ、好ましくは、両方（またはすべて）の活性薬剤が、それらの生物活性を同時に発現する期間が存在する。

40

【0178】

上記のような伝統的な経路によるアンタゴニストの患者への投与とは別に、本発明は、遺伝子療法による投与を含む。アンタゴニストをコードする核酸のそうした投与は、表現「有効量のアンタゴニストを投与する」に包含される。例えば、細胞内抗体を生成する遺伝子療法の使用に関するWO 1996/07321を参照されたい。

【0179】

50

(場合によってはベクターに含まれた)核酸を患者細胞へ到達させるための2つの主要なアプローチが存在する;インビボおよびエクシボである。インビボ送達については、核酸を、通常アンタゴニストが必要とされる部位に直接的に患者へ注入する。エクシボ治療については、患者の細胞を取り出し、この単離細胞に核酸を導入し、この改変した細胞を、直接的に、または例えば、患者へ植え込む多孔性膜内にカプセル化して、患者へ投与する(例えば米国特許第4,892,538号および第5,283,187号を参照されたい)。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技法が存在する。技法は、核酸をインビトロで培養細胞に移行させるか、または所期の宿主の細胞にインビボで移行させるかどうかによって変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した技法には、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などの使用が含まれる。遺伝子のエクシボ送達に一般に使用されるベクターは、レトロウイルスである。

10

【0180】

現在好ましいインビボでの核酸移入法には、ウイルスベクター(アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスI型またはアデノ随伴ウイルスなど)を用いるトランスフェクション、および脂質ベースのシステム(脂質媒介性遺伝子移入に有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPEおよびDC-Cholである)が含まれる。場合によっては、標的細胞に対して特異的な薬剤、例えば標的細胞の細胞表面膜タンパク質に対して特異的な抗体、標的細胞の受容体に対するリガンドなどを核酸供給源に与えることが望ましい。リポソームが用いられる場合は、エンドサイトーシスと関係がある細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、ターゲティングおよび/または取り込みやすくするために使用することができ、例えば、特定の細胞型向性のカプシドタンパク質またはその断片、循環中に内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、および細胞内局在をターゲティングし、細胞内半減期を高めるタンパク質である。受容体媒介性エンドサイトーシスの技法は、例えば、Wuら、J. Biol. Chem. 262:4429~4432(1987);およびWagnerら、PNAS USA 87:3410~3414(1990)によって記載されている。遺伝子マーキングおよび遺伝子療法のプロトコールは、例えば、Andersonら、Science 256:808~813(1992)およびWO1993/25673に記載されている。

20

【0181】

VEGFアンタゴニストは、医薬的組み合わせ製剤中に、または組み合わせ療法としての投薬レジメン中に、抗がん特性を有する少なくとも1つのさらなる化合物と組み合わせることができる。医薬的組み合わせ製剤または投薬レジメンの上記少なくとも1つのさらなる化合物は、それらが互いに悪影響を及ぼさないように、好ましくは、VEGFアンタゴニスト組成物に対して相補的な活性を有する。

30

【0182】

上記少なくとも1つのさらなる化合物は、化学療法剤、細胞傷害性薬物、サイトカイン、増殖阻害剤、抗ホルモン剤およびそれらの組み合わせでよい。そうした分子は、所期の目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。VEGFアンタゴニスト(例えば抗VEGF抗体)を含有する医薬組成物は、治療有効量の抗腫瘍剤、化学療法剤、増殖阻害剤、細胞傷害性薬物またはそれらの組み合わせを含むこともできる。

40

【0183】

一態様では、第1の化合物は抗VEGF抗体であり、上記少なくとも1つのさらなる化合物は抗VEGF抗体以外の治療抗体である。一実施形態では、上記少なくとも1つのさらなる化合物は、がん細胞表面のマーカーに結合する抗体である。一実施形態では、上記少なくとも1つのさらなる化合物は、抗HER2抗体、トラスツズマブ(例えばHerceptin(登録商標)、Genentech, Inc., South San Francisco, CA)である。一実施形態では、上記少なくとも1つのさらなる化合物は、抗HER2抗体、ペルツズマブ(Omnitarg(商標)、Genentech, Inc., South San Francisco, CA, US6949245を参照さ

50

りたい)である。一実施形態では、上記少なくとも1つのさらなる化合物は、抗体(ネイキッド抗体またはADCのいずれか)であり、さらなる抗体は、第2、第3、第4、第5、第6またはそれ以上の抗体であり、その結果、そうした第2、第3、第4、第5、第6またはそれ以上抗体(ネイキッドまたはADCとしてのいずれか)の組み合わせが血管新生障害の治療に有効である。

【0184】

本発明における他の治療レジメンは、VEGF-アンタゴニスト抗がん剤投与を含むことができ、限定はされないが、放射線療法ならびに／もしくは骨髄および末梢血移植、ならびに／または細胞傷害性薬物、化学療法剤、もしくは増殖阻害剤を含む。そうした実施形態のうちの1つでは、化学療法剤は、例えばシクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキソルビシン(doxorubicin)、ビンクリスチン(ONCOVIN(商標))、プレドニゾン、CHOP、CVPもしくはCOP、または免疫療法剤、例えば抗PSCA、抗HER2(例えばHerceptin(登録商標)、OMNITARG(商標))などの薬剤、または薬剤の組み合わせである。組み合わせ療法は、同時または連続的なレジメンとして投与することができる。連続して投与されるときは、組み合わせは、2回以上の投与で投与することができる。組み合わせ投与には、別々の製剤または単一の医薬製剤を使用する同時投与、およびいずれかの順番での連続投与が含まれ、好ましくは、両方(またはすべて)の活性薬剤が、それらの生物活性を同時に発現する時間が存在する。

【0185】

一実施形態では、抗VEGF抗体での治療は、異なる化学療法剤のカクテルの同時投与を含めた、本明細書で特定された抗がん剤と1種または複数の化学療法剤または増殖阻害剤との組み合わせ投与を含む。化学療法剤には、タキサン(パクリタキセルおよびドセタキセルなど)および／またはアントラサイクリン抗生物質が含まれる。そうした化学療法剤の調製および投薬スケジュールは、製造業者の指示に従って、または熟練の医師が経験的に決定するように、使用することができる。そうした化学療法の調製および投薬スケジュールは、「Chemotherapy Service」、(1992)M. C. Perry編、Williams & Wilkins、Baltimore、Mdにも記載されている。

【0186】

上記の同時投与される薬剤のいずれかの適切な投薬量は、現在使用されているものであり、新たに同定された薬剤と他の化学療法剤または治療との組み合わせ作用(相乗作用)のために、低下させてもよい。

【0187】

組み合わせ療法は、「相乗作用」をもたらすことができ、「相乗的」をはっきりと示すことができる。すなわち、活性成分が一緒に使用される場合に達成される効果が、化合物を別々に使用することに起因する効果の合計より大きい。相乗的効果は、活性成分が、(1)組み合わせされた単位投薬製剤で、同時処方され、同時に投与もしくは送達される場合、(2)別々の製剤として交互にもしくは並行して送達される場合、または(3)ある種の他のレジメンによる場合に、達成され得る。交互療法で送達されるときは、相乗的効果は、例えば別々の注射器の異なる注入によって、化合物が連続して投与されるまたは送達される場合に、達成され得る。一般に、交互療法の間、有効投薬量の各活性成分は、連続して、すなわち順次投与されるが、組み合わせ療法では、有効投薬量の2つ以上の活性成分は一緒に投与される。

【0188】

疾患の予防または治療に関しては、さらなる治療剤の適切な投薬量は、治療される疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度および経過、VEGFアンタゴニストおよびさらなる薬剤が予防的または治療的目的のために投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴ならびにVEGFアンタゴニストおよびさらなる薬剤に対する患者の応答、ならびに主治医の裁量によって決まる。VEGFアンタゴニストおよびさらなる薬剤は、1回でまた

は一連の治療にわたって適切に患者へ投与される。VEGFアンタゴニストは、典型的には上記のように投与される。例えば1回または複数の別々の投与であろうと持続注入であろうと、疾患のタイプおよび重症度に応じて、約 20 mg/m^2 から 600 mg/m^2 のさらなる薬剤が患者に投与するための初回の候補投薬量である。1つの典型的な1日毎の投薬量は、上述の要因に応じて、約 20 mg/m^2 、 85 mg/m^2 、 90 mg/m^2 、 125 mg/m^2 、 200 mg/m^2 、 400 mg/m^2 、 500 mg/m^2 またはそれ以上に及んでもよい。数日以上にわたるに反復投与に関しては、状況に応じて、治療は、疾患症状の所望の抑制が起こるまで持続される。したがって、約 20 mg/m^2 、 85 mg/m^2 、 90 mg/m^2 、 125 mg/m^2 、 200 mg/m^2 、 400 mg/m^2 、 500 mg/m^2 、 600 mg/m^2 （またはそれらの任意の組み合わせ）の1つまたは複数の用量を患者へ投与することができる。そうした用量は、（例えば、患者が約2から約20、例えば約6用量のさらなる薬剤が与えられるように）、断続的に、例えば毎週または2、3、4、5または6週毎に投与することができる。初回の高負荷量、それに続く1または複数のより低い用量を投与することができる。しかし、他の投薬レジメンも有用であり得る。本療法の進行は、従来の技法およびアッセイで容易にモニターされる。

10

【0189】

V. 医薬製剤

本発明において使用されるアンタゴニストの治療製剤は、保存を目的として、所望の純度を有するアンタゴニストを随意的に許容可能な担体、賦形剤または安定化剤と混合することによって、凍結乾燥製剤または水性液剤の形態で調製される。製剤に関する一般的な情報は、例えばGilmanら（編）（1990）、The Pharmacological Bases of Therapeutics、第8版、Pergamon Press；A. Gennaro（編）、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、（1990）、Mack Publishing Co.、Easton, Pennsylvania.；Avisら（編）、（1993）Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker、New York；Liebermanら（編）、（1990）Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker、New York；およびLiebermanら（編）、（1990）、Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker、New York、Kenneth A. Walters（編）（2002）Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences)、第119巻、Marcel Dekkerを参照されたい。

20

30

【0190】

許容可能な担体、賦形剤または安定化剤は、用いられる投薬量および濃度でレシピエントに毒性がなく、これには、リン酸、クエン酸および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤；防腐剤（例えば塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；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、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；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）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含めた単糖類、二糖類および他の炭水化合物；EDTAなどのキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば亜鉛-タンパク質錯体）；ならびに／またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性

40

50

界面活性剤が含まれる。

【0191】

例示的な抗VEGF抗体製剤は、米国特許第6,8841,879号に記載されている。ある種の実施形態では、抗VEGF抗体は、単回使用のバイアルに25mg/mLで製剤化される。ある種の実施形態では、100mgの抗VEGF抗体が、240mgの α , α -トレハロース二水和物、23.2mgのリン酸ナトリウム（一塩基性、一水和物）、4.8mgのリン酸ナトリウム（二塩基性無水物）、1.6mgのポリソルベート20および注射用水、USP中に製剤化される。ある種の実施形態では、400mgの抗VEGF抗体が、960mgの α , α -トレハロース二水和物、92.8mgのリン酸ナトリウム（一塩基性、一水和物）、19.2mgのリン酸ナトリウム（二塩基性無水物）、6.4mgのポリソルベート20および注射用水、USP中に製剤化される。

10

【0192】

皮下投与に適する凍結乾燥製剤は、例えば米国特許第6,267,958号（Andy aら）に記載されている。そうした凍結乾燥製剤は、適切な希釈剤で高タンパク質濃度に再構成することができ、再構成製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与することができる。

【0193】

結晶化形態のアンタゴニストも企図される。例えばUS2002/0136719A1を参照されたい。

【0194】

20

本明細書の製剤は、1種より多い活性化合物（上記の第2の医薬）、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含むこともできる。そうした医薬のタイプおよび有効量は、例えば製剤に存在するVEGFアンタゴニストの量およびタイプならびに対象の臨床パラメーターによって決まる。好ましいそうした第2の医薬を上に記載する。

【0195】

活性成分は、例えばコアセルベーション法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルもしく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（methylmethacrylate））マイクロカプセルのそれぞれに、コロイド性の薬物送達システム（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）に、またはマクロエマルジョンに封入することもできる。そうした技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. 編（1980）に開示されている。

30

【0196】

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例としては、アンタゴニストを含有する、固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、造形品の形態、例えばフィルムまたはマイクロカプセルである。徐放性マトリックスの例としては、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-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュプロリドからなる注射可能なミクロスフェア）などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

40

【0197】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。

表1.

ABCC9	CD97	DLC1	GIMAP5	LEPREL2	PCDH18	RRAS	THSD1
ACVRL1	CD105	DLL4	GIMAP6	LHFP	PDGFB	S1PR1	THY1
ADAM12	CD144	DPYS	GJA4	LIX1L	PDGFD	S1PR3	TIMP3
ADAMTS1	CD276	DUSP6	GJC1	LIMS2	PDGFRB	SCARF1	TMEM88
ADAMTS2	CARD11	EBF2	GPR4	LMO2	PHACTR2	SEMA3F	TMEM204
ADAMTS12	CDC42EP1	EFNB2	GPR124	LPAR6	PLK2	SEPT4	TM4SF1
AFAP1L2	CDH11	EGFL7	HAPLN1	LRP4	PLVAP	SERPINE1	TNFAIP2
AHR	CDH5	EHD4	HEY2	LRRC33	PLXDC2	SERPINH1	TNNT2
Alk1	CDRT4	ELTD1	HEYL	LY6E	PPAP2A	SLC9A3R2	TP53
AMOTL1	CES2	EMCN	HIGD1B	MAPK12	PPAP2B	SLC11A1	TREML4
ANGPT2	CHST15	ENG	HLX	MCAM	PPFIA4	SLC5A2	TRDN
ANXA1	CLEC4D	ERG	HOXA3	MECOM	PPM1F	SLC22A9	TRIB2
APLNR	CLEC6A	ESAM	HOXD8	MED24	PTAFR	SLC22A25	TRIM5
ARAP3	CLEC14A	ESM1	ICAM2	MDFIC	PRICKLE2	SLC43A3	TSLP
ARHGAP29	CLEC1A	ETS1	ID1	MEF2C	PROCR	SLFN5	TSP1
ARHGAP31	CNN2	F2R	IFI44	MFGE8	PRKCDBP	SNCG	TUSC5
ART3	COL15A1	F2RL3	IGFBP3	MMRN2	PRKCH	SOD3	UBXN10
ASB2	COL18A1	FAM198B	IL2RG	MYCT1	PRND	SOX7	USHBP1
ATP1B4	COL1A2	FANCI	INHBB	NAALAD2	PRR5L	SOX18	VAMP5
BGN	COL4A1	FBLN5	ITPRIPL2	NFIB	PTPRB	SPARC	VEGFR1
BHMT2	COL4A2	FBN1	JUB	NHSL2	PTPRG	SPIC	VEGFR2
BTNL9	COL4A3	FKBP10	KANK3	NID1	PTPRM	SRGN	VEGFR3
BMPR2	COL8A1	FLI1	KCNE3	NID2	QKI	SPRY4	VIM
BPIFB1	COMMD7	FLT1	KDR	NNMT	RAPGEF3	STAT1	WISP1
BST2	CRTAM	FMOD	KIAA1274	NOS3	RAPGEF5	STEAP4	WWTR1
C3orf64	CSPG4	FREM1	KIAA1462	NOTCH1	RASIP1	STON1	ZFP36L1
C8orf4	CTGF	FSTL1	KLHL4	NRARP	RASGRP3	STON1- GTF2A1L	ZNF521
C13orf15	CTTNBP2NL	FXYD5	KLHL5	NRP1	RBP7	ST8SIA4	
C1S	CYYR1	GAS6	KLHL6	NRP2	RBMS1	ST8SIA6	
CAV1	DAPK2	GAS7	KLRB1	NRXN3	RGS5	SWAP70	
CCND1	DCHS1	GIMAP1	KPNA7	P2RX7	REST	TEK	
CD34	DDAH1	GIMAP2	LAMA4	PBX2	RHOJ	TFAP2C	
CD40	DEF6	GIMAP3	LAMB1	PCDH12	RIN3	THBS1	
CD93	DKK2	GIMAP4	LATS2	PCDH17	ROBO4	THBS2	

10

20

30

表2.

