

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-523398  
(P2014-523398A)

(43) 公表日 平成26年9月11日(2014.9.11)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 45/06</b> (2006.01)	A 61 K 45/06	4 C 08 4
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 08 5
<b>A61K 39/395</b> (2006.01)	A 61 K 39/395	N 4 C 08 7
<b>A61K 38/22</b> (2006.01)	A 61 K 38/22	D 4 H 04 5
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K 38/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-501258 (P2014-501258)	(71) 出願人	506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1111 トゥエルフス フロア
(86) (22) 出願日	平成24年3月22日 (2012.3.22)	(74) 代理人	100147485 弁理士 杉村 憲司
(85) 翻訳文提出日	平成25年11月20日 (2013.11.20)	(74) 代理人	100174001 弁理士 結城 仁美
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/030204	(74) 代理人	100181272 弁理士 神 紘一郎
(87) 國際公開番号	W02012/129448		
(87) 國際公開日	平成24年9月27日 (2012.9.27)		
(31) 優先権主張番号	61/466,791		
(32) 優先日	平成23年3月23日 (2011.3.23)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗-インテグリンを用いた抗血管新生療法を改良するための方法及び組成物

## (57) 【要約】

本願明細書は、抗-血管新生治療を改善する腫瘍及び転移腫瘍を治療するための方法及び組成物である。生物システムのこれらの作用機序を抗-血管新生組成物と組み合わせた抗-ベータ1インテグリン組成物を用いて阻害することによって、腫瘍及び転移腫瘍から十分な血液供給を欠乏させて、腫瘍細胞に腫瘍細胞の死を含む増殖の停止及び可能ならば退行を生じさせる。本発明の組成物は、薬学的の組成物又は組成物中に、抗-V E G F 薬剤と組み合わせた抗-ベータ1インテグリン薬剤を含む。治療及びイメージングの方法も記載される。

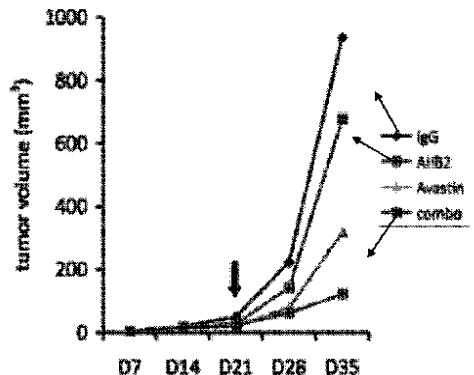


Figure 10

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

血管内皮増殖因子(VEGF)の阻害剤である第一薬剤と、  
ベータ-1インテグリンの結合を遮断する第二薬剤と、  
の組み合わせを含み、

ここで、前記組み合わせは、腫瘍細胞の増殖を、前記第一薬剤又は前記第二薬剤のいずれか別々の場合よりも大きい程度まで腫瘍細胞の増殖を阻害する、  
腫瘍細胞の増殖を阻害するための薬学的組成物。

**【請求項 2】**

前記 VEGF の阻害剤は VEGF に結合する抗体である、請求項 1 に記載の組成物。

10

**【請求項 3】**

前記抗体はヒト化マウス抗体である、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

前記第二薬剤はベータ-1インテグリンに対して結合するポリペプチドである、請求項 1、2、又は 3 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記ポリペプチドは、あらゆるアルファサブユニットに関連するベータ-1インテグリンに対して結合し、腫瘍細胞の細胞外基質に対する結合を阻害する、請求項 4 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記ポリペプチドはベータ-1インテグリンに特異的な抗体である、請求項 4 に記載の組成物。

20

**【請求項 7】**

前記ベータ-1インテグリンに特異的な抗体は、キメラ、一本鎖、又はヒト化抗体である、請求項 6 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記抗体は AII B 2、BIE 1 1 又は AII B 若しくは BIE 1 1 に由来するヒト化抗体である、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記第一薬剤及び前記第二薬剤は、VEGF を認識する 1 つの結合部位、及びベータ-1インテグリンを認識する 1 つの結合部位を有する 2 価抗体により提供される、請求項 1 に記載の組成物。

30

**【請求項 10】**

腫瘍を有する被験者に対して、  
抗血管新生薬である第一薬剤と；ベータ-1インテグリンにより仲介される腫瘍細胞の結合を遮断する第二薬剤と  
の組み合わせを投与するステップを含み、

ここで、腫瘍細胞の増殖は、前記第一薬剤又は前記第二薬剤のいずれか単独の場合よりも大きい程度で阻害される、

腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

40

**【請求項 11】**

前記抗血管新生薬は VEGF に結合する抗体である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記抗血管新生薬は、ヒト化マウスモノクローナル抗体及び完全ヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記第二薬剤はベータ-1インテグリンに結合するポリペプチドである、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記ポリペプチドは、あらゆるアルファサブユニットに関連するベータ-1インテグリ

50

ンに対して結合する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ポリペプチドはベータ - 1 インテグリンに特異的な抗体である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体は、キメラ、一本鎖、又はヒト化抗体である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体は A I I B 2、B I E 1 1 又はそのヒト化誘導体である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記腫瘍は、神経膠芽腫、大腸、肺、肝臓、腎臓、結腸、メラノーマ、及びリンパ腫からなる群から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 19】

腫瘍をベータ - 1 インテグリンの結合の阻害剤と接触させるステップを含む、神経上皮組織の腫瘍を治療する方法。

【請求項 20】

前記阻害剤はあらゆるアルファサブユニットに関連するベータ - 1 インテグリンに対して結合する抗体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

腫瘍を有する被験者に対して、

V E G F に対して結合する第一薬剤と；ベータ - 1 インテグリンにより仲介される腫瘍細胞の結合を遮断する第二薬剤と

の組み合わせを投与するステップを含み、

ここで、前記第一薬剤又は前記第二薬剤の 1 つ又は両方はラベル化されている、腫瘍をイメージングする方法。

【請求項 22】

前記第二薬剤は、キメラ、一本鎖、又はベータ - 1 インテグリンに対して結合するヒト化抗体である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記腫瘍は、神経膠芽腫、大腸、肺、腎臓、肝臓、卵巣、及び乳房からなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

前記細胞にベータ - 1 インテグリンをコード化する遺伝子の発現を妨げる拡散コンストラクトを送達するステップを含む、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法。

【請求項 25】

前記コンストラクトは、ベータ - 1 インテグリン mRNA に対して結合して、ベータ - 1 インテグリン遺伝子発現を発現停止する s h R N A をコード化するレンチウイルスベクターである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

被験者に抗 - インテグリン薬剤を投与するステップを含み、前記被験者は抗 - V E G F 抗体による治療に失敗している、

腫瘍を有する被験者を治療する方法。

【請求項 27】

( a ) 腫瘍内、切除による空洞内、又は硬膜下に配置するためのカテーテルと；  
( b ) 前記カテーテルを通して、対流強化送達法 ( C E D ) 装置により、臨床的に意義のある用量及び速度で、投与するために製剤化された、阻害性の抗 - ベータ 1 インテグリン組成物と

を含む、再発性の多形膠芽細胞腫 ( G B M ) を有する被験者を治療するためのキット。

【請求項 28】

腫瘍を有する被験者に対して、

10

20

30

40

50

抗血管新生薬である低用量の第一薬剤と；ベータ-1インテグリンにより仲介される腫瘍細胞の結合を遮断する第二薬剤と、の組み合わせを投与するステップを含み、

ここで腫瘍細胞の増殖は、より高い用量の第一薬剤により生じる量と同じ量まで阻害される、

腫瘍細胞の増殖を抑制する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

10

本出願は、2011年3月23日に出願された米国仮出願第61/466791号の利益を主張するものであり、その全開示を参照により本願明細書に援用する。

【0002】

(政府支援についての記載)

なし

【0003】

(配列表、コンピュータプログラム、又はコンパクトディスクの参照)

本出願は、EFS-WebによりASCII形式で提出された配列表を含み、その全開示を参照により本願明細書に援用する。2012年1月31日に作成されたこのASCIIの複製は、「479-100配列表.txt」と名付けられ、5287バイトのサイズがある。

20

【0004】

本発明は、治療用組成物、及び転移性癌を含む癌の治療、特に、腫瘍の血管新生を標的とした治療に関する。

【背景技術】

【0005】

(先行技術)

本発明の特定の態様についての背景的情報を下記に記載する。これらは、詳細な説明において言及されるが、必ずしも詳細に記載されない技術的特徴に関連し得る。すなわち、本発明に用いられる個々の部材又は方法は、以下に記載の文献においてより詳細に記載され得る。これらの文献は、請求項に記載される本発明の特定の態様を実施又は使用するための更なる助言を当業者に提供する。以下の記載は、本願のあらゆる請求項について重要な情報であること、又は、下記の文献の先行技術の効果に関する自白として解釈されるべきではない。

30

【0006】

多くの分子が、抗血管新生の特性を有すると同定されている。しかしながら、今日最高とされているのは、血管内皮増殖因子-A (VEGF-A) である。これは、薬のベバシズマブの標的であり (a.k.a., Avastin (登録商標) Genentech、南サンフランシスコ、カリフォルニア州)、結腸及び直腸 (Hurwitz et al., New England Journal of Medicine 350: 2335-2342 (2004))、乳房 (Miller et al., New England Journal of Medicine 357: 2666-2676 (2007))、肺 (Sandler et al., New England Journal of Medicine 355: 2542-2550 (2006))、腎臓 (Escudier et al., The Lancet 370: 2103-2111 (2007))、及び脳 (Friedman et al., Journal of Clinical Oncology, doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721 (2009)) を含む様々な末期癌を有する患者において、臨床応用の可能性を示す。VEGF-A受容体に対してデザインされた薬も、VEGF-Aそのものと反対に、最近の臨床試験において同様の可能性を示してきた。

40

50

## 【0007】

ルセンティス（登録商標）（ラニビズマブ）も組換え型ヒト化抗-VEGF抗体である。ラニビズマブは複数のVEGF-Aアイソフォームに対して結合する。抗体断片として、ラニビズマブは分子量48kDを有する小分子としてデザインされる。これは、静脈内又は腫瘍内の用途よりもむしろ、硝子体内の用途のためにパッケージ化される。

## 【0008】

VEGF-Aは最も特性評価され、おそらく最も可能性がある、血管増殖因子のファミリーである(Ferrara and Gerber, Acta Haematologica 106: 148-156 (2002))。最近では、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F、及びPIGFを含む。これらの因子は、少なくとも3つの公知の受容体チロシンキナーゼ: VEGFR1、VEGFR2、及びVEGFR3を通してシグナルを送る。

10

## 【0009】

不運なことに、今日までの抗血管新生の仮説による予測は、臨床において現実化されてきていない(Greenberg and Cheresh, Expert Opinion on Biological Therapy 9: 1347-1356 (2009))。最高でも、化学療法と組み合わせたベバシズマブ治療が、生存の延長を平均4.7月だけに留めただけである(Hurwitz et al., New England Journal of Medicine 350: 2335-2342 (2004))。患者は、究極的には継続した癌の増殖に屈する。この耐性の作用機序は、議論されており、血管新生の仮説の無効、又は腫瘍細胞の代わりの血管源を得る能力のいずれかを反映してよい。

