

(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2015-506961

(P2015-506961A)

(43) 公表日 平成27年3月5日(2015.3.5)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
A61K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N	4 B 02 4	
A61P 13/12 (2006.01)	A 61 P 13/12		4 B 05 0	
A61P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00		4 C 08 4	
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 O 1	4 C 08 5	
A61P 35/04 (2006.01)	A 61 P 35/04		4 C 08 6	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く				
(21) 出願番号	特願2014-555801 (P2014-555801)	(71) 出願人	509125475	
(86) (22) 出願日	平成25年2月1日 (2013.2.1)		アクセルロン ファーマ, インコーポレイテッド	
(85) 翻訳文提出日	平成26年9月22日 (2014.9.22)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, シドニー ストリート 128	
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/024510	(71) 出願人	507316413	
(87) 國際公開番号	W02013/116781		ペス イスラエル テアコネス メディカル センター	
(87) 國際公開日	平成25年8月8日 (2013.8.8)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ブルックリン アベニュー 330	
(31) 優先権主張番号	61/593,864	(74) 代理人	100102978	
(32) 優先日	平成24年2月2日 (2012.2.2)		弁理士 清水 初志	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	最終頁に続く		
(31) 優先権主張番号	61/597,124			
(32) 優先日	平成24年2月9日 (2012.2.9)			
(33) 優先権主張国	米国 (US)			

(54) 【発明の名称】 ALK1アンタゴニストおよび腎細胞癌の治療におけるその使用

(57) 【要約】

ある局面において、本開示は、アクチビン様キナーゼ1(ALK1)ポリペプチドの細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むポリペプチドを用いて、インビボの腎細胞癌(RCC)の腫瘍成長を阻害することができるという洞察に関する。付加的な局面において、本開示は、ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むポリペプチドが、標準治療である受容体チロシンキナーゼ阻害剤の、インビボのRCCの腫瘍成長を阻害する能力を劇的に増大させるという洞察に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

腎細胞癌(RCC)を有する哺乳動物に、受容体チロシンキナーゼ阻害剤(RTKI)、ならびに

- (a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；
- (b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；
- (c) ヒトBMP9に結合する抗体；および
- (d) ヒトBMP10に結合する抗体

より選択される薬剤の有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法。

【請求項 2】

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、かつALK1ポリペプチドが、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALK1リガンドに結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む、請求項2または3に記載の方法。

【請求項 5】

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンのFc部分をさらに含む、請求項2または3に記載の方法。

【請求項 6】

Fc部分がヒトIgG1のFc部分である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

(b)の抗体が、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

(c)の抗体が、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

(d)の抗体が、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

RTKIがスニチニブである、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

RTKIがソラフェニブである、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

RTKIがパゾパニブである、請求項1に記載の方法。

【請求項 14】

RTKIがアキシチニブである、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

RTKIがチボザニブまたはバンデタニブである、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤を投与する段階をさらに含む、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

mTOR標的阻害剤がエベロリムスである、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

mTOR標的阻害剤がテムシロリムスである、請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

RCCが腎明細胞癌である、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

RCCが腎洞に浸潤している、請求項1～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

RCCが転移性RCCである、請求項1～20のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

RCCが肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している、請求項1～21のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、

- (a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；
- (b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；
- (c) ヒトBMP9に結合する抗体；および
- (d) ヒトBMP10に結合する抗体

より選択される薬剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む、方法。

【請求項 24】

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、かつALK1ポリペプチドが、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALK1リガンドに結合する、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項23に記載の方法。

【請求項 26】

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む、請求項24または25に記載の方法。

【請求項 27】

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンのFc部分をさらに含む、請求項24または25に記載の方法。

【請求項 28】

Fc部分がヒトIgG1のFc部分である、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項 30】

(b)の抗体が、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する、請求項23に記載の方法。

【請求項 31】

(c)の抗体が、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する、請求項23に記載の方法。

【請求項 32】

(d)の抗体が、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する、請求項23に記載の方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

以前に受けたRCC治療薬がRTKIである、請求項23～32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項34】

RTKIが、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

以前に受けたRCC治療薬が哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤である、請求項23～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項36】

mTOR標的阻害剤が、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である、請求項35に記載の方法。

10

【請求項37】

以前に受けた治療薬がインターフェロン(IFN-)またはインターロイキン-2(IL-2)である、請求項23～34のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

RTKIを投与する段階をさらに含む、請求項23～37のいずれか一項に記載の方法。

【請求項39】

RTKIが、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

mTOR標的阻害剤を投与する段階をさらに含む、請求項23～37のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項41】

mTOR標的阻害剤が、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

RCCが腎明細胞癌である、請求項23～41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

RCCが腎洞に浸潤している、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

RCCが転移性RCCである、請求項23～43のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項45】

RCCが肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している、請求項23～44のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

腎細胞癌(RCC)は、悪性腎腫瘍全体の90%までを占め、米国の男性および女性において最も多く診断される癌の第8位である。米国国立癌研究所は、2012年に米国ではおよそ65,000例の腎癌の新たな症例が診断される、およびおよそ13,600件の死亡が腎癌によって起こると推定している。世界的には、毎年200,000例を超える新たな症例が診断され、100,000名を超える人々がRCCで死亡すると推定されている。世界的に見て、RCCの発生率および死亡率はいずれも増加している。

40

【0002】

RCCは、腎臓またはごく周辺の組織にまだ限局している時点で診断され、治療されるのであれば、腫瘍または腎臓の外科的切除によって治癒し得る場合が多い。しかしながら、癌が血管新生された状態になり、身体の遠隔部位に転移するにつれて、無病生存率は有意に減少する。RCCの3分の1は転移性疾患として現れ、5年生存率は10%未満である。

【0003】

転移性RCC(mRCC)は、歴史的に見て化学療法およびホルモン療法に非感受性であり、ご

50

く最近まで、全身治療は、インターロイキン2(IL-2)またはインターフェロン(IFN-)による非特異的な免疫ベースのサイトカイン療法に限定されていた。これらの療法は、低い奏功率および高い毒性率を伴う。

【0004】

過去10年間の研究は、RCC腫瘍形成および進行疾患と関連した遺伝的事象を解明するのに役立っている。特に、腫瘍細胞内および腫瘍細胞と周辺組織(例えば、常在内皮細胞および周皮細胞)との間の血管内皮増殖因子(VEGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、およびAKT/mTOR(哺乳類ラバマイシン標的タンパク質)シグナル伝達経路の異常なシグナル伝達が、RCC血管新生、細胞生存、および腫瘍増殖の駆動において影響力のある役割を果たすことが同定された。これらの経路における異常とRCCとの関連性は、次いで、VEGF、PDGF、およびmTORシグナル伝達経路の重要な段階を標的化する相次ぐ治療法の開発をもたらした。特に、2005年以来、進行性RCC適応に対して、VEGFおよびPDGF経路を標的化する5種類の薬剤(すなわち、ソラフェニブ、スニチニブ、ベバシズマブ、パゾパニブ、およびアキシチニブ)、および2種類のmTOR経路標的療法(すなわち、テムシロリムスおよびエベロリムス)がFDAによって認可されている。10

【0005】

ベバシズマブ(VEGFと結合するヒト化抗体であり、AVASTIN(登録商標)として一般に知られている)を除いて、VEGF経路を標的化する認可されたRCC治療法は、小分子ATP模倣阻害剤化合物である。これらの小分子阻害剤は、VEGFR1、VEGFR2、およびVEGFR3などの受容体チロシンキナーゼの高度に保存されたATP結合触媒部位と結合し、それにより、結合された該受容体の細胞内シグナル伝達を遮断することによって作用する。しかしながら、一部には、プロテインキナーゼの間でATP結合触媒部位は高度に保存された構造であるために、大部分の小分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、異なった、意図されない受容体チロシンキナーゼ、および場合によってはさらに他のキナーゼファミリーのメンバーにも結合し、これらを阻害する。受容体チロシンキナーゼ阻害剤のこのような「オフターゲット」の作用は、該薬物の治療適用および/または有効性を限定する有害事象および毒性を頻繁に引き起こす。20

【0006】

スニチニブ(SUTENT(登録商標)として一般に知られている)は、c-Met受容体チロシンキナーゼの小分子阻害剤として最初に開発された多標的受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。スニチニブは、c-Metに加えて、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、PDGFRa、PDGFRb、f1t-3、c-KIT(CD117)、RET、およびCSF-1R受容体チロシンキナーゼの活性を競合的に阻害する。スニチニブは、スニチニブがインターフェロン- α と比較して進行疾患患者の全生存をほぼ5ヶ月延長する(26.4ヶ月対21.8ヶ月)ことを実証する主試験を終えた後に、進行性RCCの治療における一次治療として認可を受けた。わずかではあるものの、患者生存のこの改善によって、スニチニブは、進行性RCCを有する治療未経験患者の新たな標準治療となった。スニチニブに伴う顕著な毒性を管理するために、RCC患者の50%において用量低減が必要とされることによって実証されるように、スニチニブ療法は顕著な副作用を伴う。30

【0007】

RCC治療法の最近の進歩にも関わらず、満たされていない重要な必要性がなお存在している。現在利用可能な治療法は、疾患進行のない1年未満の生存を患者に提供し、顕著な毒性を伴う。その上、治療に対する腫瘍の適応により、治療の中止および腫瘍成長の加速が頻繁に起こる。40

【発明の概要】

【0008】

概要

本開示は、アクチビン様キナーゼI(ALK1)制御系のアンタゴニスト、および腎細胞癌(RCC)を治療するためのそのようなアンタゴニストの使用を提供する。特定の局面において、RCCは腎細胞癌である。さらなる局面において、RCCはTNM(腫瘍/リンパ節/転移分類50

)ステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。他の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

【0009】

本明細書に記載されるように、ALK1は、GDF6およびGDF7を含むGDF5(増殖分化因子5)群のリガンドの受容体であり、またBMP10を含むBMP9(骨形成タンパク質5)群のリガンドの受容体もある。本開示は、ALK1および上記リガンドによって媒介されるシグナル伝達がインビボの血管新生に関与すること、ならびにこの制御系の阻害が強力な抗血管新生効果を有することを実証する。

10

【0010】

本開示はまた、ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1制御系アンタゴニストの使用により、ヒトRCC異種移植動物モデルにおいて腫瘍成長が阻害されることを実証する。本開示はさらに、ALK1のALK1-Fc融合タンパク質アンタゴニストが、ヒトRCC異種移植動物モデルにおいて、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブと組み合わせて投与された場合に、スニチニブの腫瘍成長阻害活性を有意に増強することをさらに実証する。したがって、ある局面において、本開示は、腎細胞癌の治療に使用するための、ALK1受容体または1つもしくは複数のALK1リガンドのアンタゴニストを含む、ALK1制御系のアンタゴニストを提供する。特定の局面において、ALK1アンタゴニストはALK1-Fc融合タンパク質(例えば、本明細書に記載されるALK1-Fc融合タンパク質)である。ある局面において、本開示は、腎細胞癌の治療に使用するための、ALK1受容体または1つもしくは複数のALK1リガンドのアンタゴニストを含む、ALK1制御系のアンタゴニストを提供する。特定の局面において、腎細胞癌は腎明細胞癌である。付加的な局面において、治療される腎細胞癌は腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。他の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

20

【0011】

ある局面において、本開示は、血管新生の阻害に使用するための、ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むポリペプチド(「ALK1 ECDポリペプチド」)を提供する。付加的な局面において、本開示は、RCC(例えば、腎明細胞癌)の治療に使用するための、ALK1 ECDポリペプチドを含むポリペプチドを提供する。いかなる特定の作用機序に拘束されることも望まないが、このようなポリペプチドは、ALK1のリガンドに結合し、これらのリガンドがALK1および他の受容体と相互作用する能力を阻害することによって作用すると予測される。ある態様において、ALK1 ECDポリペプチドは、SEQ ID NO:1のヒトALK1配列のアミノ酸22~118の配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。ある態様において、ALK1 ECDポリペプチドは、SEQ ID NO:1のヒトALK1配列のアミノ酸22~120の配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。ALK1 ECDポリペプチドは、小さな単量体タンパク質として、または二量体化形態(例えば、Fc融合タンパク質として発現される)で使用することができる。ALK1 ECDを第2のポリペプチド部分に融合して、リガンド結合親和性の改善、半減期の延長、またはより容易な產生もしくは精製などの、改善されたまたは所望の特性を提供することもできる。免疫グロブリンのFc部分への融合またはポリオキシエチレン部分(例えば、ポリエチレングリコール)への連結は、全身投与(例えば、静脈内、動脈内、および腹腔内投与)におけるALK1 ECDポリペプチドの血清半減期の延長に特に有用である。

30

【0012】

本明細書において実証されるように、全身投与されたALK1-Fc融合タンパク質は、ヒトRCCマウス異種移植モデルにおいて単独で投与された場合に、強力な腫瘍成長阻害効果を有

40

50

し、また試験されたヒトRCCマウス異種移植モデルにおいてスニチニブと共に全身投与された場合に、スニチニブRCC腫瘍成長阻害を劇的に増加させる。ある態様において、ALK1-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120の配列と少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、このポリペプチドは、介在リンカーを伴うかまたは伴わずに免疫グロブリンのFc部分に融合されており、この場合、該ALK1-Fc融合タンパク質は、GDF5（例えば、Genbankアクセッション番号CAA56874に記載される配列を有する）、GDF6（例えば、Genbankアクセッション番号AAH43222に記載される配列を有する）、GDF7（例えば、Genbankアクセッション番号NP_878248に記載される配列を有する）、BMP9（例えば、Genbankアクセッション番号AF156891、AF188285、AK314956、BC069643、またはBC074921に記載される配列を有する）、およびBMP10（例えば、Genbankアクセッション番号095393に記載される配列を有する）より選択されるALK1リガンドに結合する。さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質は、 1×10^{-7} M未満のK_Dで、GDF5、GDF7、およびBMP9より選択されるALK1リガンドに結合し、 1×10^{-6} Mを超えるK_DでTGF-1に結合する。Fc融合タンパク質のFc部分は、治療される生物に適切であるように、ならびに所望の薬物動態学的特性および薬力学的特性を示すように選択される。任意に、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。好みの態様において、ALK1-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120を含む。任意に、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含む。任意に、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む。任意に、ALK1-Fc融合タンパク質は、哺乳動物細胞株、特にチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株におけるSEQ ID NO:4の核酸の発現によって産生されるタンパク質である。ALK1-ECDポリペプチドは、実質的に発熱物質を含まない薬学的調製物として製剤化される。薬学的調製物は、全身送達（例えば、静脈内、動脈内、または皮下送達）または局所送達用に調製することができる。
10

【0013】

ある局面において、本開示は、治療設定において使用するためのALK1-Fc融合タンパク質の比較的均一な調製物の開発における困難に取り組む。本明細書において記載されるように、ALK1-Fc融合タンパク質は、より高次の多量体へと凝集する傾向がある。本開示は、これらの困難に対する解決法を提供し、したがって、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の二量体ALK1-Fc融合タンパク質から構成される、ALK1-Fc融合タンパク質を含む薬学的調製物を提供する。したがって、ある局面において、本開示は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120の配列と少なくとも90%、95%、96%、または97%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むALK1-Fc融合タンパク質を含む薬学的調製物を提供し、このポリペプチドは免疫グロブリンのFc部分に融合されており、この場合、該ALK1-Fc融合タンパク質は、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドに結合する。さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質は、 1×10^{-7} M未満のK_DでGDF5、GDF7、およびBMP9と結合し、 1×10^{-6} Mを超えるK_DでTGF-1に結合し、この場合、該ALK1-Fc融合タンパク質の少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%は二量体形態で存在する。
20

【0014】

ALK1-Fc融合タンパク質のFc部分は、ヒトIgG1、またはIgG2もしくはIgG3などの別のヒト免疫グロブリンサブクラスのFc部分であってよい。いくつかの局面において、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:3のアミノ酸配列を含む。他の局面において、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む。さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株などの哺乳動物細胞株におけるSEQ ID NO:4の核酸の発現によって産生される。このような薬学的調製物は、公知の技法および試薬を用いて、ALK1-Fc融合タンパク質の所望の特性を最適化する目的で製剤化することができる。
30

【0015】

本発明の薬学的調製物は、血管新生の阻害およびRCCの治療を含む、本明細書に記載さ

れる種々の治療目的のために用いることができる。特定の局面において、本薬学的調製物は腎明細胞癌を治療するために用いられる。さらなる局面において、本薬学的調製物は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物におけるRCCを治療するために用いられる。別の局面において、本薬学的調製物は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受ける準備をしている哺乳動物を治療するために用いられる。さらなる局面において、本発明の薬学的調製物は、進行性（転移性）RCCを治療するために用いられる。付加的な局面において、本発明の薬学的調製物は、血管新生を阻害するために、および／または血管新生の阻害が望ましい疾患もしくは障害を治療するために用いられる。

【0016】

いくつかの態様において、ALK1-Fc薬学的調製物、およびALK1またはALK1の1つもしくは複数のリガンド（例えば、BMP9および／またはBMP10）に対する抗体を含む調製物は、血管新生を阻害する薬剤と共に用いられる。いくつかの態様において、ALK1-Fc薬学的調製物、およびALK1またはALK1の1つもしくは複数のリガンド（例えば、BMP9および／またはBMP10）に対する抗体を含む調製物は、VEGFシグナル伝達経路アンタゴニスト（例えば、VEGFと結合する抗体（例えば、AVASTIN（登録商標））、VEGF受容体（例えば、VEGFR1、VEGFR2、およびVEGFR3）と結合する抗体、およびVEGF受容体トラップ）と共に用いられる。特定の局面において、本薬学的調製物は、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤を含む。さらなる局面において、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブ（SUTENT（登録商標））、ソラフェニブ（NEXAVAR（登録商標））、パゾパニブ（VOTRIENT（登録商標））、アキシチニブ（INLYTA（登録商標））、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である。

10

【0017】

ある局面において、本開示は、RCCを有する哺乳動物にALK1 ECDポリペプチドを投与することにより、哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を提供する。さらなる局面において、本開示は、RCCを有する哺乳動物に、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質およびVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤の有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法を提供する。1つの局面において、治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

20

【0018】

ある局面において、本発明の方法に従って投与されるALK1-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120の配列と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、このポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分に融合されており、この場合、該ALK1-Fc融合タンパク質は、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALKリガンドに結合する。さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質は、 1×10^{-6} Mを超えるK_DでTGF-1と結合する。任意に、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:3の配列を有する。別の選択肢において、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:14の配列を有する。ALK1 ECDポリペプチドは、局所的にまたは全身に（例えば、静脈内、動脈内、または皮下に）送達することができる。

30

【0019】

さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質と共に投与されるVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブ（SUTENT（登録商標））、ソラフェニブ（NEXAVAR（登録商標））、パゾパニブ（VOTRIENT（登録商標））、アキシチニブ（INLYTA（登録商標））、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である。

40

【0020】

別の局面において、本開示は、RCCを有する哺乳動物に、アクチビン様キナーゼI(ALK1)

50

-Fc、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤、および哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)阻害剤の有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法を提供する。さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質およびVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、mTOR標的阻害剤であるエベロリムスまたはテムシロリムスと共に投与される。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

【0021】

1つの局面において、治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

10

【0022】

別の局面において、本開示は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。1つの局面において、以前に受けた治療薬は、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。さらなる局面において、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である。別の局面において、以前に受けた治療薬は、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤である。さらなる局面において、mTOR標的阻害剤は、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である。他の局面において、mTOR標的阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。付加的な局面において、以前に受けた治療薬は全身サイトカイン療法剤である。さらなる局面において、全身サイトカイン療法剤はインターフェロン

20

(IFN- α)またはインターロイキン-2(IL-2)である。1つの局面によると、治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

30

【0023】

付加的な局面において、本開示は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質およびVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。さらなる態様において、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。1つの局面によると、治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

40

【0024】

付加的な局面において、本開示は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質、および受容体チロシンキナーゼと結合する抗体の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。さらなる局面において、該抗体は、VEGF、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、PDGFR α 、

50

PDGFRb、c-KIT、MET FAK、RET、FGF、TiE-1、Tie-2、およびEGFRより選択される受容体チロシンキナーゼと結合する。付加的な局面において、投与される抗体はベバシズマブである。1つの局面によると、治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

【0025】

付加的な局面において、本開示は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質およびmTOR標的阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。さらなる局面において、mTOR標的阻害剤は、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。1つの局面によると、RCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

10

20

30

40

【0026】

付加的な局面において、本開示は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質および免疫刺激性サイトカインの有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。さらなる態様において、投与される免疫刺激性サイトカインはIFN- α またはIL-2である。別の局面によると、治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

【0027】

付加的な局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受ける準備をしている哺乳動物に、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質の有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法を提供する。1つの局面において、医学的手技は、腎保存手術、腎部分切除術、腎全摘除術、および熱焼灼より選択される。いくつかの局面において、RCCは腎明細胞癌である。付加的な局面において、RCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

【0028】

1つの局面において、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受ける準備をしている哺乳動物に投与されるALK1-Fc融合タンパク質は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120の配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、この場合、該ALK1-Fc融合タンパク質は、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALK1リガンドに結合する。付加的な局面において、ALK1-Fc融合タンパク質のFc部分は、ヒトIgG1免疫

50

グロブリンのFc部分である。さらなる局面において、ALK1-Fc融合タンパク質はSEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む。

【0029】

さらなる局面において、本開示は、RCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受けける準備をしている哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、アクチビン様キナーゼI(ALK1)-Fc融合タンパク質およびVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。1つの局面によると、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である。

【0030】

別の局面において、本開示は、RCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受けける準備をしている哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、ALK1-Fc融合タンパク質、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤、およびmTOR標的阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。1つの局面において、mTOR標的阻害剤は、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である。別の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

【0031】

別の局面において、本開示は、RCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受けける準備をしている哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、ALK1-Fc融合タンパク質、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤、および免疫刺激性サイトカインの有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。1つの局面において、投与される免疫刺激性サイトカインはIFN- γ またはIL-2である。

【0032】

ある局面において、本開示は、RCCを治療するための医学的手技を受けたかまたは受けける準備をしている哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、ALK1リガンドに結合し、該ALK1リガンドのALK1への結合を阻害する抗体を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供する。いくつかの態様において、該抗体は、 5×10^{-8} M未満のK_DでALK1リガンドに結合する。いくつかの態様において、該抗体は、ALK1リガンドによって促進される血管新生を阻害する。ある局面において、該抗体は、細胞外ドメインであるSEQ ID NO:1のアミノ酸22~118または22~120においてALK1に結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10からなる群より選択される少なくとも1つのALK1リガンドへのALK1の結合を阻害する。ALK1に対するこれらのリガンドの親和性に基づいて、抗体は、 5×10^{-8} M未満、および任意に 5×10^{-8} M~ 1×10^{-10} MのK_Dで結合し得る。この範囲内の親和性を有する抗体は、GDF5、GDF6、およびGDF7のうちの1つまたは複数によるシグナル伝達を阻害するが、BMP9およびBMP10によるシグナル伝達に及ぼす効果はより低いと予測される。このような抗体は、好ましくは、GDF5、GDF6、およびGDF7からなる群より選択される少なくとも1つのALK1リガンドによって促進される血管新生を阻害する。特定の機構に拘束されることは望まないが、このような抗体はALK1活性を直接阻害することによって作用すると予測され、これはALK1リガンドの活性を阻害すると予測されるALK1-Fc融合タンパク質の活性と対比されるべきである。抗ALK1抗体は、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、またはBMP10が、BMPR1a、BMPR1b、およびBMPRII複合体などの別の受容体系を介してシグナル伝達する能力を妨害しないと予測される。しかしながら、たとえALK1 ECDが低親和性リガンドに結合し得ないかまたは阻害し得ないとしても、抗ALK1抗体は、ALK1の低親和性リガンド(例えば、結合が比較的弱いにもかかわらず、ALK1を介して有意なシグナル伝達事象を誘発すると一般に認識されているTGF- β)がALK1を介してシグナル伝達する能力を妨害すると予測される。いくつかの態様において、 1×10^{-10} M未満のK_DでALK1ポリペプチドに結合する。この範囲内の親和性を有する抗体は、BMP9またはBMP10によるシグナル伝達を阻害すると予測される。このような抗体は、好ましくは、BMP9およびBMP10のALK1への結合を阻害する。

【0033】

10

20

30

40

50

機能的なシグナル伝達複合体を形成するために、BMP9、BMP10、GDF5、GDF6、およびGDF7を含むBMP/GDFファミリーのメンバーは、I型およびII型受容体に結合する。これら2つの型の受容体に対する結合部位は異なる。したがって、ある態様において、ALK1リガンドに結合し、そのリガンドのALK1への結合を阻害する抗体は、リガンドのI型受容体結合部位またはその近傍において結合する抗体である。