Alk1	EGFL7	RGS5
CD34	ESM1	Sema3f
CD105	LAMA4	TSP1
CD144	NG2	VEGFR1
Col4a1	Nid2	VEGFR2
Col4a2	Notch1	VEGFR3
Dll4	NRP1	VIM
EFNB2	NRP2	

40

【実施例】

【0198】

以下の実施例を例示目的で提供するが、本願で請求している発明を限定するものではない。

実施例1. 材料および方法

50

マウス系統&マウスモデル

RIP-T β AgマウスをExelixis, Inc. から、Beige Nude XIDマウスをHarlanから入手した。Genentech, Inc. の動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) (IACUC) のガイドラインに従って、動物を飼育および世話した。

【0199】

治療レジメンおよび投薬

すべての投薬レジメンは、IACUCガイドラインに従って行った。研究動物は、毎日モニターし、体重は少なくとも週2回測定した。生物発光イメージングによって腫瘍成長および療法への応答をモニタリングすることを含めた、頭蓋内腫瘍の確立に使用される手順は、以前に記載されている (OzawaおよびJames. J Vis Exp. 41: 1~5, 2010)。抗血管性内皮成長因子 (VEGF) モノクローナル抗体B20-4.1.1、抗ブタクサ (コントロール) および抗D114を、以前に記載 (Fuhら、J Biol Chem. 281: 6625~6631, 2006) されているように調製し、精製して、免疫無防備状態のマウスでのすべての実験に関して、5または10mg/kgで腹腔内 (i. p.) 注入によって週2回、およびRIP-T β Agマウスでは、週1回 (5mg/kgで) 投薬した。スニチニブは、経口強制飼養によって60mg/kgで毎日投薬した。創傷治療アッセイは、Baisら (Cell. 141: 166~177, 2010) に以前に記載されているように行った。

【0200】

免疫蛍光染色&組織学的定量化

腫瘍担持RIP-T β Agマウスから切断された膵臓全体を、ショ糖 (30%) 中で5~10分4℃でインキュベートし、続いてPBSで洗浄した (2回、各15分)。次いで、膵臓を最適切断温度 (Optimum Cutting Temperature) (OCT, Sakura Finetek) 培地を含有するクリオモールドに設置し、-70℃で維持した。膵臓の切片 (6 μ m) を、クリオスタット装置 (Leica Microsystems) を使用して各OCTブロックから切り取り、染色に使用するまで-70℃で維持した。免疫蛍光染色に関しては、凍結切片を室温で風乾し、冷アセトンで5~10分間固定した。次いで、切片を再び乾燥し、PBS中に2.5% BSAおよび5% ロバ血清を含むバッファーで30~60分間ブロッキングした。ブロッキングバッファーで希釈 (製造業者のガイドラインの通りに希釈) した一次抗体を用いた染色を一晩4℃で行った。次いで、切片をPBSで洗浄し、ブロッキングバッファーで1:300に希釈した二次抗体に30~60分間曝露し、次いで、PBS中で再び洗浄した。最後に、切片を、4', 6-ジアミジノー-2-フェニルインドール (DAPI, Molecular Probes) を含有するDAKO (DAKO) にマウントして、核を可視化した。

【0201】

以下の抗体を免疫蛍光染色に使用した。一次ラット抗マウスMECA-32抗体 (Invitrogen, Inc.)、ウサギ抗Ki67およびクローンSP6 (Research Diagnostics, Inc.)。二次抗体は、Alexa-594がコンジュゲートされたロバ抗ラットおよび抗ウサギ、ならびにAlexa-488がコンジュゲートされたロバ抗ウサギおよびヤギ抗ニワトリ (Invitrogen, Inc.) を含む。染色したスライド上の腫瘍は、顕微鏡で同定し、AxioskopおよびAxiovisionソフトウェア (Zeiss, Inc.) を使用して撮影し、画像上での組織学的定量化を、カスタマイズしたアルゴリズムを使用して、Metamorphソフトウェア (Molecular Dynamics) で実施した。各時点で、平均測定値を、島/腫瘍あたり少なくとも3~5画像×各マウス由来の5腫瘍×3マウス=15の独立した病変由来の45~75画像/時点/治療から計算した。移植腫瘍モデルでの微小血管密度 (MVD) 解析については、治療群あたり6匹のマウスからの腫瘍を収集し、O. C. T. ブロックに包埋した。組織を、Leica CM3050Sで16 μ mの厚さに凍結切片化し、CD31抗体 (BD Biosciences) で染色した。画像は、Tiss

ue FAXSソフトウェアによって制御されたZeiss AxioImager Z1 蛍光顕微鏡で取得した。画像ファイルをTissueStudio解析パッケージ(v1.5、Definiens)にロードした。壊死組織ならびに皮膚組織およびしわなどの染色アーティファクトは自動的に同定され、核染色に基づいて除外された。血管密度は、全生存腫瘍領域に対するCD31陽性画素の比として計算した。

【0202】

マイクロアレイ実験

以下のように、全RNAを、コントロールおよび抗VEGFで治療したRIP-TβAg腫瘍から、7日間の治療の後に抽出した。重量に応じて腹腔内に注入される0.25% アバチンを使用して、マウスに麻酔をかけた。腹腔を開いて、臍管に接近し、総胆管を介して臍臓を灌流した。製造業者の指示の通りに希釈した約2.5mlのLiberase

TL(Roche)で臍臓を灌流した。次いで、この臍臓を腹腔から切離し、さらに、腫瘍を臍外分泌部から大きく切離した。腫瘍を新鮮な灌流溶液に懸濁し、37℃で5~6分間攪拌し、次いで、解剖顕微鏡下で再度調査し、臍外分泌部のいかなる残存断片も除去した。次いで、きれいな腫瘍をRNAlater溶液(Qiagen, Inc.)に急速凍結した。免疫不全マウスでのすべての移植実験に関して、研究期間の終わりに動物を安楽死させ、腫瘍を切離し、および素早く凍結した。全RNAを抽出し、Agilent Whole Mouse Genome 44Kアレイ、Affymetrix HGU133-plus2またはAgilent Whole Human Genomeアレイを使用して、製造業者の指示に従って、マイクロアレイを行った。

【0203】

細胞培養

D551(ATCC)皮膚線維芽細胞を、ウシ胎仔血清(Sigma-Aldrich)、ペニシリン(100ユニット/mL)、ストレプトマイシン(100μg/mL)を補充したM199培地(Invitrogen)中で培養した。初代ヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)は、Lonza Walkersvilleから購入し、EGM-2培地(Lonza Walkersville)中で維持した。馴化培地：D551細胞を90%コンフルエンスまで生育させ、培地をEGM-2に変え、7日のインキュベーション後上清を収集し、4℃で保存した。

【0204】

HUVECトランスフェクションおよび出芽アッセイ

COL4A2、NID2およびMEST遺伝子発現のサイレンシング：細胞を70%コンフルエンスまで生育させ、DharmaFECT1を使用して、製造業者(Thermo Scientific)の指示に従ってsiRNAをトランスフェクトした。トランスフェクションのためのすべてのsiRNAの終濃度は12.5nMであり、各遺伝子についてのmRNAのダウンレギュレーションをqRT-PCRによって確認した。トランスフェクションしてから24時間後に細胞をトリプシン処理し、Cytodexマイクロキャリアビーズ(Sigma-Aldrich)と、2,500個のビーズあたり 1×10^6 細胞の比で混合した。37℃で4時間コーティングを行い、混合物を20分毎に手で振盪した。次いで、コーティングしたビーズを6ウェルディッシュに移し、37℃および5%CO₂で18~20時間EGM-2中に放置した。翌日、コーティングしたビーズをEGM-2で洗浄し、EGM-2にフィブリノーゲン(2mg ml⁻¹; Sigma-Aldrich)を入れた溶液に溶解した。約200個のHMVECコーティングビーズを含む溶液を、24ウェル組織培養プレートの1ウェル中の0.625U ml⁻¹のトロンビン(Sigma)に添加した。 8×10^4 皮膚線維芽細胞(D551)を、クロットの上に蒔き、20μg/mLの抗体を含む2mLのD551馴化培地/EGM-2(1:3)でインキュベートした。2日毎に培地を交換し、4日目にアッセイを終わらせた。HUVECの出芽を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)中で2時間室温で固定されたフィブリンゲル中で免疫染色によって可視化し、次いで、ブロッキングバッファー(DAKO)で4時間室温ブロッキングし、Alexa Fluor 488ファロイジン(1:

100) および Hoechst 33258 (1:1000) (Invitrogen) と共に 4℃で一晩インキュベートし、続いて画像撮影した。Image Xpress Microを使用して画像を取り込み、MetaXpressソフトウェアでHUVECの出芽を解析した。血管成長の3要素を測定した。総成長は、ビーズあたりのすべての出芽の累積長を表し、平均成長は、ビーズあたりの出芽分枝数を表し、ビーズあたりの総プロセスは、ビーズ表面を覆う細胞から直接始まる出芽数を数えることによって決定した。統計的解析のために、各条件について4つのウェルを評価し、各実験を3回反復した。

【0205】

定量的遺伝子発現解析

RNeasyミニキット (Qiagen) を用いて、製造業者のプロトコールに従って RNAを調製した。500ngの全RNAを、High Capacity cDNA逆転写キット (Applied Biosystems) を使用して逆転写にかけた。Applied Biosystems 7500機器でリアルタイムPCRを行った。すべての検査遺伝子に対するTaqmanプローブをApplied Biosystemsから取得した。各遺伝子の相対的発現レベルを、アクチンに対して標準化した。

10

【0206】

臨床試料におけるシグネチャー遺伝子発現の決定

NO16966のXELOX治療群に登録された患者からの保存用腫瘍試料由来の切片を病理医が評価し、高い腫瘍含量領域を大きく切離して、続いて、FFPE RNA単離キット (Roche; 患者あたり7~10切片) を使用してRNAを単離した。標準的技法に従ってcDNAを合成した後に、製造業者のプロトコールに従ってFluidigm BiomarkプラットフォームでqPCRプロトコールを用いて、RNAレベルを評価した。

20

【0207】

遺伝子シグネチャーの誘導および適用

Agilent WMGマイクロアレイからの $\log_2$ 比強度値およびAffymetrix Mouse430.2マイクロアレイからのロバストマルチアレイ平均 (RMA) 標準化強度 (対数スケールにも基づく) を、パッケージ「Biobase」を使用して、式セットとしてRにインポートし、「limma」パッケージの関数「lmFit」および「eBayes」を使用して、線形モデルを各フィーチャに適合させた。抗VEGFで治療した試料において (抗ブタクサコントロールで治療した試料と比較して) 有意に ($p < 0.05$) ダウンレギュレーションしたフィーチャは保持し、Entrez Gene 識別子に変換した。これらの遺伝子の和集合を、VEGF応答性血管構造の代表と見なした。このVDV遺伝子発現シグネチャーが他の実験で変動する程度は、「limma」(上記) パッケージを使用して、線形モデルをマイクロアレイデータに適合させ、FalconおよびGentleman (Bioinformatics. 23:257~258、2007) の方法に従ってシグネチャー中の遺伝子由来のt-統計量の平均を計算することによって決定した。

30

【0208】

バイオマーカー選択の統計的方法

統計的タスクは、以下のステップを含むことができる：

1. 候補バイオマーカーの事前選択
2. 関連する臨床的有効性の応答性予測共変量の事前選択
3. 一変量レベルでのバイオマーカー予測関数の選択
4. 一変量レベルでの臨床的共変量を含むバイオマーカー予測関数の選択
5. 多変量レベルでのバイオマーカー予測関数の選択
6. 多変量レベルでの臨床的共変量を含むバイオマーカー予測関数の選択

40

【0209】

以下の文は、種々のステップを詳しく述べるものである。

【0210】

50

1：候補バイオマーカーの事前選択

候補バイオマーカーの統計的事前選択は、臨床的利益の尺度との関連性の強度に指向している。この目的のために、種々の臨床エンドポイントは、誘導された代用スコアに、例えば、観察打ち切りを回避する T T P に関する臨床的利益スコアの程度の順序割当として変換することができる。これらの代用変換測定値は、例えばノンパラメトリックなスピアマンの順位相関アプローチによって、単純相関解析に容易に使用することができる。他の方法は、例えば C o x 比例ハザード回帰のように、事象までの時間の回帰モデルにおけるメトリック共変量として、バイオマーカー測定値を使用することである。バイオマーカー値の統計的分布に応じて、このステップは、例えば、分散安定化変換および適切なスケールの使用として、あるいは生の測定値の代わりにパーセンタイルを使用するなどの標準化ステップとして、幾つかの前処理を必要とする場合がある。さらなるアプローチは、例えば、単一患者を基準にして、(x 軸=バイオマーカー値、y 軸=臨床的利益の測定値)の散布を示すことによる、二変量散布図の精査である。例えば、平滑化スプラインによって達成されるような幾つかのノンパラメトリックな回帰直線は、バイオマーカーと臨床的利益の関連を可視化するのに有用であり得る。

10

【0211】

これらの種々のアプローチの目的は、用いられる少なくとも1つの利益尺度の臨床的利益といくらかの関連性を示すが、他の測定値に対する結果は矛盾しないバイオマーカー候補の事前選択である。利用可能なコントロール群が存在するときは、異なる治療群における臨床的利益とバイオマーカーの関連性の差異が、バイオマーカー(複数可)をさらなる考慮事項に適したものとする差異予測の兆候になり得る。

20

【0212】

2：関連する臨床的有效性の応答性予想共変量の事前選択

本明細書で定義された臨床的共変量の統計的事前選択は、バイオマーカーを事前選択するためのアプローチに類似し、また、臨床的利益の尺度との関連性の強度に指向している。それ故、原則として、上記1で考慮したのと同じ方法が適用される。統計的判定基準に加えて、臨床経験および理論的知識に由来する判定基準を、関連する臨床的共変量を事前選択するのに適用することができる。

【0213】

臨床的共変量の予想値は、バイオマーカーの予想値と相互作用し得る。必要ならば、これらは予測ルールを改良するのに考慮される。

30

【0214】

3：一変量レベルでのバイオマーカー予測関数の選択

用語「予測関数」は、一般的に、標的予測を暗示するのにスケーリングされた数をもたらず、バイオマーカー測定値の数値関数を意味するのに使用される。

【0215】

簡単な例は、特定のカットオフ c およびバイオマーカー測定値 x についてのヘビサイド関数の選択であり、この場合、二値予測 A または B が作られることになり、次いで、 $H(x - c) = 0$ ならば、A を予測する。 $H(x - c) = 1$ ならば、B を予測する。

【0216】

40

これは恐らく、予測ルールにおいて一変量バイオマーカー測定値を使用する最も一般的な方法である。上記の「予測関数」の定義は、予測可能性を探究するのに使用することができる既存の訓練データセットへの照会を含む。訓練セットから適切なカットオフ c を得るために、別の経路を取ることができる。最初に、1で述べた平滑化スプラインを用いた散布図を使用して、カットオフを定めることができる。あるいは、分布の幾つかのパーセンタイル、例えば中央値または4分位値を選択することができる。カットオフは、臨床的利益の尺度に関するそれらの予測可能性に従ってすべての可能なカットオフを検討ことによって、体系的に抽出することもできる。次に、マニュアル選択を可能にするか、または最適化のための幾つかの検索アルゴリズムを用いるために、これらの結果をプロットすることができる。これは、C o x モデルを使用する、ある種の臨床エンドポイントに基づい

50

て実現させることができ、各検定のカットオフにおいて、バイオマーカーは二値共変量として使用される。次いで、臨床エンドポイントの結果を一緒に考慮して、両エンドポイントに沿った予測を示すカットオフを選択することができる。

