

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3684371号
(P3684371)

(45) 発行日 平成17年8月17日(2005.8.17)

(24) 登録日 平成17年6月10日(2005.6.10)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 38/00

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 14 (全 19 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平9-523831 (86) (22) 出願日 平成8年12月13日(1996.12.13) (65) 公表番号 特表2002-502359(P2002-502359A) (43) 公表日 平成14年1月22日(2002.1.22) (86) 国際出願番号 PCT/US1996/020447 (87) 国際公開番号 W01997/023500 (87) 国際公開日 平成9年7月3日(1997.7.3) 審査請求日 平成12年6月30日(2000.6.30) (31) 優先権主張番号 60/008,519 (32) 優先日 平成7年12月13日(1995.12.13) (33) 優先権主張国 米国(US) (31) 優先権主張番号 08/763,528 (32) 優先日 平成8年12月12日(1996.12.12) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 500468711 ザ チルドレンズ メディカル センター コーポレーション アメリカ合衆国, 02115 マサチュー セッツ, ボストン, ロングウッド アベニ ュー 300番地 (73) 特許権者 300039672 アボット・ラボラトリーズ ABBOTT LABORATORIES アメリカ合衆国 イリノイ州 60064 アボット パーク ABBOTT PARK, ILLINOI S 60064 U. S. A. (74) 上記1名の代理人 100100549 弁理士 川口 嘉之</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 内皮細胞増殖阻害剤およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

内皮細胞の増殖を抑制する量の単離されたプラスミノーゲン分子のクリングル5ペプチドのアミノ酸配列を有するタンパク質、及び医薬的に許容されるキャリアを含む、血管新生を抑制するための医薬組成物。

【請求項2】

前記タンパク質は80アミノ酸を含む請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記タンパク質は14kDの分子量を有する請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記プラスミノーゲンはヒトプラスミノーゲンである請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記タンパク質はSEQ ID NO:1のアミノ酸配列を有する請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項6】

前記タンパク質はSEQ ID NO:6のアミノ酸配列を有する請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

前記タンパク質は内皮細胞の増殖を抑制する能力を有する請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項8】

医薬として使用される請求項1～7のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のタンパク質の、個体内で内皮細胞の増殖を抑制するための医薬の製造における使用。

【請求項 1 0】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のタンパク質の、血管新生が関与する疾患を有する個体に対する治療薬の製造における使用。

【請求項 1 1】

前記個体がヒトである、請求項 9 又は 10 の使用。

【請求項 1 2】

血管新生が関与する疾患が癌である、請求項 10 の使用。

【請求項 1 3】

血管新生が関与する疾患が固形腫瘍である、請求項 12 の使用。

【請求項 1 4】

インビトロにおいて内皮細胞の増殖を抑制する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のタンパク質を内皮細胞に投与することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

この発明は国立衛生研究所の助成金 P01 - CA45548 の援助を受けてなされたものである。米
国政府は本願発明において一定の権利を保有しうる。

発明の分野

本発明は新規な内皮細胞増殖阻害剤に関する。この阻害剤は血管形成関連疾患を阻害し血管形成 (angiogenesis) のプロセスを調節することができる。さらに、本発明は体液サンプル中に存在する阻害剤を定量する診断分析およびキット、阻害剤の位置を決定する組織化学的キット、阻害剤をコードする DNA 配列および阻害剤の生合成および分解を監視するための分子プローブ、阻害剤に特異的な抗体、阻害剤のレセプターに対するペプチド作用薬および拮抗薬の発明、抗阻害剤レセプター特異抗体作用薬および拮抗薬、および阻害剤に結合させた細胞毒薬剤に関する。

発明の背景

本明細書では「血管形成」とは組織または器官への新しい血管の生成を指し、内皮細胞の増殖も含む。通常の生理学的状態では、ヒトおよび動物は非常に特異的な限定された状況でしか血管形成を行わない。たとえば、創傷の癒合、胎児および胎芽の発育および黄体、子宮内膜および胎盤の形成において血管形成が認められる。「内皮」とは漿膜腔、リンパ管、および血管に沿って並ぶ扁平な上皮細胞の薄層を指す。

コントロールされた血管形成もコントロールされていない血管形成も同じように進行すると考えられている。基底膜に取り囲まれた内皮細胞および周皮細胞は毛細血管を形成する。内皮細胞および白血球が放出した酵素により基底膜が浸食されて血管形成が始まる。次いで、血管の内腔に沿って並ぶ内皮細胞が基底膜から突き出す。血管形成刺激剤が内皮細胞を浸食された基底膜をへて移行させる。移行した細胞が元の血管から離れた芽となり、そこで内皮細胞は有糸分裂および増殖する。内皮細胞の芽は互いにつながって毛細管係蹄を形成し、新しい血管をつくる。

多くの疾患、腫瘍の転移および内皮細胞による異常な生育において持続性の制御できない血管形成が起こり、これらの状況に見られる病理学的損傷を支持する。制御できない血管形成が起こる多くの病理学的疾患は血管形成依存性疾患と血管形成関連疾患とに分類される。

腫瘍の成長は血管形成依存性であるという仮説が最初に提唱されたのは 1971 年である (Folkman J., Tumor angiogenesis: Therapeutic implications., N. Engl. Jour. Med. 285: 1182 - 1186, 1971)。簡潔に説明すると、「腫瘍」の「take」が始まると腫瘍細胞の増殖に先立って新しい毛細管が腫瘍の上に集中して形成される。腫瘍の take とは現在では、腫瘍細胞の群落が数立方ミリメートルをしめ数百万個以下であり宿主の微細血管に生育できる腫瘍の成長の前血管相を指すと理解されている。この相以上に腫瘍の大きさが拡大するためには新しい毛細血管の導入が必要である。例えばマウスの初期前血管相における肺転移は組織学的切片を高分解能の顕微鏡で観察しなければ認められなかった。

10

20

30

40

50

この仮説を支持する間接的証拠の例は以下のものを含む。

(1) マウス皮下透明腔に移植した腫瘍の成長速度は血管新生前は遅く直線的であるが、血管新生後は指数関数的に速くなる (Algire GHら、Vascular reactions of normal and malignant tumors in vivo.I.Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants.J.Natl.Cancer Inst,6:73 - 85,1945)。

(2) 血管が増殖していない単離し灌流した器官に成長した腫瘍は1~2mm³にとどまっているがマウスに移植し血管新生が行われると急速に1,000倍以上の大きさに成長する (Folkman J.ら、Tumor behavior in isolated perfused organs:In vitro growth and metastasis of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segments.Annals of surgery 164:491 - 502,1966)。

(3) 無血管角膜における腫瘍の成長は遅く一次関数的であるが、血管新生後は指数関数的に成長する (Gimbrone,M.A.,Jr.らTumor growth and neovascularization:An experimental model using the rabbit cornea.J.Natl.Cancer Institute 52:41 - 427,1974)。

(4) ウサギ眼前腔の体液に懸濁した腫瘍は生存し、無血管で1mm³以下の大きさである。これを虹彩血管床に移植すると血管新生を開始して急速に成長し、2週間以内に移植時の容量の16,000倍に達する (Gimbrone MA Jr.ら、Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization.J.Exp.Med.136:261 - 276)。

(5) 腫瘍をヒヨコ胚漿尿膜に移植すると72時間までの無血管相では生育が遅く、平均直径が0.93+0.29mm以下である。血管新生を開始すると24時間以内に急速に腫瘍が拡大し、血管新生した腫瘍は7日目までに平均直径が8.0+2.5mmに達する (Kinighton D.,Avascular and vascular phases of tumor growth in the chick embryo.British J.Cancer,35:347 - 356,1977)。

(6) ウサギ肝に転移した血管円柱は転移部の大きさが不均一であるが、血管新生が行われている部位では比較的均一な切断部位を示す。腫瘍は直径1mmまでは無血管であるが1mmを超えると血管新生する (Lien W.ら、The blood supply of experimental liver metastases.II.A microcirculatory study of normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused siliconerubber.Surgery 68:334 - 340,1970)。

(7) 癌腫が脾臓のランゲルハンス島の細胞に発生したトランスジェニックマウスにおいて、血管新生前は過形成の島の大きさは1mm以下である。6~7週目に島の4~10%が血管新生を開始し、血管新生前の島より1,000倍以上大きい血管新生した腫瘍が出現する (Folkman J.ら。Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia.Nature 339:58 - 61,1989)。