【0034】

著しくは、本明細書に開示されるデータに基づいて、ALK1に比較的弱く結合する抗体は、ALK1に対するTGF β 結合を阻害することができる一方で、GDF5またはBMP9などのより強く結合するリガンドを阻害することができない。本明細書に記載される抗体は、好ましくは組換え抗体であり、これはヒト化抗体、または一本鎖抗体から開発された完全ヒト抗体などの、分子生物学の技法を用いて構築された核酸から発現された抗体を意味する。Fv、Fab、および一本鎖抗体もまた、「組換え抗体」という用語内に含まれる。抗体はまた、ポリクローナル抗体または非組換えモノクローナル抗体（ヒトまたはマウス形態、およびトランスジェニックマウスから得られるヒト抗体を含む）であってよい。抗体およびALK1-ECDポリペプチドは、実質的に発熱物質を含まない薬学的調製物として容易に製剤化することができる。薬学的調製物は、全身送達（例えば、静脈内、動脈内、または皮下送達）または局所送達用に調製することができる。国際特許出願公開第WO 2007/040912号記載されている抗体は、本明細書に記載される様々な方法に有用であり得る。

10

【0035】

ある局面において、本開示は、本明細書において一般的にまたは具体的に記載される、ALK1ポリペプチドに結合する抗体の有効量を哺乳動物に投与することにより、哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を提供する。1つの局面において、腎細胞は腎明細胞癌である。別の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

20

【0036】

この目的に有用な抗体は、ALK1の細胞外ドメインに結合する（例えば、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118からなるポリペプチドに結合する）か、またはALK1の別の部分に結合する。1つの態様において、該抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118からなるポリペプチドに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10からなる群より選択される少なくとも1つのALK1リガンドの結合を阻害する。別の態様において、該抗体は、 5×10^{-8} M未満、および任意に 5×10^{-8} M～ 1×10^{-10} MのK_DでALK1ポリペプチドに結合する。付加的な態様において、該抗体は、GDF5、GDF6、およびGDF7からなる群より選択される少なくとも1つのALK1リガンドによって促進される血管新生を阻害する。いくつかの態様において、BMP9またはBMP10によるシグナル伝達と比較してGDF5、GDF6、またはGDF7によって媒介されるシグナル伝達を選択的に阻害する抗体は、GDF5、GDF6、またはGDF7が局在する組織：主に骨または関節で起こる血管新生の選択的阻害剤として用いられる。いくつかの態様において、該抗体は、 1×10^{-10} M未満のK_DでALK1ポリペプチドに結合する。付加的な態様において、該抗体は、ALK1のALK1リガンドへの結合を阻害し、この場合、該ALK1リガンドはBMP9およびBMP10からなる群より選択される。抗ALK1抗体は、局所的にまたは全身に（例えば、静脈内、動脈内、または皮下に）に送達することができる。特定の態様において、本開示は、抗ALK1抗体を投与することにより、哺乳動物の進行性腎細胞癌を治療する方法を提供する。

30

【0037】

別の特定の態様において、本開示は、本明細書に記載される抗ALK1抗体およびVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤を投与することにより、腎細胞癌を有する哺乳動物を治療する方法を提供する。特定の態様において、本開示は、RCCを有する哺乳動物に抗ALK1抗体およびVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤を投与することにより、腎明細胞癌を有する哺乳

40

50

動物を治療する方法を提供する。1つの局面において、RCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

【0038】

ある局面において、本開示は、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤、およびALK1リガンドに結合し、該ALK1リガンドのALK1への結合を阻害する抗体を含む組成物を提供し、この場合、該ALK1リガンドはBMP9およびBMP10からなる群より選択される。著しくは、本明細書に示されるように、中和抗BMP9抗体は、インビボの血管新生を阻害する。加えて、本明細書で実証されるように、BMP-10は血管新生を促進し、BMP-10のアンタゴニストは血管新生を阻害する。上記抗体は、 1×10^{-10} M未満のK_DでALK1リガンドに結合し得る。このような抗体は好ましくは組換え抗体であり、実質的に発熱物質を含まない薬学的調製物として製剤化することができる。薬学的調製物は、全身送達（例えば、静脈内、動脈内、または皮下送達）または局所送達用に調製することができる。

10

【0039】

ある局面において、本開示は、哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、受容体チロシンキナーゼ阻害剤(RTK1)、およびALK1リガンドに結合し、該ALK1リガンドのALK1への結合を阻害する抗体の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を提供し、この場合、該ALK1リガンドは、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10からなる群より選択される。該抗体は、GDF5、GDF6、およびGDF7からなる群より選択される少なくとも1つのALK1リガンドによって促進される血管新生を阻害し得る。さらなる局面において、治療される腎細胞癌はリンパ節に転移している。付加的な局面において、治療される腎細胞癌は腎明細胞癌である。

20

【0040】

ある局面において、本開示は、RCCを有する哺乳動物に、VEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤、およびALK1、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、またはBMP10の産生を減少させる核酸（例えば、アンチセンスまたはRNAi構築物）を含むがこれらに限定されない、ALK1シグナル伝達系の阻害剤の有効量を投与することにより、哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を提供する。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。ALK1シグナル伝達のこのような阻害剤には、アプタマー、ランダムペプチド、および選択された標的に結合できるように改変され得るタンパク質骨格（このような骨格の例には、アンチカリンおよびFNIIIドメインが含まれる）などの親和性結合試薬が含まれるが、これらに限定されない。これらの結合試薬を用いて、ALK1リガンド相互作用を破壊するか、または結合後に起こるシグナル伝達を阻害するかのいずれかにより、ALK1制御系を破壊する親和性結合試薬を同定し、選択することができる。1つの局面において、本方法に従って治療されるRCCは腎明細胞癌である。別の局面において、治療されるRCCは腎洞に浸潤している。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

30

【0041】

本開示のさらなる局面において、RCCを有する哺乳動物に、BMP9および/またはBMP10のアンタゴニストならびにVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤の有効量を投与する段階を含む、哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を提供する。いくつかの態様において、該

40

50

アンタゴニストは、BMP9および/またはBMP10に結合する抗体である。該抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、およびキメラ抗体またはヒト化抗体であってよい。該アンタゴニストは、Fd、Fv、Fab、F(ab')₁、F(ab')₂、もしくはF(ab')₂断片、一本鎖Fv(s cFv)、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、ミニボディ(minibody)、またはペプチボディ(peptibody)であってよい。いくつかの態様において、該アンタゴニストはアプタマー(ペプチドまたは核酸)である。本明細書で実証されるようなBMP9およびBMP10のアンタゴニストの重複効果を前提として、本開示は、両タンパク質と効率的に交差反応し、ひいてはこれらを遮断する抗体(例えば、BMP9およびBMP10の両方に対する10 nM未満または1 nM未満の親和性)のような、BMP9およびBMP10の両方のアンタゴニストを提供する。BMP9およびBMP10の両方と結合するALK1アンタゴニストの別の例は、BMP9およびBMP10の両方に結合し、両リガンドの活性を阻害するALK1-Fc融合タンパク質である。本発明のさらなる局面において、本方法は、mTOR標的阻害剤の有効量を哺乳動物に投与する段階をさらに含む。さらなる局面において、上記アンタゴニストは、BMP9および/またはBMP10の発現を阻害する。いくつかの局面において、該アンタゴニストは、BMP9および/またはBMP10の発現を阻害する核酸である。例えば、1つの局面において、該核酸はアンチセンスまたはRNAi核酸である。他の局面において、該アンタゴニストは、BMP9および/またはBMP10に結合する、抗体以外のタンパク質である。1つの局面において、該アンタゴニストは、GDF Trapファミリーのメンバーである。GDF Trapファミリーの例には、フォリスタチン、FLRG、ノギン、およびグレムリンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、該アンタゴニストは、BMP9およびBMP10に結合するアミノ酸配列を検出する段階を含む方法によって、アミノ酸配列のライブラリーより選択されたアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

10

20

30

40

【0042】

ある局面において、本開示は、哺乳動物における転移性腎細胞癌を治療する方法を提供する。例えば、そのような方法は、転移性腎細胞癌を有する哺乳動物に、RTK1と、ALK1 E CDタンパク質；ALK1リガンドに結合し、該ALK1リガンドのALK1への結合を阻害する抗体であって、該ALK1リガンドが、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10からなる群より選択される、抗体；SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118からなるALK1ポリペプチドに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10からなる群より選択される少なくとも1つのALK1リガンドの結合を阻害する抗体からなる群より選択される薬剤の有効量を投与する段階を含み得る。

【0043】

各場合において、本明細書に記載される薬剤は、血管新生を阻害する付加的な薬剤と共に投与することができる。

【0044】

いくつかの態様において本発明は、ALK1シグナル伝達系の阻害剤(例えば、ALK1-Fc)の有効量をそれを必要とする哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物における血管新生を阻害する方法を提供する。腫瘍の血管新生を阻害することが望ましい場合には、該薬剤は任意に、化学療法剤または生物学的抗癌剤などの、抗癌効果を有する第2の薬剤と共に投与される。さらなる局面において、該薬剤はMTOR(哺乳類ラパマイシン標的タンパク質)阻害剤と共に投与される。いくつかの態様において、本発明の方法は、腫瘍、抗VEGF療法に抵抗性である腫瘍、多発性骨髄腫腫瘍、および肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移した腫瘍からなる群より選択される血管新生関連疾患を治療するために用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】ヒトアクチビン様キナーゼ1、すなわちALK1のアミノ酸配列(SEQ ID NO:1)を示す。一重下線は、予測される細胞外ドメインを示す。二重下線は細胞内ドメインを示す。シグナルペプチドおよび膜貫通ドメインには下線を引いていない。

【図2】ヒトALK1 cDNAの核酸配列(SEQ ID NO:2)を示す。コード配列に下線を引いてある

50

。細胞外ドメインをコードする部分に二重下線を引いてある。

【図3】図3Aおよび3Bは、Fcドメインに対するヒトALK1の細胞外ドメインの融合物の例(SEQ ID NO:3)および(SEQ ID NO:14)を示す。hALK1-Fcタンパク質は、C末端でリンカー(下線)およびIgG1 Fc領域に融合された、ヒトALK1タンパク質のアミノ酸22~120を含む。

【図4】SEQ ID NO:3のhALK1-Fcポリペプチドを発現させるための核酸配列を示す。コードされるアミノ酸配列も示す。Asp22が分泌タンパク質のN末端アミノ酸となるように、リーダー配列が切断される。

【図5】内皮細胞管形成アッセイにおけるマウスALK1-Fc(「RAP」)およびヒトALK1-Fc(「ACE」)の抗血管新生効果を示す。あらゆる濃度のRAPおよびACEが、内皮細胞成長補充物(ECGS)に応答した管形成のレベルを、陽性対照、エンドスタチンよりも大きな程度で低下させた。
10

【図6】ニワトリ緘毛尿膜(CAM)アッセイにおけるGDF7の血管新生効果を示す。GDF7効果は、VEGFの効果に匹敵する。

【図7】CAMアッセイにおけるヒトALK1-Fc融合物の抗血管新生効果を示す。hALK1-Fcは、VEGF、FGF、およびGDF7によって促進される血管新生を阻害する。

【図8】マウスALK1-Fc(mALK1-Fc)、hALK1-Fc、市販の抗ALK1モノクローナル抗体(抗ALK1 mAb)および市販の中和抗VEGFモノクローナル抗体の比較抗血管新生効果を示す。ALK1-Fc構築物の抗血管形成効果は、抗VEGF抗体の効果に匹敵する。

【図9】インビボでのhALK1-Fcおよび抗VEGF抗体の抗血管新生効果を示す。マウス角膜マイクロポケットアッセイにより測定したところ、hALK1-Fcおよび抗VEGFは、眼における血管新生に対して同等の効果を及ぼした。
20

【図10】関節リウマチのマウスコラーゲン誘導性関節炎(CIA)モデルにおけるmALK1-Fcの効果を示す。このグラフは、コラーゲン誘導性の雄DBA/1関節炎マウスにおいて42日間の観察期間中に決定された群の関節炎スコアの平均値を示す。RAP-041はmALK1-Fcである。Avastin(商標)は抗VEGF抗体ベバシズマブである。

【図11】Superose 12 10/300 GLサイズ排除カラム(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)による、hALK1-Fc(SEQ ID NO:3)、およびR&D Systems(Minneapolis, MN)からのhALK1-Fc融合タンパク質の分離を示す。R&D Systemsの物質は、グラフの左側にあるピークによって示されるような、およそ13%の凝集タンパク質、およびいくつかのより低分子量の種を含む。SEQ ID NO:3の物質は、99%を超える割合で、適切な分子サイズの二量体から構成される。
30

【図12】PBSで処置したマウス(丸)およびmALK1-Fcで処置したマウス(四角)における、ルシフェラーゼを発現するルイス肺癌(LL/2-luc)細胞からの蛍光シグナルを示す。腫瘍細胞を尾静脈に注射し、処置(PBSまたは10 mg/kg mALK1-FcのIP、週2回)を細胞投与当日に開始した。PBS処置マウスは、瀕死であるために22日目に屠殺した。処置群および対照群はそれぞれ、動物7匹からなった(n=7)。

【図13】CAMアッセイにおけるVEGF媒介性血管新生に及ぼす組換えヒトBMP9(「rhB9」)および市販の抗BMP9モノクローナル抗体(「mabB9」)の効果を示す。興味深いことに、BMP9処理および抗BMP9処理の両方が、VEGF媒介性血管新生を阻害する。

【図14】ER-乳癌細胞株由来の細胞株であるMDA-MB-231細胞株を用いた同所異種移植モデルに及ぼすmALK1-Fcの効果を示す。30 mg/kgの用量において、mALK1-Fcは異種移植腫瘍に対して有意な成長遅延効果を及ぼす。
40

【図15】エストロゲン受容体陽性(ER+)乳癌細胞由来の細胞株であるMCF7細胞株を用いた同所異種移植モデルに及ぼすhALK1-Fcの効果を示す。10または30 mg/kgの用量において、hALK1-Fcは異種移植腫瘍に対して有意な成長遅延効果を及ぼす。

【図16】細胞ベースのアッセイにおいてBMP10によって誘導される転写レポーター活性を80%超阻害するhALK1-Fcの能力を示す。

【図17】ヒトBMP9タンパク質(SEQ ID NO:12)とヒトBMP10タンパク質(SEQ ID NO:13)の成熟部分のアラインメントを示す。同一性の領域を星印で示す。

【図18】786-0ヒトRCC異種移植モデルにおけるスニチニブによる腫瘍成長阻害を増強す
50

るhALK1-Fcの能力を示す。hALK1-Fcは、単剤として腫瘍成長を阻害する傾向をさらに示した。

【図19】A498ヒトRCC異種移植モデルにおいて単剤として腫瘍成長を阻害するhALK1-Fcの能力を示す。

【図20】A498ヒトRCC異種移植モデルにおけるスニチニブによる腫瘍成長阻害を増強するhALK1-Fcの能力を示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

詳細な説明

1. 概要

腎細胞癌

世界保健機関は、50種を超える異なるタイプの腎臓癌をリストアップしている。腎細胞癌(RCC)は成人で最もよく見られるタイプの腎臓癌であり、腎臓で尿細管の内層に癌細胞が生じた場合に起こる。RCCは、初期兆候の欠如、多様な臨床所見、ならびに化学療法および放射線に対する抵抗性を特徴とする。大部分のRCC腫瘍は50～70歳の患者に現れ、この疾患の発生率は男性において2～3倍高い。フォンヒッペル・リンダウ(VHL)症候群、遺伝性乳頭状腎癌、バート・ホッグ・デュベ症候群に付随する家族性腎オンコサイトーマ、および遺伝性腎癌を含むある種の遺伝子状態は、RCCの発生率上昇と関連している。患者の30%は、転移性疾患または切除不能疾患のいずれかを有してRCCの進行期にあり、このコホートの2年全生存は<10%である。Reeves et al., *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2009; 64(1):11-25。

【0047】

最もよく見られるRCCサブタイプである明細胞RCC、乳頭状RCC(I型およびII型)、嫌色素性RCC、集合管RCC、および未分類RCCを含む、5種類の主要なサブタイプのRCCが現在認識されている。その上、RCCの異なる病期を区別するために、解剖学的基準が伝統的に用いられている。腫瘍、リンパ節、および転移(TMN)分類システムは、RCCの病期を区別するために、腫瘍の原発巣のサイズ、腫瘍のリンパ節への伝播の程度、および転移の存在に基づいている。腫瘍病期は、RCCにおいて生存を予測する最も重要な因子である。Koul et al., *Am. J. Cancer Research* 2011; 1(2):240-254。早期RCC患者の50%超は治癒する。ある特定の状況下において、根治的腎摘出術はまた、局所進行性RCCおよび転移性RCCを治療するためにも適応される。臨床的限局性疾患を有する患者の23%は、腎摘出術後に転移性疾患を発症する。Koul et al., *Am. J. Cancer Research* 2011; 1(2):240-254。しかしながら、例えば、主要静脈もしくは副腎における腫瘍の存在、またはリンパ節関与(ステージIII)、および腎臓外部の疾患の存在(IV)を特徴とするTNMステージIII疾患およびステージIV疾患については、転帰は不良である。

【0048】

腎明細胞癌は、典型的には、腎皮質においてネフロンの近位曲尿細管の上皮細胞から生じ、血管浸潤を通じて伝播する傾向があり、器官限局腫瘍の18～29%において腎臓内血管内に悪性細胞が認められる。Delahunt et al., *Clin. Lab. Med.* 2005; 25(2):231-46; およびBonsib et al., *Mod. Pathol.* 2006; 19(5):746-53。120例の腎明細胞癌の広範な病理学的検査により、試験された腫瘍のおよそ半数において腎洞浸潤が示された。RCCは、最も一般的には、肺(33～72%)、腹腔内リンパ節(3～35%)、骨(21～25%)、脳(7～13%)、および肝臓(5～10%)に転移する。例えば、Klatte et al., *Urol. Oncol.* 2008; 26(6):604-9を参照されたい。

【0049】

腎臓に限局するかまたは腎臓内の小さな腫瘍は、しばしば腎部分切除術(「腎保存手術」としても知られる)によって除去される。限局性腫瘍に対する付加的な外科的手技には、組織焼灼治療(例えば、凍結手術およびラジオ波焼灼(RFA))が含まれる。癌が、サイズ、および/または腎臓内のもしくは腎臓を超えた分布の点で進行している場合、外科的介入は典型的には腎全摘除術(すなわち、隣接する副腎および腎臓周囲の脂肪組織を伴う

10

20

30

40

50

かまたは伴わない腎臓全体の切除)を含む。この手術は、腎臓癌の伝統的な標準的介入である。ある特定の状況下において、根治的腎摘出術はまた、局所進行性RCCおよび転移性RCCを治療するためにも適応される。臨床的限局性疾患を有する患者の23%は、腎摘出術後に転移性疾患を発症する。Koul et al., Am. J. Cancer Research 2011; 1(2):240-254。

【0050】

インターロイキン-2(IL-2)およびインターフェロン- α (IFN- α)などの免疫刺激性サイトカインによる免疫療法は、RCCの中軸的な系統的療法である。高用量静脈内IL-2は、奏功率15~20%、完全寛解率6~8%、および治癒率およそ5%をもたらすことが報告された。Koul et al., Am J Cancer Research 2011; 1(2):240-254。しかしながら、この治療計画には毒性がかなりある。IFN- α はより程度の低い生存利点をもたらしたが、より好ましい毒性プロファイルを有する。

【0051】

ALK1

ALK1は、TGF- β スーパーファミリーのリガンドのI型細胞表面受容体であり、ACVRL1およびACVRLK1としても知られている。ALK1は、TGF- β 1、TGF- β 3、およびBMP-9の受容体として意味づけられている(Marchuk et al., 2003; Hum. Mol. Genet. 12:R97-R112、およびBrown et al., 2005; J. Biol. Chem. 280(26):25111-8)。

【0052】

マウスでは、ALK1の機能喪失変異によって、発生中の脈管構造に種々の異常が生じる(Oh et al., 2000; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2626-31、およびUrness et al., 2000; Nat. Genet. 26:328-31)。

【0053】

ヒトでは、ALK1の機能喪失変異は遺伝性出血性毛細血管拡張症(HHT、またはオスラー・ランデュ・ウェーバー症候群)と関連し、その患者は、介在する毛細血管床を欠いて、動脈から静脈への直接的な流動(連通)(動静脈シャント)を作製する動静脈奇形を発症する。HHT患者の典型的な症状には、反復性鼻出血、胃腸出血、皮膚および粘膜皮膚の毛細血管拡張症、ならびに肺、大脳、または肝臓の脈管構造の動静脈奇形(AVM)が含まれる。

【0054】

David et al., (Blood 2007; 109(5):1953-61)およびScharpfenecker et al., (J. Cell Sci. 2007 120(6):964-72)による最近の出版物では、BMP9およびBMP10は内皮細胞においてALK1を活性化する、ならびにこの活性化の結果は内皮細胞の増殖および遊走を阻害することであると結論づけている。ALK1活性化のこのように提唱された効果は、VEGFなどの血管新生促進因子の効果と正反対である。したがって、これらの出版物は、BMP9およびBMP10自体が抗血管新生因子である、ならびにさらに、ALK1活性化は抗血管新生効果を有すると結論づけている。対照的に、本開示は、BMP9およびBMP10のアゴニストよりもむしろアンタゴニストが抗血管新生効果を有することを実証する。

【0055】

本開示は、ALK1の細胞外ドメイン(「ALK1 ECDポリペプチド」)の部分を含むポリペプチドが、インビボのRCC癌成長を阻害し得るという発見に関する。より詳細には、後述されるように、本開示は、VEGF非依存性血管新生、ならびにVEGF、FGF、およびPDGFを含む複数の血管新生因子によって媒介される血管新生の両方に影響を及ぼすALK1の関与を実証するための、ALK1 ECDアンタゴニストの使用を記載する。本開示はまた、ALK1-FcなどのALK1 ECDアンタゴニストが、インビボのヒトRCC異種移植モデルにおいてRCC腫瘍成長を阻害することができ、およびまたヒトRCC異種移植モデルにおいてスニチニブの腫瘍阻害活性を劇的に改善することができるという驚くべき発見に関する。

【0056】

本開示は加えて、ALK1の細胞外ドメイン(「ALK1 ECDポリペプチド」)の部分を含むポリペプチドを用いて、VEGF非依存性血管新生、ならびにVEGF、FGF、およびPDGFを含む複数の血管新生因子によって媒介される血管新生の両方を含む、インビボの血管新生を阻害

10

20

30

40

50

することができるという発見に関する。

【0057】

本開示はまた、ALK1の細胞外ドメイン（「ALK1 ECDポリペプチド」）の部分を含むポリペプチドを用いて、VEGF非依存性血管新生、ならびにVEGF、FGF、およびPDGFを含む複数の血管新生因子によって媒介される血管新生を含む、インビボの血管新生を阻害することができるという発見に関する。一部には、本開示は、ALK1の生理学的な高親和性リガンドの同一性を提供し、ALK1 ECDポリペプチドが血管新生を阻害することを実証する。

【0058】

一部には、本開示は、ALK1の生理学的な高親和性リガンドの同一性を提供し、ALK1 ECDポリペプチドが血管新生を阻害することを実証する。本明細書に示されるデータは、ALK1 ECDポリペプチドがTGF-1への有意な結合を示さない場合でさえ、ALK1 ECDポリペプチドが抗血管新生効果を発揮し得ることを実証する。その上、ALK1 ECDポリペプチドは、VEGF、FGF、およびGDF7を含む多くの異なる血管新生促進因子によって促進される血管新生を阻害する。したがって、本開示はALK1制御系の説明を提供し、ここで、ALK1は、GDF6およびGDF7を含むGDF5群のリガンドの受容体であり、またBMP10を含むBMP9群のリガンドの受容体でもあり、この2つのリガンド群は異なる親和性を有する。さらに、本開示は、ALK1および上記リガンドによって媒介されるシグナル伝達がインビボにおいて血管新生促進性であること、ならびにこの制御系の阻害がインビボで強力な抗血管新生効果を有することを実証する。

【0059】

したがって、ある局面において、本開示は、VEGF依存性血管新生およびVEGF非依存性血管新生の両方を含む血管新生の阻害に使用するための、ALK1受容体または1つもしくは複数のALK1リガンドのアンタゴニストを含む、ALK1制御系のアンタゴニストを提供する。しかしながら、ALK1自体に対する抗体はALK1 ECDポリペプチドとは異なる効果を有すると予測されることに留意すべきである。ALK1に対する汎中和抗体（強いリガンドまたは弱いリガンドすべての結合を阻害する抗体）は、ALK1を介したそのようなリガンドのシグナル伝達を阻害すると予測されるが、そのようなリガンドが他の受容体（例えば、GDF5～7およびBMP9～10の場合のBMPR1a、BMPR1b、BMPRII、ならびにTGF-の場合のTBRIおよびTBRII）を介してシグナル伝達する能力を阻害しないと予測される。一方、ALK1 ECDポリペプチドは、例えば実施例に示されるような構築物、GDF5～7およびBMP9～10を含む、それが強く結合するリガンドのすべてを阻害すると予測されるが、TGF-などの、それが弱く結合するリガンドには影響を及ぼさない。そのため、ALK1に対する汎中和抗体は、ALK1を介したBMP9およびTGF-シグナル伝達を遮断する一方で、この抗体は別の受容体を介したBMP9およびTGF-シグナル伝達を遮断せず、ALK1 ECDポリペプチドは、全受容体（ALK1以外の受容体でさえ）を介したBMP9シグナル伝達を阻害することができる一方で、ALK1であっても任意の受容体を介したTGF-シグナル伝達を阻害しないと予測される。