【0217】

予測関数を選択するための一般的でない別のアプローチは、共変量としてバイオマーカー値（可能ならば変換されたもの）を有する訓練セットから得られた固定パラメーターCox回帰モデルに基づき得る。さらなる可能性は、幾つかの尤度比（またはその単調変換）に関する決定に基づくことであり、標的確率密度は、予測状態の分離用の訓練セットにおいて事前決定される。次いで、バイオマーカーは、予想判定基準の幾つかの関数に当てはめられることになる。

10

【0218】

4：一変量レベルでの臨床的共変量を含むバイオマーカー予測関数の選択

一変量は、1つのバイオマーカーのみの使用を指し、臨床的共変量に関しては、これは、多変量モデルであり得る。このアプローチは、この方法が関連する共変量情報の組み込みを可能にすべきことを除けば、臨床的共変量を用いない探索と類似している。カットオフを選択する散布図法によって、共変量の限られた使用のみが可能になり、例えば、二値共変量は、プロット内でコードされる色であり得る。解析が幾つかの回帰アプローチに依拠する場合は、共変量（また、一度にそれらの多く）を使用することは、通常容易である。上の3に記載したCoxモデルに基づくカットオフ探索により、共変量を容易に取り込むことが可能になり、それによって、共変量調整された一変量カットオフ探索につながる。共変量による調整は、モデルにおける共変量として、または層別解析における包含を介して行うことができる。

20

【0219】

予測関数の他の選択も、共変量の取り込みを可能にする。

【0220】

これは、予測関数としてのCoxモデル選択に対して直接的である。これは、相互作用レベルへの共変量の影響を推定するためのオプションを含み、これは、例えば、異なる年齢群に対して、異なる予測判定基準を適用することを意味する。

【0221】

予測関数の尤度比のタイプに関しては、予測密度は、共変量を含んで推定されなければならない。この目的のために、多変量パターン認識の方法論を使用することができ、またはバイオマーカー値を、（密度推定に先立って）共変量についての重回帰によって調整することができる。

30

【0222】

バイオマーカー（生の測定値レベル）と臨床的共変量を用い、応答としての臨床的利益尺度を利用して、CART技術（Classification and Regression Trees；Breimanら（Wadsworth, Inc.：New York, 1984））をこの目的のために使用することができる。カットオフが探索され、決定木タイプの関数が予測のための共変量に関与していることが見出される。CARTにより選択されるカットオフおよびアルゴリズムは、しばしば最適に近く、種々の臨床的利益尺度を考慮することにより、組み合わせられ、統合され得る。

40

【0223】

5：多変量レベルでのバイオマーカー予測関数の選択

異なる一変量予測関数選択内に、それらの予測可能性を維持する幾つかのバイオマーカー候補が存在するときは、バイオマーカーの組み合わせによって、すなわち多変量予測関数を考慮することによって、さらなる改善が達成され得る。

【0224】

単純なヘビサイド関数モデルに基づいて、例えば、最適カットオフが示されるバイオマーカー値の二変量散布図を考慮することによって、バイオマーカーの組み合わせを評価することができる。次いで、バイオマーカーの組み合わせは、予測が改善されるように、論

50

理「AND」および「OR」演算子により異なるヘビサイド関数を組み合わせることで達成することができる。

【0225】

この目的のために、複数のバイオマーカー（生の測定レベル）および応答としての臨床的利益尺度を用いて、CART技術を使用して、バイオマーカー用のカットオフおよび予測用の決定木タイプの関数を得ることができる。CARTにより選択されるカットオフおよびアルゴリズムは、しばしば最適に近く、種々の臨床的利益尺度を考慮することによって、組み合わせられ、統合され得る。

【0226】

Cox回帰は、種々のレベルで用いることができる。第1の方法は、複数のバイオマーカーを二値方法に組み込むことである（すなわち、幾つかのカットオフを有するヘビサイド関数に基づく）。他のオプションは、メトリック方法（適切な変換後）、または二値とメトリックの混合のアプローチにおいて、バイオマーカーを用いることである。発展的多変量予測関数は、上の3に記載したCoxタイプのものである。

10

【0227】

多変量尤度比アプローチは、実行するのは困難であるが、多変量予測関数に関する別のオプションを提供する。

【0228】

6：多変量レベルでの臨床的共変量を含むバイオマーカー予測関数の選択

関連する臨床的共変量が存在するときは、複数のバイオマーカーと複数の臨床的共変量とを組み合わせることによって、さらなる改善を達成することができる。異なる予測関数の選択は、臨床的共変量を含む可能性に関して評価される。

20

【0229】

バイオマーカーに対するヘビサイド関数の単純な論理的組み合わせに基づいて、訓練セットにおいて得られたロジスティック回帰モデルに基づく予測関数にさらなる共変量を含めることができる。

【0230】

CART技術および発展的決定木は、さらなる共変量と共に容易に使用することができ、予測アルゴリズムにこれらを含むであろう。

【0231】

Cox回帰に基づくすべての予測関数は、さらなる臨床的共変量を使用することができる。相互作用レベルへの共変量の影響を推定するためのオプションが存在し、これは、例えば、異なる年齢群に対して、異なる予測判定基準を適用することを意味する。

30

【0232】

多変量尤度比アプローチは、さらなる共変量の使用に直接拡張可能ではない。

【0233】

組織学および臨床的データ解析の統計的方法

様々な動物実験からの定量的な組織学的データを、Microsoft Excelソフトウェアを使用してプロットした。スチューデントのt検定を適用して目的のデータセットを比較し、 p 値 <0.05 を有する差異を有意であると見なした。NO16966試験におけるXELOX（カペシタビンおよびオキサリプラチン）を含む治療群由来の1017人の患者からの103個の生検物を、VDV遺伝子の遺伝子発現について解析した。qRT-PCRの値を、ハウスキーピング遺伝子によって、および一般的な基準試料に対して標準化して、 δ - δCt 値を得た。続いて、22個のVDV遺伝子のそれぞれの δ - δCt 値を、Zスコアに対して平均センタリングおよび分散スケールリングした。

40

【0234】

すべてのVDV遺伝子が解析された各試料*i*について、VDVシグネチャスコア（VDV_{*i*}）を計算した。VDV_{*i*}は解析されたVDV遺伝子の全体にわたるZスコアの加重平均を表し、アルゴリズム：

$$VDV_i = \frac{1}{\sqrt{n}} \sum_{g=1}^n Z_{g,i}$$

によって与えられ、式中、 $Z_{g,i}$ は、試料 i および n の遺伝子 g に対する $qRT-PCR$ の値の標準化された z -スコアであり、今回は 22 である。 VDV_i 値は、特定のセットの遺伝子の発現が、中心平均値に対して集団的に過剰発現または低発現する程度に関する定量的な情報を提供する。

【0235】

マーカーおよび／または治療亜群間の臨床転帰（ $PF5$ および OS ）を比較するために、ログランク検定および Cox 回帰を使用し、カプランマイヤー解析によって中央時間を計算した。すべての統計検定は両側性であった。

【0236】

実施例 2. 抗 $VEGF$ の標的にされる血管コンパートメントで発現する遺伝子の同定

$VEGF$ 経路阻害活性の直接的なインビボバイオマーカーの同定への第 1 ステップとして、確立された、腭神経内分泌腫瘍（ $PNET$ ）のトランスジェニックマウスモデルにおいて、 $VEGF$ 中和の生物学的結果を特徴付けた。高度に血管新生化した $RIP-T\beta Ag$ 遺伝子改変腫瘍マウスモデル（ $GEMM$ ）において、抗 $VEGF$ モノクローナル抗体（ mAb ）治療は、抗腫瘍効力を有すること、および全生存を増大することが以前に示された（Singhら、*J. Pathology* 227（4）：417～430、2012）。 $RIP-T\beta Ag$ 末期腫瘍の組織学的解析によって、抗 $VEGF$ 治療は微小血管密度（ MVD ）の急速な低減を引き起こし、それは、治療後 72 時間で検出可能であり、7 日目にプラトーの約 50% に達することが示された（図 1A、左）。抗 $VEGF$ 誘導性の、腫瘍血管構造のこの部分（以降、「 $VEGF$ 依存性血管構造」または VDV と呼ぶ）の除去は、後の治療時点で、有意に逆行も増大もしない（図 1A、左）。これらの実験では、腫瘍血管密度および増殖指数を、それぞれ $MCA-32$ 染色（赤色、左）および $Ki67$ 染色（赤色、右）を介して、組織学的に評価した。 $DAPI$ （青色）で核を対比染色した。観察された急速な抗血管効果とは対照的に、 $VEGF$ 中和の間接的な抗腫瘍効果は、よりゆっくり進んだ。コントロール（抗 $Btaxa$ ）治療群と比較した際の抗 $VEGF$ 治療群における腫瘍増殖指数の低減は 7 日目には観察されなかったが、14 日目には明らかであり（図 1A、右）、結果としての腫瘍量の低減は、21 日目でのみで明らかであった（図 1B）。これは、初期の時点において、このモデルでの $VEGF$ 遮断の生物学的結果が主に血管特異的であることを示唆するものである。

【0237】

抗 $VEGF$ で 7 日間治療した動物由来の全腫瘍の発現マイクロアレイ解析によって、大多数の遺伝子は、コントロール抗体で治療した動物由来の腫瘍と比較した場合、発現が変化しなかったことが示された。しかし、有意に（ $p < 0.01$ に適合）抗 $VEGF$ 治療に応答した少数の遺伝子集団は、転写産物量が減少する（表 3）。興味深いことに、一致した遺伝子発現のアップレギュレーションは観察されず、これは、遺伝子発現変化は、主として、 $VEGF$ 依存性腫瘍関連内皮細胞の物理的排除によって引き起こされたことを示唆するものである（図 1C および表 3）。以下の表 3 に記載するように、 VDV シグネチャーの遺伝子を、ヒト IBC 試験における抗 $VEGF$ 応答度によって順序付けた。 $ENSEMBL$ $BioMart$ を使用してヒトとマウスのオルソログを対応付けし、この場合、「 $Log2FC$ 」は、治療前と比較した場合の、 $AVASTIN$ 治療後の遺伝子発現の $log(2)$ フォールドチェンジを表す。19 対の患者の試料およびマウスの $PNET$ を $Agilent$ マイクロアレイで解析した。少数の VDV 遺伝子は、 $Agilent$ マイクロアレイ上にヒトプローブを有しておらず、表の終わりに NA で示される。加えて、幾つかのマウス VDV 遺伝子に対するプローブは、 $Agilent$ プラットホーム上に存在しなかった。これらの遺伝子に関しては、 $Log2Fc$ は、マウス $Affymetrix$ ア

10

20

30

40

50

レイブラットフォーム上での反復実験から示され、アステリスク*で印をつけた。

【0238】

差次的（低下した）発現を有するこのセット内の遺伝子の特徴付けによって、血管の発達に参与する既知の内皮特異的な遺伝子（表3）の富化が明らかになった（表4）。加えて、この遺伝子セットに関する発現の中央フォールドチェンジは、汎血管マーカーCD31およびPLVAPで見られるものと類似しており、また、汎血管マーカーPLVAPの免疫組織化学で測定した場合、MVDの低下の程度と一致していた（図1Aおよび図1C）。

【0239】

全腫瘍の定量的PCR（qRT-PCR）によって、マイクロアレイの結果を確認し、腫瘍（インスリン）；上皮（E-CadおよびEpcam）；汎造血（CD45）；またはマクロファージ（CD68）細胞に特異的なマーカーが抗VEGF治療によって有意に変化しないことを確認した。さらに、マイクロアレイデータを確認すると、qRT-PCRは、この治療によってVEGFの転写産物レベルは有意に変化しないが、複数の既知の内皮マーカーはダウンレギュレーションされることを示した（図1D）。

【0240】

マイクロアレイとqRT-PCRの両データによって、抗VEGFに応答したダウンレギュレーションがシグネチャー中の他の遺伝子よりも顕著な遺伝子のサブセットが同定され（図1D）、このことは、シグネチャー遺伝子の幾つかは、抗VEGF治療に感受性の血管中でより選択的に発現する可能性があることを示唆するものである。低応答遺伝子および中間応答遺伝子（図1D、それぞれ黄色および赤色のバー）とは対照的に、超応答性遺伝子（図1D、紫色のバー）のこのセットは、端細胞マーカー、および発生的網膜血管新生と関連して、既知のVEGF標的（Torora、Blood. 116:4025~4033、2010；Robertsonら、Mol Cell Biol. 24:10515~10528、2004；Testoriら、Blood. 117:2735~2744、2011；Lobovら、Blood. 117:6728~6737、2011）を含む。したがって本発明者らは、これらの後者の遺伝子は、VEGF経路阻害活性の近位のバイオマーカー（proxVDV遺伝子）の候補であり、VEGF依存性腫瘍血管構造でより選択的に発現するVEGF標的である可能性が高いと仮定した。まとめると、これらの結果は、VDV遺伝子発現シグネチャーは、少なくとも2つの関連する生物学的プロセス：（i）VEGF下流のシグナル伝達の直接阻害、および（ii）引き続く、VEGFシグナル伝達に残存を依存している血管の減少を反映することを示唆するものである。この作業仮説によれば、VDV内皮遺伝子は、腫瘍関連内皮細胞におけるVEGFシグナル伝達阻害の近位の（proxVDV）および遠位の（distVDV）下流の代用マーカーを含む可能性が高い。

10

20

30

表3. ヒトIBC試験での抗VEGF応答度によって順序付けた、VDVシグネチャー中の遺伝子

ヒト炎症性乳がん			マウス膝神経内分泌腫瘍		
Entrezgene	略号	Log2FC	Entrezgene	略号	Log2FC
11082	ESM1	-1.928	71690	Esm1	-3.625
25780	RASGRP3	-1.278	240168	Rasgrp3	-1.777
10060	ABCC9	-1.229	20928	Abcc9	-1.232
3910	LAMA4	-1.219	16775	Lama4	-2.712
22795	NID2	-1.094	18074	Nid2	-3.818
4162	MCAM	-1.005	84004	Mcama	-1.731
8828	NRP2	-0.897	18187	Nrp2	-1.842
7127	TNFAIP2	-0.854	21928	Tnfaip2	-0.367
6678	SPARC	-0.843	20692	Sparc	-1.746
27253	PCDH17	-0.829	219228	Pcdh17	-1.909
23743	BHMT2	-0.808	64918	Bhmt2	-0.163
51313	FAM198B	-0.794	68659	Fam198b	-0.26
9444	QKI	-0.763	19317	Qk	-0.652
1306	COL15A1	-0.736	12819	Col15a1	-2.274
23627	PRND	-0.732	26434	Prnd	-2.48
6772	STAT1	-0.709	20846	Stat1	-0.227
8829	NRP1	-0.707	18186	Nrp1	-1.434
2200	FBN1	-0.701	14118	Fbn1	-1.139
28984	C13orf15	-0.698	66214	I190002H23Rik	-2.238
285	ANGPT2	-0.685	11601	Angpt2	-0.85
419	ART3	-0.675	109979	Art3	-0.643
85480	TSLP	-0.646	53603	Tslp	0.108
4208	MEF2C	-0.644	17260	Mef2c	-1.316
10008	KCNE3	-0.643	57442	Kcne3	-1.938
10395	DLC1	-0.64	50768	Dlc1	-0.745*
22918	CD93	-0.636	17064	Cd93	-2.406
25937	WWTR1	-0.631	97064	Wwtr1	-1.261
1848	DUSP6	-0.614	67603	Dusp6	-1.427
6649	SOD3	-0.578	20657	Sod3	0.144
4005	LMO2	-0.572	16909	Lmo2	-0.057
29969	MDFIC	-0.569	16543	Mdfic	-0.183
51088	KLHL5	-0.557	71778	Klhl5	-0.489*
83595	SOX7	-0.553	20680	Sox7	-0.765*
5414	SEPT4	-0.531	18952	Sept4	-0.814
55917	CTTNBP2NL	-0.531	80281	Ctnbnp2nl	-0.501
1282	COL4A1	-0.501	12826	Col4a1	-1.998
301	ANXA1	-0.5	16952	Anxa1	-1.31
1284	COL4A2	-0.499	12827	Col4a2	-1.742
7431	VIM	-0.493	22352	Vim	-1.321
8613	PPAP2B	-0.488	67916	Ppap2b	-2.638
112464	PRKCDBP	-0.487	109042	Prkcdbp	-1.395
1009	CDH11	-0.487	12552	Cdh11	-1.326
1295	COL8A1	-0.483	12837	Col8a1	-1.433
23493	HEY2	-0.481	15214	Hey2	-0.327
10186	LHFP	-0.467	108927	Lhfp	-0.481
2331	FMOD	-0.462	14264	Fmod	0.007
7057	THBS1	-0.46	21825	Thbs1	-0.743
659	BMPR2	-0.442	12168	Bmpr2	-0.346*
10544	PROCR	-0.441	19124	Procr	-0.743
7070	THY1	-0.435	21838	Thy1	-0.757
5027	P2RX7	-0.431	18439	P2rx7	-0.227
5159	PDGFRB	-0.43	18596	Pdgfrb	-1.35
871	SERPINH1	-0.419	12406	Serpinh1	-2.022
8490	RGS5	-0.419	19737	Rgs5	-1.002