20

## 【0010】

従来技術における治療戦略は、血管新生に基づく腫瘍の血管新生という1つの概念に過度に依存してきた。抗-血管新生の治療に対する臨床的な耐性は、脈管構造を得るために川氏の方法を用いる腫瘍細胞による可能性が極めて高い。血管拡張、血管リモデリング、血管吸収、血管隔壁形成、血管膠芽腫形成、疑似血管形成、及び循環血管内皮前駆細胞を含む、様々なタイプの腫瘍の血管新生のプロセスが以下に記載される(Dome et al., American Journal of Pathology 170: 1-15 (2007))。

30

## 【0011】

従来技術における幾つかの戦略は、腫瘍の血管新生の阻害のための治療戦略の組み合わせを提案してきた。しかしながら、これらの戦略は腫瘍の血管新生の血管新生の側面のみを標的とするか、又は、新たな腫瘍の血管の血管破裂を標的とすることを提案する。現在のところ、先行技術における治療戦略は、血管成長のシグナリング及び接着に基づく吸収のシグナリングの両方の組み合わせを標的とした化合物を生物システムに対して投与することによって、腫瘍及び/又は転移の血管新生の完全な阻害を提供する。

## 【0012】

## (特定の特許及び文献)

Park et al. (米国特許第7,618,627号、2009年11月17日発行、“Method of increasing radiation sensitivity by inhibition of beta-one integrin”)は、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させるためのイオン照射と組み合わせて、抗-ベータ1インテグリン抗体AIIIB2を用いた。

40

Theodore Yednock (米国特許第6,033,665号(2000年))“Compositions and methods for modulating leukocyte adhesion to brain endothelial cells.”。これは、臨床用にFDA承認された抗-インテグリン治療薬(複数の硬化症の治療用のアルファ-4-ベータ-1に対するTysabri(登録商標)、Elan Pharmaceuticals, Inc.)を生じさせた最初の特許の1つ

50

である。

Friess et al. (米国特許出願公開第0050385 A1号(2008年))は、共に血管新生に関連する増殖因子を標的とする、抗-VEGF抗体及び抗-HER2抗体による組み合わせ治療を提案した。

Senger et al. (米国特許第6,596,276号(2003年))は、VEGFを介する血管新生の下流にあるエフェクターを標的とする、アルファ-1及び/又はアルファ-2インテグリンサブユニットに対する阻害抗体の投与を提案した。

Bissell et al. (米国特許第5,846,536号(1998年)及び米国特許第6,123,941号(2000年))は、有効量の、ベータ1インテグリン機能-遮断抗体、又は、かかる治療を必要とする組織のベータ1受容体に対するインテグリンの機能のペプチド阻害剤を投与することによって、組織中の悪性の表現型を逆転させる方法を開示する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】米国特許第7,618,627号

【特許文献2】米国特許第6,033,665号

【特許文献3】米国特許出願公開第0050385 A1号

【特許文献4】米国特許第6,596,276号

【特許文献5】米国特許第5,846,536号

【特許文献6】米国特許第6,123,941号

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献1】Hurwitz et al., New England Journal of Medicine 350:2335-2342 (2004)

【非特許文献2】Miller et al., New England Journal of Medicine 357:2666-2676 (2007)

【非特許文献3】Sandler et al., New England Journal of Medicine 355:2542-2550 (2006)

【非特許文献4】Escudier et al., The Lancet 370:2103-2111 (2007)

【非特許文献5】Friedman et al., Journal of Clinical Oncology, doi: 10.1200/JCO.2008.19.8721 (2009)

【非特許文献6】Ferrara and Gerber, Acta Haematologica 106: 148-156 (2002)

【非特許文献7】Greenberg and Chereash, Expert Opinion on Biological Therapy 9: 1347-1356 (2009)

【非特許文献8】Hurwitz et al., New England Journal of Medicine 350:2335-2342 (2004)

【非特許文献9】Dome et al., American Journal of Pathology 170: 1-15 (2007)

【発明の概要】

【0015】

下記の概要は本発明の全ての特徴及び態様を含むことを意図するものではなく、本発明がこの概要に記載される全ての特徴及び態様を含まなければならないことを示唆するものでもない。

【0016】

本発明は概して、腫瘍細胞の増殖を阻害するための薬学的組成物に関し、該薬学的組成

10

20

30

40

50

物は、VEGFシグナリング及び/又はVEGF受容体に対する結合等のVEGFの活性の阻害剤である第一薬剤と；ベータ-1インテグリンを遮断する第二薬剤とを含む。ベータ-1インテグリンの遮断は、細胞接着の遮断、細胞接着後に生じるベータインテグリン細胞内シグナリングの遮断、又はその両方とし得る。用いられ得る薬剤はペプチド又は小分子等の要素の組成物である。これらは、抗体又は抗体様分子としてもよい。薬剤の組み合わせは相乗効果を有する、すなわち、いずれかの薬剤別々の場合よりもより効果がある。薬剤は1種の組成物又は組成物のマッチしたペアに含めてよい。

【0017】

特定の態様では、本発明は、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法に関する。概して、本発明の方法は、腫瘍を有する被験者に対して、抗血管新生薬である第一薬剤と；；ベータ-1インテグリンにより介する腫瘍細胞の細胞外マトリックスとの相互作用、及びベータ-1インテグリンシグナリングを遮断する第二薬剤との組み合わせを投与するステップを含み、ここで、腫瘍細胞の増殖は、第一薬剤又は第二薬剤のいずれか単独の場合よりも大きい程度で阻害される、すなわち、相乗効果的である。好適には、対照は癌を有するヒト対象である。

10

【0018】

一実施形態では、本発明の方法は、投与量の、アンタゴニストである、抗-VEGF受容体、抗-VEGF（例えば、抗-VEGF-A）抗体と組み合わせたベータ-1インテグリン抗体の投与を含む。様々な抗-VEGF及び抗-インテグリン薬剤を以下に詳細に記載する。組み合わせの抗体の患者への送達方法は、臨床的な腫瘍学の分野における、通常の医学、看護学、又は医療関連学の技術を有する者に周知であろう。本発明の組成物は、あらゆる臨床的手法、特に、非経口又は腫瘍内注射により投与することができる。本発明の組成物は、外科的な摘出後の腫瘍床を含む生体内における実際の又は生じ得る空洞に、直接的に適用することができる。血管透過性を増大させる薬剤も臨床的に適切な間隔で投与することができる。これらは中枢神経系（CNS）等の中枢器官における治療薬の送達を高めることができる。加えて、術後補助（アジュバント）療法計画も、放射線及び化学療法を含む治療の前、最中、又は後に行うこともできる。実施形態の繰り返しの投与も所望の臨床的效果を達成するために提供することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0019】

30

【図1】図1A、1B、及び1Cは、それぞれ、急性低酸素症に対する、U87MG神経膠腫細胞（1A）、MDA-MB-231乳癌細胞（1B）、及びSW1080結腸直腸癌細胞（1）のベータ-1インテグリン（MF1）の増加を示す3つの棒グラフである。

【図2】図2A及び2Bは、ベバシズマブ治療による治療を行った場合（A）又は行わなかった（B）場合の、神経膠腫腫瘍の異種移植片の、インテグリンベータ-1の発現についての染色を示す1対の写真である。

【図3】図3Aは、異なる増殖条件におけるU87MG神経膠腫細胞でのインテグリンベータ-1の発現を示す棒グラフであり、図3Bは、インテグリンベータ-1の発現と増殖との間の相関関係を示す散布図である。

40

【図4】図4A及び4Bは、通常の脈管構造（4A）の箇所、及び血管新生の膠芽腫血管（4B）について、インテグリンベータ-1の発現について染色した細胞を示す、多形膠芽細胞腫の患者の試料の1対の写真である。

【図5】図5は、一次性膠芽腫、及び抗血管新生evasiv神経膠芽腫の場合におけるインテグリンベータ1発現をプロットする棒グラフである。

【図6】図6は、一次性膠芽腫細胞株に対する異なる投与量のAII B2による細胞増殖阻害、及びAII B2を低酸素（1%酸素、48時間）と組み合わせた場合の相乗的な増殖阻害を示す棒グラフである。

【図7】図7A及び7Bは、3つの異なるノックダウン細胞株のインテグリンベータ-1の発現（7A）と増殖（7B）とを示す1対の棒グラフであり、インテグリンベータ-1ノックダウンが、実質的により小さい発現及び増殖を示した。

50

【図8】図8は、抗血管新生耐性の神経膠腫細胞の細胞株における、異なるA I I B 2の濃度のアネキシン及びKi67アポトーシスマーカーの発現を示す棒グラフである。

【図9】図9は、異なる濃度のAIIIB2抗体での一次GBM細胞株の細胞増殖を示す棒グラフである。

【図10】図10は、マウス腫瘍モデルにおける、異なる抗体による治療下での腫瘍の大きさの変化を示す。「combo」とラベルされたプロットは、A I I B 2 及びベバシツマブの組み合わせである。矢印は治療の開始を示す。

【図11】図11は、異なる濃度のAIIIB2により2日間治療した、増殖相及びコンフルエント（増殖停止）の培養物におけるGBM細胞の細胞増殖の時間経過を示す棒グラフである。

【図12】図12は、2日間の低酸素、その後の酸素正常状態での成長、に曝されたG B M細胞の細胞増殖の時間経過を示す棒グラフである。

【図13】図13は、コントロール IgG (10 mg/kg) (ダイヤモンド)、ベバシツマブ (10 mg/kg) (四角)、又は低用量のベバシツマブ (1 mg/kg) 及びAIIIB2 (1 mg/kg) の交互の組み合わせによる治療 (丸) を用いて、1週間おきに測定した、U87MG神経膠腫腫瘍についての腫瘍増殖の時間経過を示す線グラフである。

#### 【說明本章的中心思想和形態】

【光明を実施】

特に断りのない限り、本願明細書に用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する分野における当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本願明細書に記載されるものに類似又はそれと同等のあらゆる方法及び材料を、本発明の実施又は試験において用いることができるが、好適な方法及び材料を記載する。一般的に、細胞生物学及び科学の技術に関する命名は、周知であり、且つ当該技術分野で一般的に用いられるものである。特定の実験技術は、具体的に記載しないが、当該技術分野において周知であり、且つ本願明細書を通して引用及び言及される様々な一般的な及びより具体的な文献に記載される、従来的な方法に従って行われる。わかりやすさの目的で、下記の単語を以下に定義する。

( 0 0 2 1 )