【0060】

本明細書で用いられる用語は一般に、本開示の状況および各用語が用いられる特定の状況における、当技術分野での通常の意味を有する。本明細書で開示される組成物および方法、ならびにそれらの作製および使用方法の記載に際して、実施者にさらなる手引きが提供されるように、いくつかの用語を本明細書において考察する。用語のいかなる使用の範囲または意味も、その用語が用いられる特定の状況から明らかになるであろう。

【0061】

2. 可溶性ALK1ポリペプチド

天然ALK1タンパク質は膜貫通タンパク質であり、細胞の外部に位置するタンパク質の部分（細胞外部分）および細胞の内部に位置するタンパク質の部分（細胞内部分）を有する。本開示の局面は、ALK1の細胞外ドメインの部分を含むポリペプチドを包含する。

【0062】

ある態様において、本開示は、「ALK1 ECDポリペプチド」を提供する。「ALK1 ECDポリペプチド」という用語は、任意のシグナル配列、およびN末端からシグナル配列までの配

10

20

30

40

50

列を含むかもしくは排除した、天然ALK1ポリペプチドの細胞外ドメインのアミノ酸配列、または天然ALK1ポリペプチドの細胞外ドメインと少なくとも33%同一である、および任意に天然ALK1ポリペプチドの細胞外ドメインの配列と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列からなるかまたはこれらを含むポリペプチドを指すことを意図し、これは、SEQ ID NO:1のアミノ酸34～95のシステインノット領域、またはSEQ ID NO. 1のアミノ酸22～118もしくは22～120などの該システインノット+細胞外ドメインのN末端およびC末端における付加的なアミノ酸によって例証される。

【0063】

10

同様に、ALK1 ECDポリペプチドは、SEQ ID NO:2のヌクレオチド100～285もしくはそのサイレント変種、またはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件（一般に、このような条件は当技術分野で公知であるが、例えば、50% v/vホルムアミド、5×SSC、2% w/vプロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.3% SDS中での65℃で一晩のハイブリダイゼーション、および例えば5×SSC中で約65℃での洗浄を含み得る）下でその相補体とハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドを含み得る。加えて、ALK1 ECDポリペプチドは、SEQ ID NO:2のヌクレオチド64～384もしくはそのサイレント変種、またはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件（一般に、このような条件は当技術分野で公知であるが、例えば、50% v/vホルムアミド、5×SSC、2% w/vプロッキング剤、0.1% N-ラウロイルサルコシン、0.3% SDS中での65℃で一晩のハイブリダイゼーション、および例えば5×SSC中で約65℃での洗浄を含み得る）下でその相補体とハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチドを含み得る。したがって、「ALK1 ECDポリペプチド」という用語は、ALK1ポリペプチドの単離された細胞外部分、その変種（例えば、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120に対応する配列中に2、3、4、5、または10個以下のアミノ酸の置換、付加、または欠失を含む変種を含み、およびSEQ ID NO:1のアミノ酸34～95に対応する配列中に2、3、4、5、または10個以下のアミノ酸の置換、付加、または欠失を含む変種を含む）、その断片、および上記のいずれかを含む融合タンパク質を包含するが、いずれの場合にも、前記ALK1 ECDポリペプチドのいずれもが、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、またはBMP10のうちの1つまたは複数に対する実質的な親和性を保持することが好ましい。「ALK1 ECDポリペプチド」という用語は、任意の全長天然ALK1ポリペプチドを除外することが明確に意図される。一般に、ALK1 ECDポリペプチドは、生物学的に関連した温度、pHレベル、および浸透圧の水溶液中で溶解性となるように設計される。

20

30

40

50

【0064】

上記のように、本開示は、天然ALK1ポリペプチドと特定の程度の配列同一性または配列類似性を共有するALK1 ECDポリペプチドを提供する。2つのアミノ酸配列の同一性パーセントを決定するためには、最適に比較できるようにそれらの配列を整列させる（例えば、最適なアラインメントのために第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができ、比較のために非相同配列を無視することができる）。次いで、対応するアミノ酸位置のアミノ酸残基を比較する。第1配列中のある位置を、第2配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基が占めている場合、それらの分子はその位置で同一である（本明細書で用いられる場合、アミノ酸「同一性」はアミノ酸「相同性」と等価である）。2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、それらの配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

【0065】

配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントおよび類似性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。（Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988；Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993；Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., ed.

50

s., Humana Press, New Jersey, 1994 ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987 ; およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991)。

【0066】

1つの態様では、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、GCGソフトウェアパッケージ (<http://www.gcg.com>で利用可能) 中のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunsch(J. Mol. Biol. 1970; (48):444-453)アルゴリズムを用いて決定する。特定の態様において、以下のパラメータをGAPプログラムで使用する：Blosum62行列またはPAM 250行列のいずれか、ならびにギャップ加重16、14、12、10、8、6、または4、および長さ加重1、2、3、4、5、または6。さらに別の態様では、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントを、GCGソフトウェアパッケージ(Devereux et al., Nucleic Acids Res. 1984; 12(1):387) (<http://www.gcg.com>で利用可能) 中のGAPプログラムを用いて決定する。例示的なパラメータには、NWSgapdna.CMP行列、ならびにギャップ加重40、50、60、70、または80、および長さ加重1、2、3、4、5、または6の使用が含まれる。他に特に既定のない限り、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blosum62行列、GAP加重10、長さ加重3を使用して、GAPプログラムを用いて決定し、そのようなアルゴリズムが所望の同一性パーセントを計算できない場合には、本明細書に開示される適切な代替法が選択されるべきである。

【0067】

別の態様では、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントを、PAM120加重残基表(weight residue table)、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用して、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. Myers and W. Miller(CABIOS, 1989; 4:11-17)のアルゴリズムを用いて決定する。

【0068】

2つのアミノ酸配列間の最良の全アラインメントを決定するための別の態様は、Brutlag et al., (Comp. App. Biosci., 1990;6:237-245)のアルゴリズムに基づいたFASTDBコンピュータプログラムを用いて決定することができる。配列アラインメントでは、クエリー配列および対象配列は共にアミノ酸配列である。そのような大域配列アラインメントの結果は、同一性パーセントで示される。1つの態様では、アミノ酸配列同一性を、Brutlag et al., (Comp. App. Biosci., 1990;6:237-245)のアルゴリズムに基づいたFASTDBコンピュータプログラムを用いて行う。特定の態様において、アミノ酸アラインメントの同一性パーセントおよび類似性パーセントを算出するために使用されるパラメータは、以下を含む：行列 = PAM 150、k-タブル = 2、ミスマッチペナルティ = 1、結合ペナルティ(Joining Penalty) = 20、ランダム化グループ長(Randomization Group Length) = 0、カットオフスコア = 1、ギャップペナルティ = 5、およびギャップサイズペナルティ = 0.05。

【0069】

ある態様において、ALK1 ECDポリペプチドは、SEQ ID NO:1の配列などの天然ALK1タンパク質の細胞外部分、および好ましくはALK1細胞外ドメインのリガンド結合部分を含む。態様において、可溶性ALK1 ECDポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118または22～120のアミノ酸配列と少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む。ある態様において、切断型細胞外ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1の細胞外部分のアミノ酸配列の少なくとも30、40、または50個の連続したアミノ酸を含む。

【0070】

好ましい態様において、ALK1 ECDポリペプチドは、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10のうちの1つまたは複数に結合する。任意に、ALK1ポリペプチドは、TGF-1またはTGF-3に対する実質的結合を示さない。結合は、溶液中で、またはBiacore(商標)システムなどの表面プラズモン共鳴システムで、精製タンパク質を用いて評価することができる。好ましい可溶性ALK1ポリペプチドは、抗血管新生活性を示す。血管新生阻害活性のためのバイオアッセイには、ニワトリ緜毛尿膜(CAM)アッセイ、マウス角膜マイクロポケット

10

20

30

40

50

アッセイ、または移植腫瘍に及ぼす単離タンパク質もしくは合成タンパク質投与の効果を測定するための当技術分野で公知のアッセイが含まれる。CAMアッセイは、O'Reilly, et al.により「Angiogenic Regulation of Metastatic Growth」Cell, 1994;79 (2):315-328に記載されている。簡潔に説明すると、無傷の卵黄を有する3日齢のニワトリ胚を卵から分離し、ペトリ皿に入れる。3日間のインキュベーション後、試験すべきタンパク質を含むメチルセルロースディスクを、個々の胚のCAMに適用する。48時間のインキュベーション後、胚およびCAMを観察して、内皮増殖が阻害されたかどうかを判定する。マウス角膜マイクロポケットアッセイは、疑わしい内皮増殖阻害剤を含む別のペレットと共に、増殖因子含有ペレットをマウスの角膜中に移植し、角膜中に構成される毛細血管のパターンを観察することを含む。その他のアッセイを実施例に記載する。

10

【0071】

ALK1 ECDポリペプチドは、ALK1 ECDポリペプチドの細胞質尾部および膜貫通領域を除去することによって生成することができる。あるいは、膜貫通ドメインを構成する通常は疎水性のアミノ酸残基の欠失または親水性アミノ酸残基との置換によって、膜貫通ドメインを不活性化してもよい。いずれの場合にも、実質的に親水性のヒドロバシープロファイルを作出し、それによって脂質親和性が減少し、水溶性が改善される。親水性アミノ酸残基との置換よりも膜貫通ドメインの欠失が好ましく、これは潜在的免疫原性エピトープの導入が回避されるためである。

【0072】

ALK1 ECDポリペプチドは、様々ナリーダー配列のいずれかをN末端に付加的に含み得る。このような配列によって、ペプチドが発現され、真核生物系の分泌経路に標的化されることが可能になる。例えば、Ernst et al.、米国特許第5,082,783号を参照されたい。あるいは、天然ALK1シグナル配列を用いて、細胞から押し出すこともできる。可能ナリーダー配列には、天然、tPa、およびミツバチメリチナリーダー（それぞれSEQ ID No. 7~9）が含まれる。シグナルペプチドのプロセシングは、いくつかある可変要素の中でも、選択されたリーダー配列、使用される細胞型、および培養条件応じて変化し得、したがって成熟ALK1 ECDポリペプチドの実際のN末端開始部位は、SEQ ID NO:5のものを含め、N末端方向またはC末端方向のいずれかにアミノ酸1~5個だけ移動し得る。

20

【0073】

ある態様において、本開示は、ポリペプチドのグリコシル化を変更するためのALK1ポリペプチドの特定の変異を意図する。このような変異は、O-結合型またはN-結合型グリコシル化部位などの1つまたは複数のグリコシル化部位を導入または排除するよう選択することができる。アスパラギン結合型グリコシル化認識部位は、一般に、適切な細胞グリコシル化酵素によって特異的に認識されるトリペプチド配列、アスパラギン X スレオニン（またはアスパラギン X セリン）（式中、「X」は任意のアミノ酸である）を含む。変更はまた、野生型ALK1ポリペプチドの配列に対する1つもしくは複数のセリンもしくはスレオニン残基の付加、またはそれらによる置換（O-結合型グリコシル化部位のため）によって行うことができる。グリコシル化認識部位の第1または第3のアミノ酸位置の一方または両方における種々のアミノ酸置換または欠失（および/または第2位におけるアミノ酸欠失）により、改変トリペプチド配列で非グリコシル化が生じる。ALK1ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ALK1ポリペプチドへのグリコシドの化学的または酵素的結合による。使用する結合様式に応じて、糖を、(a) アルギニンおよびヒスチジン；(b) 遊離カルボキシル基；(c) 遊離スルフヒドリル基、例えばシステインのものなど；(d) 遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、スレオニン、もしくはヒドロキシプロリンのものなど；(e) 芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンのものなど；または(f) グルタミンのアミド基に結合することができる。これらの方は、1987年9月11日に公開されたWO 87/05330、およびAplin and Wriston, (1981) CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されており、これらは参照により本明細書に組み入れられる。ALK1ポリペプチド上に存在する1つまたは複数の炭水化物部分の除去は、化学的および/または酵素的に達成することができる。化学的脱グリコシル化は、

30

40

50

10 例えば、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物へのALK1ポリペプチドの曝露を含み得る。この処理によって、アミノ酸配列をそのままにしつつ、連結糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除く大部分またはすべての糖が切断される。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., (1987) Arch. Biochem. Bio phys. 259:52、およびEdge et al., Anal. Biochem. 1981; 118:131によってさらに記載されている。ALK1ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., (1987) Meth. Enzymol. 138:350により記載されているように、種々のエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼを使用することによって達成することができる。哺乳動物、酵母、昆虫、および植物細胞はすべて、ペプチドのアミノ酸配列によって影響され得る異なるグリコシル化パターンを導入し得るため、ALK1ポリペプチドの配列は、使用する発現系の種類に応じて適切に調節することができる。一般に、ヒトにおいて使用するためのALK1タンパク質は、HEK293またはCHO細胞株などの、適切なグリコシル化を提供する哺乳動物細胞株で発現されるが、他の哺乳動物発現細胞株、グリコシル化酵素が操作されている酵母細胞株、および昆虫細胞も同様に有用であると予測される。

【0074】

20 本開示は、ALK1ポリペプチドの変異体、特にコンビナトリアル変異体のセット、および切断変異体を作製する方法をさらに意図する；コンビナトリアル変異体のプールは、機能的変種配列を同定するのに特に有用である。そのようなコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする目的は、例えば、アゴニストもしくはアンタゴニストのいずれかとして作用し得るか、またはあるいは全体として新規な活性を有するALK1ポリペプチド変種を作製することであってよい。種々のスクリーニングアッセイを以下に提供するが、そのようなアッセイを用いて変種を評価することができる。例えば、ALK1ポリペプチド変種は、ALK1リガンドに結合する能力、ALK1リガンドのALK1ポリペプチドへの結合を妨げる能力、またはALK1リガンドによって起こるシグナル伝達を妨害する能力についてスクリーニングすることができる。ALK1ポリペプチドまたはその変種の活性はまた、細胞ベースのアッセイまたはインビボアッセイ、特に実施例に開示されるアッセイのいずれかで試験することもできる。

【0075】

30 天然ALK1ポリペプチドの細胞外ドメインを含むALK1 ECDポリペプチドと比較して選択的効力または一般的に増加した効力を有する、コンビナトリアル由来変種を作製することができる。同様に、突然変異誘発により、対応する野生型ALK1 ECDポリペプチドと劇的に異なる血清半減期を有する変種を生成することができる。例えば、改変タンパク質は、タンパク質分解、または天然ALK1 ECDポリペプチドを破壊するかまたは別の方法で除去もしくは不活性化する他の過程に対して、安定性を高めるかまたは下げることができる。そのような変種およびそれらをコードする遺伝子を利用して、ALK1ポリペプチドの半減期を調節することによって、ALK1 ECDポリペプチドレベルを変更することができる。例えば、短い半減期は、より一時的な生物学的効果をもたらすことができ、それによって、患者内の組換えALK1 ECDポリペプチドレベルをより厳密に制御することができる。Fc融合タンパク質では、リンカー（存在する場合）および/またはFc部分を変異させて、そのタンパク質の半減期を変更することができる。

【0076】

40 それぞれが潜在的ALK1ポリペプチド配列の少なくとも一部を含むポリペプチドのライブラリーをコードする遺伝子の縮重ライブラリーにより、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、潜在的ALK1ポリペプチドヌクレオチド配列の縮重セットが個々のポリペプチドとして、またはあるいはより大きな融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイ用に）発現され得るよう、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列へと酵素的に連結することができる。

【0077】

潜在的ALK1 ECD変種のライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製することができる、多くの方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成機で行い、次

いでこの合成遺伝子を発現用の適切なベクターに連結することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で周知である（例えば、Narang, SA *Tetrahedron* 1983;39:3; Itakura et al., *Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules*, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp273-289; Itakura et al., (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 1981; 53:323; Itakura et al., (1984) *Science* 1984;198:1056; Ike et al., *Nucleic Acid Res.* 1983;1983; 11:477を参照されたい）。他のタンパク質の定方向進化に、このような技法が使用されている（例えば、Scott et al., 1990;249:386-390; Roberts et al., (1992) *PNAS USA* 89:2429-2433; Devlin et al.,; *Science* 1990;249: 404-406; Cwirla et al., (1990) *PNAS USA* 87: 6378-6382；ならびに米国特許第5,223,409号、第5,198,346号、および第5,096,815号を参照されたい）。

10

【0078】

あるいは、他の形態の突然変異誘発を利用して、コンビナトリアルライブラリーを作製することができる。例えば、例としてアラニンスキャン突然変異誘発などを用いて（Ruf et al., *Biochemistry* 1994; 33:1565-1572; Wang et al., *J. Biol. Chem.* 1994; 269:3095-3099; Balint et al., *Gene* 1993; 137:109-118; Grodberg et al., (1993) *Eur. J. Biochem.* 218:597-601; Nagashima et al., *J. Biol. Chem.* 1993; 268:2888-2892; Lowman et al., *Biochemistry* 1991;30:10832-10838；およびCunningham et al., (1989) *Science* 244:1081-1085）、リンカースキャン突然変異誘発により（Gustin et al., *Virology* 1993;193:653-660; Brown et al., *Mol. Cell Biol.* 1992; 12:2644-2652; McKnight et al., *Science* 1982; 232:316）；飽和突然変異誘発により（Meyers et al., *Science* 1986; 232:613）；PCR突然変異誘発により（Leung et al., *Method Cell Mol. Biol.*, 1989; 1:11-19）；または化学的突然変異誘発などを含むランダム突然変異誘発により（Miller et al., (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY；およびGreener et al., *Strategies in Mol Biol* 1994;7:32-34）、ALK1ポリペプチド変種を作製し、スクリーニングによりライブラリーから単離することができる。特に組み合わせ設定におけるリンカースキャン突然変異誘発は、切断（生理活性）型のALK1ポリペプチドを同定するための魅力的な方法である。

20

【0079】

点突然変異および切断により作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、およびさらには特定の性質を有する遺伝子産物に関してcDNAライブラリーをスクリーニングするための幅広い技法が当技術分野で公知である。このような技法は、一般に、ALK1ポリペプチドのコンビナトリアル突然変異誘発によって作製された遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適応できる。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするために最も広く用いられている技法は、典型的に、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および、所望の活性を検出すれば検出された産物の遺伝子をコードするベクターを比較的容易に単離できるような条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。好ましいアッセイには、ALK1リガンド結合アッセイおよびリガンド媒介性細胞シグナル伝達アッセイが含まれる。

30

【0080】

ある態様において、ALK1 ECDポリペプチドは、ALK1ポリペプチド中に天然に存在する翻訳後修飾に加えて、翻訳後修飾をさらに含み得る。そのような修飾には、アセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化が含まれるが、これらに限定されない。結果として、修飾ALK1 ECDポリペプチドは、ポリエチレングリコール、脂質、多糖または单糖、およびリン酸などの非アミノ酸要素を含み得る。そのような非アミノ酸要素がALK1 ECDポリペプチドの機能性に及ぼす効果は、他のALK1 ECDポリペプチド変種について本明細書に記載されるように試験することができる。ALK1 ECDポリペプチドが、細胞内で新生型のALK1ポリペプチドの切断によって產生される場合、翻訳後プロセシングはまた、そのタンパク質の正確な折りたたみおよび／または機能にも重要であり得る。異なる細胞（CHO、HeLa、MDCK、293、WI38、NIH-3T3、またはHEK293など）は、特定の

40

50

細胞機構およびそのような翻訳後活性のための特徴的な機構を有し、ALK1ポリペプチドの正確な修飾およびプロセシングを確実にするよう選択することができる。

【0081】

ある局面において、ALK1 ECDポリペプチドの機能的変種または改変型は、ALK1 ECDポリペプチドの少なくとも一部および1つまたは複数の融合ドメインを有する融合タンパク質を含む。このような融合ドメインの周知の例には、ポリヒスチジン、Glu-Glu、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、チオレドキシン、プロテインA、プロテインG、免疫グロブリン重鎖定常領域(Fc)、マルトース結合タンパク質(MBP)、またはヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。融合ドメインは、所望の特性を付与するよう選択することができる。例えば、いくつかの融合ドメインは、アフィニティーコロマトグラフィーによる融合タンパク質の単離に特に有用である。アフィニティー精製を目的とする場合には、グルタチオン、アミラーゼ、およびニッケルまたはコバルト結合樹脂などの、アフィニティーコロマトグラフィーのための関連した充填剤を使用する。このような充填剤の多くは「キット」の形態で入手することができ、例えば、Pharmacia GST精製システム、および(HIS₆)融合パートナーと共に使用して有用であるQIAexpress(商標)システム(Qiagen)などがある。

10

【0082】

別の例として、融合ドメインは、ALK1 ECDポリペプチドの検出が容易になるよう選択することができる。そのような検出ドメインの例には、様々な蛍光タンパク質(例えば、GFP)、ならびに特異的抗体が入手可能な、通常短いペプチド配列である「エピトープタグ」が含まれる。特異的モノクローナル抗体が容易に入手可能な周知のエピトープタグには、FLAG、インフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)、およびc-mycタグが含まれる。場合によっては、融合ドメインは、関連プロテアーゼが融合タンパク質を部分消化し、それによってそこから組換えタンパク質を遊離させることを可能にする、第Xa因子またはトロンビンなどのプロテアーゼ切断部位を有する。次いで、遊離したタンパク質を、その後のクロマトグラフィー分離により融合ドメインから単離することができる。ある好ましい態様では、ALK1 ECDポリペプチドを、インビボでALK1ポリペプチドを安定化するドメイン(「安定化」ドメイン)と融合させる。「安定化」とは、これが破壊の減少によるのか、腎臓によるクリアランスの減少によるのか、または他の薬物動態学的効果によるのかにかかわらず、血清半減期を延長させるいかなるものも意味する。免疫グロブリンのFc部分との融合は、広範なタンパク質に対して所望の薬物動態学的特性を付与することが知られている。同様に、ヒト血清アルブミンとの融合も所望の特性を付与し得る。選択され得る他の種類の融合ドメインには、多量体化(例えば、二量体化、四量体化)ドメインおよび機能的ドメインが含まれる。

20

【0083】

具体例として、本開示は、Fcドメインに融合されたALK1の可溶性細胞外ドメインを含む融合タンパク質を提供する(例えば、SEQ ID NO:6)。

30

THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD(A)VSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK(A)VSNKALPVPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGPFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN(A)HYTQKSLSLSPGK*

40

【0084】

任意に、Fcドメインは、Asp-265、リジン322、およびAsn-434などの残基において1つまたは複数の変異を有する。ある場合において、これらの変異うちの1つまたは複数(例えば、Asp-265変異)を有する変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比較して、Fc受容体に結合する能力が低い。その他の場合において、これらの変異のうちの1つまたは複数(例えば、Asn-434変異)を有する変異体Fcドメインは、野生型Fcドメインと比較して、MHCクラスI関連Fc受容体(FcRN)に結合する能力が高い。

50

【0085】

融合タンパク質の異なる要素は、所望の機能性と一致する任意の様式で配置できることが理解される。例えば、ALK1 ECDポリペプチドを異種ドメインのC末端側に配置してもよいし、またはあるいは異種ドメインをALK1 ECDポリペプチドのC末端側に配置してもよい。ALK1 ECDポリペプチドドメインと異種ドメインは融合タンパク質内で隣接する必要はなく、付加的なドメインまたはアミノ酸配列を、いずれかのドメインのC末端側もしくはN末端側に、またはそれらのドメインの間に含めることも可能である。

【0086】

本明細書で用いられる場合、「免疫グロブリンFc領域」または単に「Fc」という用語は、免疫グロブリン鎖定常領域、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシル末端部分、またはその一部を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、1) CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、2) CH1ドメインおよびCH2ドメイン、3) CH1ドメインおよびCH3ドメイン、4) CH2ドメインおよびCH3ドメイン、または5) 2つもしくはそれ以上のドメインと免疫グロブリンヒンジ領域の組み合わせを含み得る。好ましい態様において、免疫グロブリンFc領域は、少なくとも免疫グロブリンヒンジ領域、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含み、好ましくはCH1ドメインを欠いている。