(8) VEGF(血管内皮成長因子)に対する特異的な抗体は、微細血管密度を減少させ、VEGFを血管形成の唯一の伝達物質とする3つのヒトの腫瘍の成長を(ヌードマウスにおいて)重大にまたは劇的に阻害する。この抗体はインビトロ(in vitro)では腫瘍細胞の成長を阻害しない (Kim K Jら、Inhibition of vascular endothelial growth factor - induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo.Nature 362:841 - 844,1993)。

(9) 抗bFGFモノクローナル抗体は、bFGFを血管形成の唯一の伝達物質とし、bFGFの分泌に依存するマウス腫瘍の成長を70%阻害する。この抗体はin vitroでは腫瘍細胞の成長を阻害しない (Hori Aら、Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor.Cancer Research,51:6180 - 6184,1991)。

(10) bFGFの腹膜組織内注射により腫瘍毛細管内皮細胞の成長を刺激し初期腫瘍およびその転移部の成長が増強される。腫瘍細胞自体はbFGFに対するレセプターを持たず、bFGFはin vitroで腫瘍細胞に対する分裂誘発因子ではない (Gross JLら、Modulation of solid tumor growth in vivo by bFGF,Proc.Amer.Assoc.Canc.Res.31:79,1990)。

(11) 特異的な血管形成阻害剤 (AGM - 1470) はインビボ(in vivo)で腫瘍の成長および転移を阻害するが、in vitroでは腫瘍細胞の増殖に対する阻害活性が低い。この阻害剤は腫瘍細胞の増殖を阻害する濃度より半最大限4ログ低い濃度で血管内皮細胞増殖を阻害する (Ingber Dら、Angioinhibins:Synthetic analogues of fumagillin which inhibit an

10

20

30

40

50

giogenesis and suppress tumor growth. Nature, 48:555 - 557, 1990)。また腫瘍の成長は血管形成に依存することを示す間接的な臨床上の証拠もある。

(12) 硝子体に転移したヒト網膜芽は生育可能で³Hチミジンを組み込むにも関わらず無血管の球形に成長し大きさは1mm³以下であった(摘出眼から除去し*in vitro*で分析した)。

(13) 卵巣癌種は腹膜に小さな無血管の白色種として転移する(1 - 3mm³)。1つ以上の移植片で血管新生を開始しなければこれ以上拡大することはまれである。

(14) 乳ガン(Wiedner N.ら、Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive breast carcinoma. N. Engl. J. Med. 324:1 - 8, 1991, および Weidner N.ら、Tumor angiogenesis: A new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma, J. Natl. Cancer Inst. 84:1875 - 1887, 1992) および前立腺癌(Wieder N., Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W., Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. American Journal of Pathology, 143(2):401 - 409, 1993)はその後の転移のリスクとの相関が高い。

(15) ヒト皮膚メラノーマは血管新生前に転移することは稀である。血管新生を開始すると病巣の厚さが増大し転移のリスクが高まる(Srivastava A.ら、The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate thickness (0.76 - 4.0mm thick) skin Melanoma. Amer. J. Pathol. 133:419 - 423, 1988)。

(16) 膀胱癌において、細胞学的所見よりも血管形成ペプチドであるbFGFの尿中濃度により疾患の状態および程度が高感度で示される(Nguyen M.ら、Elevated levels of angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in urine of bladder cancer patients. J. Natl. Cancer Inst. 85:241 - 242, 1993)。

このように血管形成が癌の転移において主要な役割を果たしていることは明らかである。この血管形成能を抑制または消失させることができれば、または制御または調節できれば、腫瘍が存在しても成長しないであろう。疾病に罹患した状態であれば、血管形成の抑制により新しい微細血管の侵入による損傷を避けることができると考えられる。血管形成の過程を抑制する治療法がこれらの疾患の撲滅または軽減につながると考えられる。

そのために必要とされているのは、好ましくない血管の増殖のような内皮細胞の増殖、特に腫瘍への増殖を阻害できる組成物および方法である。また、この組成物を検出、測定および位置決定する方法も必要である。この組成物は転移前の腫瘍の内因性成長因子の活性を克服して腫瘍中の毛細管の形成を防止することにより腫瘍の成長を阻害する。この組成物、組成物の断片、および組成物に特異的な抗体も創傷癒合および再生のような他の血管形成過程における毛細管の形成を調節することができる。この組成物および血管形成を阻害する方法は好ましくは毒性がなく副作用が少ないものである。組成物の結合部位および組成物の生合成部位を検出、測定および位置決定する方法も必要である。この組成物および組成物の断片は放射活性のある標識化および放射不活性な標識化のために他の分子と結合できる。

発明の概要

本発明は単離したプラスミノゲンクリングル5部位を用いて内皮細胞増殖活性を阻害する方法を包含する。阻害活性を持つ単離したクリングル5ペプチド断片は以下に示す約80のアミノ酸配列を含む。

CMFGNGKGYRGKRATTVTGTTCQDWAQEPHRHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKLYDYCDVPQ
SEQ ID NO:1ここで

C = Cys Y = Tyr D = Asp

M = Met R = Arg W = Typ

F = Phe T = Thy H = His

G = Gly V = Val S = Ser

N = Asn P = Pro I = Ile

K = Lys Q = Gln A = Ala

E = Glu L = Leu

本発明の内皮細胞増殖ペプチドはヒトプラスミノゲンの約462のアミノ酸から始まり約8

10

20

30

40

50

0のアミノ酸に伸びるヒトプラスミノゲン由来のペプチド断片と一致する。

本発明は阻害ペプチドの体液中の存在または欠損を検出し、内皮細胞の増殖を制御するために治療上有効な量の組成物を必要とする患者にこのペプチドまたはこのペプチドに特異的に結合する抗体を投与する診断法および治療法を包含する。さらにこの阻害ペプチドはインビトロ (in vitro) の増殖内皮細胞培養液とともにペプチドの阻害効果を緩和するための化合物試験、すなわち内皮細胞増殖の阻害を克服または逆転することのできる他の組成物のスクリーニングに用いることができる。

よって本発明の目的はヒトプラスミノゲンの462のアミノ酸から始まるクリングル5にほぼ対応する約80のアミノ酸のペプチド断片を含む内皮細胞増殖阻害剤を含む組成物を提供することである。

10

本発明の他の目的は内皮細胞増殖、特に血管形成を仲介とする疾患および過程を処置する方法を提供することである。

さらに本発明の他の目的は体液または組織中の阻害剤の存在または量を検出するための診断または予知する方法およびキットを提供することである。

さらに本発明の他の目的は、血管腫、固形腫瘍、白血病、転移、毛細管拡張、乾せん、強皮症、血管拡張性肉芽腫、心筋血管形成、プラーク血管新生、冠副側、脳副側、動静脈奇形、虚血性肢血管新生、角膜疾病、皮膚潮紅、血管新生緑内障、糖尿病性網膜症、後水晶体繊維増殖症、関節炎、糖尿病性血管新生、黄斑変性、創傷癒合、消化性潰瘍、Helicobacter関連疾患、骨折、ケロイド、血管新生、造血、排卵、月経、胎盤形成、およびネコひっかき熱を含むがこれらに限定されない疾患および血管形成に仲介された過程を処置するための方法および組成物を提供することである。

20

本発明の他の目的はガンの成長を処置または抑制するための組成物を提供することである。

本発明の他の目的は本発明の阻害剤をインビボ (in vivo) またはインビトロ (in vitro) で生産する酵素活性の生産を調節または模倣する組成物を提供することである。

さらに本発明の目的はこのような処置を必要とするヒトまたは動物に阻害剤のDNAを直接注入する阻害剤または抗阻害剤抗体を提供することである。

本発明の他の目的は体液中の阻害剤に特異的な抗体の存在を検出および定量する方法を提供することである。

本発明の他の目的はガンを検出または予後するための方法を提供することである。

30

本発明の他の目的はin vivoおよびin vitroで阻害剤結合部位を映像化または定量するために用いる組成物を提供することである。

本発明の他の目的は阻害剤の生合成の検出または定量に用いる組成物を提供することである。

本発明の他の目的は副作用が非常に軽微なガンの治療法を提供することである。

本発明の他の目的は本発明の内皮細胞増殖阻害剤または細胞毒性を持つ薬剤に結合したペプチド断片を含む組成物を提供することである。

本発明の他の目的は阻害剤に関連した組成物を特定の部位に輸送するための方法を提供することである。

本発明の他の目的は血管形成過程のような内皮細胞増殖を調節する遺伝子治療に有用な組成物および方法を提供することである。

40

個々に示した目的および他の目的、本発明の特徴および利点は以下に詳細に述べ開示した実施例および添付したクレームを吟味すれば明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