54510	PCDH18	-0.418	73173	Pcdh18	-0.074
5787	PTPRB	-0.409	19263	Ptprb	-2.028
857	CAV1	-0.404	12389	Cav1	-0.826
54538	ROBO4	-0.386	74144	Robo4	-1.605
8611	PPAP2A	-0.385	19012	Ppap2a	-0.933
10791	VAMP5	-0.378	53620	Vamp5	-0.815
5552	SRGN	-0.378	19073	Srgn	-0.902
162073	ITPRIPL2	-0.378	319622	Itpripl2	-0.707*
51294	PCDH12	-0.362	53601	Pcdh12	-1.515
4781	NFIB	-0.362	18028	Nfib	-0.945
716	C1S	-0.357	50908	C1s	-0.122
595	CCND1	-0.355	12443	Ccnd1	-1.116
1464	CSPG4	-0.355	121021	Cspg4	-1.713
54922	RASIP1	-0.348	69903	Rasip1	-1.423
3384	ICAM2	-0.347	15896	Icam2	-2.346
80781	COL18A1	-0.342	12822	Col18a1	-1.659
2828	GPR4	-0.341	319197	Gpr4	-0.14
2313	FLI1	-0.334	14247	Fli1	-1.218
57381	RHOJ	-0.33	80837	Rhoj	-1.463
79890	RIN3	-0.329	217835	Rin3	-0.137
51705	EMCN	-0.328	59308	Emcn	-2.347
11167	FSTL1	-0.324	14314	Fstl1	-1.146
79689	STEAP4	-0.321	117167	Steap4	0.26
3200	HoxA3	-0.319	15400	Hoxa3	0.271
25925	ZNF521	-0.319	225207	Zfp521	-0.482
5797	PTPRM	-0.308	19274	Ptpm	-0.479
8642	DCHS1	-0.301	233651	Dchs1	-0.367*
29015	SLC43A3	-0.301	58207	Slc43a3	-0.647
116362	RBP7	-0.299	63954	Rbp7	-2.883
1404	HAPLN1	-0.294	12950	Hapln1	0.2
1490	CTGF	-0.286	14219	Ctgf	-2.002
5937	RBMS1	-0.282	56878	Rbms1	-0.663
158326	FREM1	-0.281	329872	Frem1	-0.307*
56892	C8orf4	-0.279	69068	1810011O10Rik	-2.026
161198	CLEC14A	-0.273	66864	Clec14a	-0.563
10769	PLK2	-0.27	20620	Plk2	-1.322
51751	HIGD1B	-0.264	75689	Higd1b	-0.913
8038	ADAM12	-0.264	11489	Adam12	0.019
55901	THSD1	-0.261	56229	Thsd1	-1.379
51162	EGFL7	-0.259	353156	Egfl7	-0.934
25960	GPR124	-0.248	78560	Gpr124	-0.78
26524	LATS2	-0.247	50523	Lats2	-0.33
90952	ESAM	-0.244	69524	Esam	-1.027
1265	CNN2	-0.243	12798	Cnn2	-0.726
51676	ASB2	-0.243	65256	Asb2	-0.012
10536	LEPREL2	-0.242	14789	Leprel2	-0.925
2022	ENG	-0.235	13805	Eng	-2.167
28951	TRIB2	-0.235	217410	Trib2	-0.782*
64411	ARAP3	-0.232	106952	Arap3	-2.098
196	AHR	-0.228	11622	Ahr	-0.693
10003	NAALAD2	-0.227	72560	Naalad2	-0.356
256949	KANK3	-0.226	80880	Kank3	-0.888
81848	SPRY4	-0.225	24066	Spry4	-1.589
2122	MECOM	-0.223	14013	Mecom	-0.175
51363	CHST15	-0.221	77590	Chst15	-0.101
6623	SNCG	-0.215	20618	Sncg	-0.7
4071	TM4SF1	-0.215	17112	Tm4sf1	-0.752

10

20

30

40

116159	CYYR1	-0.211	224405	Cyyr1	0.114
2149	F2R	-0.21	14062	F2r	-0.815
79899	PRR5L	-0.209	72446	Prr5l	-0.617
84898	PLXDC2	-0.209	67448	Plxdc2	-1.16
53827	FXYD5	-0.206	18301	Fxyd5	-0.728
10561	IFI44	-0.203	99899	Ifi44	-1.481
166336	PRICKLE2	-0.203	243548	Prickle2	-0.003
80310	PDGFD	-0.2	71785	Pdgfd	-0.386
2321	FLT1	-0.2	14254	Flt1	-2.762
2621	GAS6	-0.198	14456	Gas6	-0.895
83878	USHBP1	-0.191	234395	Ushbp1	-2.261
3625	INHBB	-0.19	16324	Inhbb	-1.283
677	ZFP36L1	-0.187	12192	Zfp36l1	-1.117
84632	AFAP1L2	-0.186	226250	Afap1l2	-1.297
10516	FBLN5	-0.186	23876	Fbln5	-0.457*
23075	SWAP70	-0.184	20947	Swap70	-0.19
5724	PTAFR	-0.18	19204	Ptafr	-0.639*
84962	JUB	-0.178	16475	Jub	-0.318
92747	BPIFB1	-0.175	228801	Bpifb1	0.146
2078	ERG	-0.163	13876	Erg	-1.816
27123	DKK2	-0.159	56811	Dkk2	-2.214
26508	HEYL	-0.153	56198	Heyl	-0.699
51267	CLEC1A	-0.151	243653	Clec1a	-0.636
5793	PTPRG	-0.151	19270	Ptprg	-1.015
10161	LPAR6	-0.148	67168	Lpar6	-0.587
154810	AMOTL1	-0.147	75723	Amotl1	-0.114
286753	TUSC5	-0.146	237858	Tusc5	-0.358
9411	ARHGAP29	-0.145	214137	Arhgap29	-0.42
6237	RRAS	-0.143	20130	Rras	-0.164
57514	ARHGAP31	-0.141	12549	Arhgap31	-0.98
81792	ADAMTS12	-0.139	239337	Adamts12	-0.352*
947	CD34	-0.136	12490	Cd34	-2.707
149951	COMMD7	-0.135	99311	Commd7	0.073
9509	ADAMTS2	-0.13	216725	Adamts2	-1.263
7010	TEK	-0.13	21687	Tek	-0.57
9369	NRXN3	-0.128	18191	Nrxn3	0.422
94	ACVRL1	-0.123	11482	Acvrl1	-0.364
5978	REST	-0.123	19712	Rest	-0.851
64123	ELTD1	-0.122	170757	Eltd1	-1.681
128077	LIX1L	-0.12	280411	Lix1l	-0.488*
684	BST2	-0.119	69550	Bst2	-0.637
3397	ID1	-0.113	15901	Id1	-2.744
958	CD40	-0.109	21939	Cd40	-0.623*
4811	NID1	-0.103	18073	Nid1	-2.257
3486	IGFBP3	-0.101	16009	Igfbp3	-1.989
10345	TRDN	-0.1	76757	Trdn	-0.338*
114571	SLC22A9	-0.099	319800	Slc22a30	0.088
4837	NNMT	-0.097	18113	Nnmt	-0.29*
57608	KIAA1462	-0.091	240185	9430020K01Rik	-1.869
9749	PHACTR2	-0.09	215789	Phactr2	-0.597*
7078	TIMP3	-0.084	21859	Timp3	-1.573
2113	ETS1	-0.079	23871	Ets1	-1.224
80381	CD276	-0.078	102657	Cd276	-0.282*
30844	EHD4	-0.07	98878	Ehd4	-0.483
2701	GJA4	-0.068	14612	Gja4	-0.431
170575	GIMAP1	-0.066	16205	Gimap1	-1.332
285203	C3orf64	-0.06	101351	A130022J15Rik	-0.485

10

20

30

40

4240	MFGE8	-0.06	17304	Mfge8	-1.199
5089	PBX2	-0.057	18515	Pbx2	-0.127
3234	HOXD8	-0.052	15437	Hoxd8	0.089
9647	PPM1F	-0.052	68606	Ppm1f	-0.385
474344	GIMAP6	-0.052	231931	Gimap6	-1.191
83483	PLVAP	-0.051	84094	Plvap	-0.983
5155	PDGFB	-0.05	18591	Pdgfb	-0.884*
55340	GIMAP5	-0.049	317757	Gimap5	-1.194
7157	TP53	-0.045	22059	Trp53	-0.207*
4061	LY6E	-0.042	17069	Ly6e	-0.375
79812	MMRN2	-0.04	105450	Mmrn2	-2.415
23576	DDAH1	-0.031	69219	Ddah1	-0.14
153579	BTNL9	-0.031	237754	Btnl9	-0.913
633	BGN	-0.029	12111	Bgn	-0.797*
27143	KIAA1274	-0.027	27355	X99384	-0.52
375387	LRRC33	-0.025	224109	Lrrc33	-0.333
127733	UBXN10	-0.023	212190	Ubxn10	-0.293*
3820	KLRB1	-0.017	80782	Klrblb	-0.301*
80177	MYCT1	-0.015	68632	Myct1	-1.574
3791	KDR	-0.014	16542	Kdr	-1.778
9862	MED24	-0.012	23989	Med24	-0.242*
8522	GAS7	-0.011	14457	Gas7	-0.122
56062	KLHL4	-0.011	237010	Klhl4	-0.462
54345	SOX18	-0.008	20672	Sox18	-1.532
85363	TRIM5	-0.008	20128	Trim30a	-0.837
285852	TREML4	-0.006	224840	Trem14	-0.134
9510	ADAMTS1	-0.005	11504	Adamts1	-0.491
8840	WISP1	-0.005	22402	Wisp1	-0.866
10411	RAPGEF3	-0.004	223864	Rapgef3	-1.67
7903	ST8SIA4	-0.003	20452	St8sia4	-0.286
55303	GIMAP4	0.002	107526	Gimap4	-1.127
8824	CES2	0.003	234673	Ces2e	-2.514
89857	KLHL6	0.009	239743	Klhl6	-0.442
10052	GJC1	0.009	14615	Gjc1	-0.894
3561	IL2RG	0.01	16186	Il2rg	-0.028
56253	CRTAM	0.02	54698	Crtam	-0.022
5583	PRKCH	0.026	18755	Prkch	-0.104
6300	MAPK12	0.026	29857	Mapk12	-0.182
162394	SLFN5	0.029	327978	Slfn5	-0.515*
1807	DPYS	0.029	64705	Dpys	-0.085
4038	LRP4	0.029	228357	Lrp4	-1.971
387601	SLC22A25	0.038	319800	Slc22a30	0.088
3142	HLX	0.041	15284	Hlx	-0.189
6556	SLC11A1	0.044	18173	Slc11a1	-0.133
6524	SLC5A2	0.046	246787	Slc5a2	-0.306*
92162	TMEM88	0.048	67020	Tmem88	-1.771
64641	EBF2	0.048	13592	Ebf2	-0.12
6405	SEMA3F	0.048	20350	Sema3f	-0.581
9351	SLC9A3R2	0.054	65962	Slc9a3r2	-0.611
7022	TFAP2C	0.054	21420	Tcfap2c	-0.159
187	APLNR	0.055	23796	Aplnr	-0.024
7139	TNNT2	0.058	21956	Tnnt2	-1.175
55679	LIMS2	0.059	225341	Lims2	-0.69
11135	CDC42EP1	0.062	104445	Cdc42ep1	-1.568
976	CD97	0.067	26364	Cd97	-1.036
121599	SPIC	0.07	20728	Spic	-0.668
23604	DAPK2	0.072	13143	Dapk2	-1.32

10

20

30

40

1903	S1PR3	0.073	13610	S1pr3	0.028
23439	ATP1B4	0.083	67821	Atp1b4	0.141
338339	CLEC4D	0.091	17474	Clec4d	-0.149
9002	F2RL3	0.093	14065	F2rl3	-0.122
4846	NOS3	0.112	18127	Nos3	-0.819
1901	S1PR1	0.127	13609	S1pr1	-0.315
11037	STON1	0.144	77057	Ston1	-0.387*
50619	DEF6	0.146	23853	Def6	-0.068
1003	CDH5	0.149	12562	Cdh5	-2.001
55215	FANCI	0.15	208836	Fanci	0.342
84433	CARD11	0.15	108723	Card11	-0.205*
8497	PPFIA4	0.155	68507	Ppfia4	-0.241*
3912	LAMB1	0.181	16777	Lamb1	-2.313
5054	SERPINE1	0.194	18787	Serpine1	-1.055
286749	STON1- GTF2A1L	0.217	77057	Ston1	-0.387*
1285	COL4A3	0.223	12828	Col4a3	0.038
9771	RAPGEF5	0.269	217944	Rapgef5	-0.991
93978	CLEC6A	NA	56620	Clec4n	-0.421
284040	CDRT4	NA	66338	Cdrt4	-0.306
79652	TMEM204	NA	407831	Tmem204	-0.708
100527949	GIMAP1- GIMAP5	NA	317757	Gimap5	-1.194
7058	THBS2	NA	21826	Thbs2	-0.18
338596	ST8SIA6	NA	241230	St8sia6	-0.569
340527	NHSL2	NA	100042480	Nhsl2	0.383
8578	SCARF1	NA	380713	Scarf1	-1.018
402569	KPNA7	NA	381686	Kpna7	-0.362*
441478	NRARP	NA	67122	Nrarp	-0.218
60681	FKBP10	NA	14230	Fkbp10	-0.893