10

【0087】

1つの態様において、重鎖定常領域が由来する免疫グロブリンのクラスは、IgG(IgG₁)(サブクラス1、2、3、または4)である。免疫グロブリンの他のクラス、IgA(IgA₁)、IgD(IgD₁)、IgE(IgE₁)、およびIgM(IgM₁)も使用することができる。適切な免疫グロブリン重鎖定常領域の選択は、米国特許第5,541,087号および第5,726,044号に詳細に考察されている。特定の結果を達成するための、ある免疫グロブリンクラスおよびサブクラスからの特定の免疫グロブリン重鎖定常領域配列の選択は、当業者のレベルの範囲内であると見なされる。免疫グロブリンFc領域をコードするDNA構築物の部分は、ヒンジドメインの少なくとも一部、および好ましくはFcのCH₃ドメイン、またはIgA、IgD、IgE、もしくはIgMのうちのいずれかにおける相同ドメインの少なくとも一部を含むことが好ましい。

20

【0088】

さらに、免疫グロブリン重鎖定常領域内のアミノ酸の置換または欠失が、本明細書に開示される方法の実施および組成物で有用であり得ることが意図される。一例は、CH2領域の上部にアミノ酸置換を導入して、Fc受容体に対する親和性が減少したFc変種を作出することである(Cole et al., (1997) J. Immunol. 159:3613)。

30

【0089】

ある態様において、本開示は、他のタンパク質および/または他のALK1 ECDポリペプチド種から単離されるか、またはさもなくばこれらを実質的に含まない(例えば、少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%含まない)、単離型および/または精製型のALK1 ECDポリペプチドを利用可能にする。ALK1 ECDポリペプチドは、一般に、組換え核酸からの発現によって產生される。

【0090】

ある態様において、本開示は、ALK1タンパク質の細胞外部分のコード配列を含む可溶性ALK1ポリペプチドをコードする核酸を含む。さらなる態様において、本開示はまた、そのような核酸を含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であつてよい。例えば、本開示のポリペプチドは、大腸菌(*E. coli*)などの細菌細胞、昆虫細胞(例えば、バキュロウイルス発現系を使用する)、酵母、または哺乳動物細胞中で発現させることができる。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。したがって、本開示のいくつかの態様はさらに、ALK1 ECDポリペプチドを生成する方法に関する。本明細書において実証されるように、SEQ ID NO:14に記載され、かつCHO細胞中で発現されたALK1-Fc融合タンパク質は、強力な抗血管新生活性を有する。

40

【0091】

3. ALK1ポリペプチドをコードする核酸

ある局面において、本開示は、本明細書で開示される断片、機能的変種、および融合タ

50

ンパク質をはじめとするALK1ポリペプチド（例えば、ALK1 ECDポリペプチド）のいずれかをコードする単離および／または組換え核酸を提供する。例えば、SEQ ID NO:2は天然ヒトALK1前駆体ポリペプチドをコードし、SEQ ID NO:4は、IgG1 Fcドメインに融合されたALK1細胞外ドメインの前駆体をコードする。本核酸は、一本鎖または二本鎖であってよい。そのような核酸は、DNA分子またはRNA分子であってよい。これらの核酸は、例えば、ALK1ポリペプチドを作製する方法において、または直接的な治療物質として（例えば、アンチセンス、RNAi、または遺伝子治療アプローチにおいて）使用することができる。

【0092】

ある局面において、ALK1ポリペプチドをコードする本核酸は、SEQ ID NO:2または4の変種である核酸を含むことがさらに理解される。変種ヌクレオチド配列は、例えば対立遺伝子変種のような、1つまたは複数のヌクレオチド置換、付加、または欠失によって異なる配列を含む。

【0093】

ある態様において、本開示は、SEQ ID NO:2または4と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である単離または組換え核酸配列を提供する。当業者は、SEQ ID NO:2または4と相補的な核酸配列およびSEQ ID NO:2または4の変種もまた、本開示の範囲内に入ることを認識するであろう。さらなる態様において、本開示の核酸配列は、単離されても、組換えであっても、および／もしくは異種核酸配列と融合されても、またはDNAライブライアリー中に存在してもよい。

【0094】

他の態様において、本開示の核酸はまた、SEQ ID NO:2もしくは4に示されるヌクレオチド配列に高ストリンジエント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列、SEQ ID NO:2もしくは4の相補配列、またはそれらの断片を含む。上記のように、当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシー条件を変更できることを容易に理解するであろう。当業者は、DNAハイブリダイゼーションを促進する適切なストリンジエンシー条件を変更できることを容易に理解するであろう。例えば、約45 にて $6.0 \times$ 塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム(SSC)でハイブリダイゼーションを行い、その後50 にて $2.0 \times$ SSCで洗浄を行うことができる。例えば、洗浄段階の塩濃度は、50 における約 $2.0 \times$ SSCという低ストリンジエンシーから、50 における約 $0.2 \times$ SSCという高ストリンジエンシーまでから選択することができる。加えて、洗浄段階の温度は、室温、約22 における低ストリンジエンシー条件から、約65 における高ストリンジエンシー条件まで上げることができる。温度および塩の両方を変更することも可能であるし、またはその他の変数を変更して、温度または塩濃度を一定に維持してもよい。1つの態様において、本開示は、室温における $6 \times$ SSCおよびその後の室温における $2 \times$ SSCでの洗浄という低ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする核酸を提供する。

【0095】

遺伝暗号の縮重により、SEQ ID NO:2または4に記載の核酸とは異なる単離された核酸もまた、本開示の範囲内である。例えば、多くのアミノ酸は2種以上のトリプレットにより指定される。同じアミノ酸を特定するコドン、または同義コドン（例えば、CAUおよびCACはヒスチジンに関して同義コドンである）は、タンパク質のアミノ酸配列に影響しない「サイレント」変異を生じ得る。しかしながら、本タンパク質のアミノ酸配列に変化をもたらすDNA配列多型が、哺乳動物細胞間に存在すると予測される。当業者は、特定のタンパク質をコードする核酸の1つまたは複数のヌクレオチド（ヌクレオチドの約3～5%まで）におけるこれらの変異が、自然の対立遺伝子変異に起因して、所与の種の個体間に存在し得ることを認識するであろう。ありとあらゆるそのようなヌクレオチド変異および生じるアミノ酸多型も、本開示の範囲内である。

【0096】

ある態様では、本開示の組換え核酸を、発現構築物内で1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列に機能的に連結することができる。調節ヌクレオチド配列は、一般に、発現に用いられる宿主細胞に適したものである。種々の宿主細胞に関して、多くの種類の適切な発

10

20

30

40

50

現ベクターおよび適切な調節配列が、当技術分野において公知である。典型的に、そのような1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列には、プロモーター配列、リーダー配列またはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および転写終結配列、翻訳開始配列および翻訳終結配列、ならびにエンハンサー配列またはアクチベーター配列が含まれ得るが、これらに限定されない。本開示では、当技術分野で公知である構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターが意図される。プロモーターは、天然のプロモーター、または2つ以上のプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターのいずれかであってよい。発現構築物は、細胞内でプラスミドなどのエピソーム上に存在してよく、または発現構築物を染色体中に挿入することもできる。好ましい態様において、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択マーカー遺伝子を含む。選択マーカー遺伝子は当技術分野で周知であり、用いられる宿主細胞によって異なる。

10

【0097】

本明細書で開示されるある局面において、本核酸は、ALK1 ECDポリペプチドをコードし、かつ少なくとも1つの調節配列に機能的に連結されたヌクレオチド配列を含む発現ベクターとして提供される。調節配列は当技術分野で認識されており、ALK1ポリペプチドの発現を指示するように選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、およびその他の発現制御エレメントを含む。例示的な調節配列は、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。例えば、これに機能的に連結された場合にDNA配列の発現を制御する多種多様な発現制御配列のいずれかを、これらのベクター中で使用して、ALK1ポリペプチドをコードするDNA配列を発現させることができる。そのような有用な発現制御配列には、例えば、SV40の初期および後期プロモーター、tetプロモーター、アデノウイルスまたはサイトメガロウイルスの前初期プロモーター、RSVプロモーター、lac系、trp系、TAC系またはTRC系、発現がT7 RNAポリメラーゼにより指示されるT7プロモーター、ファージ の主要なオペレーター領域およびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖系酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼのプロモーター、例えばPho5、酵母 接合因子のプロモーター、バキュロウイルス系の多核体プロモーター、および原核細胞もしくは真核細胞またはそれらのウイルスの遺伝子発現を制御することが知られている他の配列、ならびにそれらの様々な組み合わせが含まれる。発現ベクターの設計は、形質転換しようとする宿主細胞の選択、および/または発現が所望されるタンパク質の種類などの要因に依存し得ることが理解されるべきである。その上、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、およびベクターによってコードされる、抗生物質マーカーなどの任意の他のタンパク質の発現もまた考慮すべきである。

20

【0098】

本開示に含まれる組換え核酸は、クローン化遺伝子またはその一部を、原核細胞、真核細胞（酵母、トリ、昆虫、または哺乳動物）、またはその両方での発現に適したベクター中に連結することによって、産生させることができる。組換えALK1ポリペプチドを産生させるための発現媒体には、プラスミドおよび他のベクターが含まれる。例えば、適切なベクターには、大腸菌などの原核細胞における発現用の以下の種類のプラスミドが含まれる：pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、およびpUC由来プラスミド。

30

【0099】

いくつかの哺乳動物発現ベクターは、細菌中でのベクターの増殖を容易にするための原核生物配列、および真核細胞中で発現される1つまたは複数の真核生物転写単位の両方を含む。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRc/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pko-neo、およびpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに適した哺乳動物発現ベクターの例である。これらベクターのいくつかは、原核細胞および真核細胞の両方における複製および薬物耐性選択を容易にするために、pBR322などの細菌プラスミド由来の配列を用いて修飾される。あるいは、ウシパピローマウイルス(BPV

40

50

-1) またはエプスタイン・バーウイルス (pHEBo、pREP由来、およびp205) などのウイルスの派生物を、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現に使用することができる。他のウイルス (レトロウイルスを含む) 発現系の例は、下記の遺伝子治療送達系の説明において見出すことができる。プラスミドの調製および宿主生物の形質転換で用いられる様々な方法が、当技術分野で周知である。原核細胞および真核細胞の両方に適した他の発現系、ならびに一般的な組換え手順については、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) を参照されたい。場合によっては、バキュロウイルス発現系を使用して、組換えポリペプチドを発現させることができると考えられる。そのようなバキュロウイルス発現系の例には、pVL由来ベクター (pVL1392、pVL1393、およびpVL941など)、pAcUW由来ベクター (pAcUW1など)、およびpBlueBac由来ベクター (-gal含有pBlueBac IIIなど) が含まれる。

10

【0100】

好ましい態様において、Pcmv-Scriptベクター (Stratagene, La Jolla, Calif.)、pcDNA4ベクター (Invitrogen, Carlsbad, Calif.)、およびpCI-neoベクター (Promega, Madison, Wisc.) などのベクターは、CHO細胞において本ALK1ポリペプチドが産生されるように設計される。明らかなように、本遺伝子構築物を用いて、例えば精製を目的として融合タンパク質または変種タンパク質をはじめとするタンパク質を産生させるために、培養で増殖させた細胞中で本ALK1ポリペプチドを発現させることができる。

20

【0101】

本開示はまた、本ALK1 ACDポリペプチドの1つまたは複数のコード配列 (例えば、SEQ ID NO:2または4) を含む組換え遺伝子をトランスフェクトされた宿主細胞に関する。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞であってよい。例えば、本明細書に開示されるALK1ポリペプチドは、大腸菌などの細菌細胞、昆虫細胞 (例えば、バキュロウイルス発現系を使用する)、酵母、または哺乳動物細胞中で発現させることができる。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0102】

したがって、本開示はさらに、ALK1 ECDポリペプチドをはじめとする本ALK1ポリペプチドを生成する方法に関する。例えば、ALK1ポリペプチドをコードする発現ベクターをトランスフェクトされた宿主細胞を、ALK1ポリペプチドの発現を起こし得るのに適した条件下で培養することができる。ALK1ポリペプチドを分泌させ、細胞とALK1ポリペプチドを含む培地との混合物から単離することができる。あるいは、ALK1ポリペプチドを細胞質中または膜画分中に保持し、細胞を回収し、溶解して、タンパク質を単離することもできる。細胞培養物は、宿主細胞、培地、および他の副産物を含む。細胞培養に適した培地は、当技術分野で周知である。

30

【0103】

本ALK1ポリペプチドは、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、ALK1ポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体による免疫アフィニティー精製、およびALK1ポリペプチドに融合されているドメインに結合する作用物質によるアフィニティー精製 (例えば、プロテインAカラムを用いて、ALK1-Fc融合物を精製することができる) をはじめとする、タンパク質を精製するための当技術分野で公知の技法を用いて、細胞培養液、宿主細胞、またはその両方から単離することができる。好ましい態様において、ALK1ポリペプチドは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質である。好ましい態様において、精製は、例えば以下のうちの3つまたはそれ以上を任意の順番で含む一連のカラムクロマトグラフィー段階により達成される: プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および陽イオン交換クロマトグラフィー。ウイルス濾過および緩衝液交換により、精製を完了することができる。

40

【0104】

別の態様においては、組換えALK1ポリペプチドの所望の部分のN末端における、ポリ-(H

50

is) / エンテロキナーゼ切断部位配列などの精製リーダー配列をコードする融合遺伝子によって、 Ni^{2+} 金属樹脂を用いたアフィニティクロマトグラフィーによる、発現された融合タンパク質の精製が可能になる。その後、エンテロキナーゼによる処理により精製リーダー配列を除去して、精製ALK1ポリペプチドを提供することができる（例えば、Hochuli et al., (1987) *J. Chromatography* 411:177；およびJarknecht et al., *PNAS USA* 88:8972を参照されたい）。

【0105】

融合遺伝子を作製する技法は周知である。本質的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々なDNA断片の結合は、連結のための平滑末端またはねじれ末端(stagger-ended termini)、適切な末端をもたらすための制限酵素消化、必要に応じた付着末端の充填、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素による連結を使用する、従来の技法に従って行われる。別の態様では、融合遺伝子を、自動DNA合成機を含む従来の技法によって合成することができる。あるいは、2つの連続した遺伝子断片の間に相補的なオーバーハングを生じるアンカーブライマーを用いて遺伝子断片のPCR増幅を行うことができ、その後アニーリングさせて、キメラ遺伝子配列を作製することもできる（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992を参照されたい）。

【0106】

ALK1、BMP9、BMP10、GDF5、GDF6、またはGDF7のアンタゴニストである核酸化合物のカテゴリーの例には、アンチセンス核酸、RNAi構築物、および触媒核酸構築物が含まれる。核酸化合物は、一本鎖または二本鎖であってよい。二本鎖化合物はまたオーバーハングまたは非相補性の領域を含んでもよく、そこでは鎖の一方または他方は一本鎖である。一本鎖化合物は自己相補性領域を含んでもよく、このことは、該化合物が、二重らせん構造の領域を有して、いわゆる「ヘアピン」または「ステム - ループ」構造を形成することを意味する。核酸化合物は、全長ALK1核酸配列またはリガンド核酸配列の1000ヌクレオチド以下、500ヌクレオチド以下、250ヌクレオチド以下、100ヌクレオチド以下、または50、35、30、25、22、20、もしくは18ヌクレオチド以下からなる領域に相補的なヌクレオチド配列を含み得る。相補性の領域は、好ましくは少なくとも8ヌクレオチド、および任意に少なくとも10ヌクレオチドまたは少なくとも15ヌクレオチド、および任意に15～25ヌクレオチドである。相補性の領域は、標的転写物のイントロン、コード配列、または非コード配列、例えばコード配列部分などの範囲内にあってよい。一般に、核酸化合物は約8～約500ヌクレオチド長または塩基対長の長さを有し、任意にその長さは約14～約50ヌクレオチドである。核酸は、DNA（特に、アンチセンスとして使用するため）、RNA、またはRNA:DNAハイブリッドであってよい。いずれかの1本鎖は、DNAとRNAとの混合物、およびDNAまたはRNAのいずれかとして容易に分類できない修飾形態を含み得る。同様に、二本鎖化合物はDNA:DNA、DNA:RNA、またはRNA:RNAであってよく、かついずれかの1本鎖はまた、DNAとRNAとの混合物、およびDNAまたはRNAのいずれかとして容易に分類できない修飾形態を含み得る。核酸化合物は、骨格（ヌクレオチド間結合を含む、天然核酸中の糖 - リン酸部分）または塩基部分（天然核酸のプリンまたはピリミジン部分）に対する1つまたは修飾をはじめとする、種々の修飾のいずれかを含み得る。アンチセンス核酸化合物は、好ましくは約15～約30ヌクレオチドの長さを有し、多くの場合に、血清中、細胞中、または経口送達化合物の場合の胃および吸入化合物の場合の肺など、該化合物が送達される可能性が高い場所での安定性などの特徴を改善するための1つまたは複数の修飾を含む。RNAi構築物の場合、標的転写物に相補的な鎖は、一般にRNAまたはその修飾物である。他方の鎖は、RNA、DNA、または任意の他の変化形であってよい。二本鎖RNAi構築物または一本鎖「ヘアピン」RNAi構築物の二重鎖部分は、ダイサー基質としての機能を果たす限り、好ましくは18～40ヌクレオチド長、および任意に約21～23ヌクレオチド長の長さを有する。触媒核酸または酵素核酸はリボザイムまたはDNA酵素であってよく、修飾形態もまた含み得る。核酸化合物は、生理学的条件下で、かつ非センスまたはセンス対照がほとんど影響を及ぼさない濃度で細胞と接触した場合、標的の発現を約50%、75%、90%、またはそれ以上阻害し得る。

10

20

30

40

50

核酸化合物の効果を試験するための好ましい濃度は、1、5、および10マイクロモルである。核酸化合物はまた、例えば血管新生に及ぼす効果について試験することもできる。

【0107】

4. 抗体

本開示の別の局面は、ALK1ポリペプチドの細胞外部分と反応する抗体、好ましくはALK1ポリペプチドと特異的に反応する抗体に関する。好ましい態様において、そのような抗体は、GDF5、GDF6、GDF7、BMP-9、またはBMP-10などのリガンドへのALK1結合を妨害し得る

ALK1のリガンドに対する抗体は、成熟したプロセシングされた形態の関連タンパク質に結合すべきであることが理解されるであろう。本開示はまた、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、および／またはBMP10に結合し、そのようなリガンドへのALK1結合を阻害する抗体を提供する。好ましい抗体は、CAMアッセイまたは角膜マイクロポケットアッセイ（上記参照）などのバイオアッセイにおいて、抗血管新生活性を示す。好ましい抗BMP9抗体を、以下の実施例10に記載する。ある態様において、BMP9およびBMP10の両方を阻害する抗体が望ましいと考えられる；そのような抗体は、ALK1結合アッセイ、血管新生アッセイ（例えば、HUVEC管形成アッセイ、CAMアッセイ、マトリケルアッセイ、または本明細書に記載される他のそのようなアッセイ）において両リガンドを阻害し得る。

【0108】

本明細書で用いられる「抗体」という用語は、例えば任意のアイソタイプ（IgG、IgA、IgM、IgE等）の全抗体を含むことが意図され、選択された抗原と反応する免疫グロブリンの断片またはドメインも含む。従来技法を用いて抗体を断片化し、その断片を有用性および／または関心対象の特異的エピトープとの相互作用についてスクリーニングすることができる。したがって、この用語は、あるタンパク質と選択的に反応し得る、タンパク質分解により切断された、または組換えによって調製された抗体分子の部分のセグメントを含む。このようなタンパク質分解断片および／または組換え断片の非限定的な例には、Fab、F(ab')2、Fab'、Fv、ならびにペプチドリンカーによって結合しているV[L]ドメインおよび／またはV[H]ドメインを含む一本鎖抗体(scFv)が含まれる。scFvを共有結合または非共有結合して、2つまたはそれ以上の結合部位を有する抗体を形成することができる。抗体という用語はまた、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または抗体の他の精製調製物および組換え抗体を含む。「組換え抗体」という用語は、ヒト化抗体、または一本鎖抗体から開発された完全ヒト抗体などの、分子生物学の技法を用いて構築された核酸から発現される抗体または免疫グロブリンの抗原結合ドメインを意味する。單ードメイン抗体および一本鎖抗体もまた、「組換え抗体」という用語に含まれる。

【0109】

抗体は、動物への抗原の投与、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有する動物への抗原の投与、または抗体（しばしば、一本鎖抗体または抗体ドメイン）のライブラリーに対する抗原を使用したスクリーニングを含む、当技術分野で公知の様々な方法のいずれかによって生成することができる。抗原結合活性が検出されたならば、タンパク質の関連部分を、全長IgGフレームワークをはじめとする他の抗体フレームワークに移植することができる。例えば、ALK1ポリペプチドまたはALK1リガンド由来の免疫原（例えば、BMP9もしくはBMP10、またはBMP9およびBMP10の両方に共通する免疫原）を使用して、標準的プロトコールにより、抗タンパク質／抗ペプチド抗血清またはモノクローナル抗体を作製することができる（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual ed. by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)を参照されたい）。図19に示されるように、BMP9とBMP10はかなりのアミノ酸同一性を有し、したがって各タンパク質を免疫原として使用して、BMP9およびBMP10の両方と交差反応し得る抗体を生成することができる。高度に類似している配列の断片を、免疫原として使用することもできる。マウス、ハムスター、またはウサギなどの哺乳動物を、ペプチドの免疫原性形態（例えば、ALK1ポリペプチドもしくは抗体応答を誘発し得る抗原性断片、または融合タンパク質）で免疫化することができる。タンパク質またはペプチドに免疫原性を付与する技法には、担体への複合化、または当技術分野で周知の他の技法が含まれる。ALK1ポリペプチドの免疫原性部分（好ましくは、細胞外部分）、ま

10

20

30

40

50

たはBMP9もしくはBMP10などのALK1リガンドの免疫原性部分を、アジュバントの存在下で投与することができる。免疫化の進行は、血漿または血清中の抗体価の検出によってモニターすることができる。前記免疫原を抗体のレベルを評価するための抗原として用いて、標準的なELISAまたは他の免疫アッセイを使用することができる。

【0110】

ALK1ポリペプチドまたはリガンドポリペプチド（例えば、BMP9またはBMP10）の抗原性調製物で動物を免疫化した後、抗ALK1または抗リガンド抗血清を得ることができ、必要に応じて、血清からポリクローナル抗体を単離することができる。モノクローナル抗体を作製するには、免疫化動物から抗体産生細胞（リンパ球）を回収し、標準的な体細胞融合手順により骨髄腫細胞などの不死化細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を創出することができる。このような技法は当技術分野で周知であり、これには、例えば、ハイブリドーマ技法（Kohler and Milstein, *Nature*, 1975;256: 495-497により最初に開発された）、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozbar et al., *Immunology Today*, (1983;4:72、およびヒトモノクローナル抗体を作製するためのEBV ハイブリドーマ技法（Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96）が含まれる。ハイブリドーマ細胞を、本開示の哺乳動物ALK1ポリペプチドまたはBMP9もしくはBMP10などのリガンドと特異的に反応する抗体の産生について免疫化学的にスクリーニングすることができ、このようなハイブリドーマ細胞を含む培養物からモノクローナル抗体を単離することができる。BMP9およびBMP10の両方に対する特異性を有する抗体は、BMP9またはBMP10のいずれかを単独で接種した動物から得られたハイブリドーマから選択することができる。

10

20

30

40

50

【0111】

本明細書で用いられる抗体という用語は、本ALK1ポリペプチドもしくはALK1リガンドポリペプチドの1つ、または標的抗原の組み合わせ（例えば、BMP9およびBMP10）とやはり特異的に反応するその断片を含むことが意図される。従来技法を用いて抗体を断片化し、それらの断片を、全抗体について上記したのと同様の様式で有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、 $F(ab)_2$ 断片は、抗体をペプシンで処理することにより生成することができる。得られた $F(ab)_2$ 断片をジスルフィド架橋を還元するように処理して、 $F(ab)_1$ 断片を生成することができる。本開示の抗体は、抗体の少なくとも1つのCDR領域によって付与されるALK1ポリペプチドに対する親和性を有する、二重特異性分子、一本鎖分子、ならびにキメラ分子およびヒト化分子を含むことがさらに意図される。好ましい態様において、抗体は、これに結合されて検出され得る標識（例えば、標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であってよい）をさらに含む。