「VEGF」という用語は、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor)を指し、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor)をも指し、Genbankアクセション番号: AAA35789の、更には、Leung, et al. "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen," Science 246 (4935), 1306-1309 (1989)に記載される、例示的なアミノ酸配列を有する。VEGFは、二量体であり、ジスルフィド結合した46kDaの、血小板由来増殖因子(「PDGF」)に関連する糖タンパク質である。これは、正常細胞株及び腫瘍細胞株により生産され；内皮細胞選択的な分裂促進因子であり；インビオ試験系(例えば、ウサギ角膜)において血管新生の活性を示し；内皮細胞及び単球に対して走化性であり；内皮細胞中でプラスミノーゲン活性化因子を誘導して、毛細管の形成中に細胞外マトリックスのタンパク質分解に関与する。多数のVEGFのアイソフォームが知られており、それらは同等の生物活性を示すものの、それらを分泌する細胞のタイプ、及びそれらのヘパリン結合能力において異なる。VEGFSの細胞の需要遺体(VEGFRs)は、膜貫通受容体チロシンキナーゼである。これらは、7つの免疫グロブリン様領域を有する細胞該領域、及び細胞内チロシンキナーゼ領域を特徴とする。VEGFR-1(flt-1としても知られている)、VEGFR-2(KDR3としても知られている)、及びVEGFR-3を含む、様々なタイプのVEGF受容体が特性評価されている。大多数のヒトの腫瘍、特に、神経膠腫及び細胞腫、は高レベルのVEGF及びVEGFRsを発現する。これは、腫瘍細胞により放出されるVEGFが、パラクリンのように、血管の毛細管の成長、及び腫瘍細胞

瘍内皮の増殖を刺激し、血液供給の向上を通して、腫瘍の増殖を加速するという仮説を導いた。

【0022】

「VEGF阻害剤」という用語は、VEGF-VEGFR経路によるシグナリングを減少する物質又は方法を指す。VEGF阻害剤は、例えば、小分子、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質としてよく、より具体的には、抗体を含み、抗-VEGF抗体、抗-VEGFR抗体、イントラボディ（細胞内抗体）、マキシボディ、ミニボディ、ダイアボディ、ペプチボディ、リセプチボディ、溶解性VEGF受容体タンパク質及びその断片等のFc融合タンパク質、並びに他の様々なものを含む。今日好適なVEGF阻害剤はペプチドであり、例えば、阻害剤に基づく抗体等である。多くのVEGF阻害剤は、VEGF又はVEGF受容体に対して結合することによって、機能する。他は、VEGF若しくはVEGF受容体に対して結合する因子、又はVEGFシグナリング経路の他の要素に対して結合することによって、より間接的に機能する。また他のVEGF阻害剤は、VEGFシグナリング経路を調節する翻訳後修飾の制御を変更することによって、作用する。本発明に従うVEGF阻害剤は、より間接的な作用机上により作用してもよい。関わる作用機序が何であれ、本願明細書に用いられるように、VEGF阻害剤は、阻害剤の非存在下での同じ状況におけるものよりも、所与の状況におけるVEGFシグナリング経路の効果活性を減少させる。別のVEGF阻害剤は、下記の通り、RNAiを用いる、核酸に基づくものである。

10

20

30

【0023】

「ヒト化」という用語は、非ヒト免疫グロブリン由来の配列を最小限含むキメラ抗体である、非ヒト（例えば、齧歯類）形式の抗体を指す。大部分では、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト靈長類等の非ヒトの種（ドナーの抗体）の超可変領域由来の残基により置換されている、ヒト免疫グロブリン（レシピエントの抗体）である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基が、対応する非ヒトの残基により置換されている。更には、非ヒト抗体は、レシピエントの抗体又はドナーの抗体に見られない残基を含んでよい。これらの変性は抗体の働きを更に高めるためになる。一般的に、ヒト化抗体は、実質的に全てにおいて、少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域を含み、全て又は実質的に全ての超可変ループは非ヒト免疫グロブリンのそれに対応し、且つ全て又は実質的に全てのFRsは非ヒト免疫グロブリンの配列である。ヒト化抗体は、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれをも含む。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323-329 (1988); 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992) を参照のこと。

40

50

【0024】

「対流強化送達法（convection enhanced delivery）」という用語は、血液脳関門を回避して脳に薬物送達する方法を指す。対流強化送達法は、最初に、R. Hunt Bobo et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (March 1994, Vol 91, pages 2076-2080; "Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain") により記載された。対流強化送達法は、脳実質への幾つかのカテーテルの頭蓋の穴による定位固定、及びマイクロインフュージョンポンプによる治療用薬剤のその後の注入を含む。脳への大部分の薬の局所送達の標準的な方法は、静脈内注射及び脳関門の通過又は脳室内注射のいずれかにより、分散に依存するものであり、大部分の薬剤の不均一分布を生じる。脳に対する薬物の静脈内投与は、血液脳関門により妨害され、第分子の通過を妨げる。血液脳関門は、血管内皮細胞間の狭い接合部を特徴とし、様々な天然及び合成の物質（抗癌薬物を含

む)が脳に侵入することを妨げる又は遅らせる。分散に依存する技術とは対照的に、対流強化送達法は、細胞外空間に薬物を押し出すために、注入カテーテルの先端で実現される圧力勾配を用いる。目的は薬物をより均等に、より高濃度で、分散のみにより投与された場合よりも広い領域に亘って、分散させることである。治療用薬剤の対流強化送達は、腫瘍摘出を伴う開頭術の後で行ってよい。薬物の対流強化送達は、Yael Mardor et al. in Cancer Research (August 2005, vol 65, pages 6858 - 6863; "convection-enhanced drug delivery: Increased efficacy and magnetic resonance image monitoring" に詳細に記載される。

10

## 【0025】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、非ヒト(例えば、マウス)配列を実質的に含まない抗体を指す。これは、当該技術分野に知られるように、Fv部分又はCDR領域のいずれかの、抗体の結合領域を保存するマウス配列の除去により、完全ヒト又はヒト化させてよい。

## 【0026】

「抗体」という用語は、Fv断片、軽鎖及び重鎖可変領域のみを含むFv断片、ジスルフィド結合により結合したFv断片(Brinkmann, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 547-551 (1993))、可変領域及び定常領域の部分を含むFab又は(Fab)'2断片、一本鎖抗体(Bird et al., Science 242: 424-426 (1988); Huston et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988))等の様々な形式の変性又は変形された抗体、並びにその同等物を更に含む。抗体は、原始的に動物(特にマウス又はラット)又はヒトを起源とするものとしてよく、又はキメラのものとしてもよい(Morrison et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984))。これは、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)、及び英国特許出願公開第8707252号に記載されるようにヒト化してもよい。

20

## 【0027】

「細胞外基質」という用語は、細胞の結合のための物質を指し、脈管構造(血管内皮細胞)、又は、細胞外マトリックス(ECM)、すなわち、様々な他の重要な機能を発揮することに加えて、通常、動物細胞に構造的な支持を与える、動物組織の細胞外部分等の両方の組織を含んでよい:これは、線維性タンパク質及びグリコサミノグリカンの連結メッシュを含む。

30

## 【0028】

「shRNA」という用語は、ショートヘアピンRNAを指す。

## 【0029】

「RNAi」という用語は、RNA干渉を指す。RNAiは、二重鎖RNA(dsRNA)をdsRNAと同じ配列を含むメッセンジャーRNA(mRNA)を分解するために用いる、転写後の標的とした遺伝子のサイレンシング技術である(Sharp, P. A. and Zamore, P. D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P. D., et al. Cell 101, 25-33 (2000); Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999); Cottrell T R, and Doering T L. 2003. Trends Microbiol. 11: 37-43; Bushman F. 2003; Mol Therapy. 7: 9-10; McManus M T and Sharp P A. 2002. Nat Rev Genet. 3: 737-47)。このプロセスは、内在性のリボヌクレアーゼが長いdsRNAを短く切断する、例えば、21又は22ヌクレオチド長のRNAsとされ、

40

50

低分子干渉RNA又はsiRNAと名付けられる、ときに生じる。低分子干渉RNA部分はその後標的のmRNAの分解を仲介する。RNAiの合成用キットは、例えば、New England Biolabs社又はAmbion社から市販されている。一実施形態では、アンチセンスRNAにおいて用いるための本願明細書に記載される1つ又は複数の化学をRNAiを仲介する分子において用いることができる。

【0030】

「薬学的組成物」という用語は、「薬学的に許容可能な」希釈剤、安定化剤、賦形剤等と組み合わせて、特定の量で、列挙する治療用薬剤を含む、製品又は製品のペアを指す。 「薬学的に許容可能」という用語は、本発明の薬学的組成物、薬物、又は医薬の製剤中に用いるための、十分な純度及び品質を有し、また、動物又はヒトに対して適切に投与したときに、副作用、アレルギー、又は他の有害反応を生み出すことのない、分子の集合及び組成物を指す。ヒトへの使用及び動物への使用の両方が、本発明の範囲に同等にふくまれるため、薬学的に許容可能な製剤は、ヒト又は動物用の、薬学的組成物、薬物、又は医薬を含む。

10

【0031】

方法に関する本発明の特定の態様では、薬学的組成物は、1種の薬剤を含んでよいが、この方法によれば、他の薬剤と共に、治療の流れの中で投与されてもよい。

【0032】

(方法及び材料一般)

本願明細書に記載されるのは、1) 血管の新たな成長又はリモデリング(すなわち、血管新生)と、2) 直接的な接着性の相互作用(すなわち、吸収)による既存の血管の使用による腫瘍の血管新生という2つの作用機序が認められる、腫瘍及び転移腫瘍、を治療するための改良した方法及び組成物である。生物システム中の両作用機序を組み合わせて阻害することによって、腫瘍及び転移腫瘍は、十分な血液供給を取り除くことができ、腫瘍細胞の死を含む腫瘍細胞の成長停止及び可能ならば退行を生じさせることができる。この方法は、血管新生が疾患、特に癌のプロセスにおいて寄与する因子となる、科学的研究及び医療において様々な用途を有する。別の実施形態では、組織の修復又は交換のための血管新生の増強を、血管新生及び接着性の血管吸収の両方を同時に又は連続的に促進することによって達成することができる。

20

【0033】

現在のVEGF経路を標的とする血管新生治療は、Genetech's Avastin(登録商標)(ベバシツマブ)により指導される、2009年の総売上高が61億ドルであった、急成長中の市場である。しかしながら、Avastin(登録商標)は、中程度の臨床的成功しか示さなかった。最高でも、それは、脳癌(多形の神経膠芽腫、GBM)において4.2月の未成長の生存、及び結腸癌において4.7月の全体的な生存を高めただけである。更に残念なことに、FDAは、既に英国において起きているように、転移性乳癌におけるAvastin(登録商標)の使用についての承認を覆すことを検討している。

30

【0034】

Avastin(登録商標)は、新たな血管形成(血管新生)を妨げ、腫瘍細胞のグルコース及び酸素を欠乏させる。特に、ベータ1インテグリンは、腫瘍細胞において酸素欠乏(別名、低酸素)中に上方制御される。Avastin(登録商標)治療に不成功であった患者から採取したGBM細胞では、この標的は、未処理の一次性GBM細胞と比較して、50~200×に上方制御される。興味深いことに、腫瘍細胞の増殖の過程中、及び有糸分裂及び細胞生存における二元的役割を与えるガンマ線照射後にも上方制御される。この標的の阻害は、ECMスキャフォールド(間質及び血管基底膜)上の腫瘍細胞のインテグリン依存的な浸入を防ぐこともできる。