図1は、細胞に添加した、ヒトプラスミノゲンより単離したクリングル5ペプチド断片の濃度に対する、内皮細胞増殖の阻害を細胞数のパーセントの変化で示したものである。

図2はヒトプラスミノゲンから分離したクリングル5ペプチド断片調製品のゲル電気泳動である。レーン1は単離したクリングル、レーン2は分子量マーカーである。

図3はヒトプラスミノゲンのクリングル1,2,3,4および5のアミノ酸組成である (SEQ ID NOS:2-6)。

50

図4はアミノカルボン酸(AMCHA)を添加したまたは添加していないヒトプラスミノゲンクリングル5の抗内皮細胞増殖活性を示し、リジン結合部位はクリングル5の抗内皮細胞増殖活性の原因ではないことを示している。

図5は組み換えクリングル5のウシ内皮細胞増殖に対する阻害効果を示す。

発明の詳細な説明

本発明では内皮細胞増殖を阻害し血管形成を調節し、好ましくない血管形成、特に腫瘍の成長に関連した血管形成を阻害するために有効な組成物および方法を提供する。本発明はヒトプラスミノゲンのクリングル5由来の約80のアミノ酸配列を特徴とする内在性増殖阻害タンパク質を含む。阻害剤のアミノ酸配列は種によってわずかに異なる。活性を持つ阻害剤のアミノ酸数は異なり、内皮阻害活性を有する非常に相同性の高いアミノ酸配列も本発明に含まれると考えられることがわかる。

10

本発明は、好ましくない内皮細胞の増殖が認められるヒトまたは動物にインビトロ(in vitro)で内皮細胞増殖を阻害することのできるヒトプラスミノゲンのクリングル5を含む組成物を投与することによって血管形成のような好ましくない制御されていない内皮細胞増殖により仲介された疾患および過程を処置する方法および組成物を提供する。好ましくは単離されたタンパク質の純度は少なくとも約80%であり、より好ましくは約90%の純度であり、さらに好ましくは少なくとも約95%の純度である。本発明は特には腫瘍の成長の処置または抑制に有用である。血管新生前の転移腫瘍を持つヒトまたは動物への阻害剤の投与は腫瘍の成長または拡大の抑制に有用である。

また、本発明は内皮細胞増殖阻害剤をコードするDNA配列、内皮細胞増殖阻害剤をコードするDNA配列を含む発現ベクター、阻害剤をコードするDNA配列を含む1つ以上の発現ベクターを含む細胞を包含する。さらに本発明は内皮細胞増殖阻害剤をコードするDNA配列を患者に導入してインビボ(in vivo)で阻害剤の濃度を調節する遺伝子治療法に関する。

20

また、本発明は体液および組織中の内皮細胞増殖阻害剤を検出および測定し、組織および細胞中の阻害剤の位置を決定するための診断法およびキットを含む。診断法およびキットはその分野の技術者によく知られているいずれの構造でも良い。本発明は内皮細胞増殖阻害剤およびその一部に特異的な抗体、および内皮細胞増殖阻害剤に特異的な抗体の結合を阻害する抗体をも含む。これらの抗体は多クローン抗体でもモノクローナル抗体でも良い。内皮細胞増殖阻害剤に特異的な抗体を診断キットに用いて阻害剤の存在または量を検出することで血管形成により仲介されたガンまたは他の疾患の発症または再発を診断または

30

予後できる。内皮細胞増殖阻害剤に特異的な抗体をヒトまたは動物に投与して、ヒトまたは動物に阻害剤に対する免疫を受動的に付与し、血管形成阻害を軽減させることができる。

また、本発明は体液中の内皮細胞増殖阻害剤に結合する抗体の存在または量を検出するための診断法およびキットを含む。診断法およびキットはその分野の技術者によく知られているいずれの構造でも良い。

本発明は阻害剤のレセプターに結合し細胞に適切なシグナルを伝達して作用薬または拮抗薬として作用する抗阻害剤レセプター特異的抗体も含む。本発明は、陽電子、消光断層撮影法、オートラジオグラフィ、フローサイトメトリー、電磁波受容体結合分析、および免疫組織化学のみに限定されないがこれらを含む技術を用いて阻害剤結合部位を検出し映像化するために用いる同位体またはタンパク質で標識化できる阻害剤ペプチド断片およびアナログを含む。

40

これらの阻害剤ペプチドおよびアナログは阻害剤レセプターの作動薬および拮抗薬として作用することによって、内皮細胞増殖阻害剤の生化学的活性を増強または阻害する。このようなペプチドは阻害剤に特異的に結合するレセプター分子の分離に用いることができる。

本発明は治療および研究に適用する内皮細胞増殖阻害剤、阻害剤断片、阻害剤に特異的な抗血清、および細胞毒剤に結合させた阻害剤レセプター作動薬およびレセプター拮抗薬も含む。さらに、この阻害剤、阻害剤の断片、阻害剤に特異的な抗血清、阻害剤レセプター作動薬および阻害剤レセプター拮抗薬は医薬品として用いることのできる賦形剤および、

50

また生分解性ポリマーおよび基質のような徐放性の化合物または組成物とともに用いて治療薬組成物を形成しても良い。

本発明は内皮細胞増殖阻害剤の転写および翻訳に含まれるリボ核酸およびデオキシリボ核酸の分子プローブを含む。これらの分子プローブは組織および細胞内の阻害剤の生合成の検出および測定に有用である。

さらに詳細には、本発明は血管形成のような内皮細胞増殖に仲介されたまたは関連した疾患および過程を検出および治療する組成物および方法を含む。阻害活性を有する分離したクリングル5ペプチド断片は以下に示す約80のアミノ酸配列を含む、

CMFGNGKGYRGKRATTVTGTQCQDWAQEPHRHSIFTPETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCYTTNPRKL YDYCDVP
Q SEQ ID NO:1

ここで

C = Cys Y = Tyr D = Asp

M = Met R = Arg W = Trp

F = Phe T = Thr H = His

G = Gly V = Val S = Ser

N = Asn P = Pro I = Ile

K = Lys Q = Gln A = Ala

E = Glu L = Leu

この阻害剤はヒトプラスミノーゲンのようなプラスミノーゲンから分離するか、化学的または生化学的方法（細胞培養、組み換え遺伝子発現、ペプチド合成、および*in vitro*でプラスミノーゲンまたはプラスミンを酵素触媒作用により活性を持つ阻害剤を生成する方法）で合成することができる。組み換え技術はポリメラーゼ鎖反応（PCR）を用いたDNAからの遺伝子増幅、および逆転写酵素/PCRを用いたRNAからの遺伝子増幅を含む。

また、本発明は、内皮細胞増殖阻害剤をコードするDNA配列を含むベクター（ここで、ベクターは細胞内に存在すると阻害剤を発現することができる）を含む組成物と、ベクターを含む細胞を含む組成物（ここで、ベクターは、阻害剤、または阻害剤の断片またはこれらのアナログをコードするDNA配列を含み、そして、細胞内に存在すると阻害剤を発現することができる）と、および、ベクターを含む細胞をヒトまたはヒト以外の動物に移植することを含む方法（ここで、ベクターは阻害剤をコードするDNA配列を含み、そして、細胞内に存在すると阻害剤を発現することができる）も包含する。

阻害剤のアミノ酸および核酸配列に関して「ほぼ同じ」または「ほぼ相同的な」という用語を使用した場合は、内皮細胞増殖阻害活性を有し、本明細書で開示した特異的なN-末端アミノ酸配列を有するタンパク質とほぼ同じ14kDの分子量をもちアミノ酸配列の相溶性が高いアミノ酸配列、または本明細書で開示した特異的なN-末端アミノ酸配列と分子量がほぼ14kDで等しく、アミノ酸配列の相溶性が高い内皮細胞増殖阻害剤をコードする核酸配列を意味する。

相溶性が高いとは、アミノ酸の相溶性が少なくとも約80%、好ましくはアミノ酸の相溶性が少なくとも約90%、さらに好ましくはアミノ酸の相溶性が少なくとも約95%であることを意味する。本明細書で用いている「内皮阻害活性」とは、一般的にはある分子が血管形成を阻害する能力、およびたとえばある分子が繊維芽細胞成長因子の存在下でウシ毛管細胞の成長を阻害する能力を指す。