【0112】

ある好ましい態様において、本開示の抗体は、組換え抗体、特にヒト化モノクローナル抗体または完全ヒト組換え抗体である。

【0113】

抗体に関して用いられる場合の「に特異的に反応する」という形容詞は、当技術分野で一般的に理解されているように、抗体が、関心対象の抗原（例えば、ALK1ポリペプチドまたはALK1リガンド）と関心対象ではない他の抗原との間で十分に選択的であること、抗体が、少なくとも、特定の種類の生体試料中の関心対象の抗原の存在の検出に有用であることを意味することが意図される。この抗体を使用するある方法においては、より高度の結合特異性が望ましいと考えられる。例えば、関心対象ではない、存在量が非常に多い1つまたは複数のタンパク質の存在下において、関心対象の、存在量が少ないタンパク質を検出する際に使用するための抗体は、抗体が関心対象の抗原と他の交差反応物との間でより高度の選択性を有する場合に、より良好に作用し得る。モノクローナル抗体は、一般に、（ポリクローナル抗体と比較して）所望の抗原と交差反応性ポリペプチドとを効果的に識別する傾向がより強い。加えて、あるタイプの生体試料（例えば、糞便試料）中の関心対象の抗原を選択的に同定するのに効果的な抗体は、異なる種類の生体試料（例えば、血液試料）中の同じ抗原を選択的に同定するのに、同程度に効果的でない場合がある。同様に

、他の生物混入物を欠く精製タンパク質調製物中の関心対象の抗原を同定するのに効果的な抗体は、血液試料または尿試料などの粗製生体試料中の関心対象の抗原を同定するのに、同程度に効果的でない場合がある。したがって、好ましい態様において、本願は、抗体の使用に選択される試料型である可能性が高い試料型中の関心対象の抗原に対する特異性が実証された抗体を提供する。

【0114】

抗体：抗原の相互作用の特異性に影響を及ぼす1つの特徴は、抗原に対する抗体の親和性である。所望の特異性は異なる親和性の範囲で達成され得るが、一般に好ましい抗体は、約 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、またはそれ未満の親和性（解離定数）を有する。ALK1に対するTGFの結合親和性が明らかに低いことを考えると、多くの抗ALK1抗体はTGF結合を阻害すると予測される。しかしながら、GDF5、6、7群のリガンドはおよそ 5×10^{-8} Mの K_D で結合し、BMP9、10リガンドはおよそ 1×10^{-10} Mの K_D で結合する。したがって、これらのリガンドのシグナル伝達活性を妨害するように、適切な親和性の抗体を選択することができる。

10

【0115】

加えて、所望の抗体を同定する目的で抗体をスクリーニングするために使用される技法は、得られる抗体の特性に影響を及ぼし得る。例えば、ある治療目的のために使用される抗体は、特定の細胞型を標的化し得ることが好ましい。したがって、このタイプの抗体を得るには、関心対象の抗原を発現する細胞に結合する抗体をスクリーニングすることが望ましいと考えられる（例えば、蛍光活性化細胞選別による）。同様に、例えば、抗体を溶液中の抗原と結合させるために用いるのであれば、溶液結合を試験することが望ましいと考えられる。抗体：抗原の相互作用を試験して、特定の所望の抗体を同定するためには、種々の異なる技法が利用可能である。そのような技法には、ELISA、表面プラズモン共鳴結合アッセイ（例えば、Biacore結合アッセイ、Bia-core AB, Uppsala, Sweden）、サンドイッチャッセイ（例えば、IGEN International, Inc.、Gaithersburg, Marylandの常磁性ビーズシステム）、ウエスタンプロット、免疫沈降アッセイ、および免疫組織化学が含まれる。

20

【0116】

好ましい態様において、本明細書に開示される抗体は、ヒトBMP9の成熟部分に結合する抗体であり、そのアミノ酸配列を以下に示す：

30

RS AGAGSHCQKT SLRVNFEDIG WDSWIIAPKE YEAYECKGGC FFPLADDVTP
TKHAIQTLV HLKFPTKVGK ACCVPTKLSP ISVLYKDDMG VPTLKYHYEG
MSVAECGCR (SEQ ID NO: 12)

【0117】

付加的な態様において、本明細書に開示される抗体は、ヒトBMP10の成熟部分に結合する抗体であり、そのアミノ酸配列を以下に示す：

30

NAKG NYCKRTPLYI DFKEIGWDSW IAPPGYEAY ECRGVVCNYPL
AEHLPTKHA HQALVHLKN SQKASKACCV PTKLEPISIL YLDKGVVVTYK
FKYEGMAVSE CGCR (SEQ ID NO: 13)

【0118】

加えて、ライプラリーからの選択により、BMP9またはBMP10に結合する非抗体タンパク質を生成することができる。特定のリガンドに結合するランダムペプチドおよびフレームワークベースのタンパク質を選択するために、多種多様な技術が利用可能である。一般に、有用な非抗体タンパク質を同定するためのアプローチは、BMP9および／もしくはBMP10に結合するか、または受容体（例えば、ALK1）結合もしくは細胞シグナル伝達（例えば、SMAD1/5シグナル伝達）などのBMP9もしくはBMP10活性を阻害するタンパク質をライプラリーからスクリーニングまたは選択することを含む。

40

【0119】

5. 抗体およびFc融合タンパク質における改変

本出願はさらに、操作されたFc領域または変種Fc領域を含む抗体およびALK1-Fc融合タ

50

ンパク質を提供する。そのような抗体およびFc融合タンパク質は、例えば、抗原依存性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)などのエフェクター機能の調節に有用であり得る。加えて、改変により、抗体およびFc融合タンパク質の安定性を改善することができる。抗体およびFc融合タンパク質のアミノ酸配列変種は、DNAに適切なヌクレオチド変化を導入すること、またはペプチド合成によって調製される。そのような変種は、例えば、本明細書に開示される抗体およびFc融合タンパク質のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/または該残基への挿入、および/または該残基の置換を含む。最終構築物が所望の特徴を有するという条件で、欠失、挿入、および置換を任意に組み合わせて、最終構築物に到達させる。アミノ酸変化はまた、グリコシリ化部位の数または位置の変化など、抗体およびFc融合タンパク質の翻訳後過程を変更することもできる。

10

【0120】

アミノ酸配列に変化を導入することにより、エフェクター機能が低下した抗体およびFc融合タンパク質を生成することができ、そのような変化には、Bluestone et al. に記載されているAla-Ala変異 (WO 94/28027およびWO 98/47531を参照されたい; Xu et al., 2000 Cell Immunol 200; 16-26もまた参照されたい) が含まれるが、これに限定されない。したがって、ある態様において、定常領域内にAla-Ala変異をはじめとする変異を含む本開示の抗体およびFc融合タンパク質を用いて、エフェクター機能を低下させるかまたは消失させることができる。これらの態様に従って、抗体およびFc融合タンパク質は、234位のアラニンへの変異、もしくは235位のアラニンへの変異、またはそれらの組み合わせを含み得る。1つの態様において、抗体またはFc融合タンパク質はIgG4フレームワークを含み、この場合、Ala-Ala変異は、234位のフェニルアラニンからアラニンへの変異、および/または235位のロイシンからアラニンへの変異を示す。別の態様において、抗体またはFc融合タンパク質はIgG1フレームワークを含み、この場合、Ala-Ala変異は、234位のロイシンからアラニンへの変異、および/または235位のロイシンからアラニンへの変異を示す。抗体またはFc融合タンパク質は、あるいはまたは加えて、CH2ドメイン中の点変異K322Aをはじめとする他の変異を保有し得る(Hezareh et al., 2001; J. Virol. 75: 12161-8)。

20

【0121】

特定の態様において、抗体またはFc融合タンパク質は、補体依存性細胞傷害(CDC)を増強または阻害するために改変される。CDC活性の調節は、Fc領域に1つまたは複数のアミノ酸の置換、挿入、または欠失を導入することによって達成することができる(例えば、米国特許第6,194,551号を参照されたい)。あるいはまたは加えて、システイン残基をFc領域に導入してもよく、それによりこの領域における鎖間ジスルフィド結合形成が可能になる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、改善されたもしくは低下した内部移行能、および/または増加したもしくは減少した補体媒介性細胞死滅を有し得る。Caron et al.; J. Exp Med. 1992; 176:1191-1195、およびShopes, B. (1992); J. Immunol. 148: 2918-2922、W099/51642、Duncan & Winter Natureb, 1988; 322: 738-40; 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; ならびにWO94/29351を参照されたい。

30

【0122】

6. 腎細胞癌を治療するため、血管新生を調節するため、および他の障害を治療するための方法および組成物

40

本開示は、ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、またはGDF5、GDF6、GDF7、BMP9、BMP10、もしくはALK1のECDに対する抗体などの本明細書に開示される抗体、または以下まとめて「治療薬」もしくは「ALK1アンタゴニスト」と称される上記のいずれかの核酸アンタゴニスト(例えば、アンチセンスまたはsiRNA)の有効量を哺乳動物に投与することにより、哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を提供する。これらの治療薬は、単一の薬剤として、または他のRCC治療薬と組み合わせて、腎細胞癌を治療するのに有用であると予測される。

【0123】

特に、本開示のポリペプチド治療薬は、RCCの治療における治療薬として特に魅力的と

50

なるいくつかの特性を有する。例えば、大部分の生物学的薬剤とは異なり、ALK1 ECDポリペプチドは、腫瘍の成長、増殖、および腫瘍血管新生を促進し維持する複数の因子を調節することによって腎細胞成長に影響を及ぼす。癌が、例えば、腫瘍の成長、増殖、血管新生、および転移を駆動する複数の異なるシグナル伝達経路と関連した変異を頻繁に有する場合、これは癌と高度に関連性がある。したがって、本明細書に開示される治療薬は、単一の血管新生因子を標的化する薬物（例えば、VEGFを標的化するベバシズマブ）による治療に抵抗性である腎細胞癌などの腫瘍の治療に特に効果的であり、それと同時に、活性化内皮細胞上に選択的に発現され、腫瘍血管新生および細胞増殖を駆動するBMP9、VEGF、およびFGFなどの複数の因子に対するこれらの細胞の反応を制御する上で有益な役割を果たすと考えられるALK1の活性を遮断する可能性を提供する。

10

【0124】

本明細書で実証されるように、ALK1-Fc融合タンパク質は、ヒトRCC異種移植モデルにおいてインビボの腫瘍の腫瘍成長を減少させるのに効果的である。したがって、ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、および本明細書で開示される他の治療薬は、腎細胞癌を治療するための単独の（すなわち、単剤の）治療法において有用であると予測される。加えて、本明細書でさらに開示されるように、ALK1-Fc融合タンパク質は、試験されたヒトRCC異種移植モデルのそれぞれにおいて、進行性RCCの現在の標準治療であるスニチニブの腫瘍成長阻害活性を有意に増加させる。したがって、ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、および本明細書で開示される他の治療薬は、腎細胞癌を治療するための受容体チロシンキナーゼ阻害剤などの他の薬剤との併用療法において有用であると予測される。

20

【0125】

本明細書で用いられる場合、「治療する」または「治療」という用語は、哺乳動物（例えば、ヒト）、対象、細胞、組織、器官、または生体液に対する外因性治療薬、診断薬、または組成物の接触または投与を指し、例えば、治療方法、薬物動態学的方法、診断方法、研究方法、および実験方法を指し得る。「治療すること」または「治療」は、疾患、病態、もしくは障害の症状、合併症、もしくは生化学的兆候の発症を予防するかまたは遅延させる、その疾患、病態、もしくは障害の症状を軽減するか、またはさらなる進行を停止させるかもしくは阻害するための、ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または他のALKアンタゴニストの投与を含む。治療は、予防的（疾患の発症を予防するかもしくは遅延させる、またはその臨床的もしくは準臨床的症状の発現を予防するため）であってよく、または疾患、病態、もしくは障害の発現後の症状の治療的抑制もしくは軽減であってもよい。治療は、単独の、または1つもしくは複数の付加的な治療薬と組み合わせたALK1 ECDポリペプチド（例えば、ALK1-Fc融合タンパク質）または他のALK1アンタゴニストで行うことができる。本明細書で用いられる場合、「哺乳動物」または「対象」という用語は、哺乳動物（ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ウシ、イヌ、ネコ、ラット、およびマウスなどの非靈長類を含むがこれらに限定されない）、より具体的には靈長類（サル、類人猿、およびヒトを含むがこれらに限定されない）、およびさらにより具体的にはヒトを指す。

30

【0126】

本明細書で用いられる場合、（例えば、治療のためなどの）「有効な量」または「有効量」という用語は、任意の臨床的に測定可能な程度まで症状もしくは影響の退行を誘導することによるか、またはその進行を阻害することによるかにかかわらず、治療された対象または集団において1つまたは複数の疾患症状または影響を軽減するなど、所望の効果を達成するのに十分である、治療薬、例えばALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチドの量を指す。任意の特定の疾患症状もしくは影響を軽減する（「治療有効量」とも称される）、または特定の疾患症状もしくは影響を予防する（「予防有効量」とも称される）のに効果的である治療薬の量は、疾患状態、患者の年齢および体重、ならびに患者において所望の応答を誘発する薬物の能力などの要因に応じて変動し得る。疾患症状または影響が軽減されているかどうかは、その症状または影響の重症度または進行状態を評価す

40

50

るために（例えば、医療提供者または実験臨床医により）典型的に使用される任意の臨床測定によって評価することができる。

【0127】

本明細書で用いられる場合、頭字語「RTKI」という用語は、VEGFR1、VEGFR2、またはVEGFR3に結合し、そのシグナル伝達を阻害する小分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤を指す。RTKIは、VEGFRに加えて、PDGFRa、PDGFRb、RET、およびc-Metなどの受容体チロシンキナーゼに結合し、これを阻害し得る。同様に、RTKIは、異なるクラスのキナーゼ、ならびにセリンキナーゼであるB-rafキナーゼおよびc-rafキナーゼなどの、細胞表面受容体ではないキナーゼを阻害し得る。

【0128】

したがって、1つの局面において、本開示は、腎細胞癌(RCC)を有する哺乳動物に、RTKI、およびALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または本明細書で開示される他のALKアンタゴニストの有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法に関する。1つの局面において、ALKアンタゴニストは、(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；(c) ヒトBMP9に結合する抗体；および(d) ヒトBMP10に結合する抗体より選択される薬剤である。いくつかの局面において、本方法に従って用いられるALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をさらに含み、付加的な局面において、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。他の局面において、ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0129】

付加的な局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を包含する。特定の態様において、医学的手技は、腎保存手術、腎摘出術、腎全摘除術、および組織焼灼より選択される。さらなる局面において、治療は、医学的手技後の1、2、3、4、5、6、または1ヶ月以内に哺乳動物に施行される。

【0130】

いくつかの局面において、本開示の方法に従って用いられる抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープと結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する。付加的な局面において、該抗体は、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する。さらなる局面において、該抗体は、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する。

【0131】

いくつかの局面において、本開示の方法に従って用いられるRTKIはスニチニブである。

【0132】

他の態様において、本開示の方法に従って用いられるRTKIはスニチニブではない。

【0133】

いくつかの局面において、本開示の方法に従って用いられるRTKIはソラフェニブである。付加的な局面において、RTKIはパゾパニブである。付加的な局面において、RTKIはアキシチニブある。別の局面において、RTKIはチボザニブまたはバンデタニブである。付加的な局面において、本方法に従って用いられるRTKIは、モテサニブ(AMG-706)、バタラニブ(PTK787/ZK)、サマキサニブ(samaxanib)(SU5416)、SU6668、AZD2171、XL184、XL880/GSK1363089、PF-2351066、MGCD265、ZD6474、AEE788、AG-013736、AG-013737、GW786034、およびABT-869より選択される薬剤である。さらなる局面において、薬学的調製物は、国際特許出願公開第W097/22596号、第WO 97/30035号、第WO 97/32856号、またはWO 98/13354号に開示されているVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬を含む。付加的な局面において、本

開示は、腎細胞癌(RCC)を有する哺乳動物に、(1) RTKI、(2) ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または開示される他のALKアンタゴニスト、および(3) 哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤の(1)有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法に関する。本明細書で用いられる場合、「mTOR標的阻害剤」という用語は、AKT/mTORシグナル伝達経路に結合し、そのシグナル伝達を阻害する小分子阻害剤を指す。mTOR標的阻害剤、および本開示の方法に従って使用され得るmTOR標的阻害剤を同定するためのアッセイは、当技術分野で公知である。いくつかの局面において、本発明の方法に従って用いられるmTOR阻害剤はエベロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤はテムシロリムスである。付加的な局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

10

【0134】

付加的な局面において、本開示の方法に従って治療される腎細胞癌(RCC)は、腎明細胞癌である。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。他の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。さらなる局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

20

【0135】

したがって、1つの局面によれば、本開示は、転移性腎細胞癌(RCC)を有する哺乳動物に、RTKI、およびALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または本明細書で開示される他のALKアンタゴニストの有効量を投与する段階を含む、哺乳動物における転移性RCCを治療する方法に関する。1つの局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法を包含する。特定の態様において、医学的手技は、腎保存手術、腎摘出術、腎全摘除術、および組織焼灼より選択される。さらなる局面において、治療は、医学的手技後の1、2、3、4、5、6、または1カ月以内に哺乳動物に施行される。

20

【0136】

さらなる局面において、本開示は、RCC治療薬による前治療を受けた哺乳動物を治療する方法に関する。さらなる局面において、本開示は、以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；(c) ヒトBM P9に結合する抗体；および(d) ヒトBMP10に結合する抗体より選択される薬剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を包含する。いくつかの局面において、本方法に従って用いられるALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をさらに含み、付加的な局面において、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。他の局面において、ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0137】

いくつかの局面において、本開示の方法に従って用いられる抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する。付加的な局面において、該抗体は、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する。さらなる局面において、該抗体は、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する。

40

【0138】

1つの局面において、以前に受けたRCC治療薬はRTKIである。さらなる局面において、RTKIは、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバン

50

デタニブより選択される薬剤である。別の局面において、以前に受けたRCC治療薬は、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤である。さらなる局面において、mTOR標的阻害剤は、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

【0139】

付加的な局面において、以前に受けたRCC治療薬は全身サイトカイン療法剤である。さらなる局面において、以前に受けたRCC治療薬はインターフェロン(IFN-)またはインターロイキン-2(IL-2)である。

10

【0140】

いくつかの局面において、RCC治療薬による前治療を受けた哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、スニチニブである。

【0141】

他の態様において、RCC治療薬による前治療を受けた哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、スニチニブではない。

【0142】

いくつかの局面において、RCC治療薬による前治療を受けた哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、ソラフェニブである。付加的な局面において、RTKIはパゾパニブである。付加的な局面において、RTKIはアキシチニブある。別の態様において、RTKIはチボザニブまたはバンデタニブである。付加的な局面において、本方法に従って用いられるRTKIは、モテサニブ(AMG-706)、バタラニブ(PTK787/ZK)、サマキサニブ(SU5416)、SU6668、AZD2171、XL184、XL880/GSK1363089、PF-2351066、MGCD265、ZD6474、AEE788、AG-013736、AG-013737、GW786034、およびABT-869より選択される薬剤である。さらなる局面において、薬学的調製物は、国際特許出願公開第W097/22596号、第W0 97/30035号、第W0 97/32856号、またはWO 98/13354号に開示されているVEGF受容体チロシンキナーゼ阻害薬を含む。

20

【0143】

付加的な局面において、本開示は、以前に腎細胞癌(RCC)治療薬を受けた哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、(1) RTKI、(2) ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または開示される他のALKアンタゴニスト、および(3) 哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。mTOR標的阻害剤、および本開示の方法に従って使用され得るmTOR標的阻害剤を同定するためのアッセイは、当技術分野で公知である。いくつかの局面において、本発明の方法に従って用いられるmTOR阻害剤はエベロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤はテムシロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

30

【0144】

付加的な局面において、本開示は、以前に腎細胞癌(RCC)治療薬を受けた哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、本開示の方法に従って治療される腎細胞癌(RCC)が腎細胞癌である、方法に関する。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。他の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。さらなる局面において、RCCは転移性腎細胞癌である。付加的な局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

40

【0145】

さらなる局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受ける準備をしている哺乳動物を治療する方法に関する。1つの局面において、本開示は

50

、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受ける準備をしている哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；(c) ヒトBMP9に結合する抗体；および(d) ヒトBMP10に結合する抗体より選択される薬剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を包含する。いくつかの局面において、本方法に従って用いられるALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をさらに含み、付加的な局面において、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。他の局面において、ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。1つの局面において、薬剤は、医学的手技の少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日前に投与される。別の局面において、哺乳動物は、手術の前に、該薬剤による少なくとも1、2、3、または4回の一連の治療を受けている。別の局面において、薬剤は、腎保存手術、腎摘出術、腎全摘除術、および組織焼灼より選択される医学的手技の前に投与される。

10

【0146】

いくつかの態様では、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受ける準備をしている哺乳動物を治療するために、抗体が投与される。さらなる態様において、投与される抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープと結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する。付加的な局面において、該抗体は、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する。さらなる局面において、該抗体は、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する。

20

【0147】

いくつかの局面では、医学的手技を受ける前の哺乳動物を治療するために、本明細書に開示されるALK-1アンタゴニストと共にRTKIが投与される。いくつかの局面において、RCCを治療するための医学的手技を受ける前の哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、スニチニブである。他の態様において、RCCを治療するための医学的手技を受ける前の哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、スニチニブではない。

30

【0148】

いくつかの局面において、RCCを治療するための医学的手技を受ける前の哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、ソラフェニブである。付加的な局面において、RTKIはパゾパニブである。付加的な局面において、RTKIはアキシチニブある。別の態様において、RTKIはチボザニブまたはバンデタニブである。付加的な局面において、本方法に従って用いられるRTKIは、モテサニブ(AMG-706)、バタラニブ(PTK787/ZK)、サマキサニブ(SU5416)、SU6668、AZD2171、XL184、XL880/GSK1363089、PF-2351066、MGCD265、ZD6474、AEE788、AG-013736、AG-013737、GW786034、およびABT-869より選択される薬剤である。さらなる局面において、薬剤は、国際特許出願公開第W097/22596号、第WO 97/30035号、第W0 97/32856号、またはWO 98/13354号に開示されているRTKIを含む。

40

【0149】

いくつかの局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受ける準備をしている哺乳動物を治療する方法であって、(1) RTKI、(2) ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または開示される他のALKアンタゴニスト、および(3) 哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。いくつかの局面において、本発明の方法に従って用いられるmTOR阻害剤はエベロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤はテムシロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

【0150】

50

付加的な局面において、本開示は、腎細胞癌(RCC)を治療するための医学的手技を受ける前の、RCCを有する哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、該腎細胞癌(RCC)が腎細胞癌である、方法に関する。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。他の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。さらなる局面において、RCCは転移性腎細胞癌である。付加的な局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

【0151】

さらなる局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けた哺乳動物を治療する方法に関する。1つの局面において、本開示は、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；(c) ヒトBMP9に結合する抗体；および(d) ヒトBMP10に結合する抗体より選択される薬剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法を包含する。いくつかの局面において、本方法に従って用いられるALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をさらに含み、付加的な局面において、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。他の局面において、ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。1つの局面において、薬剤は、医学的手技の少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日後に投与される。別の局面において、薬剤は、医学的手技の1週間、1ヶ月、または3ヶ月以内に投与される。別の局面において、薬剤は少なくとも1、2、3、4、5、6、または7日後に投与される。別の局面において、哺乳動物は、手術後に、該薬剤による少なくとも1、2、3、または4回の一連の治療を受ける。別の局面において、薬剤は、腎保存手術、腎摘出術、腎全摘除術、および組織焼灼より選択される医学的手技の後に投与される。

【0152】

いくつかの態様では、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けた哺乳動物を治療するために、抗体が投与される。いくつかの局面において、該抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する。付加的な局面において、該抗体は、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する。さらなる局面において、該抗体は、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する

【0153】

いくつかの局面では、RCCを有し、かつRCCを治療するための医学的手技を受けた哺乳動物を治療するために、本明細書に開示されるALK-1アンタゴニストと共にRTKIが投与される。いくつかの局面において、医学的手技を受けた後の哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、スニチニブである。他の態様において、RCCを治療するための医学的手技を受けた後の哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、スニチニブではない。いくつかの局面において、RCCを治療するための医学的手技を受けた後の哺乳動物を治療する方法に従って用いられるRTKIは、ソラフェニブである。付加的な局面において、RTKIはアキシチニブある。別の態様において、RTKIはチボザニブまたはバンデタニブである。付加的な局面において、本方法に従って用いられるRTKIは、モテサニブ(AMG-706)、バタラニブ(PTK787/ZK)、サマキサニブ(SU5416)、SU6668、AZD2171、XL184、XL880/GSK1363089、PF-2351066、MGCD265、ZD6474、AEE788、AG-013736、AG-013737、GW786034、およびABT-869より選択される薬剤である。さらなる局面において、薬剤は、国際特許出願公開第W097/22596号、第WO 97/30035号

10

20

30

40

50

、第WO 97/32856号、またはWO 98/13354号に開示されているRTKIを含む。

【0154】

付加的な局面において、本開示は、腎細胞癌(RCC)を治療するための医学的手技を受けた後の哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、(1) RTKI、(2) ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または開示される他のALKアンタゴニスト、および(3) 哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。いくつかの局面において、本発明の方法に従って用いられるmTOR阻害剤はエベロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤はテムシロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