40

【0035】

本発明の態様は、Avastin(登録商標)(ベバシツマブ)等の抗-VEGF抗体の治療が不成功であった患者においてベータ1インテグリンを阻害する薬剤の使用に関する

50

る。これは、下記の通りインビトロで、及びインビボで示される。「抗-VEGF抗体の治療が不成功」という記載は、臨床的意味で本願明細書で用いられる。ベバシツマブの不成功的臨床的定義は：1）（通常70%の患者において）開始から反応がないこと、及び2）初期反応の後治療前に疾患の進行があること、である。進行に関する客観的な、しかしながら最も頻繁に用いられる（また、特にベバシツマブの臨床試験において用いられる）診断基準は、マクドナルド（McDonald）診断基準である。そのため、抗-ベータ-1組成物は、ベバシツマブが不成功であった3LのGBMに対する単剤治療としてよい。

#### 【0036】

（血管吸収）

10

Holash et al. (1999; *Science* 284: 1994-1998 "essel co-option, regression and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF")は、腫瘍のサブセットが既存の宿主の血管を吸収することによって初めに成長することを、ラット神経膠腫モデルにおいて実証した。この吸収された宿主の脈管構造は、やがてVEGF及び血管新生の上方制御を示した。脳転移腫瘍についての発明者の研究は、血管吸収又は既存の血管の使用が、実験用の脳転移腫瘍の確立の初期における腫瘍細胞による、及び疾患の初期を示すヒト臨床用試料中において用いられる、血管の主要な形態であることを示した。この発見は、ミクロコロニー形成前のデノボ血管新生の要件を除外する。CNS実質は、内皮及び癌細胞の接着及び生存に必要である非血管性の間質の基底膜要素を大きく欠いている。そのため、血管吸収は、そうでなければ神経網で広く用いられない、非神経系の癌細胞の悪性の増殖に関する物質を供給する。転移性腫瘍細胞による増殖は、インビトロで、基底膜の基層に対する接着により大きく促進され、MEKを阻害することによって減衰される。組織培養における実験と一致して、インビボでのコロニー形成の初期段階中、微小転移の圧倒的多数は、既存の脳血管のVBMと直接的に接触することが見出され、これらの細胞の多くは増殖していた。このように、血管基底膜（VBM）は、脳における腫瘍細胞増殖のための活性物質と示唆される。VBMは接着及び悪性細胞の浸入を促進し、血管新生のあらゆる兆候の前の腫瘍増殖に十分であった。

20

#### 【0037】

（血管吸収におけるベータ-1インテグリンの役割）

30

血管の血管基底膜にチアする腫瘍細胞の接着は、ベータ-1インテグリンにより仲介されることが見出されている。腫瘍細胞におけるベータ-1インテグリンサブユニットの遮断又は喪失は、血管基底膜に対する接着を妨げ、ビボでの転移腫瘍の確立及び増殖を減衰させた。脳における転移中の接着及び浸入における脈管構造のための転移性癌細胞の要件は、臍島の発達中のVBMについての要件により類似したものとしてよい。島細胞はVBMに適合するためのベータ1インテグリンを用い、この相互作用は増殖及び内分泌機能に必要となる。Nikolova et al.は、この基底膜の微小環境を、「血管ニッチ（vascular niche）」と称した（Nikolova et al., 2006; *Dev Cell* 10: 397-405; "the vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and beta cell proliferation"）。同様に、血管の壁細胞は、血管に対する適切な接着及び血管安定性を維持するために、ベータ1インテグリンサブユニットを必要とする。同様に、その後、癌細胞は、脳の転移中に必須の機能を求めて、脳のVBMをハイジャックすると思われる。興味深いことに、限局性の安定確立されたCNSメラノーマ転移において血管新生を阻害することにより、血管吸収による増殖への転換が生じる。これは、治療的活用のための生物標的を表し得る腫瘍細胞による血管に使用するための連続体を与える。

40

#### 【0038】

腫瘍細胞と血管との間の相互作用は、ベータ1インテグリンに仲介される腫瘍細胞の血

50

管の血管基底膜に対する接着に依存する。この相互作用は、脳における腫瘍細胞の、迅速な増殖及び微小転移巣の確立を促進するのに十分である。この欠陥栄養の作用機序は、CNSの細胞癌（足場依存性細胞）及びリンパ腫（足場非依存性細胞）の両方に普遍的である。ベータ1インテグリンは、通常の細胞生物学の多くの場面において支配的な役割を演じ、癌の開始、成長、及び転移で関与している。コラーゲン及びラミニン等の多様なリガンドに対する可変的な交雑性の接着性受容体として機能する、少なくとも10個のベータ1インテグリンヘテロダイマーがある。我々のデータは、ベータ1インテグリンサブユニットのみのアンタゴニズム（拮抗作用）は、脳への転移に関する治療戦略において有用となり得ることを示す。実際、Park et al. は、抗-ベータ1インテグリンサブユニット抗体の阻害剤は、乳癌細胞においてアポトーシスを誘導したが、単層で成長した細胞ではそうはならなかったことを見出した（Park et al. 2006；

“1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo” Cancer Res. 66: 1526-1535）。同じ抗体で細胞株由来の乳癌異種移植を有するマウスを治療したところ、腫瘍の体積の減少を導いた。インピトロで記載されるアポトーシスの作用機序に加えて、血管吸収の阻害も増殖を減衰させ得る。ベータ1インテグリンの役割を評価する代わりの戦略は、腫瘍を乳癌のMMTV/PyMT転移モデルで分析することである。腫瘍形成の誘導後のベータ1インテグリンの条件的な欠乏は、腫瘍増殖についての足場依存的なシグナリングへの依存に一致して、FAKリン酸化及び増殖の障害を生じる。

#### 【0039】

本発明の方法は、ベータ1インテグリン受容体、特に、神経膠芽腫、未分化星状細胞腫、乳/乳房の癌、肺癌、メラノーマ、結腸及び直腸癌、膀胱癌、子宮内膜癌、卵巣癌、腎癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、肺癌、前立腺癌、及び甲状腺癌を有する、あらゆるタイプの内皮又は非内皮の哺乳動物の腫瘍の治療に適用することができる。

#### 【0040】

このように、この態様の利点は、血管新生及び接着性の血管吸収を含む腫瘍の血管新生の作用機序の両方を標的とすることである。下記の通り、ベータ-1インテグリンの阻害の利点は腫瘍により用いられる血管の吸収を遮断することのみならず、直接的に腫瘍の増殖を阻害すること及び低酸素により活性化される生存シグナリングの経路を妨害することも含む。これにより、抗-血管新生薬のみに頼っていた先行技術の戦略において同定された治療への耐性を回避することができる。腫瘍の休止及び退行を含む治療の構造の評価方法は、当業者に周知であろう。これらは、MRI、CT、PET、及びSPECT、並びに物理的サイズ測定等の医療のイメージング技術、及び患者の臨床的状態の使用を含むであろう。

#### 【0041】

本発明の方法の実施に有用な、インテグリンに対する抗体、特に、ベータ1インテグリンは、当技術分野において知られている。抗-ベータ1インテグリン抗体A11B2の応用により、癌細胞中の悪性の表現型を戻すことの記載について、Bissell et al. の米国特許第6123941号参照。CD-29エピトープに対する抗-ベータ-1インテグリンは、Research Diagnostics, Inc., フランドル、ニュージャージー州から入手可能である。別の抗-ベータ1インテグリン抗体はCSATであり、アイオワ大学ハイブリドーマバンクから入手可能である。別の市販の抗-ベータ1インテグリン抗体は4B7R、マウスIgGカッパ抗体は、Ancell Immunology Research Productsから入手可能である。

#### 【0042】

A11B2は、元来ヒト絨毛癌ハイブリドーマから単離され、ベータ1インテグリン細胞外領域の全てのヘテロダイマーに対して非特異的に結合した抗-ベータ1インテグリン

10

20

30

40

50

抗体として同定された、ラットモノクローナル IgG1 である。酵素処理された AII B 2 F (ab)' 断片を用いた実験は、抗体のエピトープ結合部分は活性であり、ベータ 1 インテグリンに仲介されるシグナリング及び下流のシグナリング中間体の下方制御を生じさせることを示した。ベータ 1 インテグリンの生物学に関する更なる詳細は、主として細胞質ドメインに関して異なる 5 つの公知のスプライスバリエントにより、より複雑となり、抗 - ベータ 1 インテグリン抗体の調製における免疫様のポリペプチドに関連して以下に更に記載される。AII B 2 は、細胞外ドメインにより全ての変異体を認識することが見出されている。Park et al (2009 年 11 月 17 日発行の米国特許第 7618627 号、"Method of increasing radiation sensitivity by inhibition of beta-one integrin") は、腫瘍細胞のアポトーシスを増加させるために、AII B 2 抗体をイオン照射と組み合わせて用いた。  
10

## 【0043】

Hall et al. の "The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 Integrin Heterodimers Mediate Cell Attachment to Distinct Sites on Laminin," J. Cell Biol. 110: 2175-2184 (1990)" に報告されるように、抗 - インテグリン抗体 AII B 2 を下記の通り調製した：ルイスラットに、Ribi アジュバンドと 1:1 で混合した、107 個の EDTA - 培養した JAR 細胞癌細胞で、2 週間隔で 2 回の腹腔内注射を与えた。2 週間後、2 回の追加的な脾臓内注射をアジュバンド非存在下で 2 週間隔で与えた。Balb/c マウスに、2 月間隔で 4 回の、 $5 \times 10^6$  個の第 1 期ヒト栄養膜細胞層の腹腔内注射を与えた。最後の注射の 4 日後、各脾臓を、Wheelock et al. (1987) により修正される Kennett et al. (1980) の方法により、Sp2/0 形質細胞腫細胞と融合させた。ハイブリドーマの上澄みは、上記の接着性アッセイを用いて、FN、LN、又は Col I V に対する JAR ヒト細胞癌の細胞接着を阻害するそれらの能力について調べられた。2 つのラットハイブリドーマの上澄みは、FN のみ (BIE 5 及び BIG 2) に対する接着を阻害する一方、他の 2 つは LN、FN、及び Col I V (AII B 2 及び BIE 11) に対する接着を阻害することが見出された。1 つのマウスハイブリドーマの上澄みは、JAR 細胞の Col I V のみ (S2G3) に対する接着を阻害した。これらのハイブリドーマは、限界希釈によりクローニングされた。ラット抗体は、培養物の上澄みからヤギ抗 - ラットアガロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。マウスの上澄み、S2G3、IgM は、4 での 50% 飽和硫酸アンモニウムを用いた沈殿により 10 倍濃縮した。これらの抗体を、更なる使用の前に、FN、LN、及び Col I V で被覆された基材に対する接着阻害活性について再試験した。  
20

## 【0044】

本発明の方法及び組成物と共に用いるのに適した抗 - インテグリン抗体は、Werb, Z., Tremble, P., Berensten, O., Crowley, E., and Damsky, C. H. (1989) に記載される方法と同様の方法により生産することができる。フィプロネクチン受容体を介するシグナル伝達は、コラゲナーゼの発現を誘導する。J. Cell Biol. 109, 877-890; and Damsky, C. H., Fitzgerald, M., and Fisher, S. J. (1992)。この文献は、能力ある抗体についてのスクリーニングアッセイを提供する。用いられる免疫原は、前ヒト JAR 細胞癌細胞であった。抗体は、Fn、Col-I、I V 及び LN に対する細胞接着を遮断するため、これらの方法で更なる特性評価をされることが可能となる。  
30