本発明は、ガンのような疾患の診断または予後のための体液および組織中の阻害剤の検出をも含む。本発明は細胞および組織中の阻害剤結合部位およびレセプターの検出を含む。また、本発明は阻害剤の生成を増強して、および/または単離した阻害剤、または好ましくは精製した阻害剤、または阻害剤作用薬または拮抗薬、および/または阻害剤特異的抗血清または阻害剤に特異的な抗血清に対する抗血清を患者に投与して、関節炎および腫瘍を含むがこれらに限定されない血管形成疾患および過程を治療または防止する方法を含む。付加的な処置法は細胞毒薬に結合させた阻害剤、生化学的活性を持つ阻害剤断片、阻害剤のアナログ、阻害剤に特異的な抗血清、または阻害剤レセプター作用薬および拮抗薬を含む。

10

20

30

40

50

この阻害剤に特異的に結合する抗体を用いた受動免疫治療は生殖、発育、および創傷癒合および組織修復のような血管形成に依存した過程の調節に採用できる。さらに、阻害剤に特異的な抗体のFab領域に対する抗血清を投与して内因性の阻害剤特異的抗血清の阻害剤への結合能を遮断することができる。

本発明は患者の阻害剤をコードする遺伝子を制御する遺伝子治療を包含する。細胞にDNAを移入または送達して遺伝子産物のタンパク質を発現させる方法、遺伝子治療とも言うが、この方法は本明細書で参考文献に組み入れたGene Transfer into Mammalian Somatic Cells in vivo, N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12 (4) : 335 - 356 (1992) で開示されている。遺伝子治療はex vivoまたはin vivo治療に用いるためのDNA配列の体細胞または生殖細胞系細胞への組み込みを含む。遺伝子治療は遺伝子、過正常または異常な遺伝子の機能を置換し、感染症および他の病理学的疾患を撲滅する機能を有する。

10

この医学的問題を遺伝子治療を用いて処置する方法は欠損遺伝子を同定した後機能を有する遺伝子を付加して欠損遺伝子の機能を置換するか、またはわずかに機能している遺伝子の機能を促進するような治療法、または遺伝子を付加して現在の状態を処置するタンパク質を生産させるか、または組織または器官の治療法に対する感受性を高めるような予防的な方策を含む。予防的な方法の例として、阻害剤をコードする核酸配列を患者に配置して血管形成を予防するか、放射線に対する腫瘍細胞の感受性を高める遺伝子を挿入して腫瘍に放射線照射した際の腫瘍の死滅率を高める方法があげられる。

阻害剤DNAまたは阻害剤制御配列を転写する多くの方法が本発明の中で考えられる。阻害剤と特異的に関連した通常認められる1つのプロモーター以外のプロモーター配列、または阻害剤の生成を増加させる他の配列のトランスフェクションも遺伝子治療の方法として考えられる。この技術の一例としてTranskaryotic Therapies社 (Cambridge, Massachusetts) では、同種の組み換えを用いて細胞内のエリスロポエチン遺伝子を作動させる「遺伝子のスイッチ」を挿入している。Genetic Engineering news, April 15, 1994を参照のこと。このような「遺伝子のスイッチ」は通常、細胞内で阻害剤(または阻害剤のレセプター)を発現しない阻害剤(または阻害剤レセプター)の活性化に用いることができる。

20

遺伝子治療のための遺伝子転移は大きく分けて物理的方法(電気穿孔法、直接的遺伝子移入および粒子衝撃法)、化学的方法(脂質を主成分とする担体、または他の非ウイルス性のベクター)および生化学的方法(ウイルス由来のベクターおよびレセプターの使用)に分類できる。たとえばDNAで覆ったリポソームを含む非ウイルス性のベクターを用いることができる。このようなリポソーム/DNA複合体を患者に直接静脈内注射することができる。リポソームとDNAの複合体は肝臓で濃縮され、肝臓でDNAをマクロファージおよびクッパー細胞に移送すると考えられている。この細胞は長期間生存し、移送されたDNAが長期間にわたって発現する。さらにベクターまたは遺伝子の裸のDNAを目的とする器官、組織または腫瘍に直接注入して治療に用いるDNAを標的輸送できる。

30

遺伝子治療の方法は輸送部位によって分類することもできる。遺伝子を移入する基本的な方法はex vivoの遺伝子移入、in vivoの遺伝子移入、およびin vitroの遺伝子移入である。ex vivoの遺伝子移入では患者から細胞を採取し細胞培養液で増殖させる。DNAを細胞にトランスフェクションし、トランスフェクションさせた細胞の数を増大させたのち患者に再移植する。in vitroの遺伝子移入では形質転換した細胞は組織培養細胞のような培養液中で成長した細胞であり、特定の患者から採取した細胞ではない。これらの「実験室の細胞」をトランスフェクションに用い、トランスフェクションした細胞を選択して増殖させ患者に移植するかまたは他の用途に用いる。

40

in vivoの遺伝子移入は細胞が患者の体内に存在するときに患者の細胞にDNAを導入することを含む。この方法は非感染性のウイルスを用いた遺伝子移入を用いて遺伝子を患者に移入するか、または裸のDNAを患者のある部位に注入して遺伝子産物のタンパク質が発現する細胞の割合に達するまでDNAを取り込ませることを含む。さらに「遺伝子ガン」の使用のようなここで述べた他の方法を内皮細胞増殖阻害剤DNAまたは阻害剤制御配列のin vitroの挿入に用いても良い。

遺伝子治療の化学的方法はリポソームに限らずDNAを細胞膜を通過させる脂質を主成分と

50

する化合物を含む。負に荷電したDNAに結合するリポフェクチン、サイトフェクチン、脂質を主成分とする陽イオンは細胞膜を横切る複合体を形成し、DNAを細胞内に供給する。他の化学的方法は特異的なリガンドを細胞表面のレセプターに結合させて取り囲み、細胞膜を通して輸送することを含むレセプターをベースとした細胞内取り込み作用を用いる。リガンドはDNAに結合し複合体全体が細胞内に輸送される。リガンド遺伝子複合体は血流に注入されたのちレセプターを持つ標的細胞がリガンドに特異的に結合し、リガンド-DNA複合体を細胞内に輸送する。

多くの遺伝子治療法は遺伝子を細胞内に挿入するためにウイルス性のベクターを用いている。たとえば末梢および腫瘍浸潤リンパ球、肝細胞、表皮細胞、筋細胞、または他の体細胞への遺伝子の *ex vivo* の導入に改変したレトロウイルスベクターが用いられている。これらの改変した細胞を患者に導入して、挿入したDNAの遺伝子産物を患者に供給する。ウイルスベクターは *in vivo* の方法を用いた細胞への遺伝子の挿入にも用いられている。外来遺伝子の組織特異的発現を支持するために組織特異的であることが知られているシス作用制御要素 (*cis-acting regulatory elements*)、またはプロモータを用いることができる。 *in vivo* でのDNAまたはウイルスベクターの特異的構造上の部位へ、原位置の輸送を用いてこのことは達成することができる。たとえば *in vivo* での血管への遺伝子移入は *in vitro* で形質導入した内皮細胞を動脈壁の選択した部位に移植して行う。ウイルスに感染した周囲の細胞も遺伝子産物を発現する。ウイルスベクターは例えばカテーテルによって *in vivo* 部位に直接輸送できるため、ウイルスに感染するのはごく限られた部位のみであり、長期間にわたって部位特異的な遺伝子発現が可能となる。レトロウイルスを用いた *in vivo* の遺伝子移入も改変したウイルスを乳房組織および肝組織において器官に通じる血管に注入することにより示された。

遺伝子治療に用いるウイルスベクターは以下のウイルスのみに限定されないがレトロウイルス、ポリオウイルスまたは Sindbis ウイルスのような他のRNAウイルス、アデノウイルス、アデノウイルス伴生ウイルス、ヘルペスウイルス、SV40、ワクシニアおよび他のDNAウイルスを含む。複製欠損ネズミレトロウイルスは最も一般的に用いられている遺伝子移入ベクターである。ネズミ白血病レトロウイルスはタンパクのコア (*gag*) に含まれ、宿主の範囲を決定する糖タンパク質エンベロープ (*env*) に取り囲まれて、核のコアタンパク、およびポリメラーゼ (*pol*) 酵素と複合体を形成した一本鎖のRNAからなる。レトロウイルスのゲノム構造は *gag*、*pol* および 5' および 3' 末端反復配列 (LTR) で取り囲まれた *env* 遺伝子を含む。レトロウイルスベクター系はウイルス構造タンパクがパッケージングの細胞系にイントランス (*in trans*) で供給されれば 5' および 3' 末端反復配列 (LTR) およびパッケージングシグナルのみを含む最小のベクターでベクターのパッケージング、感染および標的細胞への組み込みができるという事実を活用できる。遺伝子移入に対するレトロウイルスベクターの基本的な利点として多くの細胞種で効率よく感染および遺伝子発現すること、標的細胞の染色体DNAに正確に1コピーのベクターを組み込めること、およびレトロウイルスゲノムの操作が容易であることが含まれる。