10

【0155】

付加的な局面において、本開示は、RCCを治療するための医学的手技を受けた後の、RCCを有する哺乳動物におけるRCCを治療する方法であって、該腎細胞癌(RCC)が腎明細胞癌である、方法に関する。いくつかの局面において、RCCはTNMステージIII疾患である。付加的な局面において、RCCはTNMステージIV疾患である。付加的な局面において、RCCは腎内血管内に認められる。他の局面において、RCCは腎洞に浸潤している。さらなる局面において、RCCは転移性腎細胞癌である。付加的な局面において、RCCは副腎またはリンパ節に転移している。さらなる局面において、RCCは肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している。

20

【0156】

さらなる局面において、本開示は、転移性RCCを有する哺乳動物を治療する方法に関する。1つの局面において、本開示は、転移性RCCを治療する方法であって、(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；(c) ヒトBMP9に結合する抗体；および(d) ヒトBMP10に結合する抗体より選択される薬剤の有効量を哺乳動物に投与する段階を含む方法を包含する。いくつかの局面において、本方法に従って用いられるALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をさらに含み、付加的な局面において、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。他の局面において、ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

30

【0157】

いくつかの態様では、転移性RCCを有する哺乳動物を治療するために、抗体が投与される。さらなる態様において、投与される抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープと結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する。付加的な局面において、該抗体は、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する。さらなる局面において、該抗体は、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する。

40

【0158】

1つの局面に従って、本開示は、転移性腎細胞癌(RCC)を有する哺乳動物に、RTKI、およびALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または本明細書で開示される他のALKアンタゴニストの有効量を投与する段階を含む、哺乳動物における転移性RCCを治療する方法に関する。いくつかの局面において、RTKIはスニチニブである。他の態様において、RTKIはスニチニブではない。いくつかの局面において、RTKIはソラフェニブである。付加的な局面において、RTKIはパゾパニブである。付加的な局面において、RTKIはアキシチニブある。別の態様において、RTKIはチボザニブまたはバンデタニブである。付加的な局面において、RTKIは、モテサニブ(AMG-706)、バタラニブ(PTK787/ZK)、サマキサニブ(S

50

U5416)、SU6668、AZD2171、XL184、XL880/GSK1363089、PF-2351066、MGCD265、ZD6474、AEE788、AG-013736、AG-013737、GW786034、およびABT-869より選択される薬剤である。さらなる局面において、薬剤は、国際特許出願公開第W097/22596号、第WO 97/30035号、第WO 97/32856号、またはWO 98/13354号に開示されているRTKIを含む。

【0159】

いくつかの局面において、本開示は、転移性RCCを有する哺乳動物を治療する方法であって、(1) RTKI、(2) ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または開示される他のALKアンタゴニスト、および(3) 哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。いくつかの局面において、本発明の方法に従って用いられるmTOR阻害剤はエベロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤はテムシロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

10

【0160】

本開示は、ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または本明細書に開示される他の「治療薬」もしくは「ALK1アンタゴニスト」の有効量を哺乳動物に投与する段階により、哺乳動物における血管新生を阻害する方法を提供する。これらの治療薬は、骨および関節、ならびに腫瘍、特に骨および関節と関連した腫瘍における血管形成を阻害するのにも有用であると予測される。

20

【0161】

血管新生関連疾患には、例えば、固形癌、白血病などの血液由来腫瘍、および腫瘍転移を含む血管新生依存性癌；良性腫瘍、例えば、血管腫、聴神経腫、神経線維腫、トラコーマ、および化膿性肉芽腫；関節リウマチ；乾癬；ルベオーシス；オスラー・ウェーバー症候群；心筋血管新生；プラーク新血管新生；毛細血管拡張症；血友病性関節(hemophilia c joint)；ならびに血管線維腫が含まれるが、これらに限定されない。

【0162】

特に、本開示のポリペプチド治療薬は、癌(腫瘍)、および特に成長を支持するために血管新生過程に依存することが知られているような癌を治療または予防するのに有用である。大部分の抗血管新生薬とは異なり、ALK1 ECDポリペプチドは、複数の因子によって促進される血管新生に影響を及ぼす。癌が、腫瘍血管新生を支持する複数の因子を高頻度で獲得する場合、これは癌と高度に関連性がある。したがって、本明細書に開示される治療薬は、単一の血管新生因子を標的化する薬物(例えば、VEGFを標的化するベバシズマブ)による治療に抵抗性である腫瘍の治療に特に効果的である。本明細書で実証されるように、ALK1-Fc融合タンパク質は、メラノーマ、肺癌、および多発性骨髄腫の病理学的影響を減少させるのに効果的である。多発性骨髄腫は、重要な血管新生成分を含む癌として広く認識されている。したがって、ALK1-Fc融合タンパク質および本明細書に開示される他の治療薬は、多発性骨髄腫および骨と関連する他の腫瘍を治療するのに有用であると予測される。本明細書で実証されるように、本明細書に開示される治療薬を用いて、多発性骨髄腫と関連する骨損傷を改善することができ、したがってこれを用いて、乳房腫瘍または前立腺腫瘍などの他の腫瘍の骨転移と関連する骨損傷を改善することができる。本明細書に記載されるように、GDF5~7リガンドは骨において高度に発現され、またいかなる特定の機構に制限されることも望まないが、これらのリガンドの干渉により、骨における腫瘍発達に必要とされる過程が破壊され得る。

30

【0163】

いくつかの局面において、本開示は、血管新生阻害が望ましい状態を有する哺乳動物における血管新生を阻害する方法であって、(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；(c) ヒトBMP9に結合する抗体；および(d) ヒトBMP10に結合する抗体より選択される薬剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。いくつかの局面において、本方法に従って用いられるALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:1のアミノ酸22~120の配列と少なくとも90%

40

50

同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む。さらなる局面において、ALK1ポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をさらに含み、付加的な局面において、Fc部分はヒトIgG1のFc部分である。他の局面において、ALK1ポリペプチドは、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0164】

いくつかの態様では、哺乳動物における血管新生を阻害するために、抗体が投与される。さらなる態様において、投与される抗体は、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープと結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する。付加的な局面において、該抗体は、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する。さらなる局面において、該抗体は、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する。

10

【0165】

いくつかの局面では、哺乳動物における血管新生を阻害するために、本明細書に開示されるALK-1アンタゴニストと共にRTKIが投与される。いくつかの局面において、RTKIはスニチニブである。他の態様において、RTKIはスニチニブではない。いくつかの局面において、RTKIはソラフェニブである。付加的な局面において、RTKIはパゾパニブである。付加的な局面において、RTKIはアキシチニブある。別の態様において、RTKIはチボザニブまたはパンデタニブである。付加的な局面において、RTKIは、モテサニブ(AMG-706)、バタラニブ(PTK787/ZK)、サマキサニブ(SU5416)、SU6668、AZD2171、XL184、XL880/GSK1363089、PF-2351066、MGCD265、ZD6474、AEE788、AG-013736、AG-013737、GW786034、およびABT-869より選択される薬剤である。さらなる局面において、国際特許出願公開第W097/22596号、第WO 97/30035号、第WO 97/32856号、またはWO 98/13354号に開示されているRTKI。

20

【0166】

いくつかの局面において、本開示は、血管新生を阻害する方法であって、(1) RTKI、(2) ALK1-Fc融合タンパク質などのALK1 ECDポリペプチド、または開示される他のALKアンタゴニスト、および(3) 哺乳類ラバマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤の有効量を哺乳動物に投与する段階を含む方法に関する。いくつかの局面において、本発明の方法に従って用いられるmTOR阻害剤はエベロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤はテムシロリムスである。他の局面において、mTOR阻害剤は、WYE354、YE132(Pfizer)、PP30およびPP242、AZD8055、OSI-027、Torin1、BEZ235、XL765、GDC-0980、PF-04691502およびPF-05212384より選択される薬剤である。

30

【0167】

本開示に従って、本明細書に記載される抗血管新生薬を、疾患治療のための他の組成物および手順と併用することができる。例えば、ALK1またはALK1リガンドアンタゴニストと組み合わせて、手術、放射線、または化学療法で従来通りに腫瘍を治療することができ、その後、該アンタゴニストを患者に投与して、微小転移の休止状態を延長し、任意の残存原発性腫瘍を安定化することができる。

40

【0168】

血管新生阻害薬はまた、新たな癌または再発癌を発症するリスクが高いことがわかっている個体に予防的に投与することもできる。したがって、本開示の局面は、ALK1もしくはALK1リガンドアンタゴニストおよび/またはその誘導体、または本開示の別の血管新生阻害薬の有効量を対象に投与する段階を含む、対象における癌を予防的に防止する方法を包含する。

【0169】

本明細書で実証されるように、ALK1-Fcは、関節リウマチのマウスモデルの表現型を弱めるのに効果的である。したがって、本明細書に開示される治療薬を、関節リウマチおよび他のタイプの骨または関節炎症の治療に使用することができる。

【0170】

50

例えば、排卵、月経、および胎盤形成などのある正常な生理学的過程もまた、血管新生と関連している。本開示の血管新生阻害タンパク質は、内皮細胞が過剰または異常に刺激される疾患の治療に有用である。これらの疾患には、腸管癒着症、アテローム性動脈硬化症、強皮症、および肥厚性瘢痕、すなわちケロイドが含まれるが、これらに限定されない。これらは、ネコ引っ搔き病 (*Rochele minalia quintosa*) および潰瘍 (ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)) などの、病理学的結果として血管新生を有する疾患の治療にも有用である。

【0171】

一般的な血管新生阻害タンパク質は、胚着床に必要な子宮血管新生を減少させるかまたは防ぐことによって、受胎調節薬として使用することができる。したがって、本開示は、胚着床を防ぐのに十分な量の阻害タンパク質が女性に投与された場合の、効果的な受胎調節方法を提供する。受胎調節方法の1つの局面では、胚着床を阻止するのに十分な量の阻害タンパク質が、性交および受精が起こる前または後に投与され、そのようにして受胎調節の効果的な方法、おそらくは「事後」方法が提供される。この記述によって拘束されることは望まないが、子宮内膜の血管新生の阻害は胚盤胞の着床を妨害すると考えられる。卵管粘膜の血管新生の同様の阻害も胚盤胞の着床を妨害し、卵管妊娠の発生を妨げる。本開示の血管新生阻害薬の投与は、胎盤の正常な血管新生の増強を妨害し、ならびにまた首尾よく着床した胚盤胞内の血管の発達、ならびに発達中の胚および胎児を妨害することもまた考えられる。

10

【0172】

投与方法には、丸剤、注射 (静脈内、皮下、筋肉内)、座剤、臍スポンジ、臍タンポン、および子宮内器具が含まれるが、これらに限定されない。ある態様では、1つまたは複数の治療薬を共に (同時に) または異なる時間に (連続して) 投与することができる。加えて、治療薬は、癌を治療するためまたは血管新生を阻害するための別の種類の化合物と共に投与することができる。ある態様において、本開示の本方法は単独で使用することができる。あるいは、本方法は、増殖性障害 (例えば、腫瘍) の治療または予防に向けられた他の従来の抗癌治療アプローチと併用することもできる。例えば、このような方法は、予防的な癌防止において、癌再発および術後転移の予防において、ならびに他の従来の癌療法の補助剤として使用することができる。本開示は、本ポリペプチド治療薬の使用によって、従来の癌療法 (例えば、化学療法、放射線療法、光療法、免疫療法、および手術) の有効性を増強することができることを認識する。

20

30

【0173】

広範な一連の従来の化合物は、抗新生物活性を有することが示されている。これらの化合物は、固体腫瘍を縮小させる、転移およびさらなる成長を防ぐ、または白血病性もしくは骨髄性の悪性腫瘍における悪性細胞の数を減少させるために、化学療法における薬学的薬剤として使用されている。化学療法は様々なタイプの悪性腫瘍を治療するのに効果的であるが、多くの抗新生物化合物は望ましくない副作用を誘導する。2つまたはそれ以上の異なる治療を組み合わせた場合、治療は相乗的に作用し得、治療の各々の投与量の減少が可能となり、それによってより高投与量の各化合物によってもたらされる有害な副作用が軽減されることが示されている。他の例において、治療に対して不応性である悪性腫瘍が、2つまたはそれ以上の異なる治療の併用療法に応答する場合がある。

40

【0174】

本明細書に開示されるポリペプチド治療薬が、別の従来の抗新生物薬と組み合わせて同時にまたは連続して投与される場合、このような治療薬は、抗新生物薬の治療効果を増強し得るか、またはそのような抗新生物薬に対する細胞の耐性を克服し得る。これにより抗新生物薬の投与量の減少が可能となり、それによって望ましくない副作用が軽減されるか、または耐性細胞における抗新生物薬の有効性が回復される。

【0175】

本開示の方法はまた、眼の状態を治療するために用いられる他の医薬品との同時投与を含む。2つ以上の薬剤または薬剤と医薬品との組み合わせを投与する場合、投与は同時に

50

または時間内に連続して行うことができる。治療薬および／または医薬品は、異なる投与経路または同じ投与経路によって投与することができる。

【0176】

7. 製剤および有効用量

本明細書に記載される治療薬は、薬学的組成物に製剤化することができる。本開示に従って使用するための薬学的組成物は、1つまたは複数の生理学的に許容される担体または賦形剤を用いて、従来の様式で製剤化することができる。このような製剤は、一般に、大部分の規制要件に従って実質的に発熱物質を含まない。

【0177】

ある態様において、本開示の治療法は、組成物を全身投与する段階、または移植片もしくは器具として局所投与する段階を含む。投与される場合、本開示において使用するための治療組成物は、発熱物質を含まない生理学的に許容される形態である。本明細書に開示される方法において、上記組成物中に同様に任意に含まれ得る、ALK1シグナル伝達アンタゴニスト以外の治療的に有用な薬剤を、本化合物（例えば、ALK1 ECDポリペプチドまたは本明細書に開示される抗体のいずれか）と同時または連続して投与することができる。

10

【0178】

典型的に、本明細書に開示されるタンパク質治療薬は、非経口投与、特に静脈内投与または皮下投与される。非経口投与に適した薬学的組成物は、1つまたは複数のALK1 ECDポリペプチドまたは他の抗体を、1つまたは複数の薬学的に許容される無菌等張水溶液もしくは非水溶液、分散液、懸濁液、または乳濁液、あるいは使用直前に無菌注射液または分散液に再構成され得る無菌粉末と組み合わせて含んでよく、これは抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、製剤を対象となるレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含み得る。本開示の薬学的組成物中で使用され得る適切な水性および非水性担体の例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等など）、およびこれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどの被覆材の使用により、分散剤の場合には必要とされる粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持することができる。

20

【0179】

組成物および製剤は、必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置で提供することができる。パックは、例えば、ブリスターパックのように金属またはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与のための説明書が添付され得る。

30

【実施例】

【0180】

実施例1：ALK1-Fc融合タンパク質の発現

本出願者らは、その間に最小リンカーを有してヒトFcに融合されたヒトALK1の細胞外ドメインを有するか、またはマウスFcドメインに融合されたマウスALK1の細胞外ドメインを有する可溶性ALK1融合タンパク質を構築した。これらの構築物は、それぞれhALK1-FcおよびmALK1-Fcと称される。

40

【0181】

hALK1-Fcを、CHO細胞株から精製されたものとして図3Bに示す(SEQ ID NO:14)。注目すべきは、ヒトALK1タンパク質の細胞外ドメインの従来のC末端はSEQ ID NO:1のアミノ酸118であるが、本発明者らは、グルタミン残基で終結するドメインを有するのを回避することが望ましいと判断した。したがって、ヒトALK1に由来するSEQ ID NO:14の部分は、Q118のC末端側に2つの残基、ロイシンおよびアラニンを取り込んでいる。したがって本開示は、Q118の上流側の1~5アミノ酸(SEQ ID NO:1に対して113~117)または下流側の1~5アミノ酸(119~123)のどこかであるALK1由来配列のc末端を有するALK1 ECDポリペプチド(Fc融合タンパク質を含む)を提供する。

【0182】

50

hALK1-Fcタンパク質およびmALK1-Fcタンパク質をCHO細胞株において発現させた。3つの異なるリーダー配列を検討した。

(i) ミツバチメリチン(HBML) :

MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO: 7)

(ii) 組織プラスミノーゲンアクチベーター(TPA) :

MDAMKRGGLCCVLLCGAVFVSP (SEQ ID NO: 8)

(iii) 天然 :

MTLGSPRKGLLMLLMALVTQG (SEQ ID NO: 9)

【0183】

選択された形態はTPAリーダーを使用し、図4に示されるプロセシングされていないアミノ酸配列(SEQ ID NO:5)を有する。

【0184】

このポリペプチドは、図4に示される核酸配列(SEQ ID NO:4)によってコードされる。

【0185】

精製は、例えば以下のうちの3つまたはそれ以上を任意の順番で含む一連のカラムクロマトグラフィー段階によって達成することができる：プロテインAクロマトグラフィー、Qセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および陽イオン交換クロマトグラフィー。ウイルス濾過および緩衝液交換により、精製を完了することができる。hALK1-Fcタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにより判定して>98%の純度、およびSDS PAGEにより判定して>95%の純度に精製された。

【0186】

タンパク質の產生および精製の過程において、本発明者らは、hALK1-Fcが、二量体と、変性還元条件(例えば、還元SDS-PAGE)下では純粋であるようであるが、患者に投与するには問題のあるより高次の凝集物との混合物として発現される傾向があることを認めた。凝集物は免疫原性があるかまたは生物学的利用能が不十分である可能性があり、またそれらの不均一性のために、これらの凝集物によって、薬学的調製物を薬物開発に望ましいレベルで特徴づけることが難しくなる。したがって、最終調製物中の凝集物の量を減らすために、様々なアプローチを試験した。

【0187】

1つのアプローチにおいて、いくつかの異なる細胞培養培地を試験した。IS CHO-CD (Cat. No. 91119、Irvine Scientific、Santa Ana, CA) は、hALK1-Fcの高レベルの產生を維持しつつ、凝集生成物の產生の顕著な減少を示した。加えて、pH 8.0での疎水性相互作用カラム(例えば、フェニルセファロース)からの物質の溶出により、凝集生成物のさらなる分離が起こった。得られた物質は、99%を超える二量体からなる。R&D Systemsによって販売されているALK1-Fc融合タンパク質(cat. No. 370-AL、Minneapolis, MN)との比較から、NSO細胞において產生されたこのタンパク質は84%が二量体であり、残りのタンパク質はサイズ排除クロマトグラフィーによって高分子量種として現れることが示される。調製物についてのサイズ分離カラムプロファイルの比較を図11に示す。凝集物形成がALK1-Fc生成における重大な問題として特定されたことにより、付加的な精製段階を伴うアプローチ(しかし、そのようなアプローチは精製タンパク質のより低い収率をもたらし得る)を含めた、他のアプローチが開発され得ることが予測される。

【0188】

実施例2：ALK1-Fcリガンドの同定

ALK1はTGF ファミリーのリガンドの1型受容体である。Biacore(商標)システムを用いて、TGF ファミリーの複数のメンバーをヒトALK1-Fc融合タンパク質に対する結合について試験した。TGF 自体、GDF8、GDF11、BMP2、およびBMP4はすべて、hALK1-Fc融合タンパク質に対する実質的な結合を示すことができなかつたが、BMP2およびBMP4は限定された結合を示した。対照的に、GDF5およびGDF7は、いずれの場合にもおよそ 5×10^{-8} MのK_D値

10

20

30

40

50

を有して、有意な結合を示した。GDF5およびGDF7のGDF6との構造類似性に基づいて、GDF6が類似の親和性で融合タンパク質と結合することが予測される。hALK1-Fcに対する最も高い親和性は、 $1 \times 10^{-10} \sim 2 \times 10^{-9}$ のK_D値でBMP9について、およびおよそ 3×10^{-9} のK_D値でBMP10について観察された。

【0189】

実施例3：内皮細胞に及ぼすALK1-Fcおよび抗ALK1抗体の効果の特徴づけ

Smad1/5/8媒介性シグナル伝達に応答する4つの連続するコンセンサスSBE部位の制御下にあるルシフェラーゼレポーター構築物(SBE4-luc)を用いて、本発明者らは、HMVEC細胞においてhALK1-Fc薬物または中和ALK1特異的モノクローナル抗体の存在下および非存在下で、BMP-9媒介性活性を測定した。HMVEC細胞をrhBMP-9(50 ng/ml)で刺激し、これにより、この場合にはSBE4-luc調節の転写上方制御の増加によって証明されるSmad1/5/8媒介性の転写活性化を誘導した。添加した場合に、hALK1-Fc化合物(10 μg/ml)または抗体(10 μg/ml)は、この転写応答をそれぞれほぼ60%減少させ、このことから、ALK1-Fcの存在がBMP9シグナル伝達を有意に減少させること、およびその上、BMP9シグナル伝達がALK1活性に関連することが示される。

【0190】

上流アクチビン受容体の活性化をアッセイするために、SMADリン酸化の活性化が一般的に用いられる。ALK1は、そのリガンドによる活性化に際して、SMADタンパク質1、5、および8のリン酸化を調節することが知られている。ここで、本発明者らは、30分の時間経過にわたってrhBMP-9(50 ng/ml)を添加して、ALK1受容体を生来的に発現するヒト内皮細胞株であるHUVEC細胞においてSMADリン酸化を開始させた。リガンドで細胞を処理してから5分後に、SMAD1/5/8のリン酸化が認められ、リン酸化は全30分間にわたって維持された。比較的低濃度のhALK1-Fc(250 ng/ml)の存在下で、SMAD1/5/8のリン酸化が減少し、このことから、この薬剤が内皮細胞におけるSmad1/5/8活性化を阻害することが確認された。

【0191】

インビトロ系におけるALK1-Fcの血管新生効果を評価するために、本発明者らは、マトリゲル基材上での内皮細胞の管形成を減少させる際の該化合物の有効性をアッセイした。この技法は、新血管新生を評価するために一般的に使用されており、迅速かつ再現性の高い結果をもたらす。内皮細胞成長補充物(ECGS)を用いて、マトリゲル上の内皮細胞から微小血管の形成を誘導し、次いで、18時間の時間経過にわたって、薬物およびECGSの両方の存在下において、抗血管新生化合物の有効性を索形成の減少として計測する。予測通り、ECGS(200 ng/ml)の添加は、マトリゲル基材上で生じる内皮細胞索形成の基礎レベルを示す陰性対照(処理が加えられない)と比較して、有意な索形成を誘導した(図5)。hALK1-Fc(100 ng/ml)またはmALK1-Fc(100 ng/ml)のいずれかを添加すると、索形成は明白に減少した。全試料における血管長の最終的な定量により、あらゆる濃度のhALK1-fcまたはmA LK1-Fcが、新血管新生を基礎レベルにまで低下させることが明らかとなった。加えて、強い血管新生促進因子ECGSの存在下におけるhALK1-FcおよびmALK1-Fcは、新血管新生の強力な阻害を維持し、このことから、陰性対照エンドスタチン(100 ng/ml)よりもさらにより強力な抗血管新生活性が実証された。

【0192】

実施例4：CAMアッセイ

VEGFおよびFGFは、血管新生を促進することが周知である。CAM(ニワトリ緑毛尿膜)アッセイ系を用いて、GDF7の血管新生効果を評価した。図6に示されるように、GDF7は、VEGFの効力と同様の効力で血管新生を促進する。GDF5およびGDF6でも同様の結果が認められた。

【0193】

ALK1-Fc融合物をCAMアッセイにおいて抗血管新生活性について試験した。これらの融合タンパク質は、VEGF、FGF、およびGDF7によって促進される血管新生に対して強力な抗血管新生効果を示した。図7を参照されたい。BMP9およびPDGFは、このアッセイにおいて血管新生を誘導する比較的不十分な能力を示したが、これらの因子のそのような血管新生効

10

20

30

40

50

果は、それでもなおALK1によって阻害された。

【0194】

ALK1-Fcタンパク質および市販の抗血管新生抗VEGFモノクローナル抗体を、CAMアッセイで比較した。ALK1-Fcタンパク質は、抗VEGFと比較して同様の効力を有した。抗VEGF抗体ベバシズマブは、現在、ヒトにおける癌および黄斑変性症の治療に用いられている。図8を参照されたい。

【0195】

興味深いことに、抗ALK1抗体(R&D Systems)は、このアッセイ系で血管新生を有意に阻害することができなかった。本発明者らは、これは異なる種におけるALK1配列の相違を反映し得ると予測する。

10

【0196】

実施例5：マウス角膜マイクロポケットアッセイ

マウス角膜マイクロポケットアッセイを用いて、ALK1-Fcがマウス眼における血管新生に及ぼす効果を評価した。腹腔内投与したhALK1-Fcは、眼の血管新生を有意に阻害した。図9に示されるように、hALK1-Fcは、眼の血管新生を抗VEGFと同程度にまで阻害した。hALK1-Fcおよび抗VEGFは、同一の重量／重量投与量で使用した。VEGFを含浸させたマトリゲルプラグが眼以外の位置に移植された場合にも、同様のデータが得られた。