## 【0045】

低酸素と組み合わせられたラットモノクローナル抗体 AII B 2 を用いたベータ 1 インテグリンの阻害は、インビトロで相乗的に GBM 細胞の増殖を低減した。AII B 2 は、インビトロで、Avastin (登録商標) evasive GBM 細胞の増殖をも直接的  
40

に低減した。かかる組成物は、インビボでの腫瘍イメージングに、又は細胞増殖又は細胞侵襲（例えば、低酸素又はイオン照射）に対する応答についてのバイオマーカーとして、用いることもできる。未治療のGBMの血管新生におけるベータ-1インテグリンの著しい上方制御も観察された。そのため、それは、インビボでの血管新生のプロセスを直接的に阻害する及び/又はイメージングするために用いることもできる。

【0046】

上記の通り、様々なVEGF阻害剤を、本発明の方法及び組成物に用いることができる。Oliner et al. 米国特許出願公開第2009/0304694 A1号、2009年12月10日公開、タイトル“ANG2 AND VEGF INHIBITOR COMBINATIONS”に記載の通り、本願発明の方法に用いられる適切なVEGF阻害剤は、(a)参照により本願明細書にその全体、特に4TBPAPCを開示する部分を援用される米国特許出願公開第2003/0125339号又は米国特許第6995162号、に記載される4TBPAPC、(b)参照により本願明細書にその全体、特にAMG706を開示する部分を援用される米国特許出願公開第2003/0125339号又は米国特許第6995162号、に記載されるAMG706、(c)Avastin（登録商標）、(d)参照により本願明細書にその全体、特にNexaver（登録商標）を開示する部分を援用される国際公開第00/42012号、国際公開第00/41698号、米国特許出願公開第2005/0038080 A1号、米国特許出願公開第2003/0125359 A1号、米国特許出願公開第2002/0165394 A1号、米国特許出願公開第2001/003447 A1号、米国特許出願公開第2001/0016659 A1号、及び米国特許出願公開第2002/013774 A1号に記載されるNexaver（登録商標）、(e)PTK/ZK；(f)Sutent（登録商標）、並びに(g)米国特許出願公開第2006/0241115号に記載される式IVのVEGF阻害剤、を含む。この点、今日の好適なVEGF阻害剤はAMG706である。

【0047】

ヒト化した抗-VEGF又は抗インテグリン抗体は、幾つかの方法により調製することができる。Slatkowski et al. による米国特許第6949245号、2005年9月27日発送、タイトル、“Humanized anti-ErbB2 antibodies and treatment with anti-ErbB2 antibodies”は、本願開示に従って用いることができる抗体のヒト化の方法を記載した。本願明細書におけるモノクローナル抗体は、具体的に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来するか又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する、抗体中の相当する配列と同一か又は相同であり、鎖の残りが、別の種に由来するか又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する、抗体中の相当する配列と同一か又は相同である、「キメラ」抗体、並びに、これらが所望の生物活性を示す限りにおいてかかる抗体の断片、を含む（米国特許第4816567号；及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本願明細書における興味のキメラ抗体は、非ヒトの靈長類（例えば、旧世界ザル、類人猿等）由来の可変領域抗原結合配列、並びにヒトの定常領域配列を含む「靈長類化（primatized）」された抗体を含む。

【0048】

上記の米国特許第69492445号に更に記載されるように、ヒト化抗体は、非ヒトのソースから導入される1つ又は複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート（import）」残基と称され、一般的には「インポート（import）」の可変領域から取り出される。ヒト化は基本的に、Winterら（Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)）の方法に沿って、超可変領域の配列をヒト抗体

10

20

30

40

50

の相当する配列に置換することによって、行うことができる。従って、かかる「ヒト化」抗体は、実質的に未変形のヒトの可変領域が非ヒトの種に由来する相当する配列により置換されている、キメラ抗体（米国特許第4816567号）である。実際、ヒト化抗体は、一般的に、幾つかの超可変領域の残基、及び可能ならばいくつかのF R 残基が、齧歯類の抗体中の類似の部位に由来する残基により置換されている、ヒト抗体である。

【0049】

例えば、かかる組成物の調製に有用な方法を記載する目的で、参照により本願明細書に援用される、Williams et al の米国特許第5840300号、タイトル「Methods and compositions comprising single chain recombinant antibodies」に記載される通り、一本鎖組換え型抗体も用いることができる。手短に言えば、組換えPCR、すなわち、オーバーラップエクステンション（SOE）PCR法によるスプライシングを用いて、カッパ、重鎖、及びラムダの免疫グロブリン鎖を、別々に増幅し、後に1本鎖として結合し、ここで、一本鎖は重鎖とカッパ鎖、又は重鎖とラムダ鎖を含む。柔軟性のある直鎖のリンカーペプチドをプライマーに用いられ、このプライマーはV<sub>L</sub>をV<sub>H</sub>に結合させるために用いられるリンカーを含み、軽鎖及び重鎖を一本鎖として含むインテグリン結合可変領域を含む新規の組換え型Fv断片を形成する。Fv断片はベータ1インテグリンサブユニットに対するFv断片のライブラリーとして開発することができる。

10

【0050】

適切な抗体は、ヒト抗体を発現するようにデザインされた遺伝子組み換えされたマウス中で調製することもできる。マウスは、ヒトベータ1インテグリンの断片、及び適切なミエローマ細胞株と融合させた活性なB細胞を含むマウスの脾細胞を含む抗原で免疫することができる。ヒトIgレパートリーを有するマウスは市販されている。Hemachandra et al. "Human Monoclonal Antibodies against Pseudomonas aeruginosa Lipopolysaccharide Derived from Transgenic Mice Containing Megabase Human Immunoglobulin Loci Are Opsonic and Protective against Fatal Pseudomonas Sepsis," INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 2001, p. 2223-2229 Vol. 69, No. 4 を参照。

20

30

【0051】

本願発明の抗体を調製する別の技術である、ファージディスプレイによるコンビナトリアルライブラリー技術は、抗-インテグリン活性についてスクリーンすることができるヒトMabsの大きなライブラリーを作るための有用な方法を提供する。リンパ球mRNAから作られたライブラリーは、モノクローナルFabレパートリーの最大10<sup>8</sup>の組換え体からなるものとし得る。纖維状ファージ表面にライブラリーを提示し、モデルエピトープ（下記のベータ1インテグリン断片）に対してパニングすることによって、モノクローナルFab抗体はその免疫的特性及び生物的特性（インテグリン阻害）について選択し、分析することができる。Fabは、安価に大量に生産することができ、元来非-免疫原性であるため、治療的及び診断的方法の両方における使用に理想的である。この技術の記載については、参照により本願明細書に援用される、Witzum et al. 米国特許第6716410号を参照。

40

【0052】

Marks et al. により記載される通り、ヒト一本鎖Fv（scFv）は、ベータ1抗原に結合する非-免疫性のファージディスプレイから単離することができる。選択された抗体のCDR3の軽鎖（V(L)）及び重鎖（V(H)）可変領域は、その後変異導入され、変異導入されたscFvはファージ上に提示され、抗原上でより高い親和性を有する変異体が選択される。Schier et al., "Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 sing

50

le-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site," J Mol Biol. 1996 Nov. 8; 263(4):551-67 を参照。

## 【0053】

他の抗原とクロスリンクする二重特異性抗体（例えば、ダイアボディ）はも用いることができる。他の二重特異性のものに似ず、ダイアボディはバクテリア（*E. coli*）又は酵母（*P. pastoris*）からの分泌により機能ある形態で生産することができる。詳細はプロトコールは、Tomlinson I. and Holliger P. (2000) Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments, Methods Enzymol, 326, 461-479; 及びHolliger, P. (2001) Expression of antibody fragments in *Pichia pastoris*. Meth. Mol. Biol. に見出すことができる。二量体の抗体断片、又はミニボディを様々な公知の方法で作製することができる。これらは、被共有結合又は共有結合のダイマー（sc(FV)2）を生産する。本発明の抗体組成物は、当該技術分野において公知であり、参照により本願明細書に援用される米国特許第6165467号における凍結乾燥したモノクローナル抗体の記載に例示されるように、公知の安定化剤及び賦形剤と共に、無菌の粉体又は液体の形式で、静脈内注射用に、精製済みの薬学的組成物として調製することができる。

## 【0054】

「相乗的」という用語は、本願明細書において、従来的な意味で用いられ、その組み合わせの活性が、その組み合わせの各構成要素の個々の活性を加えたものよりも大きくなるような構成要素の組み合わせを指す。

## 【0055】

VEGF活性の他の阻害剤も本願発明の方法及び組成物に用いることができる。例えば、Afibbercept (VEGF-Trap, AVE-0005) は、ヒトIgG1のFc領域に融合した、血管内皮増殖因子受容体1 (VEGFR1) の第2のIg領域、及び血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR2) の第3のIg領域を含む完全ヒト組換型融合タンパク質である。Afibberceptは、全てのVEGF-Aアイソフォーム、及び胎盤増殖因子 (PIGF) と結合し、これらの因子が血管新生を刺激するのを妨げる。Afibberceptは、4mg/kgで化学療法と組み合わせて2週間に1回、点滴静注により投与される。

## 【0056】

ヌママムシ (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) の毒液に由来する、VEGF受容体結合タンパク質、KDR-bp (KDR結合タンパク質) と名付けられる、は、触媒的に不活性なPLA2ホモログであるLys49PLA2であり、これは、Fujisawa et al. "Catalytically inactive phospholipase A2 homologue binds to vascular endothelial growth factor receptor-2 via a C-terminal loop region," Biochem. J. (2008) 411, 515-522. に記載される通り、強い筋毒性を有し、VEGF受容体をアンタゴナイズすることが見出された外来性分子である。

## 【0057】

特定の態様では、本発明は、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法を含み、該方法は、腫瘍を有する被験者に対して、抗血管新生薬である第一薬剤と；ベータ-1インテグリンにより介される腫瘍細胞の結合を遮断する第二薬剤との組み合わせを投与するステップを含み、ここで、腫瘍細胞の増殖は、より高い臨床的用量での第一薬剤により生じる阻害と同等

の程度で阻害される。低用量の第一薬剤は、例えば、製品のラベル及び説明書に示される最小用量で投与される VEGF 阻害剤としてよい。本発明によれば、腫瘍増殖は、VEGF 阻害剤が承認される最高の用量で与えられた場合と少なくとも同程度阻害されるであろう。例えば、直腸又は結腸癌を治療する場合のベバシツマブの推奨用量は、14日毎のIV による投与で、1kg 当たり 5mg 又は 10mg のいずれか (1 ポンド当たり約 2.3mg から 4.5mg) である。推奨用量は、与えられる化学療法のタイプに基づいて変動する (kg 当たり 5 又は 10mg のいずれか) であろう。

#### 【0058】

(VEGF の阻害剤である薬剤とインテグリンを遮断する薬剤との治療上の組み合わせ)