アデノウイルスはコアタンパクと複合体を形成し、カプシドタンパクで取り囲まれた直線の二本鎖のDNAからなる。分子生物学の進歩により *in vivo* で標的細胞に新規な遺伝子配列を形質導入できるベクターの創製にアデノウイルスを利用できるようになった。アデノウイルスを基本とするベクターは遺伝子産物のペプチドを高濃度で発現する。アデノウイルスベクターはウイルス力価が低い場合も感染率が高い。さらにこのウイルスは細胞から遊離したビリオンとして完全な感染性を有するため生産細胞系は必要でない。アデノウイルスベクターの潜在的な利点として *in vivo* で異種遺伝子を長期間発現できることもあげられる。

DNA移送の機械的方法としてリポゾームのような融合誘導脂質小胞および膜融合に用いる他の小胞、リポフェクチンのような陽イオン脂質を組み込んだDNAの脂質粒子、DNAの直接注入、DNAの生殖細胞または体細胞へのマイクロインジェクションなど、DNAで覆われたパーティクルの空気による移送、「遺伝子ガン」で用いる筋の粒子などおよびリン酸カルシウムトランスフェクションのような無機化合物を用いる方法が含まれる。この他の、リガ

10

20

30

40

50

ンドを仲介とした遺伝子治療は、DNAと特異的なリガンドとを結合させDNA - リガンド結合体を形成し、このDNAを特異的な細胞または組織に導くことを含む。

プラスミドDNAの筋肉細胞への注射により、トランスフェクトされマーカー遺伝子の発現を維持する高いパーセントの細胞を産出することが知られている。プラスミドのDNAは細胞のゲノムに組み込んで組み込まなくても良い。トランスフェクションしたDNAの非組み込みにより、終末まで分化した非増殖性の組織で細胞またはミトコンドリアのゲノムに突然変異の挿入、欠失、または改変がおきる恐れもなく、長期間にわたって遺伝子産物のタンパク質をトランスフェクションおよび発現させることができる。治療に用いる遺伝子の特異的な細胞に永久ではないが長期間転写することは遺伝病の治療または予防に適用であると考えられる。DNAを周期的に注入して受容体細胞のゲノムに突然変異を起こすことなく遺伝子産物濃度を維持することができる。外因性DNAの非組み込みにより1つの細胞にいくつかの異なる外因性DNAを存在させ全ての構造遺伝子に種々の遺伝子産物を発現させることができる。

10

パーティクルを用いた遺伝子転写法が最初に用いられたのは植物組織の形質転換である。パーティクル衝撃装置または「遺伝子ガン」を用いてDNAで覆われた高密度粒子（金またはタングステンなど）が標的器官、組織または細胞を貫通できる高速度まで加速する原動力を発生させる。パーティクル衝撃装置はin vitro、またはex vivoまたはin vivoで細胞、組織、または器官にDNAを導入する技術に用いることができる。

遺伝子転写のための電気穿孔法は電流を用いて細胞または組織の電気穿孔を用いた遺伝子転写への感受性を高める。DNA分子が細胞内へ貫通するよう膜の透過性を高めるためにある電界強度をもつ短い電気インパルスを用いる。この技術はin vitro、またはex vivoまたはin vivoで細胞、組織、または器官にDNAを導入する技術に用いることができる。

20

担体を用いたin vivoの遺伝子転写は外来DNAの細胞へのトランスフェクションに用いることができる。担体とDNAとの複合体は体液または血流に導入でき体内の標的器官または組織に部位特異的に向かう。リポゾームおよび、ポリリジン、リポリジンまたはサイトフェクチンのようなポリカチオンを用いることができる。リポゾームは細胞特異的または器官特異的に発達させることができるためリポゾームを担体とした外来DNAは標的細胞で取り入れられる。ある細胞の特異的なレセプターを標的とした免疫リポゾームの注入は、レセプターを持つ細胞にDNAを挿入する簡便な方法として用いることができる。現在用いられている他の担体系はin vivoの遺伝子転写における肝細胞へのDNAの運搬に用いるアジアロ

30

グリコプロテイン/ポリリジン複合体である。トランスフェクションしたDNAは他種の担体と複合体を形成してDNAが受容体細胞に担持されたのち細胞質または核質に滞留するようにできる。DNAは特異的に発生した小胞複合体として担体の核タンパクに結合し直接核に運ばれる。

本発明の阻害剤の遺伝子制御は阻害剤遺伝子、または遺伝子に関連した制御部位、または転写または翻訳の速度を調節するRNA転写物に結合する化合物を投与して行う。阻害剤をコードするDNA配列でトランスフェクションした細胞をin vivoの阻害剤源として患者に投与することもできる。たとえば阻害剤をコードする核酸を含むベクターで細胞をトランスフェクションすることができる。

本明細書で用いている「ベクター」という用語は特異的な核酸配列を含むかまたは特異的な核酸配列と関連し、特異的な核酸配列を細胞に輸送する機能を持つ担体を意味する。ベクターの例として、プラスミドおよびウイルスのような感染性の微生物、またはリガンドとDNAの複合体、リポゾーム、脂質とDNAの複合体のような非ウイルス性のベクターを含む。内皮細胞増殖阻害剤DNA配列を含む組み換えDNA分子を発現制御配列と結合して阻害剤を発現できる発現ベクターを形成することが望ましい。トランスフェクションする細胞は患者の正常な細胞、患者の罹患した細胞、または患者以外の細胞でもよい。

40

たとえば、患者から除去した腫瘍細胞を本発明の阻害剤タンパク質を発現できるベクターでトランスフェクションし、患者に再導入することができる。トランスフェクションした細胞は患者の体内で腫瘍の成長を阻害する濃度の阻害剤を生成する。患者はヒトまたはヒト以外の動物でも良い。さらに、阻害剤DNAは担体を用いずに直接患者に注入してもよい

50

。特に、阻害剤DNAを皮膚、筋肉または血液に注射してもよい。

阻害剤の発現は長期間継続するかまたは阻害剤DNAを周期的に投与して細胞、組織または器官または液体中の阻害剤タンパクを希望の濃度に維持する。

以下の仮定に束縛されることは望んでいないが、腫瘍は血管形成を開始するとき1つ以上の血管形成ペプチド（例えば、aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GM-CSFなど）を放出し、このペプチドは血管外から原発性腫瘍の付近の標的の内皮に局部的に作用し、循環しない（または循環するが半減期が短い）。この血管形成ペプチドは内皮細胞阻害剤（血管形成の阻害剤）の作用に打ち勝って原発性腫瘍が群落を拡大し続けるために十分な量が生産されなければならない。原発性腫瘍は一度成長すると、血行中に内皮細胞阻害剤を放出し続ける。この仮定によると、この阻害剤は、原発腫瘍からある程度離れて血管内の方向から標的毛管内皮に作用し、循環し続ける。このため、原発腫瘍から離れた転移部が血管形成を開始する

10

ちょうどその時に、その付近の毛管内皮は新しく入ってくる阻害剤により阻害される。同じ技術を用いて実行される本発明の内皮細胞増殖阻害剤の生産は、以下の段階を含む、組み換えDNA技術を用いて行うことができる。ここで、この組み換えDNA技術は、(1)先に述べ、図面に例示したように阻害剤を同定および精製する段階と、(2)精製した阻害剤のN-末端アミノ酸配列を決定する段階と、(3)阻害剤配列の5'および3'オリゴヌクレオチドプライマーを合成する段階と、(4)ポリメラーゼを用いて阻害剤遺伝子配列を増幅する段階と、(5)増幅した配列を発現ベクターのような適切なベクターに挿入する段階と、(6)阻害剤を発現できる微生物または他の発現系にベクターを含む遺伝子を挿入する段階と、および、(7)組み換えにより生産された阻害剤を分離する段階とを含む。適切なベクターはウイルス、バクテリアおよび真核生物（酵母など）の発現ベクターを含む。上記の技術は参考文献として組み入れた「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(Second Edition by Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 1989)に詳細に記載されている。