10

20

表4.VDVシグネチャー中で大きな比率を占める遺伝子オントロジー用語

a.生物学的プロセスのオントロジー

GOBPID	P値	オッズ比	Expカウント	カウント	サイズ	用語
GO:0001568	1.659e-30	10.57	6.785	51	385	血管の発達
GO:0072358	9.829e-27	11.35	5.111	42	307	心血管系の発達
GO:0032501	8.002e-20	3.465	78.43	145	4610	多細胞生物プロセス
GO:0001525	6.98e-17	9.984	3.435	27	205	血管新生
GO:0009653	7.513e-14	4.884	10.34	40	698	解剖学的構造の形態形成
GO:2000145	1.642e-12	6.281	5.146	27	292	細胞運動性の調節
GO:2000026	3.997e-12	3.818	14.26	45	809	多細胞生物の発達調節
GO:0009888	5.801e-12	3.667	15.58	47	901	組織の発達
GO:0023052	7.066e-12	2.478	70.26	120	3987	シグナル伝達
GO:0007166	1.25e-10	2.676	33.91	72	1924	細胞表面受容体関連シグナル伝達経路
GO:0032879	1.428e-10	3.256	17.69	48	1004	局在化の調節
GO:0007155	4.022e-10	4.398	8.01	30	486	細胞接着
GO:0000902	6.839e-10	3.51	13.06	39	741	細胞形態形成
GO:0051716	1.061e-09	2.433	52.42	92	3224	刺激に対する細胞応答
GO:0022603	1.467e-09	4.37	7.419	28	421	解剖学的構造の形態形成の調節
GO:0001570	8.696e-09	15.27	0.8459	10	48	血管発生
GO:0048869	1.529e-08	3.118	15.44	40	1031	細胞発達過程
GO:0040013	1.842e-08	8.857	1.745	13	99	移動運動の負の調節
GO:0048468	1.947e-08	2.812	19.23	46	1115	細胞発達
GO:0048731	2.693e-08	2.53	31.52	62	2288	システムの発達
GO:0030336	3.752e-08	9.341	1.533	12	87	細胞遊走の負の調節
GO:0042330	6.307e-08	3.522	9.376	29	532	走性
GO:0009893	1.02e-07	2.496	24.48	52	1389	代謝プロセスの正の調節
GO:0051271	1.021e-07	8.436	1.674	12	95	細胞成分の移動の負の調節
GO:0044093	1.213e-07	2.808	16.41	40	931	分子機能の正の調節
GO:0007411	3.51e-07	4.087	5.78	21	328	軸索ガイダンス
GO:0048812	3.608e-07	3.374	9.023	27	512	ニューロン投射の形態形成
GO:0030182	3.819e-07	2.824	14.52	36	824	ニューロン分化
GO:0007154	5.952e-07	2.121	47.13	78	2982	細胞間情報伝達
GO:0040017	6.315e-07	5.375	3.155	15	179	移動運動の正の調節
GO:0016310	6.357e-07	2.528	19.53	43	1108	リン酸化
GO:0051272	6.783e-07	5.342	3.172	15	180	細胞成分の移動の正の調節
GO:0042221	7.279e-07	2.602	18.43	41	1141	化学的刺激への応答
GO:0048667	9.499e-07	3.275	8.9	26	505	ニューロン分化に関与する細胞形態形成
GO:0050789	1.172e-06	2.17	74.81	105	5270	生物学的プロセスの調節
GO:0032990	1.185e-06	3.084	10.19	28	578	細胞部分の形態形成
GO:0006793	1.34e-06	2.38	22.21	46	1260	リン代謝プロセス

10

20

30

40

GO:0030030	1.641e-06	2.758	13.48	33	765	細胞突起組織
GO:0010646	1.784e-06	2.444	19.6	42	1112	細胞間情報伝達の調節
GO:0009966	2.756e-06	2.621	15.19	35	923	シグナル伝達の調節
GO:0022008	3.002e-06	2.528	16.53	37	938	ニューロン新生
GO:0048870	3.186e-06	3.659	6.098	20	382	細胞運動性
GO:0009887	4.196e-06	2.871	10.87	28	617	器官形態形成
GO:0007507	4.451e-06	3.866	5.164	18	293	心臓の発達
GO:0045446	4.495e-06	17.35	0.4527	6	26	内皮細胞分化
GO:0001569	4.818e-06	17.13	0.4582	6	26	血管のパターン形成
GO:0048584	4.947e-06	2.568	14.86	34	843	刺激応答の正の調節
GO:0043549	7.131e-06	3.048	8.724	24	495	キナーゼ活性の調節
GO:0045937	7.801e-06	4.308	3.86	15	219	リン酸代謝プロセスの正の調節
GO:0001936	1.231e-05	8.512	1.093	8	62	内皮細胞増殖の調節
GO:0008284	1.364e-05	3.179	7.289	21	425	細胞増殖の正の調節
GO:0030198	1.997e-05	5.91	1.898	10	109	細胞外基質構成
GO:0008015	2.281e-05	3.708	4.741	16	269	血液循環
GO:0009725	2.406e-05	2.638	11.3	27	641	ホルモン刺激への応答
GO:0048534	2.486e-05	3.138	6.997	20	397	造血器官またはリンパ器官の発達
GO:0019220	2.551e-05	2.954	8.206	22	489	リン酸代謝プロセスの調節
GO:0010595	2.975e-05	11.81	0.6168	6	35	内皮細胞遊走の正の調節
GO:0010810	3.38e-05	7.291	1.251	8	71	細胞-基質付着の調節
GO:0042698	3.434e-05	6.244	1.621	9	92	排卵周期
GO:0001934	3.78e-05	4.201	3.401	13	193	タンパク質リン酸化の正の調節
GO:0048010	4.137e-05	11.04	0.6521	6	37	血管内皮成長因子受容体シグナル伝達経路
GO:0006950	5.219e-05	1.815	44.18	69	2507	ストレス応答
GO:0032101	5.353e-05	3.606	4.547	15	258	外部刺激応答の調節
GO:0061041	5.373e-05	8.175	0.9869	7	56	創傷治癒の調節
GO:0032268	5.635e-05	2.661	9.924	24	594	細胞タンパク質の代謝プロセスの調節
GO:0001945	5.934e-05	25.18	0.2291	4	13	リンパ管の発達
GO:0007162	6.034e-05	8.011	1.005	7	57	細胞接着の負の調節
GO:0045766	6.761e-05	7.853	1.022	7	58	血管新生の正の調節
GO:0008285	6.909e-05	2.899	7.525	20	427	細胞増殖の負の調節
GO:0043627	6.995e-05	4.577	2.644	11	150	エストロゲン刺激への応答
GO:0050900	7.404e-05	3.915	3.63	13	206	白血球遊走
GO:0021700	7.715e-05	4.973	2.221	10	126	発生上の成熟
GO:0001974	7.921e-05	13.54	0.4582	5	26	血管リモデリング
GO:0032835	7.921e-05	13.54	0.4582	5	26	糸球体の発達
GO:0032270	8.472e-05	2.943	7.032	19	399	細胞タンパク質の代謝プロセスの正の調節
GO:0035556	9.397e-05	1.921	29.33	50	1664	細胞内のシグナル伝達
GO:0001932	9.729e-05	3.013	6.515	18	391	タンパク質リン酸化の調節
GO:0042060	9.976e-05	2.741	8.357	21	492	創傷治癒

10

20

30

40

GO:0016337	0.0001106	3.214	5.41	16	307	細胞-細胞接着
GO:0071363	0.0001128	5.282	1.886	9	107	成長因子刺激への細胞応答
GO:0010628	0.0001161	2.276	14.47	30	821	遺伝子発現の正の調節
GO:0050790	0.0001167	2.351	13.11	28	783	触媒活性の調節
GO:0051093	0.0001208	7.078	1.117	7	67	発生プロセスの負の調節
GO:0045165	0.0001249	4.267	2.82	11	160	細胞運命のコミットメント
GO:0007220	0.0001449	18.88	0.282	4	16	ノッチ受容体のプロセッシング
GO:0051345	0.000164	2.876	6.785	18	385	加水分解酵素活性の正の調節
GO:0018212	0.0001647	4.503	2.432	10	138	ペプチジルチロシンの修飾
GO:0070887	0.0001692	2.072	19.16	36	1087	化学的刺激に対する細胞応答
GO:0001886	0.0001795	42.33	0.1234	3	7	内皮細胞形態形成
GO:0001541	0.0001858	8.144	0.8459	6	48	卵胞発達
GO:0010557	0.0002096	2.164	15.68	31	890	高分子生合成プロセスの正の調節
GO:0043086	0.0002104	2.728	7.543	19	428	触媒活性の負の調節
GO:0030195	0.0002225	10.52	0.564	5	32	血液凝固の負の調節
GO:0034446	0.0002369	16.18	0.3172	4	18	基質付着依存性細胞伸展
GO:0006897	0.0002547	3.098	5.234	15	297	エンドサイトーシス
GO:0050679	0.0002688	5.27	1.674	8	95	上皮細胞増殖の正の調節
GO:0030168	0.0002748	3.396	4.142	13	235	血小板活性化
GO:0065008	0.0002799	1.783	34.8	55	2016	生物学的質の調節
GO:0070168	0.0002835	33.86	0.141	3	8	生体鉱物組織の発達の負の調節
GO:0051128	0.0002838	2.469	9.684	22	574	細胞成分構成の調節
GO:0007178	0.0002866	6.079	1.281	7	75	膜貫通受容体タンパク質セリン/スレオニンキナーゼシグナル伝達経路
GO:0090101	0.0002906	7.434	0.9164	6	52	膜貫通受容体タンパク質セリン/スレオニンキナーゼシグナル伝達経路の負の調節
GO:0045596	0.0002939	3.054	5.305	15	301	細胞分化の負の調節
GO:0042246	0.0002987	9.796	0.5992	5	34	組織再生
GO:0002682	0.0003018	2.271	12.44	26	706	免疫系プロセスの調節
GO:0070482	0.0003078	3.56	3.648	12	207	酸素レベルへの応答
GO:0001300	0.0003093	Inf	0.03525	2	2	経時的な細胞老化
GO:0007521	0.0003093	Inf	0.03525	2	2	筋細胞の運命決定
GO:0048522	0.0003187	1.841	30.24	49	1922	細胞プロセスの正の調節
GO:0050818	0.000323	7.275	0.934	6	53	凝固の調節
GO:0045860	0.0003382	3.01	5.375	15	305	プロテインキナーゼ活

10

20

30

40

						性の正の調節
GO:0007599	0.0003383	2.549	8.477	20	481	止血
GO:0001933	0.0003581	7.123	0.9517	6	54	タンパク質リン酸化の負の調節
GO:0034329	0.0003606	4.054	2.679	10	152	細胞間結合の構築
GO:0014706	0.0003664	3.487	3.719	12	211	横紋筋組織の発達
GO:0035239	0.0003664	3.487	3.719	12	211	管の形態形成
GO:0071841	0.0003674	1.663	49.66	72	2818	細胞成分の構成または細胞レベルでの合成
GO:0030509	0.0003759	5.797	1.339	7	76	BMPシグナル伝達経路
GO:0051384	0.000388	4.418	2.221	9	126	グルココルチコイド刺激への応答
GO:0008354	0.0004197	28.22	0.1586	3	9	生殖細胞の遊走
GO:0022617	0.0004197	28.22	0.1586	3	9	細胞外基質の分解
GO:0045601	0.0004197	28.22	0.1586	3	9	内皮細胞分化の調節
GO:0051918	0.0004197	28.22	0.1586	3	9	線維素溶解の負の調節
GO:0060627	0.0004433	3.942	2.749	10	156	小胞媒介性輸送の調節
GO:0009968	0.0004471	2.717	6.742	17	391	シグナル伝達の負の調節
GO:0048732	0.0004527	3.401	3.807	12	216	腺発達
GO:0002009	0.0004607	3.205	4.371	13	248	上皮の形態形成
GO:0051130	0.0004695	2.8	6.151	16	349	細胞成分構成の正の調節
GO:0002576	0.0004767	5.554	1.392	7	79	血小板の脱顆粒
GO:0002064	0.0004815	6.702	1.005	6	57	上皮細胞の発達
GO:0017015	0.0004815	6.702	1.005	6	57	トランスフォーミング成長因子β受容体シグナル伝達経路の調節
GO:0030855	0.0005169	4.232	2.308	9	136	上皮細胞の分化
GO:0009612	0.0005305	4.723	1.85	8	105	機械的刺激への応答
GO:0048762	0.0005305	4.723	1.85	8	105	間葉細胞の分化
GO:0050730	0.0005305	4.723	1.85	8	105	ペプチジルチロシンリン酸化の調節
GO:0061061	0.0005315	2.766	6.221	16	353	筋構造の発達
GO:0030335	0.0005443	4.201	2.325	9	135	細胞遊走の正の調節
GO:0002274	0.000555	5.403	1.427	7	81	骨髄性白血球の活性化
GO:0001503	0.0005782	3.302	3.912	12	222	骨化
GO:0006936	0.0005782	3.302	3.912	12	222	筋収縮
GO:0048660	0.0005806	6.448	1.04	6	59	平滑筋細胞増殖の調節
GO:0008585	0.0005979	5.331	1.445	7	82	女性生殖腺の発達
GO:0014910	0.0006398	11.92	0.4053	4	23	平滑筋細胞遊走の調節
GO:2000379	0.0006398	11.92	0.4053	4	23	活性酸素種代謝プロセスの正の調節
GO:0019538	0.0006644	1.598	56.89	79	3228	タンパク質代謝プロセス
GO:0071900	0.0006835	2.921	5.146	14	292	タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性の調節
GO:0051347	0.0006995	2.793	5.763	15	327	転移酵素活性の正の調節
GO:0016044	0.0007038	2.34	9.658	21	548	細胞膜構築

10

20

30

40

GO:0051704	0.0007045	2.023	16.09	30	913	複数生物のプロセス
GO:0009790	0.0007198	2.202	11.75	24	667	胚発達
GO:0033002	0.0007424	5.124	1.498	7	85	筋細胞増殖
GO:0045944	0.0007803	2.432	8.389	19	476	RNAポリメラーゼIIプロモーターからの転写の正の調節
GO:0032496	0.0007913	3.639	2.961	10	168	リボ多糖への応答
GO:0001775	0.0007992	2.571	7.103	17	419	細胞活性化
GO:0001953	0.0008032	21.16	0.1939	3	11	細胞基質間接着の負の調節
GO:0017187	0.0008032	21.16	0.1939	3	11	ペプチジルグルタミン酸のカルボキシル化
GO:0080090	0.0008098	1.558	67.27	90	3817	一次代謝プロセスの調節
GO:0050673	0.0008897	4.954	1.543	7	90	上皮細胞増殖
GO:0010757	0.0009171	112.4	0.05287	2	3	プラスミノゲン活性化の負の調節
GO:0001819	0.0009233	3.881	2.503	9	142	サイトカイン産生の正の調節
GO:0031328	0.0009347	1.962	17.13	31	972	細胞性生合成プロセスの正の調節
GO:0008360	0.000975	5.79	1.146	6	65	細胞形態の調節
GO:0030099	0.0009911	3.526	3.049	10	173	骨髄系細胞の分化

10

20

b.細胞構成成分オントロジー

GOCCID	P値	オッズ比	Expカウント	カウント	サイズ	用語
GO:0044421	6.134e-11	6.593	3.923	22	252	細胞外部分
GO:0005581	1.2e-08	10.43	1.384	12	81	コラーゲン
GO:0005615	6.927e-08	3.082	12.87	35	753	細胞外間隙
GO:0005886	2.337e-07	2.486	24.72	51	1707	原形質膜
GO:0044459	3.383e-07	2.294	28.98	57	1748	原形質膜部分
GO:0005604	3.837e-07	11.44	0.9494	9	57	基底膜
GO:0030141	7.723e-06	4.297	3.846	15	225	保存性分泌顆粒
GO:0005887	1.712e-05	2.235	19.92	40	1174	原形質膜に不可欠
GO:0005796	5.637e-05	14.64	0.4273	5	25	ゴルジルーメン
GO:0009897	6.485e-05	5.071	2.171	10	127	原形質膜の外側
GO:0005587	9.504e-05	58.16	0.1026	3	6	IV型コラーゲン
GO:0031093	0.0001243	8.805	0.7862	6	46	血小板α顆粒ルーメン
GO:0005605	0.0001291	19.45	0.2735	4	16	基底膜
GO:0005606	0.0001642	43.62	0.1196	3	7	ラミニン1複合体
GO:0060205	0.0001778	8.189	0.8375	6	49	細胞質膜結合型小胞ルーメン
GO:0045121	0.0004315	3.947	2.735	10	160	膜ラフト
GO:0005788	0.0005969	4.621	1.88	8	110	小胞体ルーメン
GO:0005912	0.0006938	3.697	2.906	10	170	接着接合部
GO:0043259	0.0008633	115.9	0.05128	2	3	ラミニン10複合体
GO:0070022	0.0008633	115.9	0.05128	2	3	トランスフォーミング成長因子β受容体複合体