接着性の血管吸収及び血管新生を制御する薬剤は、一緒に又は処方時間のインターバルの後に連続的に投与してよい。一緒に投与される場合、これらは許容可能な生体適合性の送達のプラットフォームにより送達してよい。代わりに、薬剤は互いに直接的に融合されてよい。加えて、複数の血管新生の及び / 又は接着性の血管吸収を制御する薬剤が、同時又は連続的のいずれかで投与されてよい。最後に、いかなる実施形態も、照射、化学療法、及び / 又は血管透過性を増大させる薬剤等のアジュバント療法と組み合わせてよい。

#### 【0059】

下流のシグナリング、又は細胞外受容体 (VEGFR - 1 / Flt - 1, VEGFR - 2 / Flk - 1) に対して結合する能力のいずれかにおいて、VEGF - A に対する阻害効果を有する、血管新生のシグナリングの側面を阻害する実施形態が用いられてよい。他の血管新生のメディエーターも標的としてよく、他の VEGF ファミリーメンバー (VEGF - B, VEGF - C, VEGF - D, VEGF - E、及び PIGF ) 並びにその受容体 (VEGFR - 1 / Flt - 1, VEGFR2 / Flk - 1, VEGFR - 3 / Flt - 4) 、線維芽細胞増殖因子 (FGF - 1 及び FGF - 2) 並びにその受容体 (FGFR - 1、FGFR - 2、FGFR - 3、FGFR4) 、内皮増殖因子メンバー (EGF 及び HB - EGF) 並びにその受容体 (EGFR) 、CEACAM - 1 / CD - 66a 、オーファン受容体 HER - 2 、アンジオポエチン (Ang 1、Ang 2、Ang 3、及び Ang 4) 並びにその受容体 (Tie - 1 及び Tie 2) 、血小板由来増殖因子 (PDGF) 並びにその受容体 (PDGF 型アルファ及び PDGF 型ベータ) 、トランスフォーミング増殖因子ベータファミリーメンバー (TGF - ベータ - 1、TGF ベータ 2、TGF - ベータ 3) 並びにその受容体 (TGFBR2) 、デルタ様リガンド 4 並びにその受容体 (Notch) 、並びに、アンジオスタチン及びタムスタチン等の天然の抗血管新生薬の既存の構造タンパク質の断片を含む。

#### 【0060】

下流のシグナリング、又は細胞外受容体に対して結合する能力のいずれかにおいて、ベータ - 1 インテグリンに対する阻害効果を有する、接着性の血管吸収のシグナリングの側面を標的とする実施形態が用いられてよい。これらは、ディスインテグリン、細胞外マトリックスの構成要素 / 断片、接着斑キナーゼ (FAK) 、FAK 関連非キナーゼ、並びに細胞外シグナル関連キナーゼ (ERK / MAPK) を含んでよい。

#### 【0061】

抗 - 血管新生の組成物は、ヒトモノクローナル抗体若しくは抗体断片、ヒト化抗体若しくは抗体断片、阻害ペプチド、キナーゼ阻害剤、内在性阻害剤、小分子阻害剤、ナノボディ、RNAi、アプタマー、アンチセンス、又は薬学的に許容可能なベクター若しくはキャリアと組み合わせたこれらの薬剤のいずれかを含んでよい。

#### 【0062】

抗 - 接着性の血管吸収の組成物は、ヒトモノクローナル抗体若しくは抗体断片、ヒト化抗体若しくは抗体断片、阻害ペプチド、キナーゼ阻害剤、内在性阻害剤、小分子阻害剤、ナノボディ、RNAi、アプタマー、アンチセンス、又は薬学的に許容可能なベクター若しくはキャリアと組み合わせたこれらの薬剤のいずれかを含んでよい。

#### 【0063】

現在のところ好適な実施形態では、再発した多形性膠芽腫 (GBM) を有する患者には

10

20

30

40

50

、1つ又は複数の、腫瘍内、切除による空洞内、又は硬膜下に配置するためのカテーテルの移植を行う。患者は、承認された臨床的な用量及び間隔で、標準的な静脈内のベバシツマブ治療を与えられる。ベバシツマブ注射の少なくとも24時間又は理想的には48~120時間後、阻害性の抗-ベータ-1インテグリン組成物は、前記カテーテルを通して、対流強化送達法(CED)装置により、臨床的に意義のある用量及び速度で、投与される。

#### 【0064】

別の実施形態では、上記処方計画は、イオン照射及び/又は化学療法等の追加的なアジュバンド療法と組み合わせられる。別の実施形態では、上記処方計画は新たに診断されたGBMに対して与えられる。別の実施形態では、抗血管新生の組成物及び阻害性の抗-ベータ-1インテグリン組成物の両方がCEDにより投与される。別の実施形態では、抗血管新生の組成物及び阻害性の抗-ベータ1-インテグリン組成物の両方が非経口で投与される。別の実施形態では、1つ又は複数の組成物が、可溶性の生体劇合成ポリマー等の不活性なキャリア中で、腫瘍床に直接的に投与される。別の実施形態では、両方の組成物が2価の抗体として同時に投与される。別の実施形態では、阻害性の抗-ベータ-1インテグリン組成物は、単独で、抗血管新生治療を受けていない患者に対して投与される。別の実施形態では、抗-ベータ-1インテグリン組成物は、それに結合したラジオアイソトープ、特に、ベータ線を発する元素を更に含む。

10

#### 【0065】

低酸素を誘導するための代わりの薬剤は、抗-血管新生治療に加えて、血管塞栓のための血管内技術(超選択的塞栓術/標的的塞栓術)を用いることである。この手法は、病変部を収縮して、外科的な摘出のためにより好ましい状況を提供するために、髄膜腫及びAVMs等の極めて血管の多い脳の病変部に使用するものとして知られている。

20

#### 【0066】

この標的を阻害することは、乳房、肺、肝臓、腎臓、結腸、メラノーマ、及びリンパ腫等のほとんどの内皮及び非内皮の腫瘍を含むGBMを越えて、ベータ1インテグリンを発現する幾つかの癌に対して効果的とし得る。加齢に関連した滲出型黄斑変性等の主要性疾患における血管新生を阻害するための抗-ベータ1組成物への追加的な使用もあり得る。最後に、ベータ1-インテグリンシグナリングは接着及び増殖を含む幾つかの免疫細胞の機能にとって重要であるため、抗-炎症性指示のための抗-ベータ-1組成物への使用もあり得る。

30

#### 【0067】

代わりの実施形態は、再生医療戦略として生物システムにおいて血管新生を促進させることに関する。かかる実施形態では、血管新生の及び接着の血管吸收の両方の選択的制御が組織修復又は再生の向上を生じさせる。

#### 【0068】

本発明の更なる実施形態は、腫瘍細胞内でベータ-1インテグリン遺伝子発現をノックダウンするためのshRNA(ショートヘアピンRNA)の使用を含む。これは、下記の実施形態で実施され、腫瘍細胞増殖における相当の低減が抗-VEGF抗体に対して耐性を有する細胞株において示された。実施例では、shRNAsは、RNA干渉(RNAi)の強力なメディエーターである短鎖の干渉RNAs(siRNA)の前駆体である。RNAiでは、siRNAに配列で相同的な遺伝子が、転写後の段階でサイレンス(発現制御)される。効果的なsiRNAsを生じ得る様々な異なるヘアピン構造がある。レンチウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、脳の分化したニューロンを含む非分裂性細胞に感染することができる。短鎖のヘアピンRNAsは、レンチウイルスから発現することができ、様々な細胞型の高効率のトランスフェクションを可能にする。効果的なRNAヘアピンコンストラクトは、サイレンスされる遺伝子の配列に基づいてデザインしてよい。インテグリンベータ-1は、ヒトにおいて、ITGB1遺伝子によりコード化されるタンパク質である。インテグリンベータ-1サブユニットについての全ヒトmRNAは、Genbank locus X07979、アクセション番号BC020057

40

50

に記載される。3656ヌクレオチド(配列番号:1)の、J. Cell Biol. 105(3), 1183-1190(1987)にも記載されるこの配列は、簡潔さのために本願明細書では繰り返さないが、特に参照により本願明細書に援用される。この公知の配列は、実施されたshRNA等の干渉核酸コンストラクトをデザインするために用いてよい。

【0069】

全てのヘアピンコンストラクトが効果的なRNAi応答を生み出すわけではないものの、良好なコンストラクトについて富化させる法則が開発された。これらの法則は、多数の効果的なコンストラクトの実験、マイクロRNAs及び効果的なsiRNAsの熱力学的解析に基づく。法則は、例えば、Ambion technical bulletin #506に公開され、オンラインで入手可能である。

10

【0070】

DNAベクター由来のコンピテントなウイルスの調製は、コンストラクトの細胞株中のパッケージングに関わる。RNAiレンチウイルスのパッケージングは、cDNAを運搬するレンチウイルスをパッケージングすることと本質的に同様である。基本的に、DNAベクターは、ヒト293細胞等のパッケージング細胞株中に一過的にトランスフェクトされ、2-3日後に上澄みがウイルスを含むようになる。

20

【0071】

大概、レンチウイルスベクターの生産システムは、「スプリット(split)」システムに基づき、天然のウイルスゲノムが個々のヘルパープラスミドコンストラクトに分離されている。異なるウイルス要素を3つ又は4つの別々のベクターに分離することにより、レンチウイルスゲノムの偶発的な組換えにより複製可能なウイルスが作られるリスクを減少させる。

20

【0072】

本発明に従ってベータインテグリンノックダウンを生産するためのレンチウイルスの生産システムを選択する場合、宿主の範囲が制限されている(すなわち、齧歯類のみに感染することができるウイルス)ウイルスか、又は宿主の範囲が広い(マウス、トリ、ヒト等に感染することができるウイルス)ウイルスか、を調製してよい。大概、ウイルス表面の被覆タンパク質は、種の特異性を決定する。レンチウイルスの生産システムはスプリットであるため、この被覆タンパク質が、例えば、水疱性口内炎ウイルス(VSV/G)糖タンパク質(広い宿主指向性の範囲を示す)か、狭宿主性のマルトース結合表面の糖タンパク質(限定された特異性を示す)かを用いることによって、変えることができる。

30

【0073】

Gene Link SiRNA explorer(<http://www.genelink.com/sirna/shrnai.asp>)を用いて、例えば、配列TTCTGGATTGGACTGATCAGTT(配列番号:2)を含む、483のshRNA配列をヒトベータ-1インテグリンのmRNAと同定した。

30

【0074】

本願明細書において言及される薬剤はそれを必要とする、本願明細書に記載される腫瘍を患っている患者に、ヒトへの投与に適した薬学的組成物の形式で、送達されることが好ましい。この組成物は、当該技術分野で知られているように、例えば、安定化剤、緩衝剤、賦形剤等が混ぜ合わされ、単離され且つ実質的にピュアな形であり、外来性の薬剤を含むことのない、抗体又は核酸を含む。

40

【0075】

下記の実施例は、本願明細書に記載される特定の発明の概念の例示である。

【実施例】

【0076】

(実施例1:ベータ-1インテグリンの高発現に関係する低酸素)