20

阻害剤または生化学的活性を持つ阻害剤断片を生産する他の方法は、ペプチド合成による。阻害剤のアミノ酸配列は、たとえば自動ペプチド配列分析法により決定できる。別の方法として、たとえば前述の方法を用いて阻害剤をコードする遺伝子またはDNA配列を分離すれば、当業者に既知の手動または自動配列法を用いてDNA配列を決定できる。その結果核酸配列からは、アミノ酸配列に関する情報が得られる。

ペプチドのアミノ酸配列が明らかとなれば、「Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach」(E. Atherton and R.C. Sheppard, IRL Press, Oxford, England)で例示されたような当業者に既知の方法でペプチド断片を合成できる。続いて互いに結合させて大きな断片を形成する複数断片を合成できる。この合成ペプチド断片はin vitroおよびin vivoの作用活性および拮抗活性を試験するために特異的な部位をアミノ酸置換して合成することもできる。組織へのアフィニティ結合力の高いペプチド断片はアフィニティカラム上の阻害剤に結合したレセプターの分離に用いることができる。

30

この阻害剤は血管形成のような、内皮細胞増殖に仲介された疾患、または内皮細胞増殖を含む過程の処置に有効である。本発明は有効な量の阻害剤、または生化学的活性を持つ阻害剤断片、または集合体として抗血管形成活性を有する阻害剤断片の組合せ、または阻害剤作用薬および拮抗薬を用いて血管形成に仲介された疾患を処置する方法を含む。血管形成により仲介された疾患は、固体腫瘍、白血病のような血液腫、腫瘍転移、たとえば血管腫、聴覚腫、神経線維腫、トラコーマ、および血管拡張性肉芽腫のような良性腫瘍、関節リウマチ、乾せん、網膜炎、未熟児網膜炎、黄斑変性、角膜グラフト拒絶、血管新生性緑内障、後水晶体線維増殖症、ルベオシスのような眼の血管形成疾患、オスラー・ウェバー症候群、心筋血管新生、プラーク血管新生、毛細管拡張、血友病関節、血管線維腫、および創傷肉芽を含むが、これらに限定されない。

40

この阻害剤は内皮細胞の過度のまたは異常な刺激を示す疾患の処置に有用である。この疾患は腸管癒合、アテローム硬化症、強皮症、および肥厚性瘢痕、すなわちケロイドを含むがこれらに限定されない。この阻害剤は胚の着床に必要な血管新生を阻害することにより受胎調節剤に用いることができる。この阻害剤はネコひっかき熱 (Rochele minalia quin

50

tosa) および潰瘍 (Helicobacter pylori) のように病理学的な結果として血管形成を有する疾患の処置に有用である。

この阻害剤の合成ペプチド断片は種々の用法がある。阻害剤と高い特異性および親和性で結合することのできるレセプターに結合するペプチドは放射線標識してオートラジオグラフおよび膜結合技術を用いた結合部位の映像化および定量に用いることができる。

さらに、半減期の短い同位体による阻害剤または阻害剤のペプチド断片の標識化により陽電子消光断層撮影法または他の近代的な放射線写真技術を用いて腫瘍の阻害剤結合部位を決定するために *in vivo* でレセプター結合部位を映像化できる。リシンのような細胞毒薬を阻害剤およびアフィニティの高い阻害剤のペプチド断片と結合して、阻害剤に結合する細胞を破壊する道具として使用できる。この細胞は微小転移部および原発性腫瘍のみに限定されないがこれらを含む多くの部位に見いだされる。細胞毒薬と結合させたペプチドは望ましい部位に最大限に輸送されるように注入する。たとえば、標的部位に供給する血管、または標的に直接カニューレを通して注入して輸送することが成し遂げられる。このような薬剤は注入カニューレと連結した浸透圧ポンプを通して制御し輸送することもできる。阻害剤拮抗剤を血管形成刺激薬とともに適用して組織の血管新生を増進する。この治療法は転移癌種を破壊する有効な手段となる。

阻害剤は疾患を処置する他の化合物および方法と組み合わせて用いることができる。たとえば、腫瘍は手術、放射または阻害剤と組み合わせた化学療法により従来どおり処置し、その後微小転移部の潜伏期間を延長し残余の原発性腫瘍の成長を安定化および阻害するために阻害剤を患者に投与してもよい。さらに、阻害剤、阻害剤断片、阻害剤に特異的な抗血清、阻害剤レセプター作用薬および拮抗薬、またはその組合せを医薬品として適用できる賦形剤および、必要に応じ生分解性ポリマーのような徐放性マトリックスと組み合わせて治療薬組成物を形成する。

ここで用いる徐放性マトリックスは、酵素または酸/塩基による加水分解または溶解によって分解する素材、通例はポリマーからなるマトリックスである。一度体内に挿入されると、マトリックスは酵素および体液の作用を受ける。徐放性マトリックスはリポゾーム、ポリラクチド (ポリ乳酸)、ポリグリコリド (グリコール酸のポリマー)、ポリラクチドコ-グリコリド (乳酸およびグリコール酸の共重合体) ポリマーの無水物、ポリ (オルト) エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、コンドロイチン硫酸、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンのようなアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドンおよびシリコンのような生体適合性素材から選択することが望ましい。推奨する生分解性マトリックスはポリラクチド、ポリグリコリド、またはポリラクチドコ-グリコリド (乳酸とグリコール酸の共重合体) のいずれかである。

本発明の血管形成を調節する治療組成物は固体、液体またはエアゾールでもよく既知の投与経路から投与する。固体の治療組成物の例はピル、クリーム、および移植可能な容量単位を含む。ピルは経口投与し、治療クリームは局所に投与する。移植可能な容量単位は局所に、例えば腫瘍部位に投与するか、移植して血管形成調節治療組成物を全身に放出するように、例えば皮下に投与する。液体組成物の例は皮下、静脈内、動脈内注射に適應する処方、および局所性および吸入投与の処方を含む。エアゾール処方の例は肺に投与するための吸入処方を含む。

本発明の阻害剤タンパクは阻害剤およびそのレセプターに特異的な抗体の生産に用いることもできる。固体は多価抗体でもモノクローナル抗体でも良い。阻害剤または阻害剤レセプターに特異的に結合するこの抗体は体液または組織中の阻害剤濃度または阻害剤レセプター濃度を検出または定量する通常の当業者に既知の診断法およびキットに用いることができる。この試験結果はガンおよびその他の血管形成を仲介する疾患の診断または発症および再発の予後に用いることができる。

この阻害剤は阻害剤に結合する抗体を検出および定量する診断法およびキットの開発に用いることもできる。このキットは阻害剤に特異的な抗体の循環を検出できると考えられる。そのような抗阻害剤抗体の循環が認められる患者は複数の腫瘍および癌腫が成長しやす

10

20

30

40

50

く、治療または寛解の期間ののち再発しやすと考えられる。この抗体のFab断片は抗阻害剤抗体の中和に用いる抗阻害剤特異的Fab断片抗血清産生に用いる抗原として用いることができる。このような方法で循環している阻害剤を抗阻害剤抗体により除去し、循環している阻害剤の濃度を有効に上昇させることができる。

本発明の他の態様は、過度の外因性阻害剤の作用を遮断する方法に関する。これはヒトまたは動物をその系の好ましくない阻害剤に特異的な抗体で受動免疫することにより行う。この治療は異常な排卵、月経、および胎盤形成、および血管新生の治療において重要である。阻害剤に特異的な抗体のFab断片は阻害剤に対する結合部位を含む。この断片は阻害剤に特異的な抗体からこの部門に習熟したものによく知られている技術を用いて分離する。阻害剤に特異的な抗血清のFab断片は抗Fab断片血漿産生を引き起こすための抗原として用いる。阻害剤に特異的なFab断片に対する抗血清の注入は阻害剤の阻害剤抗体への結合を防止する。抗阻害剤のFab断片への阻害剤の結合を遮断して内因性抗阻害剤抗体を中和することにより治療上の利益が得られる。この治療の最終的効果は内因性の循環している阻害剤が標的細胞に達する能力を促進し、転移の拡大を減少させることである。