30

40

GO:0005578	0.0009301	3.548	3.018	10	191	タンパク質性細胞外基質
------------	-----------	-------	-------	----	-----	-------------

c.分子機能オントロジー

GOMFID	P値	オッズ比	Exp カウント	カウント	サイズ	用語
GO:0005201	4.706e-11	13.3	1.329	14	80	細胞外基質構成成分
GO:0005021	5.369e-10	182.3	0.1329	6	8	血管内皮成長因子活性化受容体活性
GO:0005509	1.059e-08	3.583	10.28	32	619	カルシウムイオン結合
GO:0005178	3.02e-08	10.98	1.213	11	73	インテグリン結合
GO:0019199	1.52e-07	9.187	1.412	11	85	膜貫通受容体プロテインキナーゼ活性
GO:0050431	5.162e-07	50.39	0.1827	5	11	トランスフォーミング成長因子β結合
GO:0060089	2.742e-06	2.354	21.36	44	1286	分子トランスデューサー活性
GO:0005518	8.458e-06	11.21	0.7476	7	45	コラーゲン結合
GO:0038023	6.846e-05	2.287	15.45	32	930	シグナル伝達受容体活性
GO:0017154	8.724e-05	59.96	0.09968	3	6	セマフォリン受容体活性
GO:0005024	0.000149	18.52	0.2824	4	17	トランスフォーミング成長因子β活性化受容体活性
GO:0008289	0.0001585	2.793	7.376	19	444	脂質結合
GO:0030246	0.0001911	2.937	6.263	17	377	炭水化合物結合
GO:0005539	0.0002787	4.192	2.592	10	156	グリコサミノグリカン結合
GO:0019899	0.0003593	2.176	14	28	843	酵素結合
GO:0001871	0.0005776	3.797	2.841	10	171	パターン結合
GO:0005520	0.0006073	12.03	0.3987	4	24	インスリン様成長因子結合
GO:0048407	0.0006767	22.48	0.1827	3	11	血小板由来成長因子結合
GO:0019834	0.0008154	119.4	0.04984	2	3	ホスホリパーゼA2阻害活性

【0241】

実施例3. VEGFシグナル伝達遮断への血管応答は、複数の腫瘍モデル全体にわたって保存されている。

VEGFシグナル伝達遮断へのVDV応答は間質特異的であり、複数の腫瘍モデル全体にわたって保存されている。

本発明者らは、マウス末期PNETモデルで同定されたVDV転写シグネチャーが他の腫瘍モデルでも検出可能であるかどうかを決定しようとした。

【0242】

10

20

30

40

50

最初に、確立された (400 mm^3) 皮下ヒト乳がん腫瘍モデル (MDA-MB-231) 由来の試料において、抗VEGF治療への全腫瘍の応答を解析した。教師なし発現解析は抗VEGF治療試料とコントロール治療試料を区別できなかったが、短期 (すなわち24時間) の抗VEGF治療は、すべての他の遺伝子と比べて、大多数のVDV遺伝子の発現の有意な下方シフトを誘導するのに十分であった ($p < 0.0001$; 図2A、上のパネル)。VDV遺伝子は内皮特異的であるという仮説に合致して、これらの遺伝子の発現変化は、マウスマイクロアレイ上のプローブでのみ検出され、ヒトマイクロアレイ上のプローブでは検出されず、これは、間質と腫瘍細胞の違いと一致する (図2A)。また、RIP-TβAg GEMM由来のデータに一致して、MDA-MB231皮下異種移植乳がん腫瘍の抗VEGFでの治療は、汎血管マーカーおよび他のVDV遺伝子と比べて、候補proxVDV遺伝子の激しいダウンレギュレーションを誘導した。

10

【0243】

本発明者らは、第3のモデルである、同所性の頭蓋内U87神経膠芽細胞腫における長期の抗VEGF治療の効果も、マウスト異質的プローブによってのみ検出され、候補proxVDV遺伝子がより顕著にダウンレギュレーションした、低下したVDV遺伝子発現パターンをもたらすことを発見した (図2B)。類似した、抗VEGF抗体への応答のVDVパターンも、検査した複数の、抗VEGFで治療したヒト異種移植およびマウス腫瘍モデル全体にわたって、一貫して観察された。

【0244】

したがって、腫瘍モデルおよび移植部位にかかわらず、かつ抗体治療の長さとは無関係で、(proxVDVおよびdistVDV遺伝子からなる) VDVシグネチャーによって、全腫瘍のmRNA試料において、VEGF経路阻害の血管下流の生物学的結果を反映する遺伝子発現変化の一貫性がある検出が可能になる。

20

【0245】

VEGFシグナル伝達はVDV遺伝子発現を誘導する

次に、本発明者らは、VEGF刺激が、2つの異なる病理学的状況、すなわち、D114/Notch1シグナル伝達経路の遮断に応答した創傷治癒および腫瘍血管新生の増大において、内皮のVDV遺伝子発現を逆に増大させることによって、未熟な新生血管構造の形成を特色付けできる程度を評価した。

【0246】

インビボでのマウス皮膚創傷アッセイにおいて、組換えVEGF (rVEGF) の12時間にわたる局所添加は、大部分のVDV遺伝子の発現を皮膚の創傷部位で増大させたが、抗VEGF治療は、反対の効果が予想された (図2C)。腫瘍で見られた応答に一致して、VEGF遮断および局所VEGFの効果は、proxVDV遺伝子候補において最も顕著であった。

30

【0247】

D114/Notch1シグナル伝達経路の阻害を介する新生血管形成誘導の結果を、抗D114、抗VEGFまたはコントロールの抗ブタクサ抗体でMDA-MB-231腫瘍担持マウスを48時間治療することによって評価した。D114/Notch1経路は、VEGFシグナル伝達の増強を介して非生産的な血管新生をある程度増大させる (Jakobssonら、Biochem Soc Trans. 37:1233~1236、2009; Ridgwayら、Nature. 444:1083~1087、2006; Jakobssonら、Nat. Cell Biol. 12(10):943~953、2010)。組織学的解析によって、予想通り、抗VEGF治療は腫瘍血管構造の血管除去を誘導するが、抗D114で治療した腫瘍は、コントロールと比較したときにMVDの増大を示すことが示された (図2D、左)。VDV遺伝子の発現は、調和して変化し、抗VEGF治療の際に低下し、D114の遮断に応答して増大した (図2D、右)。この場合もやはり、他のモデルで見られるように、proxVDV遺伝子候補の発現の変化は、他のVDV遺伝子のものよりも顕著である。

40

【0248】

50

全体的に見て、これらのデータは、ほとんどのV D V遺伝子はV E G F主導の新生血管構造で発現すること、ならびにそれらの集団的な発現は、V E G Fの生物活性およびV E G F依存性血管構造の相対的存在量を恐らく反映することを示唆するものである。

【0249】

注目すべきことに、V E G F経路活性化の転写効果が、インビトロとインビボの両方のシステムで以前に検討された。しかし、インビトロでの、内皮細胞におけるr V E G F刺激の転写の結果は、遺伝子が実際に本物のV E G Fのインビボ標的であるかどうかを決定するための十分な情報を提供しない。実際、本発明者らは、インビトロでのH U V E Cのr V E G F刺激は、本発明者らが同定したほとんどのp r o x V D V遺伝子の転写を誘導しないことを多くの条件下で発見した（図3）。この矛盾は、血流および機械的力を含めた多くの刺激のインテグレーターとしての血管構造の全身的な役割、ならびにV E G F応答が用量および状況依存性であることを考慮すれば、驚くべきことではない。

10

【0250】

他方では、本明細書で同定した遺伝子の幾つか（E S M 1を含む）、および本発明者らが有望な標的として同定しなかった遺伝子（中でもP c d h 1 7、E H D 3、P R D M 1およびT H B Dを含む；図3を参照されたい）は、インビトロでのV E G F刺激によって確実にアップレギュレーションされる。したがって、本明細書に提示するp r o x V D V遺伝子のリストは、包括的である可能性が低く、本発明者らは、さらなるインビボでのV E G Fの標的を同定するために、インビボとインビトロのデータセットを現在統合している。

20

【0251】

実施例4. p r o x V D V遺伝子は、V E G F/V E G F R-2下流の生物活性のインビボでの近位マーカーである。

インサイツハイブリダイゼーション（I S H）のデータによって、E s m 1は、H M 7結腸異種移植腫瘍由来の血管の重要な部分で高く発現しているが、抗V E G Fで治療した腫瘍由来の血管ではほとんど検出不可能であることが示された（図4 A～図4 C）。これはE s m 1が本物のp r o x V D V遺伝子であることと矛盾しない。しかし、E S M 1はV E G F以外の他の刺激によって制御されおり（S c h e r p e r e e lら、C r i t . C a r e M e d . 3 4（2）：5 3 2～5 3 7、2 0 0 6）、かつE S M 1は腫瘍細胞でも時折発現し得るので、本発明者らは、F D Aが承認したV E G F/V E G F R-2阻害剤に応答して、V E G F下流のシグナル伝達の生物活性をインビボで計測するために、集団的およびより特異的な手段としてのさらなるp r o x V D V遺伝子候補を検証する必要があった。したがって、これらの実験では、確立されたM D A-M B-2 3 1腫瘍を担持するマウスを、コントロールのm A b、抗V E G F m A b（ベバシズマブに対する代用薬として）、スニチニブ（スーテント（登録商標）；E s c u d i e r . E x p e r t R e v . A n t i c a n c e r T h e r . 1 0（3）：3 0 5～3 1 7、2 0 1 0）、R T Kの中でも特にV E G F R-2を標的にする小分子T K I、またはより特異的なV E G F R-2阻害剤のアキシチニブ（K i n d l e r ら、L a n c e t O n c o l . 1 2（3）：2 5 6～2 6 2、2 0 1 1；G r u n w a l d ら、O n c o . T a r g e t s T h e r . 5：1 1 1～1 1 7、2 0 1 2）で治療した。続いて、腫瘍を、治療後8、1 6または7 2時間で収集して、解析した（図5 A、上のパネル）。先の観察と一致して、3種の阻害剤すべてが、治療してから7 2時間後に収集した腫瘍において、M V Dの有意な低減を誘導した（図4 D）。遺伝子発現レベルで、すべての場合において、p r o x V D V遺伝子が、汎血管マーカーC d 3 1およびP l v a pについて見られるよりも大きなダウンレギュレーションを示すことを本発明者らは発見した（図5 A）。重要なことに、V e g f aの発現ならびに非血管マーカー、E-cad（上皮）およびC d 4 5（造血性）の発現は、検査したV E G F経路阻害剤のうちのいずれかによる顕著な影響を受けなかった（図4 E）。このことは、p r o x V D V遺伝子発現の変化は、「オンターゲット」および内皮特異的らしいことを示唆するものである。7 2時間目では、スニチニブは、最強のV E G F経路阻害剤であるように思われる（図5 A）。

30

40

50

【0252】

転写応答の動態は、小分子阻害剤と抗VEGF抗体治療で異なっていた。遺伝子発現の有意な変化は、治療してから8時間後で、スニチニブまたはアキシチニブによって誘導されなかった。治療後16時間でのみ、proxVDV遺伝子の発現をダウンレギュレーションすることに対する2つのSMIの効果は明らかであり、この効果は、治療してから72時間後で増大した(図5A)。それとは対照的に、抗VEGF mAb(腹腔内投与)によるproxVDV(distVDVではない)遺伝子のダウンレギュレーションは、投薬してから8時間後で明らかであり、治療後16時間までにそのピークに達する。

【0253】

このproxVDV遺伝子セットが、腫瘍関連内皮細胞(TAEC)でのVEGFシグナル伝達によって実際制御されるかどうかを確認するために、MDA-MB-231-GFP腫瘍担持動物を、抗VEGFまたはコントロール抗体で治療し、次いで、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によってTAEC(Cd31+、Cd45-、GFP-)を単離し、2つの異なる治療群間で、エクスピボでの遺伝子発現を比較した。本発明者らは、検査したすべての汎血管マーカーおよびproxVDV遺伝子が、他の選別した細胞集団と比較して、内皮細胞で非常に富化していることを発見した(図6)。proxVDV遺伝子のPrnd、Esm1、Nid2、Kcne3、Apj、AplnおよびMestは、コントロールと比べて、抗VEGFで治療した動物から単離されたTAEC細胞において一貫してダウンレギュレーションされたが、Cd31、Plvap、Ets-1およびHlxなどの他のVDV遺伝子はそうでなかった(図5B)。このデータは、Prnd、Esm1、Nid2、Kcne3、Apln、ApjおよびMestは、VEGF生物活性の近位かつ感受性のバイオマーカーであり、腫瘍関連内皮細胞内の経路の直接阻害に対するインビボでの候補レポーターであることを確認するものである。

【0254】

実施例5. VEGFシグナル伝達遮断への血管の転写応答は、マウスとヒトの腫瘍で保存されている。

本発明者らがマウスモデルで同定したVEGF中和への応答が、ヒト腫瘍血管構造で保存されているかテストするために、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標))で治療した患者由来の腫瘍生検物において、VDVシグネチャー発現へのVEGF遮断の効果を検討した。ここでは、本発明者らは、単剤として1用量のベバシズマブで治療した19人の炎症性乳がん患者由来の治療前および治療後21日目のマッチドペアの生検物からの、公表されたマイクロアレイデータ(Wedamら、Journal of Clin. Oncology, 24:769~777、2006)を活用した。先験的に、従来のバイオインフォマティクス解析では、これらの生検物においてベバシズマブ治療に応答する最も特異的な血管遺伝子発現変化を区別することができなかった(Yangら、Clin Cancer Res, 14:5893~5899、2008)が、ヒトオルソログのVDV遺伝子セットの焦点を合わせた発現解析は、治療前の生検物と比較して、ベバシズマブ治療後の臨床試料において、VDV転写産物の明らかなダウンレギュレーションを示した(図7)。マウス腫瘍モデルと同様に、本発明者らは、ESM1、NID2、PRND、KCNE3およびMESTなどの幾つかのproxVDV遺伝子の発現が、VEGF治療の際により顕著に低下することを観察した。したがって、前臨床モデルにおいて本発明者らが同定したVDV遺伝子セットによって、臨床腫瘍試料におけるVEGFシグナル伝達阻害への進化的に保存された血管応答の検出が可能になる。

【0255】

実施例6. ヒト結腸直腸がんにおけるVDV遺伝子の治療前の発現レベルは、ベバシズマブへの臨床応答と相関する。

本発明者らのデータは、VDV遺伝子が富化されたヒト腫瘍血管は、VEGFシグナル伝達阻害に比類なく応答性であることを示す。本発明者らは、次に、治療前の腫瘍試料におけるこれらのマーカーの相対的富化が、抗VEGF療法への応答性を実際に予測することができるという仮説をテストした。

10

20

30

40

50

【0256】

化学療法と組み合わせたベバシズマブは、転移性結腸直腸がん（CRC）の患者において無増悪生存（PFS）および全生存（OS）を増大させることが以前に示された（Hurwitzら、N Engl J Med. 350:2335～2342、2004）。NO16966は、プラセボまたはベバシズマブのいずれかと組み合わせたオキサリプラチンを主成分とする化学療法（XELOXまたはFOLFOX-4）を患者に与えた、ファーストラインの転移性CRC試験であり、この特定の試験における化学療法へのベバシズマブの追加は、OSの差異（副次的エンドポイント）は統計的有意性に届かなかったが、主要エンドポイントのPFSを有意に改善した（Saltzら、Journal of Clin. Oncology. 26:2013～2019、2008）。VDV遺伝子の発現が臨床転帰と関連し得るかどうかをテストするために、本発明者らは、XELOXを含む治療群に登録された103人の患者（バイオマーカー評価可能な亜集団）由来の利用可能な治療前の保存腫瘍組織において、VDV遺伝子の発現レベルを解析した。これらの臨床試料由来のRNAの質および量が限られていたため、遺伝子発現は、4種の異なるハウスキーピング遺伝子（遺伝子発現のノーマライゼーション用）、VEGF（コントロールとして）、ならびに（i）CD31、CD34およびVE-CADHなどの、MVDの指標としての汎血管マーカー；（ii）VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、エフリンB2、NRP、ESM1、NID2、COL4a2およびLAMA4aを含めた、VEGF経路の重要な要素およびproxVDV遺伝子；および（iii）DLL-4、Notch1、ALK1およびEGFL7を含めた、内皮シグナル伝達経路の成分であり、VDV生物学の潜在的なモジュレーターであるさらなるVDV遺伝子を含む、22種の代表的な近位および遠位VDV遺伝子を含む、以前に設計および検証した「血管新生」Fluidigm qRT-PCRチップ（図8B）で解析した（このコンパクトな22種のVDV遺伝子シグネチャーの検証のために図9Aを参照されたい）。