【0197】

これらのデータは、ALK1に対する高親和性リガンドが血管新生を促進すること、およびALK1-Fc融合タンパク質が強力な抗血管新生活性を有することを実証する。ALK1に対するリガンドは、ALK1に対して中程度の親和性を有するGDF5、6、7群と、ALK1に対して高親和性を有するBMP9、BMP10群との2つのカテゴリーに分類される。

20

【0198】

GDF5、6、および7は主に骨および関節に局在化し、BMP9は血液中を循環する。したがって、ALK1、GDF5、6、および7を含む骨および関節の血管新生促進系、ならびにALK1およびBMP9（およびおそらくはBMP10）を含む全身性の血管新生系が存在するようである。

【0199】

実施例6：関節リウマチのマウスモデル

マウスコラーゲン誘導性関節炎モデルは、関節リウマチの広く受け入れられているモデルである。本研究では、マウス10匹の群を、媒体、抗VEGF（ベバシズマブ陰性対照として、これはベバシズマブがマウスVEGFを阻害しないためである）、または1 mg/kg、10 mg/kg、もしくは25 mg/kgの用量のmALK1-Fc（「RAP-041」）で処置した。21日目のコラーゲン追加免疫後、関節炎スコア（図10を参照されたい）および足の腫脹は全群で着実に増加し、およそ38日目にピークに達した。mALK1-Fc（「RAP-041」）で処置したマウスは、特に最も高い用量（25 mg/kg）において両方の特徴についてスコアの低下を示したが、低下は統計学的有意性を達成しなかった。それにもかかわらず、用量に関連した傾向は明らかである。

30

【0200】

42日目の研究終了時までに、関節炎の発生率は、媒体対照処置マウスでは10/10に、ベバシズマブ処置マウスでは9/10に、1 mg/kgのmALK1-Fcで処置した群では8/10に、および0 mg/kgのmALK1-Fcで処置した群では9/10に達していた。25 mg/kgのmALK1-Fcで処置した群では、疾患発生率はより低く、6/10であった。

40

【0201】

実施例7：CAMアッセイにおいて腫瘍血管新生を減少させるALK1-Fc

腫瘍は、いずれの組織とも同様に、基本的な栄養および酸素所要量を有する。小さい腫瘍は、隣接する血管から拡散によって十分な量を獲得することができるが、腫瘍のサイズが増加するにつれて、腫瘍は、既存の毛細血管を補充し維持することによって栄養分を確保しなければならない。ALK1-Fcタンパク質が血管阻害により腫瘍成長を制限する能力を試験するために、本発明者らは、メラノーマ外植片CAMアッセイにおいて様々な濃度のmALK1-Fcを試験した。上記のCAMアッセイと同様に、各卵の表面に小さい窓を作製し、そこを

50

介して 5×10^5 個のB16メラノーマ細胞を移植した。その後、卵を、1週間の期間にわたって0.02 mg/ml mALK1-Fc、0.2 mg/ml mALK1-Fcで毎日処理するか、または未処理のままにした。実験の終了時に、腫瘍を注意深く取り出し、重量測定し、デジタル画像を撮影した。mALK1-Fcで処理したCAMに由来する腫瘍は、未処理のCAM腫瘍と比較してサイズの有意な減少を示した。腫瘍重量の定量により、0.02 mg/mlまたは0.2 mg/ml mALK1-Fcのいずれかで毎日処理した腫瘍の重量が、未処理のCAMと比較して65%および85%の減少を示したことが実証された(図6E)。結論として、新血管新生および腫瘍成長は、ALK1-Fcの添加により用量反応的な様式で有意に抑制され、このことから、ALK1-Fcが強力な抗血管新生薬であることが示される。

【0202】

10

実施例8：肺癌の実験モデル

腫瘍進行に及ぼすALK1-Fcの効果をさらに確認するために、肺癌のマウスモデルを試験した。蛍光標識されたマウスルイス肺癌細胞(LL/2-luc)を、尾静脈からアルビノBlack 6マウスに投与した。同じ日に、そのマウスにおいて、腹腔内投与したPBS対照(n=7)または10 mg/kg mALK1-Fc (n=7)のいずれかによる処置を開始した。生存中の蛍光画像法により、対照マウスにおいて肺に局在化する腫瘍の実質的な発達が示され、マウスが移植後22日目までに瀕死になり、屠殺されなければならないほどであった。それに反して、ALK1-Fc処置マウスは肺腫瘍の成長の実質的遅延を示し、22日目現在で100%の生存を示した。図12を参照されたい。

【0203】

20

これらのデータは、ALK1-Fcが肺癌のマウスモデルにおいて腫瘍成長に実質的な効果を及ぼし、延命効果をもたらすことを実証する。

【0204】

実施例9. 血管新生に及ぼすBMP9および抗BMP9の効果

CAM(ニワトリ緘毛尿膜)アッセイ系を用いて、組換えヒトBMP9(rhB9)および抗BMP9モノクローナル抗体(mabB9)(R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. No. MAB3209)の血管新生効果を評価した。この抗体は、BMP9/ALK1シグナル伝達を中和することが知られている。例えば、Scharpfenecker et al., J Cell Sci. 2007 Mar 15;120(Pt 6):964-72; David et al., (2007); Blood Mar 1;109(5):1953-61; David et al., Circ. Res. 2008 Apr 25;102(8):914-22を参照されたい。

30

【0205】

おそらくは、外因性VEGFの非存在下における血管新生の欠如によって、このアッセイの感度が低下するために、BMP9も抗BMP9も外因性VEGFの非存在下では血管新生に実質的な効果を及ぼさなかった。図13の右側の棒グラフを参照されたい。VEGFの非存在下において、両タンパク質は、5日サイクルの1日目および3日目に、1日に50 ngを1回投与して使用した。しかしながら、VEGFの存在下では、BMP9およびその抗体はいずれも、実質的な抗血管新生効果を及ぼした。図13を参照されたい。これらのデータは、BMP9とVEGFの組み合わせに関して、Scharpfenecker et al.のデータと一致し、またBMP9自体の抗血管新生効果に関して、Scharpfenecker et al.およびDavid et al.の結論と一致する。しかしながら、抗BMP9抗体の効果は、発表された文献とは顕著に対照的である。これらのデータに基づいて、本発明者らは、適切な血管新生には最適なレベルまたは生理学的レベルのBMP9が必要であり得る、およびBMP9の過剰または欠乏が血管新生を阻害すると仮定する。

40

【0206】

興味深いことに、抗BMP9抗体の効果は、ALK1-Fc(別のBMP9アンタゴニストである)もまた血管新生を阻害することを示す、本明細書に示されるデータと一致する。したがって、これらのデータは、ALK1-Fcおよび抗BMP9がそれぞれ抗血管新生効果を有すること、および抗BMP9抗体が、ALK1-Fcが示されるのとほぼ同じように、腫瘍、関節リウマチ、および眼障害などの血管新生障害の治療において有用である可能性が高いことを実証する。

【0207】

MAB3209の抗血管新生活性を前提として、本発明者らは、このマウスモノクローナル抗

50

体をヒト化して、ヒトで使用するための治療薬を提供することができることを提唱する。抗体は、キメラ化、CDR移植、表面再処理(resurfacing)、復帰突然変異、超ヒト化(supernaturalization)、ヒトストリング含有量最適化(human string content optimization)、ならびに経験的方法、例えば、FRライブラリーの作製および選択、FRシャッフリング、およびヒューマニア化(humaneering)などを含む、当技術分野で認識されている種々の技法によりヒト化することができる。例えば、Almagro and Fransson, *Frontiers in Biosciences*, 13: 1619-1633, 2008を参照されたい。

【0208】

実施例10. 乳癌腫瘍モデルに及ぼすALK1-Fc融合タンパク質の効果

mALK1-Fcは、エストロゲン受容体陽性腫瘍細胞(ER+)およびエストロゲン受容体陰性腫瘍細胞(ER-)の両方に由来する乳癌腫瘍細胞株の成長を遅らせるのに効果的であった。

【0209】

腫瘍成長および潜在的転移のインビオ検出を可能にするために、MDA-MB-231乳癌細胞株(ER-細胞に由来)にルシフェラーゼ遺伝子を安定にトランスフェクトした。本研究では、 1×10^6 個のMDA-MB-231-Luc細胞を、胸腺欠損ヌードマウス(Harlan)の乳房脂肪パッドに同所的に移植した。腫瘍進行を、IVIS Spectrum画像化システム(Caliper Life Sciences)を使用して生物発光検出により追跡した。発光(検出された光子の数)の増加は、腫瘍量の増加に対応する。

【0210】

雌のヌードマウス30匹の乳房脂肪パッドに、 1×10^6 個の腫瘍細胞を注射した。腫瘍移植の3日後に、マウスを、皮下(SC)注射によって週に2回、媒体対照またはmALK1-Fc(30 mg/kg)のいずれかで処置した。処置を継続し、腫瘍進行を10週間にわたって生物発光画像法によりモニターした。30 mg/kgでのmALK1-Fc処置により、生物発光検出により判断して、媒体処置対照と比較して腫瘍進行が遅くなった(図14)。mALK1-Fcによる処置は、このモデルにおいて腫瘍成長を遅らせたが、これを回復させなかつた。腫瘍は、継続した成長を支持するための新たな血管形成を必要とするまでは特定のサイズにまで生存可能であり得るという点で、このことは抗血管新生化合物に予測され得る。同様の実験において、hALK1-Fcは、3 mg/kgもの低い用量レベルで、たとえわずかにより少ないとしても、同様の効果をもたらした。

【0211】

エストロゲン受容体陽性(ER+)のルシフェラーゼ発現細胞株であるMCF-7もまた、同所移植モデルにおいて試験した。このモデルでは、雌のヌードマウスの皮下に、17-エストラジオールの60日間徐放性ペレットを移植する。ペレット移植の2日後に、 5×10^6 個のMCF-7腫瘍細胞を乳房脂肪パッドに移植した。マウスを、IP経路により、3、10、および30 mg/kgのhALK1-Fcまたは媒体対照で週に2回処置した。腫瘍進行を、IVIS-Spectrum撮像装置(Caliper Life Sciences)を用いて、生物発光画像法により週ベースで追跡した。媒体処置マウスでは、腫瘍は研究26日目まで急速に進行した(図15)。26日目以降は、60日目の研究の終了時(エストラジオールペレットが枯渇した時点)まで、腫瘍生物発光の変動が認められた。これらの変動は、急速な腫瘍成長が宿主動物の血管新生応答を超えて、腫瘍壊死およびそれに伴う発光シグナルの減少を引き起こし得るという、このモデルの共通の特徴のためである。残りの細胞は成長し続け、シグナルの増加をもたらす。10または30 mg/kgのhALK1-Fcで処置したマウスは、媒体処置対照と比較して、腫瘍サイズを研究期間中に一定レベルで維持することができ、このことから、腫瘍成長に及ぼすこの分子の強力な効果が示される。

【0212】

実施例11. 細胞ベースのアッセイにおけるhALK1-FcによるBMP10シグナル伝達の阻害

ヒト神経膠芽腫T98G細胞に3つのプラスミド:1) 全長ALK1をコードする発現構築物;2) Smad1/5/8媒介性シグナル伝達に応答するホタルルシフェラーゼレポーター構築物(実施例3参照)、および3) ウミシイタケルシフェラーゼ対照構築物をトランスフェクトした細胞ベースのアッセイにおいて、BMP10シグナル伝達に及ぼすhALK1-Fcの効果を決定し

10

20

30

40

50

た。トランスフェクト細胞を組換えヒトBMP10(1 ng/ml)で処理すると、ウミシイタケルシフェラーゼ活性に対して、ホタルルシフェラーゼ活性が強く促進された(図16)。ALK1発現構築物を省略すると、BMP10促進性の活性はおよそ2/3減少し(データは示さず)、したがってこのことから、ALK1がBMP10シグナル伝達の主要なメディエーターであることが示唆される。完全トランスフェクト細胞をhALK1-Fc(65 ng/ml)およびBMP10(1 ng/ml)で処理すると、単独のBMP10と比較して転写応答が80%を超えて減少した(図16)。まとめると、これらの結果から、ALK1がBMP10シグナル伝達の主要なメディエーターであること、およびALK1-Fcがそのようなシグナル伝達を顕著に阻害し得ることが示唆される。

【0213】

実施例13. 786-0腫瘍異種移植モデルにおいてスニチニブの活性を増強するALK-Fc

10

フォンヒッペル・リンダウ(VHL)欠損ヒト腎細胞癌(RCC)細胞株である786-0細胞(Iliopoulos et al., Nature Medicine 1995; 1:822-6を参照されたい)をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection)より入手し、RPMI 1640培地(Cellegro)で培養した。培地には2 mmol/L L-グルタミン、10% FCS、および1%ストレプトマイシン(50 µg/mL)を補充し、細胞は5% CO₂と共に37 °Cで培養した。0.25%トリプシンおよび0.02% EDTAに短時間曝露することにより、786-0細胞をサブコンフルエントな培養物から回収した。10%ウシ胎仔血清を含む培地でトリプシン処理を停止し、細胞を無血清培地で1度洗浄し、PBS中に再懸濁した。>90%の生存度を有する単一細胞からなる懸濁液のみを、注射に使用した。

【0214】

ヒトRCC異種移植片を確立するために、786-0腫瘍細胞を、平均体重20 gである6~8週齢の雌の胸腺欠損ヌード/ベージュマウス(Charles River Laboratories)の側腹部に皮下注射した(1×10⁷個細胞)。マウスの>80%において腫瘍が生じ、腫瘍は通常、移植の数日以内に目で見て明らかとなった。腫瘍が直径12 mmまで成長した時点で、マウスを媒体+Fc、スニチニブ+Fc、媒体+ALK-Fc、またはスニチニブ+ALK-Fcで処置した。スニチニブ(53.6 mg/kg; Pfizer)は、経管栄養の開始により、週7日のうち6日投与した。ALK1-Fc(10 mg/kg)は、腹腔内に週に3回投与した。マウスを処置している間、2日ごとに腫瘍を測定した。

20

【0215】

図18に示されるように、スニチニブ+Fcによる処置により、786-0マウスヒト腫瘍異種移植モデルにおいて腫瘍成長が遅くなった。この効果は、腫瘍をスニチニブ+ALK-Fcで処置した場合にさらに増強され、このことから、腎細胞癌のモデルにおいて、ALK-FCがスニチニブの腫瘍成長阻害活性を増強することが示唆される。

30

【0216】

実施例14. A498腫瘍異種移植モデルにおいて単剤活性を有するALK-Fc

VHL欠損ヒトRCC細胞株であるA498細胞(Iliopoulos et al., Nature Medicine 1995; 1:822-6を参照されたい)をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手し、イーグル最小必須培地で培養した。培地には2 mmol/L L-グルタミン、10% FCS、および1%ストレプトマイシン(50 µg/mL)を補充し、細胞は5% CO₂と共に37 °Cで培養した。0.25%トリプシンおよび0.02% EDTAに短時間曝露することにより、786-0細胞をサブコンフルエントな培養物から回収した。10%ウシ胎仔血清を含む培地でトリプシン処理を停止し、細胞を無血清培地で1度洗浄し、PBS中に再懸濁した。>90%の生存度を有する単一細胞からなる懸濁液のみを、注射に使用した。

40

【0217】

ヒトRCC異種移植片を確立するために、A498腫瘍細胞を、平均体重20 gである6~8週齢の雌の胸腺欠損ヌード/ベージュマウス(Charles River Laboratories)の側腹部に皮下注射した(1×10⁷個細胞)。マウスの>80%において腫瘍が生じ、腫瘍は通常、移植の数日以内に目で見て明らかとなった。腫瘍が直径12 mmまで成長した時点で、マウスをFcまたはALK-Fcで処置した。ALK-Fc(10 mg/kg)は、腹腔内に週に3回投与した。マウスを処置している間、毎日、腫瘍を測定した。

50

【0218】

図19に示されるように、単独のALK-Fcによる処置により、A498マウスヒト腫瘍異種移植モデルにおいて腫瘍成長が劇的に遅くなつたことから、ALK-FCは単剤活性を有する。

【0219】

実施例15. A498腫瘍異種移植モデルにおいても同様にスニチニブの活性を増強するALK-Fc
A498の細胞培養および異種移植片の確立は、実施例14に記載されている通りに実施した。
腫瘍が直径12 mmまで成長した時点で、マウスを媒体 + Fc、スニチニブ + Fc、媒体 + ALK
-Fc、またはスニチニブ + ALK-Fcで処置した。スニチニブ (53.6 mg/kg ; Pfizer) は、経
管栄養の開始により、週7日のうち6日投与した。ALK1-Fc(10 mg/kg)は、腹腔内に週に3回
投与した。マウスを処置している間、毎日、腫瘍を測定した。

10

【0220】

図20に示されるように、スニチニブ + Fcまたは媒体 + ALK-Fcによる処置により、A498腫
瘍異種移植モデルにおいて腫瘍成長が遅くなつた。しかしながら、組み合わせて投与した
場合、ALK-FCは、A498腫瘍成長に対するスニチニブの腫瘍成長阻害活性を実質的に増加させた。

【0221】

参照による組込み

本明細書で言及された出版物および特許はすべて、個々の出版物または特許がそれぞれ
詳細にかつ個別に参照により組み入れられることが示されるがごとく、全体として参照
により本明細書に組み入れられる。矛盾する場合には、本明細書におけるいかなる定義も含
め、本出願が優先する。

20

【0222】

均等物

本発明の特定の態様を本明細書において明確に開示するが、上記の明細書は例示的なものであつて、限定的なものではない。本明細書および添付の特許請求の範囲を再検討すれば、本発明の多くの変形が当業者に明らかとなるであろう。本発明の全範囲は、特許請求の範囲をそれらの均等物の全範囲と共に、および本明細書をそのような変形と共に参考して決定されるべきである。

【 図 1 】

ヒトアクチビン受容体様キナーゼ1(ALK1)のアミノ酸配列

(gi:3915750; SEQ ID NO:1)

1 MTLGSPRKG LMLMVALVTQ GDPV KPSRGV LVTCTSPHCKGPTCRGAW CTVVLRYEEG
61 RHPDTEHRRGG NHFLERCLGR PTEVNTVYCG DSHI NCHNSV LVLATDPPS EPGTGDQJ A
112 LILGVLALL ALVALGVLG WLYRERKQG RGLLSLGEES SUKJNQH DSGM QDLDS
162 DCTTGSGSGL PEVTRVTR QVASELGGK GRYEYGEGL WHGESEV KVF ESSRDEWSF
214 RETHFTV LVLQHNLGEL ASDMSNNS TQWLTHYIPEL HEGSGLDFL R1LPHLPA
301 RLAASVAGA, LALVIEGHV EKTRD FAKRNSVY VLS NCCJADL GLAVM3QGSD
371 YLDINGNNPRV KTRKYMPEAV FDE RTDCE FSKVWTDWA VLS VEWI REAR UTRVNGVED
421 YSPDPEVYDPP NEDPSFEDCA VSCVCDQET JPNNRLADPP LSULQAMMRB C3WPNPSAHL
481 TALRICK LQG KINSSPEKIER VQ

【 図 2 】

ヒトアクチビン受容体様キナーゼ1(ALK1)の核酸配列 (SEQ ID NO:2)

【 図 3 】

ALK1-Fe 融合タンパク質 I (SEQ ID NO:3)

DPVKPSRGPI,VTCTESPHCKGPICTRGAWCTVVLVREEGRHQPEHRRGCGN,HLRE,CGRGPTEFVNHYCCDSHLCNHNVS,VLVLEATQP,SE,PQG,FGDQLATGGGTT,HTC,PPCPAP,ELLGGPSVLFPPPKPDKTLMSIRTP,ETVVF,VV,DVDSHEDPEVKFNWYV,DG,VE,VHNAKT,KPREEQYNS,TRVVS,VLV,TLV,HLNGKEY,KCKVS,NAK,VP,VI,T,ISKAK,GQ,PREP,QTYV,TLPSRF,EM,TKNQSV,TLCKVGFY,PSDIA,EW,V,NSNGO,PNENYY,TKTP,PI,USDGS,FFLYSKLT,VDKRSR,WOQGNV,FS,CS,VM,HEALHN,HYTQ,KS,LSL,SPGK

A

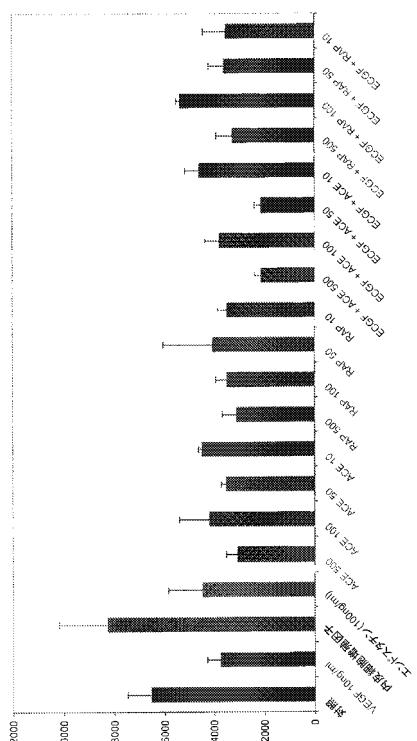
ALK1-Fc 融合タンパク質 II (SEQ ID NO:14)

DPVKPSRGPVTC1CESPHCKGPTCRGAWCTVVLVREEGRHQPEHRCGNLHRELC
RGRPTFVNHYCCDSHICNHNVSLEATQPPSQQGTDGQLATGGTHICPPCAPP
EALGAPSVPFLPPKPKDITMISKTPTEVTCVVVDVSHI;DPEVKFNWVYDGVEVHNK
TKPREEQYNSTYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTSKAKGQPREF
PQVYTLPPSREEMTKNVSLSLTCVLKGYPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
PFLFLYSKLIVDKRSRWWQQGNVVFCSVMHEALIINHYTQKSLSLSPGK

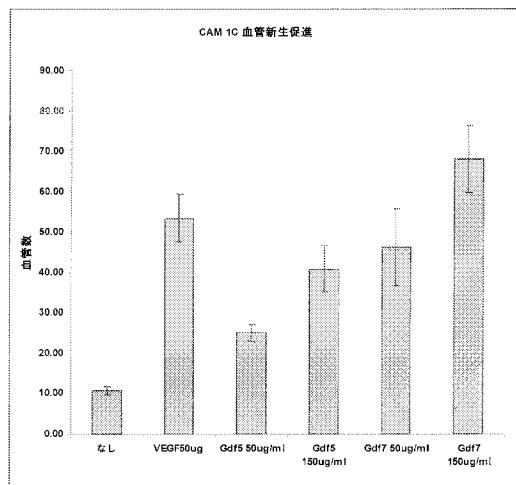
B

〔 図 5 〕

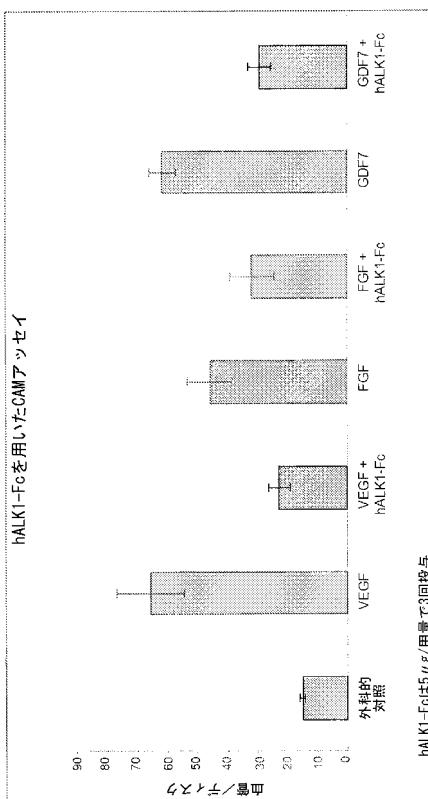
ALK1-Fc発現構築物をコードする核酸配列（核酸配列、SEQ ID NO:4；アミノ酸配列、SEQ ID NO:5）