高速増殖の癌の確立及び抗血管新生治療後における別の一般的な細胞ストレスである、低酸素が、患者の多形膠芽細胞腫(GBM)の試料におけるベータ1の高発現に関係する

50

ことを示す。この作用機序を直接的に確認するために、我々は、神経膠腫細胞を6～48時間、1%酸素に曝して、微小環境の低酸素刺激を行った。我々は、インビトロで神経膠腫細胞においてベータ1インテグリン発現に大きな増加を観察した。これは、迅速で可逆の細胞の応答であり、乳癌及び結腸直腸癌細胞においても実証された。抗-血管新生治療がインビボで増殖中の腫瘍においてベータ1の発現を急激に増加させることを証明するために、我々は、最後にベバシツマブ治療を行った日のうちに採取したマウス由来の神経膠腫を染色した。コントロールと比較して特記すべきベータ1の増加が、治療された腫瘍、特に、低酸素の腫瘍コアにおいて観察された（図2）。

## 【0077】

（実施例2：腫瘍細胞増殖中に観察されるベータ1インテグリンの発現の増加）

インビトロでの腫瘍細胞におけるベータ1の発現の更なる増加が、腫瘍細胞の増殖そのものの中で観察された。U87MG神経膠腫細胞において、インビトロでの細胞コンフルエントとベータ1のレベルとの間には負の相関がある（図3）。加えて、U87MG神経膠腫細胞において、増殖マーカーであるKi-67は、FACSによる実験の通り、ベータ1の発現と正の相関がある。これは、他の研究者が乳癌細胞において観察した結果と一致している。第一に、我々は、一次性GBM由来のヒトの外科的試料中の血管新生の血管におけるベータ1インテグリンの発現において相当な減少を視覚的に観察した（図4）。このベータ1インテグリンの発現の増加は、上記の通り、神経膠腫細胞において観察された細胞の増殖へのベータ1の集合に関連すると考えられる。このように、血管の浸入及び増殖に加えて、ベータ1インテグリンは、腫瘍細胞の増殖、低酸素及びIR青の生存シグナリング、及び血管新生のプロセス中の血管内皮細胞に、密接に関係すると思われる。これらの複数の特徴は、ベータ1インテグリンを、直接的に腫瘍の増殖を阻害することができる、また、抗-血管新生薬への耐性の発達を減衰させる抗-血管新生薬を用いた併用療法として、非常に魅力的な標的とする。

## 【0078】

（実施例3：腫瘍細胞における抗-VEGF抗体耐性へのベータ1インテグリンの関与）

ベータ1インテグリンがベバシツマブ耐性に関与し得るという仮説を実証するために、我々は、ベバシツマブ治療の前、及び獲得したベバシツマブ耐性の発達後に採取した、一対の患者のGBMの試料において、ベータ1インテグリンに対する免疫蛍光化学を用いた。未治療の試料と比較して、ベバシツマブ後のGBM組織において、12対中9対で明らかな増加が見られた（75%、図5）。

## 【0079】

ベバシツマブ耐性を獲得した後の腫瘍細胞におけるベータ1インテグリンの発現の増加を直接的に証明するために、一次性GBMs（位階目の手術）由来の、及び抗血管新生治療に対する耐性の発達後少なくとも30日で単離された組織由来の細胞株を分析した。実際、ベータ1インテグリン発現は、前者グループと比較して後者のグループに由来する細胞において平均で13倍高かった（図6）。

## 【0080】

観察したベータ1インテグリンの上方制御が機能的なものであったことを証明するために、我々は、活性化された焦点接着キナーゼ（リン酸化-FAK<sup>tyr397</sup>）に隣接する患者の腫瘍部位を染色した。リン酸化-FAK<sup>tyr397</sup>染色は、治療前に採取した患者の試料と比較して、ベバシツマブ耐性を獲得した後に採取した試料において相当高かった。

## 【0081】

このように、ベータ1インテグリンは、獲得したベバシツマブ耐性の発達後に採取された臨床的な患者の試料において機能的に上方制御される。

## 【0082】

（実施例4：ベータ1インテグリンの阻害後の抗-VEGF抗体耐性細胞株における病原力の減少）

レンチウイルス粒子中のインテグリンベータ1shRNAは、Santa Cruz

10

20

30

40

50

Biotechnology, Inc., カタログ番号SC-35675から購入した。4つの異なるshRNA配列の混合物を与えた。この試薬は、ベバシツマブ治療に不成功であった患者に由来する、SF8106-A×1及びSF7796-A×3（それぞれ、BRG3及びBRG2として知られている）細胞株を形質転換するために用いられる。我々は、レンチウイルスベクターを用いてベータ1及びベータ3インテグリンの安定ノックダウン細胞株を作製した。我々は、BRG3細胞において、一週間後に、GFPベクターコントロール細胞株又はベータ3ノックダウン細胞株のいずれかと比較して、70%のベータ1のノックダウンと、それに相当する60%の細胞増殖の減少を実証した（図8）。これらの細胞をより詳細に研究するために、我々は、90%超のベータ1がノックダウンされたBRG3ノックダウン細胞株を単離して、接着性、細胞伸展、細胞移動、及び細胞増殖を含む腫瘍細胞の病原力の増加を示す機能を評価した。これらのノックダウン細胞株は、ベクターコントロール細胞株と比較して、4つの機能全てにおいて相当に損なわれた。  
10

#### 【0083】

インビボでの上記発見を実証するために、我々は、3つの上記BRG3ベータ1インテグリンノックダウン細胞株を同時にヌードマウスに移植して、6か月間腫瘍を追跡した。ベクターコントロールの腫瘍細胞は正常に増殖する一方、我々は、研究の全期間において、ノックダウン細胞株のいずれについても全く増殖を観察しなかった（図10）。実際、15中13（87%）のノックダウン腫瘍が完全に消失した。この発見がベータ1ノックダウンの直接的な結果であることを証明するために、我々は、BRG2及びBRG3由来のポリクローナルノックダウン細胞株を移植して、インビボでの増殖を同様にモニターした。これらの細胞株は平均70%のベータ1ノックダウンを実証した。予測通り、これらの細胞株は、ベクターコントロール細胞株よりも遅く増殖した。しかしながら、90%ノックダウン細胞株とは対照的に、数週間後、両細胞株はインビボで潜伏性の増殖を示し、増殖とベータ1インテグリンのレベルとの用量依存的な関係を示唆する。  
20

#### 【0084】

このように、ベバシツマブ耐性の神経膠腫細胞株におけるベータ1の90%超のノックダウンは、インビトロで病原性の表現型を減衰させ、インビボでの異種移植モデルでの増殖を完全に妨害する。

#### 【0085】

（実施例5：抗-VEGF抗体耐性細胞株の抗-ベータ1インテグリン抗体治療）  
30

臨床的に意義のあるモードのベータ1阻害を伴う上記結果を証明するために、我々は、よく特性評価されたAIIIB2阻害性のラットモノクローナル抗-ベータ1インテグリン抗体をインビトロでの阻害実験で用いた。アイソタイプがマッチしたIgGをコントロールとして用いた。ベバシツマブ耐性神経膠腫細胞株は、10 μg / mLで、接着性（データ未公表）及び移動（動的な映像分析、未公表）の低減を含むベータ1のノックダウンとしての同様な機能の阻害を示した。細胞増殖に対する効果は、アポトーシス/細胞死（アネキシンV）又は増殖（Ki-67抗原）のいずれかについての免疫蛍光染色を用いて実証された。染色後、細胞をフローサイトメトリー/蛍光励起セルソーティング（FACS）によりソートした。この分析は、AIIIB2で治療されたGBM細胞におけるKi-67における相当な減少を示したが、アネキシンVの免疫反応性に関して全く効果を示さず、細胞分裂停止の効果と一致した（データ未公表）。  
40

#### 【0086】

このAIIIB2での治療を、細胞増殖が増殖状態により影響され得るかどうかを理解するために、インビトロで一次性GBM細胞株を用いて繰り返した。コンフルエントな培養物（増殖停止）中のものでなく、サブコンフルエントな培養物（増殖フェーズ）中の細胞は、2日間のAIIIB2治療により相当に増殖阻害された（図11）。

#### 【0087】

最後に、週2回の最大5mg / kgmでの用量でのAIIIB2でのインビボでの治療は、皮下の異種移植モデルにおけるBRG3ベバシツマブ耐性細胞株（データ未公表）の増  
50

殖を相當に阻害した。アポトーシスターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介UTP末端標識(TUNEL)は、BRG3細胞株におけるAIB2治療された腫瘍でのアポトーシスの増加を明らかにした(データ未公表)。

【0088】

このように、AIB2等の機能遮断する抗体を用いたベータ1インテグリン阻害は、ベータ1ノックダウンと同様なインビトロでの病原性の表現型を減衰させる。加えて、AIB2の非経口投与は、インビボでの、標準の及びベバシツマブ耐性の神経膠腫の異種移植の腫瘍増殖を阻害するのに効果的である。

【0089】

(実施例6:ベータ1の阻害が上皮間葉移行(EMT)及び幹様表現型を逆行させる)

スフェロイドの培養物中の腫瘍細胞の増殖が、幹様表現型の代替物となり、低酸素及び酸性のpH等のストレス要因により促進/富化され得る。標準的な神経膠腫細胞株(U87MG)及びBRG3ベバシツマブ耐性細胞株の両方におけるベータ1のノックダウンは、スフェロイドの形成を相当に悪化させる(データ未公表)。AIB2は、48時間の低酸素により誘導されたU87MG神経膠腫細胞のスフェロイド増殖をも阻害した。

【0090】

スフェロイド増殖の悪化に加えて、ベータ1インテグリンの阻害は、腫瘍細胞領域の相当な増加により示されるEMTの逆行、及び間葉系受容体c-metの50%の減少を促進する(データ未公表)。

【0091】

(実施例7:ベータ1インテグリンでの抗血管新生治療の相乗効果)

抗血管新生治療の効果のインビトロのモデルとして、我々は、増殖フェーズにある一次性GBM細胞を、低酸素で2時間、その後酸素正常で2日間曝した。低酸素は、ベバシツマブ等の抗-血管新生治療のインビトロでの代替物として用いた。2日の回復期間のAIB2抗体の追加により、低酸素又はAIB2治療のみのいずれかの場合と比較して、腫瘍細胞の増殖の更なる低減が生じた(図12)。このように、ベータ1インテグリンと抗血管新生薬との組み合わせは、治療効果の相乗効果を予見させる。

【0092】

インビトロの上記結果を証明するために、我々は、皮下のU87MG神経膠腫を有するマウスを、コントロール1gG(10mg/kg)、ベバシツマブ(10mg/kg)、又は低用量の交互のベバシツマブ(1mg/kg)及びAIB2(1mg/kg)の併用療法で、週2回、治療した。治療の数週間後、低用量の交互の併用療法は、標準的な用量のベバシツマブのみの場合と同じくらい腫瘍増殖の阻害に効果的であることを示した(図13)。このように、要約すれば、ベータ1インテグリンの阻害は、1)血管吸収及び血管周囲の浸入(又はあらゆる標準的なECM基質への浸入)を妨げること、2)IR、及び低酸素等の侵襲後に腫瘍細胞の生存率を低減する、可能ならばアポトーシスを促進すること、3)腫瘍細胞の増殖を直接的に阻害すること、4)内皮細胞が増殖すること及び移動することを標的とすることによって血管新生を直接的に阻害すること、5)上皮間葉移行(EMT)を含む病原性の幹様の表現型を逆行させることによって、腫瘍の増殖を阻害し得ることが示された。重要なことに、レンチウイルスのノックダウン又はAIB2の使用のいずれかによりベータ1受容体をアンタゴナイズすることは、インビボで、ベバシツマブ耐性の神経膠腫の異種移植の増殖を相当に減衰させることができる。更に、AIB2治療は、神経膠腫の異種移植モデルにおいて少なくとも20×だけ必要なベバシツマブの用量を低減することができる。