本発明は内皮細胞増殖阻害活性を有する阻害剤のいかなる誘導体も含むと考えていることが理解できるであろう。本発明は全阻害剤タンパク質、阻害剤タンパク質の誘導体および阻害剤タンパク質の生化学的活性を持つ断片を含む。これはアミノ酸置換したまたはアミノ酸官能基に結合した糖または他の分子を持つ阻害剤活性を有するタンパク質を含む。本発明は阻害剤および阻害剤レセプターをコードする遺伝子、およびこの遺伝子により発現されるタンパク質を含む。

上述した阻害活性を有するタンパク質およびタンパク質断片はその部門の通常の方法を持つ者によく知られた処方を用いて医薬品として容認できる処方中に含まれる分離したほぼ純粋なタンパク質およびタンパク質断片として供給できる。この処方は標準的な経路から投与できる。一般に、この化合物は局所性、経皮、腹膜組織内、頭蓋内、大脳脳室内、大脳内、腔内、子宮内、経口、直腸または非経口（静脈内、髄腔内、皮下または筋内）の経路により投与できる。さらに、この阻害剤は化合物を徐放性による生分解性ポリマーと結合させて、ポリマーを薬剤輸送が望まれる部位の近傍に、例えば腫瘍の部位または阻害剤がゆっくりと全身に放出されるように移植する。カニューレを通して問題の部位に、たとえば成長している転移部に直接またはその腫瘍への血管に高濃度の濃度の阻害剤を制御して輸送するために浸透圧ミニポンプを用いることができる。生分解性ポリマーおよびその使用はたとえばここで参考文献に取り入れたBremら、*J.Neurosurg.* 74:441 - 446 (1991) に詳細に記載されている。

本発明の阻害剤の用量は治療する疾患の状態または状況およびヒトまたは動物の体重および容態および化合物の投与経路のような他の臨床的な因子に依存する。ヒトまたは動物の治療には、約0.5mg/kg ~ 500mg/kgの阻害剤を投与できる。特定の動物またはヒトにおける半減期によって、阻害剤は1日数回から週1回投与できる。本発明はヒトおよび家畜にともに適用できることがわかる。本発明の方法は単独投与と同時にまたは長期間にわたる複数投与を考えている。

この阻害剤処方は経口、直腸、眼病治療（intravitrealまたは腔内を含む）、鼻、局所性（頬、舌下を含む）、子宮内、腔内、または非経口（皮下、腹膜組織内、筋内、静脈内、皮内、頭蓋内、気管内、および硬膜外を含む）投与に適した処方を含む。この阻害剤処方は単位用量の形態で提供し従来の医薬技術で調製する。この技術は活性成分と医薬担体または賦形剤とを結合させる段階を含む。一般に、処方では活性成分を液体の担体または微細に分散した固体の担体または両者と、均一に密接に結合させ、その後必要であればその調製品を成形する。

非経口投与に適した処方は抗酸化剤、緩衝液、静菌剤および処方をレシピエントの血液と等張にする溶質を含む水性または非水性の無菌の注入溶液、および懸濁剤および硬化剤を含む水性または非水性の無菌の懸濁液を含む。この処方はたとえば密封アンプルおよびバイアルのような単位用量または複数用量の容器で提供し、使用直前にたとえば注入用の水のような無菌の液体担体を添加するのみで投与できる凍結乾燥した状態で貯蔵する。処方

10

20

30

40

50

箋に応じて調合した注入溶液および懸濁液は、前記のような無菌の粉末、顆粒および錠剤から調製する。

推奨する単位用量処方では投与する成分の1日の容量単位、1日の副用量、またはその適切な部分を含む。特に一部前述した成分に加えて、本発明の処方は問題となっている処方の種類に関連した従来の他の薬剤も含む。阻害剤タンパク質、または阻害剤タンパク質の生化学的活性を持つペプチド断片と細胞毒薬を組み込むか、または結合させて患者に2つの治療を提供できる。

本発明の血管形成阻害ペプチドは標準的な微量化学で合成できHPLCおよび質量分析光度測定器を用いて純度を確認できる。ペプチド合成、HPLC精製および質量分析光度測定器の方法はその分野に習熟した者によく知られている。阻害剤ペプチドおよび阻害剤レセプターペプチドも組み替え大腸菌または酵母の発現系を用いて生産し、カラムクロマトグラフィで精製する。

完全な阻害剤分子の異なるペプチド断片は以下の例に限定されないが、特異的な抗血清を開発する抗原として、阻害剤結合部位に作用する作用薬および拮抗薬として、阻害剤に結合する細胞の死滅を標的とした細胞毒薬と結合してまたは組み合わせるペプチドとしてのいくつかの適用法に用いるために合成することができる。ペプチドを含むアミノ酸配列の分子の外部の領域に位置し抗血清に結合しやすいことを基本に選択する。阻害剤のアミノ末端およびカルボキシ末端、分子の中央領域も合成した断片で個々に代用する。

このペプチド配列をGenBank, Brookhaven Protein, SWISS - PROT, およびPIRのようなタンパク質配列データベースを用いて既知の配列と比較し潜在的な配列の相同性を決定する。この情報によって他の分子と高い相同性を示す配列の排除が容易になり、阻害剤に対する抗血清、作用薬、拮抗薬の開発において特異性を高められる可能性が高まる。

阻害剤および阻害剤由来のペプチドは標準的な方法を用いて他の分子と結合させることができる。阻害剤のアミノ末端およびカルボキシ末端はともにチロシンおよびリジン残基を持ち、例えば従来の技術(チロシン残基 - クロラミンT、ヨードゲン、ラクトペルオキシダーゼ、リジン残基 - Bolton - Hunter試薬など)を用いて同位体または非同位体で標識する。この結合技術はこの分野に習熟した者によく知られている。あるいは、チロシンのおよびリジン残基を持たない断片にチロシンまたはリジンを付加してペプチドの反応性のあるアミノ基およびヒドロキシル基を標識しやすくする。この結合技術はアミノ酸で利用できる以下の官能基に限定されないがアミノ、スルフヒドラル、カルボキシル、アミド、フェノール、およびイミダゾールを含む官能基を基本に選択する。この結合を生じさせるために用いる試薬は多くあるがその中でもグルタルアルデヒド、ジアゾ化ベンジジン、カルボジイミド、およびp - ベンゾキノンを含む。

阻害剤ペプチドは、同位体、酵素、担体タンパク質、細胞毒薬、蛍光分子、化学発光、生物発光および他の化合物と化学的に結合させて種々に適用する。結合反応の効率は特定の反応に適したさまざまな技術を用いて決定する。例えば阻害剤ペプチドの¹²⁵Iによる放射線標識はクロラミンTおよび比活性の高いNa¹²⁵Iを用いて行う。この反応はメタビス亜硫酸ナトリウムで停止し混合物を使い捨てカラムで脱塩する。標識化したペプチドをカラムから溶出し画分を収集する。各画分から等分量を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。このように、標識化した阻害剤ペプチドから反応しなかったNa¹²⁵Iを分離する。最も放射比活性の高いペプチド断片を保存して次に阻害剤抗血清への結合能分析などに用いる。

ペプチド結合はこの他に多価抗体の産生に適用する。たとえば、リジン残基を含む阻害剤ペプチドをグルタルアルデヒドを用いて精製ウシ血清アルブミンに結合する。反応の効率は放射線標識したペプチドの取り込みを測定することにより決定する。反応しなかったグルタルアルデヒドおよびペプチドは透析により分離する。結合体を保存して後に使用する。阻害剤に特異的な抗血清、阻害剤アナログ、阻害剤のペプチド断片および阻害剤レセプターを発生させることができる。ペプチド合成および精製の後、その分野に習熟した者に既知の確立された技術を用いてモノクローナル抗血清および多価抗血清を増大できる。たとえば、多価抗血清はウサギ、ヒツジ、ヤギまたはその他の動物で増大できる。ウシ血清ア

10

20

30

40

50

ルブミンのような担体分子と結合した阻害剤ペプチド、または阻害剤自体を、アジュバンド混合物と組み合わせて、乳化し、背、頸部、側腹部、および時に肉趾の複数部位に皮下注入する。ブースター注射 (Booster injection) は2~4週間ごとのように一定の間隔で行う。血液サンプルは静脈穿刺により、たとえば、注射の約7日から10日後に、透析した後耳辺縁静脈を用いて採取する。血液サンプルは4℃で一晩凝塊形成させ4℃で約2400Xgで30分間遠心した。血清を除去し、分画して即座に使用する場合は4℃で後に分析する場合は-20~-90℃で保存する。