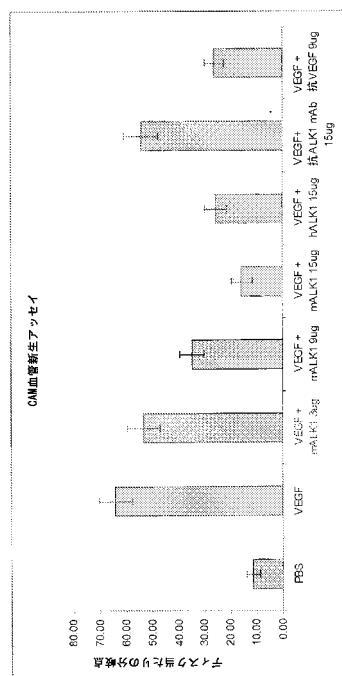
【図6】



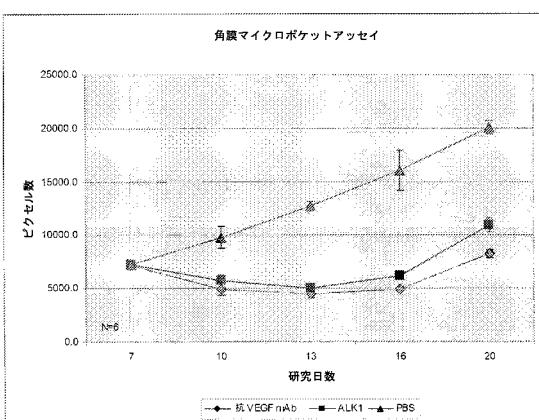
【図7】



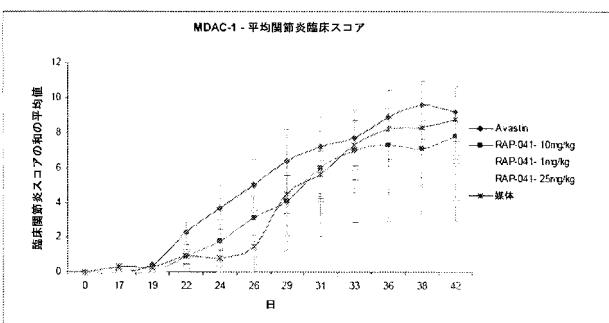
【図8】



【図9】

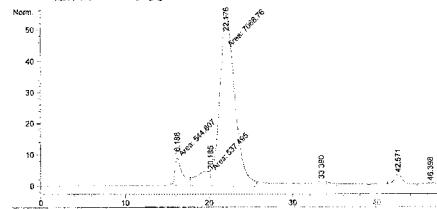


【図10】

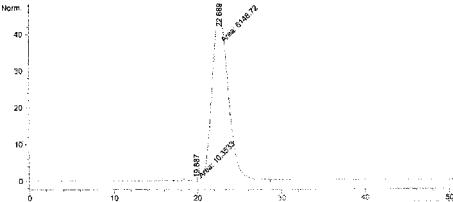


【図 1 1】

R&D Systems からの ALK1-Fc 融合タンパク質

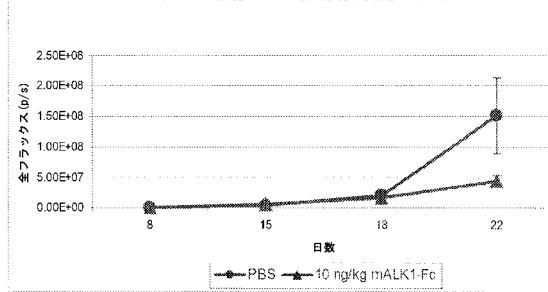


本出願者らによって調製された ALK1-Fc 融合タンパク質

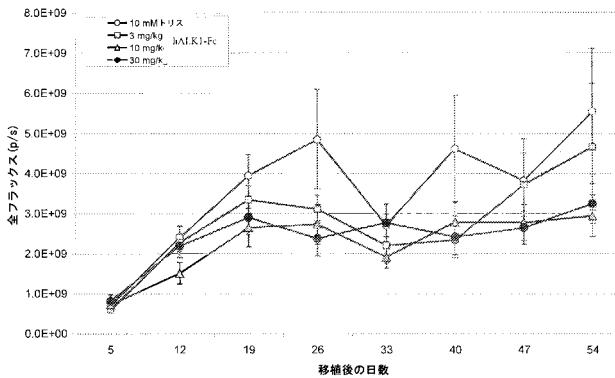


【図 1 2】

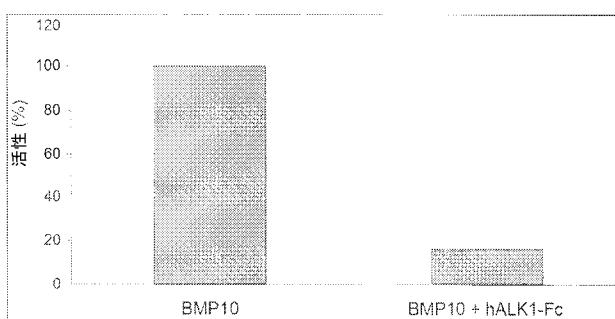
LL/2-Luc 細胞の i.v. 注射 (実験的転移モデル)



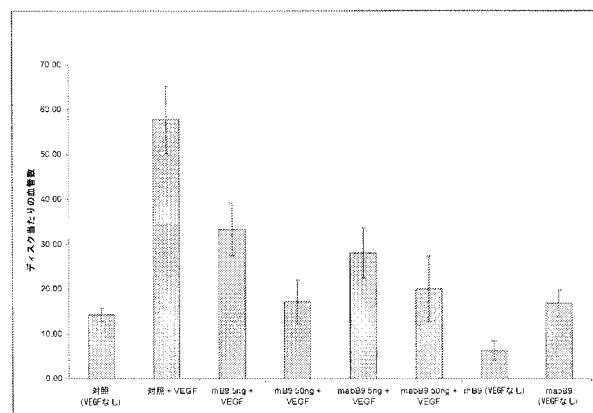
【図 1 5】



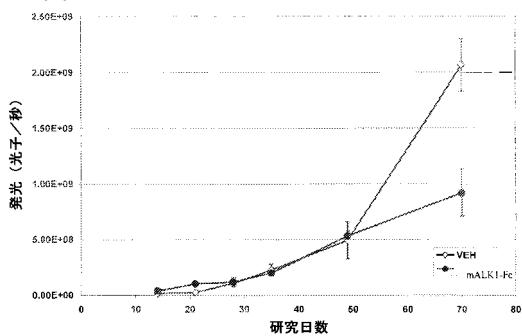
【図 1 6】



【図 1 3】



【図 1 4】

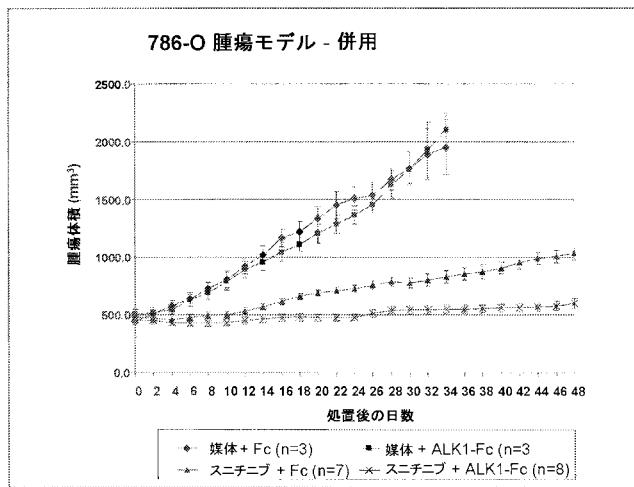


【図 1 7】

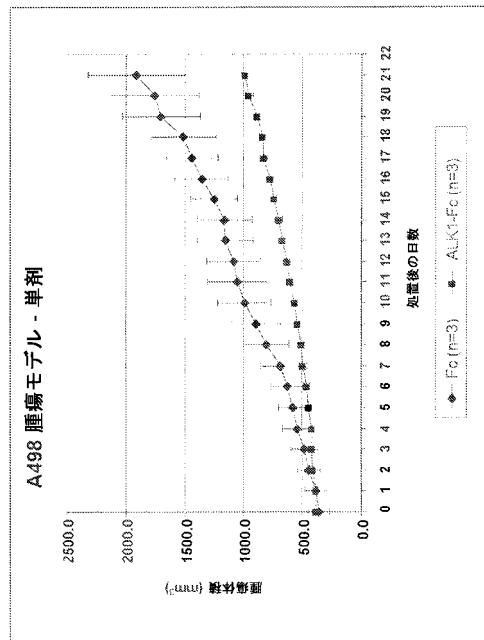
Peptides used in the study:

- bmp10: RSAAGSHCQK CSIRVNFEDI GDSWIIAPK EYEAYPECRG CFFPLADDTV PIKHAIVGTL 60
- bmp10: -NAKGNVCKR TPVLYDEKEI GDSWIIAPK GYEAYPECRG CRYPAEELT PIKHAIVGAL 59
- bmp10: VHLKPTTKVG KACCPPTKLS PISVLYKDM GVPTLYKHE GMSVACGGCR 110
- bmp10: VHLKPTTKVG KACCPPTKLS PISVLYKDM GVPTLYKHE GMSVACGGCR 108

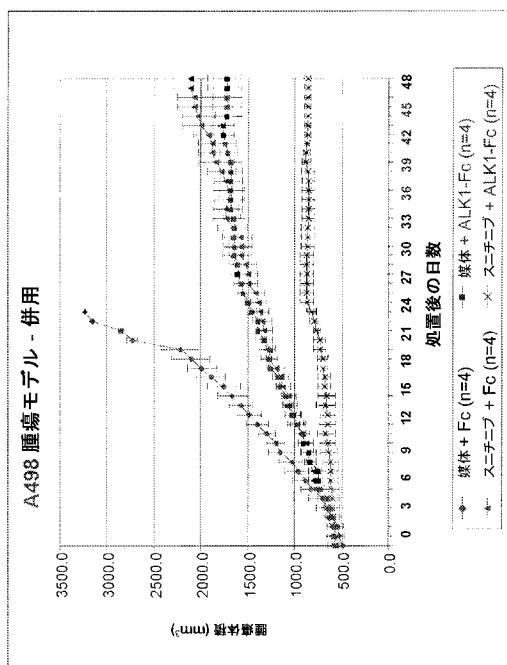
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【配列表】

2015506961000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年1月14日(2015.1.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

受容体チロシンキナーゼ阻害剤(RTKI)、ならびに

(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチドであって、任意で、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列、SEQ ID NO:3の配列またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、かつ任意で、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALK1リガンドに結合する、ALK1ポリペプチド；

(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体であって、任意で、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、かつGDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する、抗体；

(c) ヒトBMP9に結合する抗体であって、任意で、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、かつ受容体に対するBMP9の結合を阻害する、抗体；および

(d) ヒトBMP10に結合する抗体であって、任意で、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、かつ受容体に対するBMP10の結合を阻害する、抗体

より選択される薬剤の組み合わせを含み、哺乳動物が任意で以前に腎細胞癌(RCC)治療薬を受けていたる、腎細胞癌を有する哺乳動物における腎細胞癌治療剤。

【請求項2】

RTKIがスニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブまたはバンデタニブである、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項3】

哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤をさらに含み、mTOR標的阻害剤が、任意でエベロリムスまたはテムシロリムスである、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項4】

腎細胞癌が腎明細胞癌である、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項5】

腎細胞癌が腎洞に浸潤している、腎細胞癌が転移性腎細胞癌である、または腎細胞癌が肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項6】

哺乳動物が以前にRCC治療薬を受けており、該RCC治療薬がRTKIであり、かつ以前に受けた該RTKIが、任意でスニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項7】

哺乳動物が以前にRCC治療薬を受けており、該RCC治療薬が哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤であり、かつ以前に受けたmTOR標的阻害剤が、任意でエベロリムスおよびテムシロリムスより選択される、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項8】

哺乳動物が以前にRCC治療薬を受けており、以前に受けた該RCC治療薬がインターフェロン(IFN-)またはインターロイキン-2(IL-2)である、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項 9】

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンの定常ドメインまたはFc部分をさらに含み、該Fc部分が任意でヒトIgG1のFc部分である、請求項1に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項 10】

RTKIをさらに含み、かつ、該RTKIが任意で、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびパンデタニブより選択される薬剤である、請求項1～9のいずれか一項に記載の腎細胞癌治療剤。

【請求項 11】

mTOR標的阻害剤をさらに含み、かつ、該mTOR標的阻害剤が任意で、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である、請求項1～9のいずれか一項に記載の腎細胞癌治療剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

いくつかの態様において本発明は、ALK1シグナル伝達系の阻害剤（例えば、ALK1-Fc）の有効量をそれを必要とする哺乳動物に投与する段階を含む、哺乳動物における血管新生を阻害する方法を提供する。腫瘍の血管新生を阻害することが望ましい場合には、該薬剤は任意に、化学療法剤または生物学的抗癌剤などの、抗癌効果を有する第2の薬剤と共に投与される。さらなる局面において、該薬剤はMTOR（哺乳類ラバマイシン標的タンパク質）阻害剤と共に投与される。いくつかの態様において、本発明の方法は、腫瘍、抗VEGF療法に抵抗性である腫瘍、多発性骨髄腫腫瘍、および肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移した腫瘍からなる群より選択される血管新生関連疾患を治療するために用いられる。

[本発明1001]

腎細胞癌(RCC)を有する哺乳動物に、受容体チロシンキナーゼ阻害剤(RTKI)、ならびに

- (a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；
- (b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；
- (c) ヒトBMP9に結合する抗体；および
- (d) ヒトBMP10に結合する抗体

より選択される薬剤の有効量を投与する段階を含む、哺乳動物におけるRCCを治療する方法。

[本発明1002]

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、かつALK1ポリペプチドが、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALK1リガンドに結合する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む、本発明1002または1003の方法。

[本発明1005]

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンのFc部分をさらに含む、本発明1002または1003の方法。

[本発明1006]

Fc部分がヒトIgG1のFc部分である、本発明1005の方法。

[本発明1007]

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

(b)の抗体が、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する、本発明1001の方法。

[本発明1009]

(c)の抗体が、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する、本発明1001の方法。

[本発明1010]

(d)の抗体が、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する、本発明1001の方法。

[本発明1011]

RTKIがスニチニブである、本発明1001の方法。

[本発明1012]

RTKIがソラフェニブである、本発明1001の方法。

[本発明1013]

RTKIがパゾパニブである、本発明1001の方法。

[本発明1014]

RTKIがアキシチニブである、本発明1001の方法。

[本発明1015]

RTKIがチボザニブまたはバンデタニブである、本発明1001の方法。

[本発明1016]

哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤を投与する段階をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1017]

mTOR標的阻害剤がエベロリムスである、本発明1016の方法。

[本発明1018]

mTOR標的阻害剤がテムシロリムスである、本発明1016の方法。

[本発明1019]

RCCが腎明細胞癌である、本発明1001～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

RCCが腎洞に浸潤している、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

RCCが転移性RCCである、本発明1001～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

RCCが肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している、本発明1001～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

以前にRCC治療薬を受けた哺乳動物における腎細胞癌を治療する方法であって、

(a) ALK1の細胞外ドメインのリガンド結合部分を含むALK1ポリペプチド；

(b) ヒトALK1の細胞外ドメインに結合する抗体；

(c) ヒトBMP9に結合する抗体；および

(d) ヒトBMP10に結合する抗体

より選択される薬剤の有効量を該哺乳動物に投与する段階を含む、方法。

[本発明1024]

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、かつALK1ポリペプチドが、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるALK1リガンドに結合する、本発明1023の方法。

[本発明1025]

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～120の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、本発明1023の方法。

[本発明1026]

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンの定常ドメインをさらに含む、本発明1024または1025の方法。

[本発明1027]

ALK1ポリペプチドが免疫グロブリンのFc部分をさらに含む、本発明1024または1025の方法。

[本発明1028]

Fc部分がヒトIgG1のFc部分である、本発明1027の方法。

[本発明1029]

ALK1ポリペプチドが、SEQ ID NO:3またはSEQ ID NO:14の配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1023の方法。

[本発明1030]

(b)の抗体が、SEQ ID NO:1のアミノ酸22～118の配列内のエピトープに結合し、GDF5、GDF6、GDF7、BMP9、およびBMP10より選択されるリガンドの結合を阻害する、本発明1023の方法。

[本発明1031]

(c)の抗体が、SEQ ID NO:12のアミノ酸1～111の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP9の結合を阻害する、本発明1023の方法。

[本発明1032]

(d)の抗体が、SEQ ID NO:13のアミノ酸1～108の配列内のエピトープに結合し、受容体に対するBMP10の結合を阻害する、本発明1023の方法。

[本発明1033]

以前に受けたRCC治療薬がRTKIである、本発明1023～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

RTKIが、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される、本発明1033の方法。

[本発明1035]

以前に受けたRCC治療薬が哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mTOR)標的阻害剤である、本発明1023～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

mTOR標的阻害剤が、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である、本発明1035の方法。

[本発明1037]

以前に受けた治療薬がインターフェロン(IFN-)またはインターロイキン-2(IL-2)である、本発明1023～1034のいずれかの方法。

[本発明1038]

RTKIを投与する段階をさらに含む、本発明1023～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

RTKIが、スニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブ、アキシチニブ、チボザニブ、およびバンデタニブより選択される薬剤である、本発明1038の方法。

[本発明1040]

mTOR標的阻害剤を投与する段階をさらに含む、本発明1023～1037のいずれかの方法。

[本発明1041]

mTOR標的阻害剤が、エベロリムスおよびテムシロリムスより選択される薬剤である、本発明1040の方法。

[本発明1042]

RCCが腎細胞癌である、本発明1023～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

RCCが腎洞に浸潤している、本発明1042の方法。

[本発明1044]

RCCが転移性RCCである、本発明1023～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

RCCが肺、腹腔内リンパ節、骨、脳、または肝臓に転移している、本発明1023～1044のいずれかの方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 13/24510
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/00, A61K 38/16; A61K 31/40 (2013.01) USPC - 514/19.3, 514/21.2, 514/414 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/19.3, 514/21.2, 514/414		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/1.1, 514/7.5, 530/350, 436/86, 548/468		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google, Google Scholar: renal cell carcinoma, RCC, receptor tyrosine kinase inhibitor, RTKI, ALK1, BMP9, BMP10, GDF5, GDF6, GDF7, sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, tivozanib, vandetanib, rapamycin, mTOR, everolimus, temsirolimus, Fc fusion, metastatic RCC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Motzer, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. <i>J Clin Oncol.</i> 2009, 27(22):3584-3590	1, 11
Y	Cunha, et al. Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis. <i>J Exp Med.</i> 2010, 207(1):85-100	1-7, 11, 23-29
Y	Escudier, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. <i>N Engl J Med.</i> 2007, 356(2):125-34.	1-7, 23-29
Y	US 2008/0175844 A1 (Grinberg, et al.) 24 July 2008 (24.07.2008) Abstract, claims 1-6, 13-22	2-7, 24-29
A	Cho, et al. Future Directions in Renal Cell Carcinoma: 2011 and Beyond. <i>Hematol Oncol Clin North Am.</i> 2011, 25(4): 917-935	1-7, 11, 23-29
A	Cunha, et al. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. <i>Blood</i> 2011, 117(26):6999-7006	1-7, 11, 23-29
A	Bertolini, et al. Anti-VEGF and beyond: shaping a new generation of anti-angiogenic therapies for cancer. <i>Drug Discov Today</i> <i>Epub</i> 22 August 2011, 16(23-24):1052-1060	1-7, 11, 23-29
A	Pircher, et al. Biomarkers in tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. <i>Int J Mol Sci.</i> 2011, 12(10):7077-99	1-7, 11, 23-29
A	Elfiky, et al. Novel molecular targets for the therapy of renal cell carcinoma. <i>Diagn Med.</i> 2012, 13(73):461-71	1-7, 11, 23-29
<input checked="" 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 01 June 2013 (01.06.2013)	Date of mailing of the international search report 19 JUN 2013	
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 PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/24510

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0017019 A1 (Shields, et al.) 15 January 2009 (15.01.2009) para [0015], [0123], [0347], [0348], Fig 3D; SEQ ID NO:4	1-7, 11, 23-29
A	WO 2011/127519 A1 (BALDWIN) 20 November 2011 (20.10.2011)	1-7, 11, 23-29
X,P	Nolan-Stevaux, et al. Beyond VEGF: The NOTCH and ALK1 Signaling Pathways as Tumor Angiogenesis Targets. 02 July 2012. [Retrieved from the Internet 25 March 2013: < http://cdn.intechopen.com/pdfs/28601/nTech-Beyond_vegf_the_notch_and_alk1_signaling_pathways_as_tumor_angiogenesis_targets.pdf >]	1-7, 11, 23-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/24510

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 19-22, 33-45 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I+: claims 1-18, 23-32 drawn to a method of treating renal cell carcinoma (RCC) in a mammal, comprising administering to a mammal that has RCC an effective amount of a receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKI) and an agent. The first invention (claims 1-6, 7, 11, 23-29) is restricted to the first RTKI, sunitinib (claim 11) and the first agent, ALK1 polypeptide, of SEQ ID NO: 1 (the first sequence and the first ligand in claim 2). Should an additional fee be paid, Applicant is invited to elect an RTKI and an additional agent to be searched. An exemplary election is RTKI sunitinib and agent SEQ ID NO: 1. Exact claims to be searched will depend on the election. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" groups will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-7, 11, 23-29, restricted to the first RTKI, sunitinib (claim 11) and the first agent, ALK1 polypeptide, of SEQ ID NO: 1 (the first sequence and the first ligand in claim 2)

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/24510

***** Supplemental Sheet *****

In Continuation of Box III. Observations where unity of invention is lacking:

The inventions of Group I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

The special technical feature of each invention of Group I+ is the specific combination of a specific RTKI and a specific agent. The inventions of Group I+ do not share this technical feature because no significant structural similarities can readily be ascertained among specific RTKIs and specific agents or combinations thereof, i.e. any one of RTKI together with any one of: (a) any one of ALK1 polypeptides comprising a ligand binding portion of the extracellular domain of ALK 1, (b) any one of antibodies that bind to the extracellular domain of human ALK 1; (c) any one of antibodies that bind to human BMP9; and (d) any one of antibodies that binds to human BMP10.

Common Technical Features

The inventions of Group I+ share the technical feature of a method of treating RCC comprising administering an effective amount of an RTKI and an agent. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art as being obvious over an article titled "Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma" by Escudier, et al. (N Engl J Med. 2007, 356(2):125-34) (hereinafter "Escudier"), in view of an article titled "Genetic and pharmacological targeting of activin receptor-like kinase 1 impairs tumor growth and angiogenesis" by Cunha, et al. (J Exp Med. 2010, 207(1):85-100) (hereinafter "Cunha") as follows:

Escudier teaches a method of treating renal cell carcinoma (RCC) in a mammal (Abstract) comprising administering to a mammal that has RCC an effective amount of a RTKI (Abstract). Escudier does not disclose co-administering to the mammal an ALK1 polypeptide. Cunha discloses administering to a mammal an ALK1 polypeptide comprising a ligand binding portion of the extracellular domain (pg 91, col 1, pg 92, col 1 - Fig. 4 c; RAP-041, P< 0.05; pg 88, col 2- Fc portion of IgG1, BMP9 and BMP10 are high-affinity ligands for ALK1, Fig. 3 d). Accordingly, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to combine Escudier and Cunha by co-administering sorafenib of Escudier and RAP-041 of Cunha to treat RCC, because Cunha specifically suggests supplementing targeting tumors by multireceptor tyrosine kinase inhibitors with a complementary anti-angiogenic therapy (pg 85, col 1 to col 2) and further discloses that "[t]reatment with RAP-041 impairs tumor angiogenesis in vivo" (pg 92, col 1).

As the common technical feature would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Inventions of Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 31/44 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 K 31/4439 (2006.01)	A 6 1 K 31/404	
A 6 1 K 31/4709 (2006.01)	A 6 1 K 31/44	
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/4439	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 K 31/4709	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
	C 0 7 K 16/00	
	C 0 7 K 19/00	
	C 1 2 N 9/12	
	C 1 2 N 9/99	

(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, RU, TJ, 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, RO, 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, BN, 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, HU, 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, PA, 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

(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
(74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
(74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 バット ルパル エス .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ロスリンデール パインデール ロード 31

(72)発明者 クマール ラヴィンドラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アクトン アーリントン ストリート 421

(72)発明者 ミエル ジェームス ダブリュ .
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックリン ジョン ストリート 26

(72)発明者 ピアサル ロバート
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウォバーン バード ストリート 21

(72)発明者 シャーマン マシュー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン ジャネット ロード 33

(72)発明者 ソルバン ニコラス
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブライトン リッチフィールド ストリート 77

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA10 BA61 CA07 DA02 EA04
4B050 CC05 DD11 LL01
4C084 AA02 AA19 BA02 BA22 CA18 CA23 DC32 MA16 MA22 MA23
MA35 MA55 MA66 MA67 NA14 ZA812 ZB262 ZC202 ZC751
4C085 AA13 AA33 BB11 BB31 BB36 BB42 CC23 EE03 GG02 GG04
4C086 AA01 AA02 AA03 BC12 BC13 BC17 BC28 BC45 CB22 GA07
MA02 MA04 NA14 ZA81 ZB26 ZC20 ZC75
4H045 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA89 EA28 FA74