【0093】

(結論)

上記特定の記載は、本発明の例示説明を意味し、添付の請求項に記述の同等の本発明の範囲により定義される本発明の範囲を限定すると解されるべきではない。この明細書に記載されるあらゆる特許又は文献は、明示的に説明されないが、当業者により理解されうる、本発明の特定の実施形態を実施する際に有用な方法及び材料の詳細を説明することを目

10

20

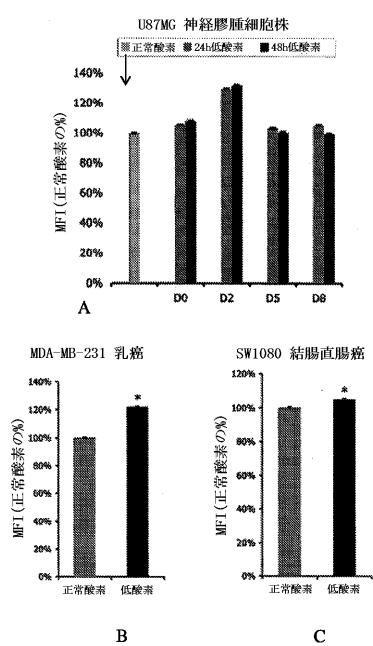
30

40

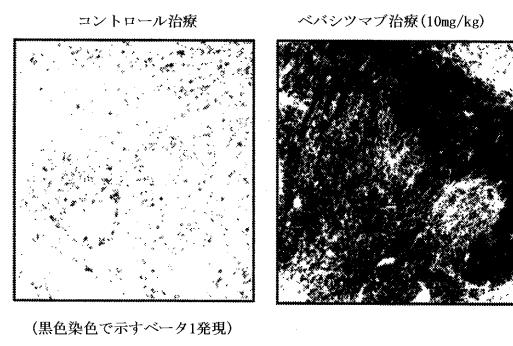
50

的とする。かかる特許又は文献は、それぞれが具体的に個別に本願明細書に参照され含まれる場合と同様に、言及される方法又は材料を記載する及び実施可能とする目的で必要に応じて、参照により本願明細書に援用される。

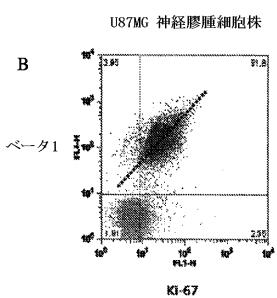
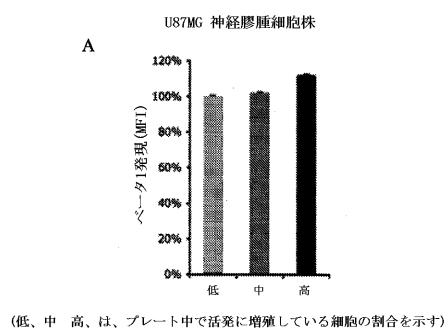
【図1】



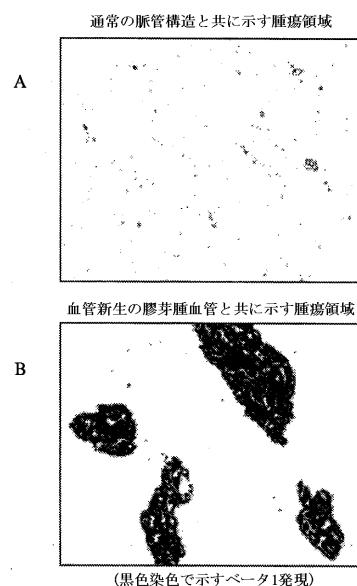
【図2】



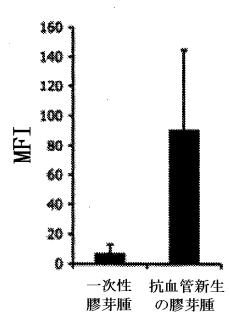
【図3】



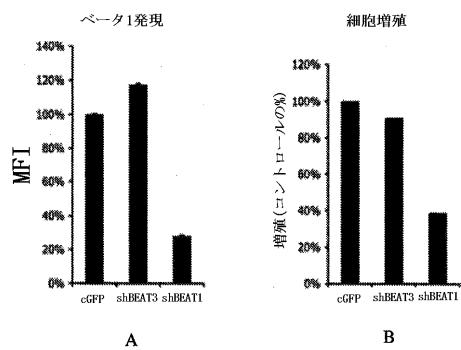
【図4】



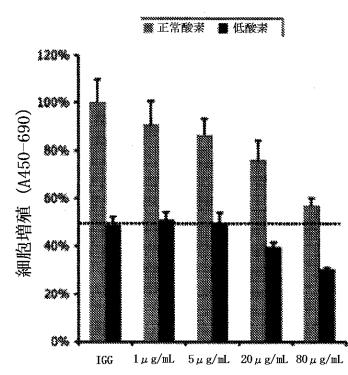
【図5】



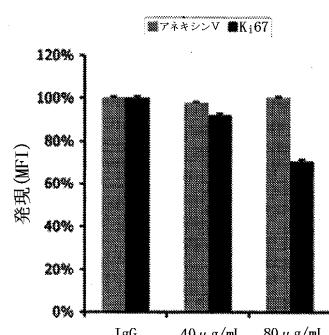
【図7】



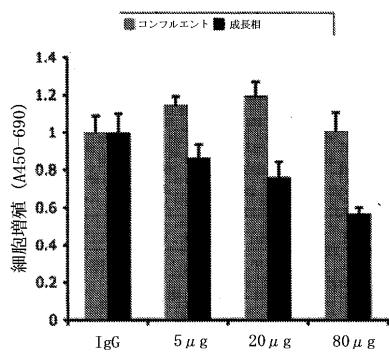
【図6】



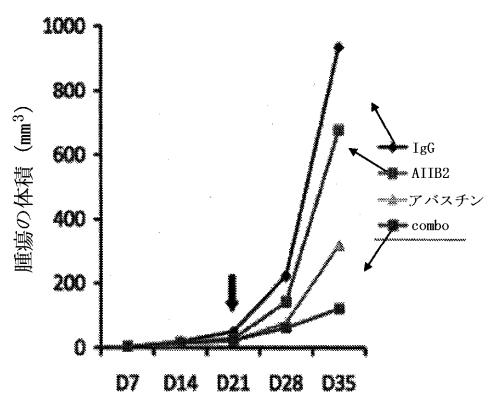
【図8】



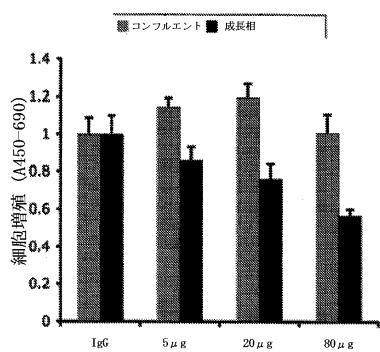
【図9】



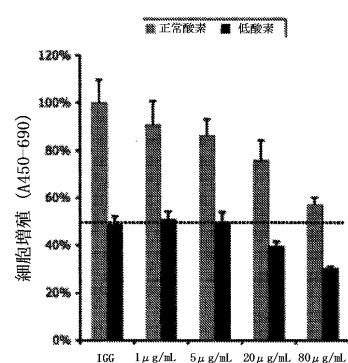
【図10】



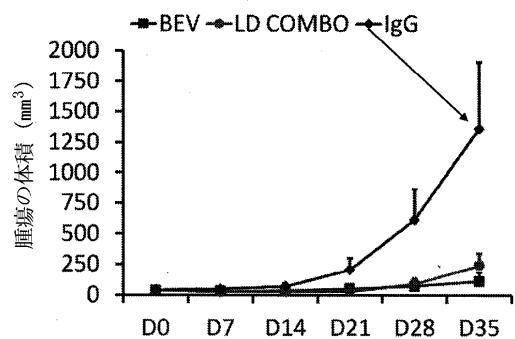
【図11】



【図12】



【図 1 3】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/30204
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - IPC(8)-A61K 39/00; A61K 39/395; A61K 38/18; A61K 48/00 (2012.01) USPC - USPC-424/133.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC-424/133.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC-424/133.1; 424/158.1, 145.1; 514/8.1, 44R (text search, key word limited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWest (US Pat, PgPub, EPO, JPO), GoogleScholar (PL, NPL), FreePatentsOnline (US Pat, PgPub, EPO, JPO, WIPO, NPL); search terms: anti-VEGF anti-integrin inhibitor VEGF anti beta 1 integrin antibody combination combination therapy cancer tumor viral vector shRNA bind beta-1 integrin mRNA kit glioblastoma multiforme catheter		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0220504 A1 (Chuntharapei et al.) 3 September 2009 (03.09.2009) Para [0005]-[0007], [0041]-[0045], [0157], [0238]	1-7, 9-16, 18-24, 26, 28 ----- 8, 17, 25, 27
Y	WO/2009/009114 A2 (Satyal et al.) 15 January 2009 (15.01.2009) para [0018]-[0022], [0034], [0037]	8, 17
Y	US 2010/0048677 A1 (Mitchell et al.) 25 February 2010 (25.02.2010) para [0086]	25
Y	US 2009/0124976 A1 (Mittermayer) 14 May 2009 (14.05.2009) abstract, para [0007]	27
A	US 20030143191 A1 (Bell et al.) 31 July 2003 (31.07.2003) para [0601], [1090], [0598], [0819], [0801]	1-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 June 2012 (02.06.2012)	Date of mailing of the international search report <b>29 JUN 2012</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 48/00</b>	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
<b>A 6 1 K 35/76</b>	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
<b>A 6 1 K 49/00</b>	(2006.01)	A 6 1 K 35/76
<b>C 0 7 K 16/22</b>	(2006.01)	A 6 1 K 49/00
<b>C 0 7 K 16/46</b>	(2006.01)	C 0 7 K 16/22
		C 0 7 K 16/46

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R 0, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ウォーレン ショーン カーボネル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 5 8 サンフランシスコ イリノイ ストリート 4  
0 9 オンコシナジー インコーポレイテッド内

(72)発明者 マニッシュ クマール アギー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 4 3 サンフランシスコ パルナッソス アベニュー  
5 0 5 サンフランシスコ ユニバーシティ オブ カリフォルニア ルーム エム 7 7 9

F ターム(参考) 4C084 AA02 AA13 AA20 CA53 DA40 DB57 MA02 NA14 ZB26  
4C085 AA13 AA14 CC04 CC23 EE03 HH03 KA03 KA26 LL18  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 MA70 NA14 ZB26  
4H045 AA11 AA30 CA40 DA75 EA20