【0257】

図8Aは、本研究で調査したNO16966試験由来の103人の患者におけるOSおよびPFSのカプランマイヤー分析を示す。これらの患者では、化学療法へのベバシズマブの追加は、統計的に有意なPFS（HR、0.59；95%CI、0.37から0.93； $p=0.024$ ）およびOSの利益（HR、0.45；95%CI、0.23から0.85； $p=0.015$ ）をもたらした。結腸がんの普及試料での予備的な実験によって、これらの22種のVDV遺伝子の発現が高度に相関することが示されたので（図8C）、いずれかの個々の遺伝子の中央発現レベルまたは22種のVDV遺伝子サブセットに対する中央発現スコアを、いずれの場合にも「高い」または「低い」のいずれかとしてCRC試料を分類するための根拠として使用することにした（図8B）。次いで、臨床転帰と「高い」または「低い」治療前の遺伝子発現との間の相関をテストした。以前に報告されたように、治療前のVEGF mRNAレベル単独による治療コホートの層別化は、ベバシズマブで治療した患者において、臨床転帰への差次的効果を示さなかった（図9B）。また、単一のdistVDV遺伝子（CD31）の発現レベルによって「高い」および「低い」サブセットに分類された、ベバシズマブで治療した患者は、PFSの差異を示さなかったが、OSの利益において傾向があった（図9C）。いずれの場合も、VEGFまたはCD31と治療との間の相互作用は、いかなる予測効果も示さなかった。特に、同一患者集団を「VDV高」集団対「VDV低」集団に層別化したときに（図8D）、効果量および有意性は、ベースライン解析と比較して実質的に変化した。「VDV低」患者（図8Dの点線）では、ベバシズマブと化学療法の組み合わせは、PFS（HR、0.88；95%CI、0.47から1.62； $p=0.67$ ）およびOS（HR、0.58；95%CI、0.25から1.33； $p=0.2$ ）の両方において、化学療法単独と比較して軽度の増加を与えた。それとは対照的に、「VDV高」患者（図8D、実線）では、化学療法へのベバシズマブの追加対化学療法単独は、顕著かつ有意なPFS（HR、0.36；95%CI、0.17から0.77； $p=0.0079$ ）およびOS（HR、0.31；95%CI、0.11から0.93； $p=0.036$ ）の利益をもたらした。治療とマー

カー状態の間の相互作用は、PFS ($p = 0.036$) について有意な予測効果を示すが、「VDV高」患者の相対危険率において改善が観察されたにもかかわらず、OS ($p = 0.37$) については統計的有意性に達しなかった。したがって、この比較的小さな103人の患者の試料セットでは、集団的なVDV遺伝子サブセットの高い発現は、特に化学療法へ追加したベバシズマブによってもたらされる臨床転帰の改善と関連し、PFSに関して予測効果を有する。

【0258】

実施例7. VEGFアンタゴニストに対する患者の応答性または感受性のモニタリング

この実施例は、患者がVEGFアンタゴニストに対して応答性または感受性であるかどうかをモニターするためのアッセイを記載している。インフォームド Consent と共に試料（例えば血液または組織生検物）を、VEGFアンタゴニスト（例えば抗VEGF抗体）で治療する前に1人または複数の患者から得る。周知の手順に従って、DNAおよび血清／血漿を単離する。この試料は、個体試料としてプールしてもよいし、維持してもよい。

10

【0259】

上記のように、表1または表2に記載される少なくとも1つの遺伝子の発現を、上記少なくとも1つの遺伝子についてmRNAを測定することによって、または上記少なくとも1つの遺伝子によってコードされるタンパク質をELISAを使用して検出することによって評価し、この評価は以下の置き換えを伴う：（1）マウス遺伝子（例えばNid2）標準の代わりにヒト遺伝子（例えばNid2）標準；（2）ビオチン標識化ヤギ抗マウス遺伝子（例えばNid2）ポリクローナルAbの代わりにビオチン標識化ヤギ抗ヒト遺伝子（例えばNid2）ポリクローナル抗体；および（3）0.5% BSAの代わりに10% FBS。本明細書に記載のように、試料が、コントロールと比べて、上記少なくとも1つの遺伝子の少なくとも2倍の発現増加を示す患者は、VEGFアンタゴニストでの治療に応答性または感受性の患者として同定される。

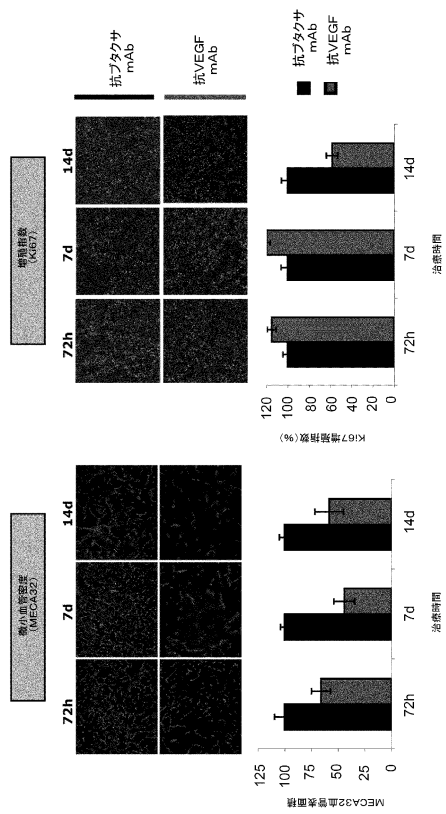
20

【0260】

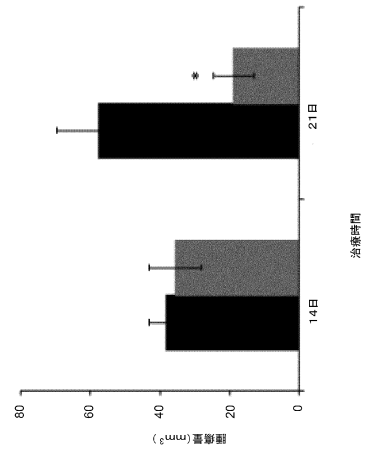
前述の発明は、理解を明瞭にする目的で、例示および実施例を通してある程度詳細に記載したが、その記載および実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用されるすべての特許、特許出願、科学文献およびGenbankの受託番号の開示は、あたかも各特許、特許出願、科学文献およびGenbank受託番号が具体的かつ個別的に参照により組み込まれるように、すべての目的のために、その全体が参照により明示的に組み込まれる。そうした特許出願は、特に、本出願が利益を主張する、2012年1月13日に提出された米国特許仮出願第61/586,660号を含む。

30

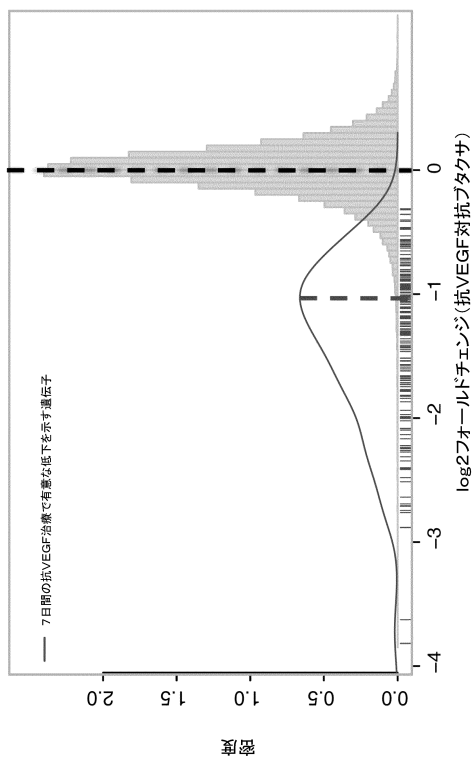
【図 1 A】



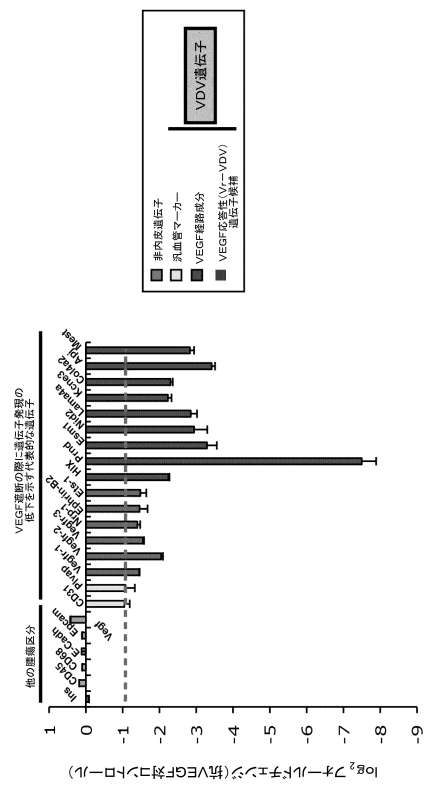
【図 1 B】



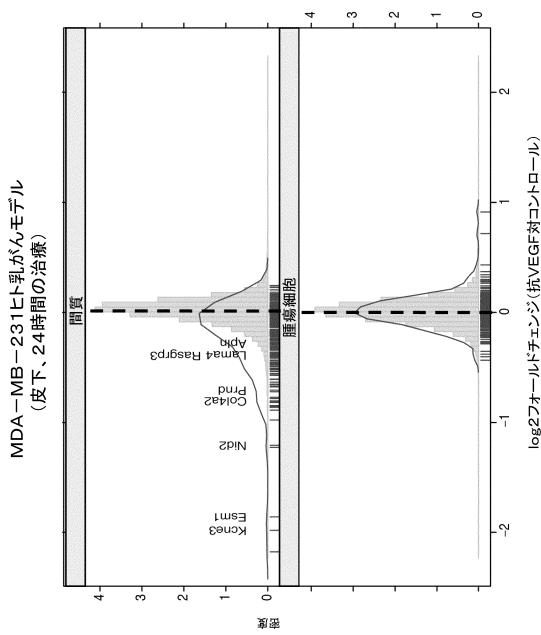
【図 1 C】



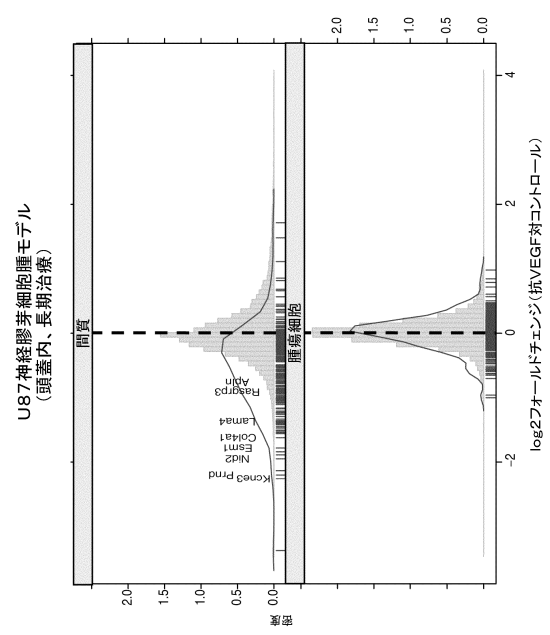
【図 1 D】



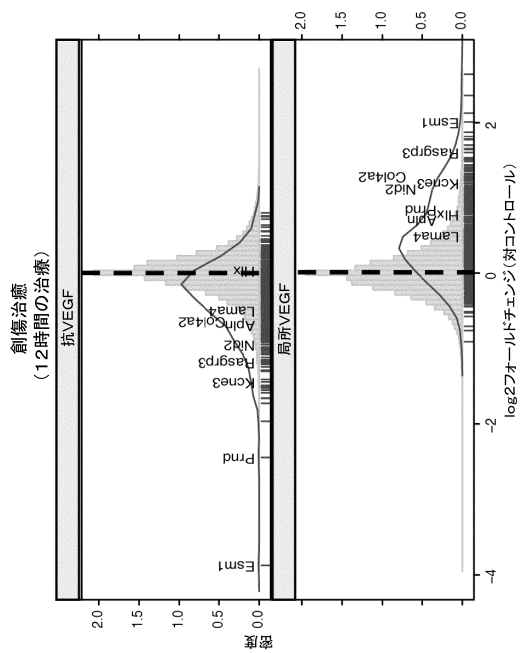
【図 2 A】



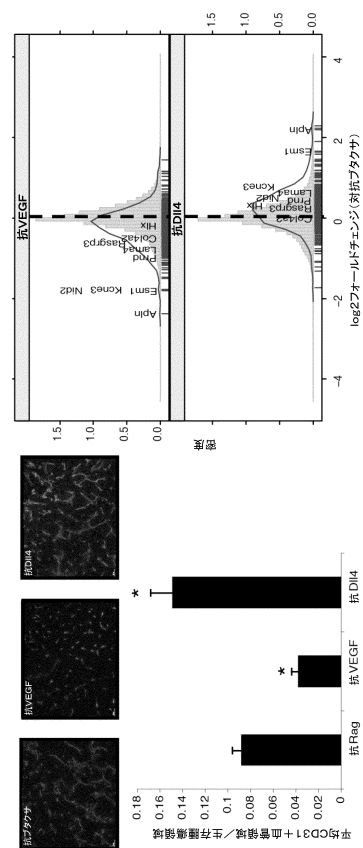
【図 2 B】



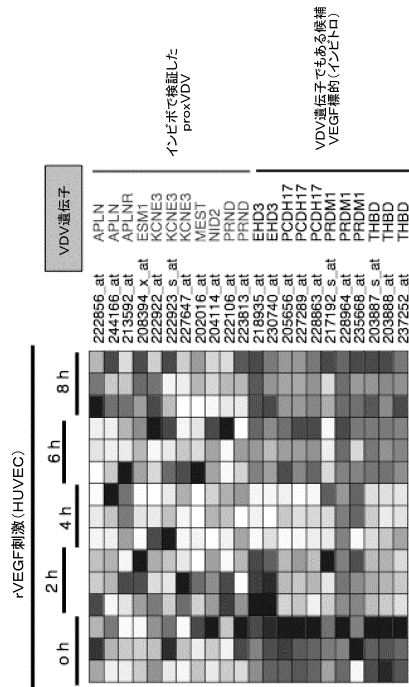
【図 2 C】



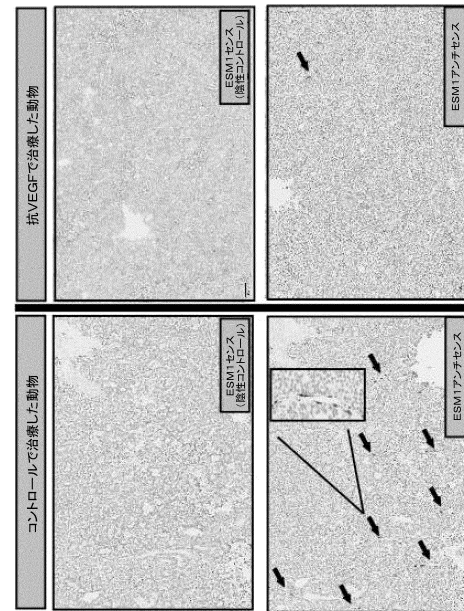
【図 2 D】



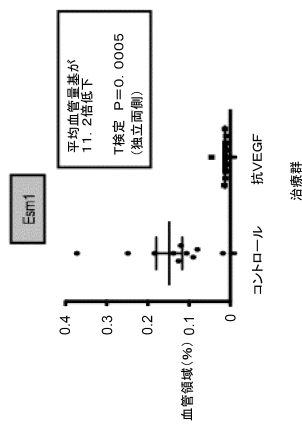
【図 3】



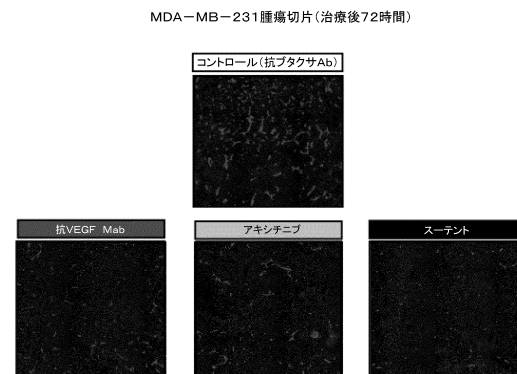
【図 4 A】



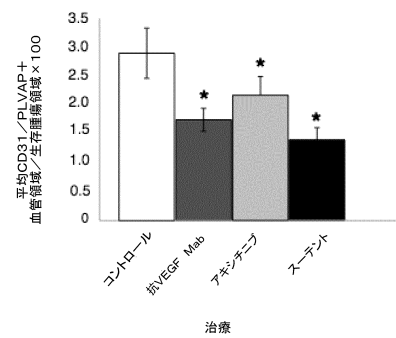
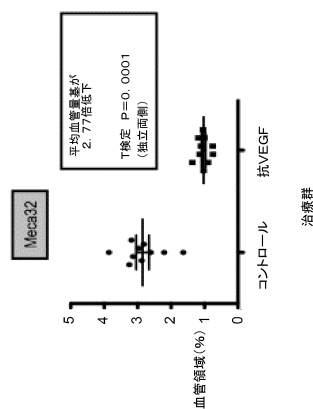
【図 4 B】



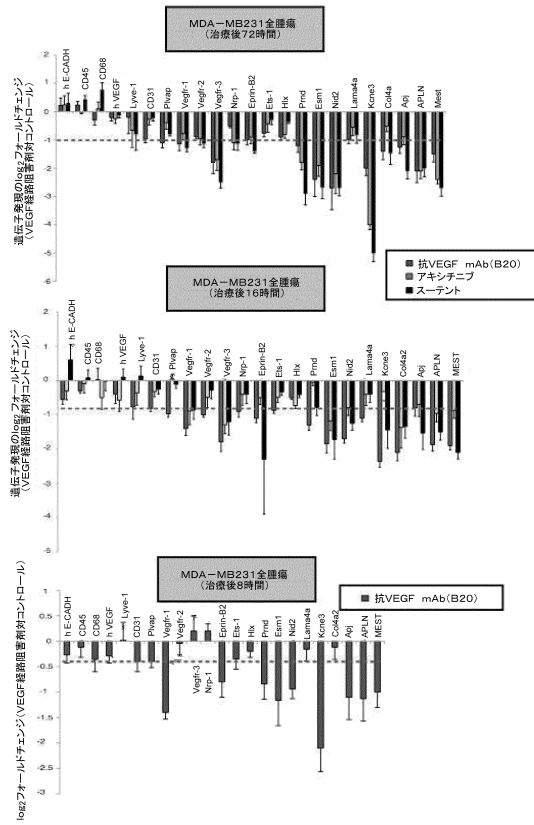
【図 4 D】



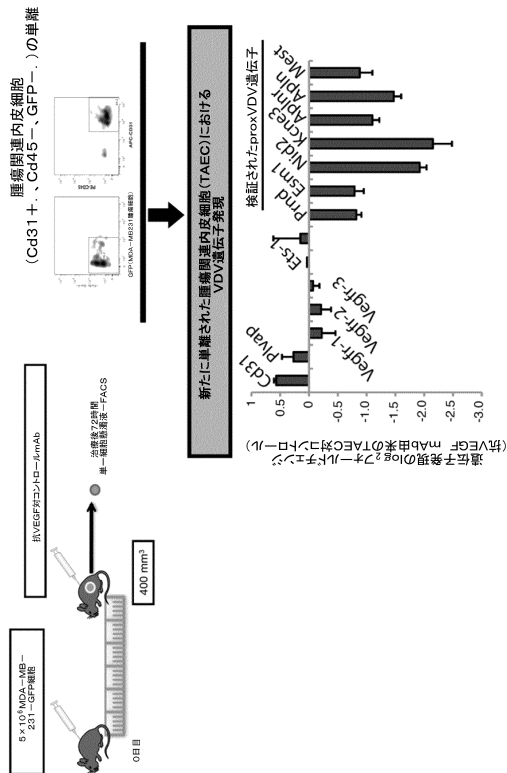
【図 4 C】



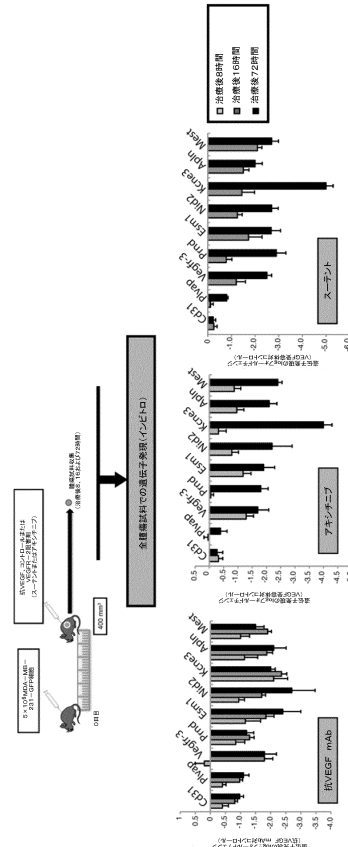
【図 4 E】



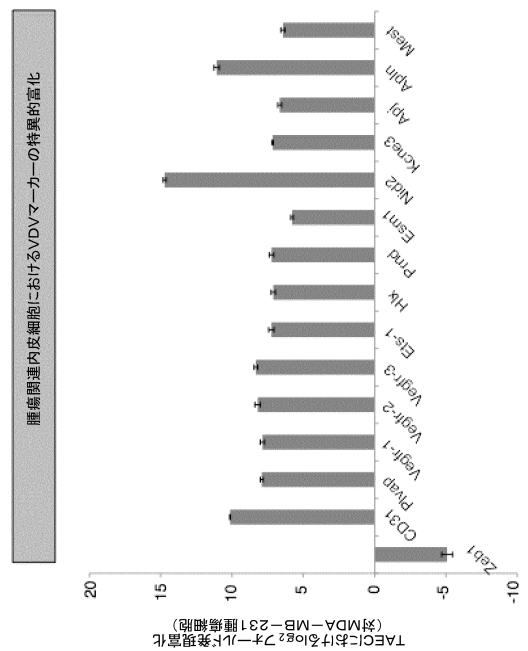
【図 5 B】



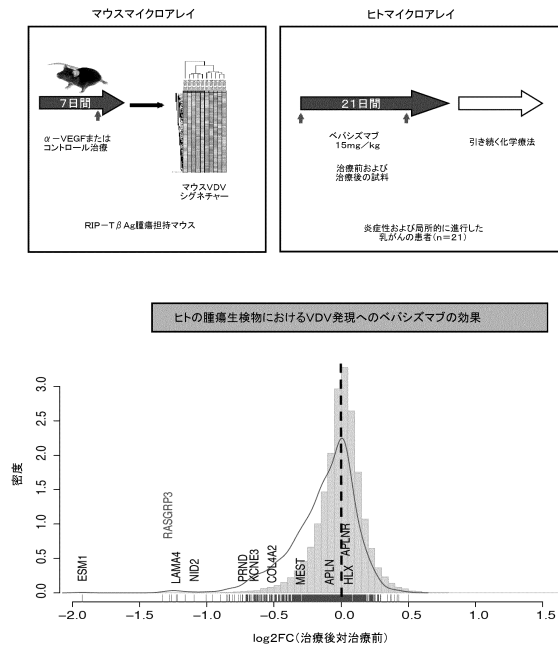
【図 5 A】



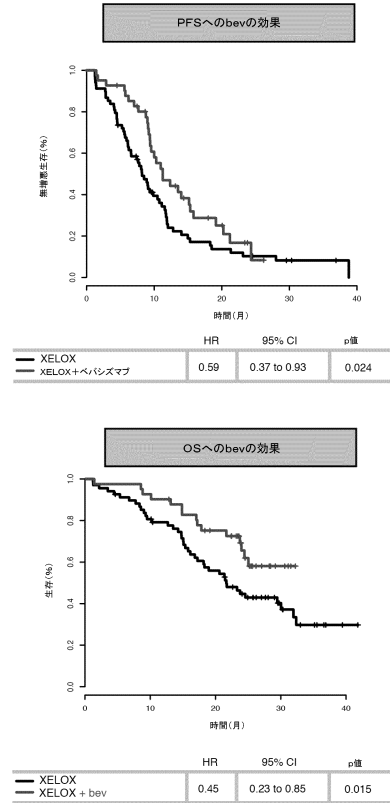
【図 6】



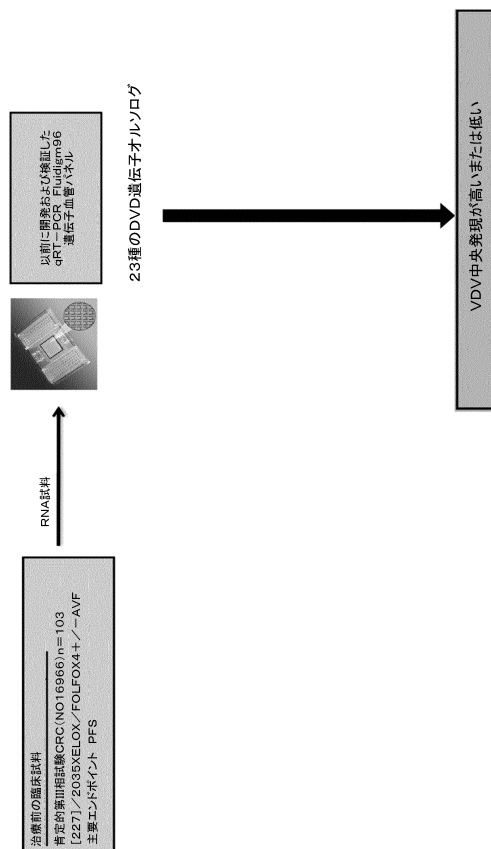
【圖 7】



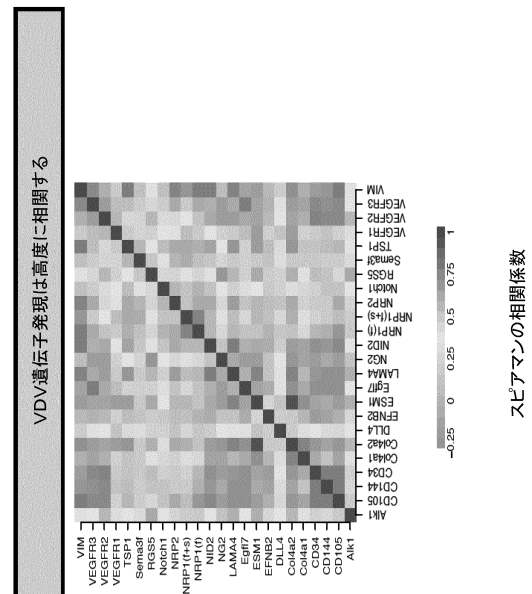
【図 8 A】



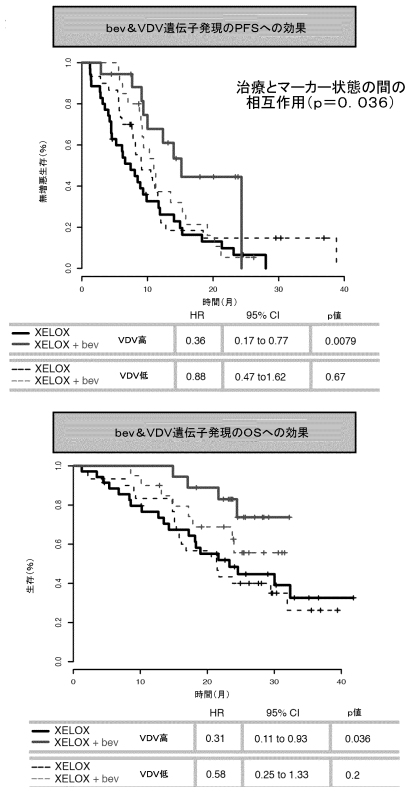
【図 8 B】



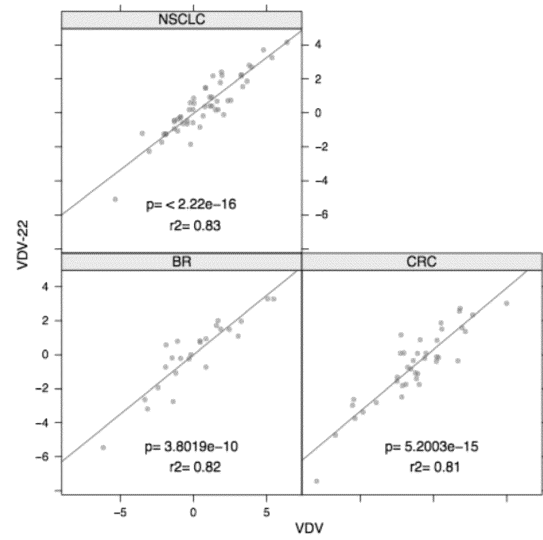
【図 8 C】



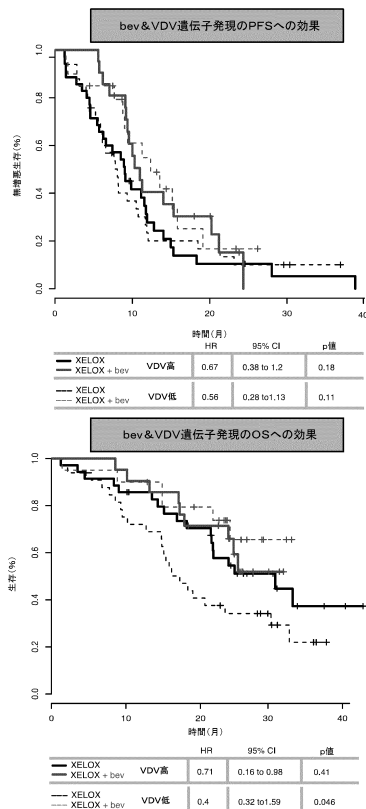
【図 8 D】



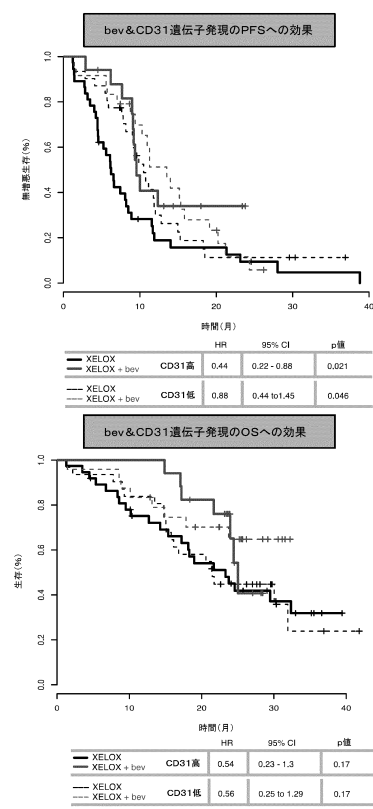
【図 9 A】



【図 9 B】



【図 9 C】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/50 P
G 0 1 N 33/574 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
C 1 2 N 15/09 (2006.01) G 0 1 N 33/574 Z
C 1 2 N 15/09 2 0 0

(72)発明者 シュミット, マイケ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

(72)発明者 シン, マリカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 0 / 0 0 6 2 3 2 (WO, A 1)
国際公開第2 0 1 1 / 0 2 0 0 4 9 (WO, A 1)
Lancet Oncol., 2 0 1 0 年, Vol.11, pp.1172-1183

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)