多価抗血清の生成により生じる全ての血漿サンプルまたはモノクローナル抗血清の産生により生じる中間のサンプルは抗体価測定のため分析した。力価はいくつかの方法、たとえばドットプロットおよび密度分析、および放射標識したペプチドと抗体の複合体をプロテインA、二次血清、冷却したエタノールまたは木炭-デキストランを用いて沈殿させ続いてガンマカウンターで活性測定して決定する。最も力価の高い抗血清は市販のアフィニティカラムを用いて精製する。阻害剤ペプチドはアフィニティカラムのゲルに結合する。抗血清サンプルはカラムを通過し抗阻害剤抗体はカラムに結合して残る。この抗体を次に溶出、収集して力価および特異性を測定し評価する。

最も力価の高い阻害剤に特異的な抗血清を試験して以下のことを確認する、a) 抗原が最も特異的に結合し非特異的な結合が最も少ない至適の抗血清希釈、b) 標準置換曲線において多量の阻害剤ペプチドに結合する能力、c) 関連するペプチドおよび関連した種のタンパク質との交差活性、d) 血漿、尿、組織、および細胞培養液の抽出物中の阻害剤ペプチドを検出できる能力。

阻害剤、および阻害剤レセプターを測定するキットも、本発明の一部として考えられる。力価および特異性が最も高く血漿、尿、組織の抽出物中、および細胞培養液中に阻害剤ペプチドを検出できる抗血清は阻害剤を迅速に、確実に、高感度で、および特異的に測定および位置決定するための使いやすいキットを確立するためにさらに検討する。この分析キットは、競合的および非競合的分析、放射免疫分析、生物発光および化学発光分析、蛍光定量分析、サンドイッチアッセイ、免疫放射定量分析、ドットプロット、ELISAを含む酵素結合分析、微量滴定プレート、尿または血液を迅速に監視する抗体被覆片またはディップスティック、および免疫細胞化学のみに限定されないがこれらの技術を含む。各キット用に分析のレンジ、感度、精度、信頼性、特異性、および再現性が確立されている。分析内、および分析間の変動は置換または活性の標準曲線の20%、50%、および80%に確立されている。

研究および臨床に一般に用いられている分析キットの例は放射免疫分析 (RIA) キットである。阻害剤RIAを以下に説明する。阻害剤または阻害剤ペプチドを放射性ヨウ素標識および精製した後、最も力価の高い抗血清を種々の希釈液に適切なバッファー系で10,000cpmのように比較的一定量の放射活性を有するチューブに添加する。他のチューブには緩衝液または前免疫の血清を入れ非特異的結合を測定する。4℃で24時間インキュベートした後、プロテインAを添加しチューブを渦動し90分間室温でインキュベートし、4℃で約2000~2500Xgで遠心して標識化した抗原に結合した抗体の複合体を沈殿させる。上澄みは吸引により除去してペレットの放射活性をガンマカウンターで測定する。非特異的結合を差し引いて約10%~40%の標識化ペプチドに結合する抗血清希釈液はさらに特徴が明らかにされる。

次に、既知量のペプチドを標識化ペプチドおよび抗血清を含むチューブに添加して抗血清の開発に用いる阻害剤ペプチドの希釈範囲 (約0.1pg~10ng) を決定する。さらにたとえば24~48時間インキュベートした後、プロテインAをチューブに添加し遠心し、上澄みを除去しペレットの放射活性を測定する。標識化していない阻害剤ペプチド (標準) による放射標識した阻害剤ペプチドの結合の置換は標準曲線となる。種々の濃度の他の阻害剤ペプチド断片、他種由来の阻害剤、および相同的なペプチドを分析チューブに添加して阻害剤抗血清の特異性を特徴づける。

原発性腫瘍および二次腫瘍、ルイス肺ガン (Lewis cancer)、阻害剤を生産する細胞の培養液、胎盤、子宮、および脳、肝臓、腸のような他の組織を含みこれらに限定されない種

10

20

30

40

50

々の組織の抽出物を調製する。組織抽出物を凍結乾燥または高速真空乾燥したのち、分析緩衝液を添加し、異なるアリコートを用いたRIAチューブ内に配置する。阻害剤産生細胞の抽出物はスタンダード曲線に平行な置換曲線を描き、阻害剤を産生しない組織の抽出物は阻害剤から放射標識した阻害剤を置換しない。さらにLewis肺ガンの動物の尿、血漿、および脳脊髄液の抽出物を分析チューブに多量に添加する。平行な置換曲線は阻害剤分析は組織および体液中の阻害剤の測定に有用であることを示している。

阻害剤を含む組織抽出物はさらにアリコートを逆相HPLCにかけることで特徴が明かにされる。溶出成分を収集し、高速真空乾燥器で乾燥し、RIA緩衝液で再構成し阻害剤RIAで分析する。阻害剤が溶出された位置に対応する画分の阻害剤免疫反応性が高い。

この分析キットは指示、抗血清、阻害剤または阻害剤ペプチド、および放射標識した阻害剤および/または阻害剤・阻害剤抗体複合体の結合を沈殿させるための試薬を提供する。このキットは腫瘍を持つまたは腫瘍を持たない動物およびヒトの生物体液中および組織抽出物中の阻害剤の測定に有用である。

他のキットを組織および細胞中阻害剤の位置決定に用いる。この阻害剤免疫組織化学キットは指示、阻害剤抗血清、およびフルオレセインイソチオシアネートのような蛍光分子、または原発抗血清の可視化に用いるそのほかの試薬に結合させた血清および二次腫瘍の遮断を供する。免疫組織化学技術はその分野に習熟した者によく知られている。この阻害剤免疫組織化学キットは光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて組織断片および培養細胞中の阻害剤の位置決定ができる。このキットは研究および臨床の目的にともに使用できる。たとえば腫瘍を生検しまたは収集してミクロトームで組織切片を切断して阻害剤生産部位を検討できる。このような情報はガンの検出および治療において診断および治療目的において有用である。阻害剤生合成部位を可視化する他の方法は阻害剤伝達RNAのプローブとの*in situ*ハイブリダイゼーションに用いるための核酸の放射標識を含む。同じく、阻害剤レセプターは免疫組織化学的技術を用いて位置決定、可視化および定量できる。

本発明は、さらに次の実施例により説明するが、これは発明の範囲を限定するために記載しているのでは全くない。反対に、この記述を読めばこの分野に習熟した者にはこの手段は種々の他の実施態様、変形、および同等の物があることが明瞭に理解されることが考えられる。

実施例 1

内皮細胞増殖阻害剤の証明

ヒトプラスミノゲンクリングル5の活性

由来：ヒトプラスミノゲンを適切な酵素で消化しクリングル5断片を得た。このペプチド断片は、この分野に習熟した者によく知られたタンパク質およびペプチドの標準的な精製法により分離し、精製した。ペプチド調製物をゲル電気泳動した結果を示した図2に、単離されたクリングル5の純度を示す。

分析：内皮細胞阻害活性はウシ毛管内皮細胞におけるDNA合成の阻害（[メチル- H^3]チミジンの取り込み）により分析した。毛管内皮細胞はウシ副腎上体より調製しゼラチン被覆48ウェルマイクロプレート上で成長させた。

種々の量の分離したクリングル5を培養した細胞に添加し細胞数の変化を測定した。細胞数の変化の割合をクリングル5の培養細胞への添加量の関数として当てはめ、図1のグラフを得た。

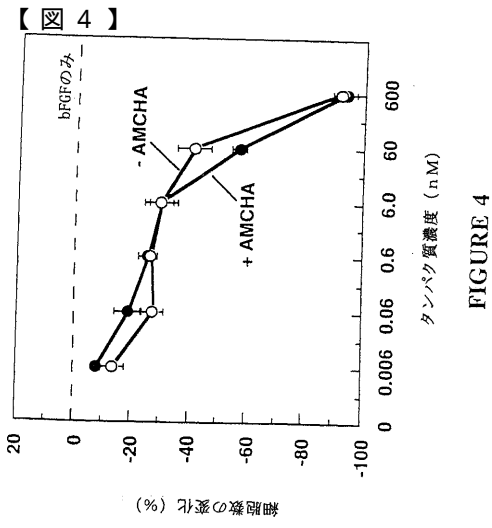
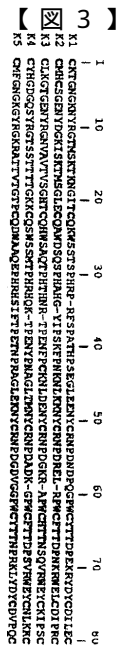
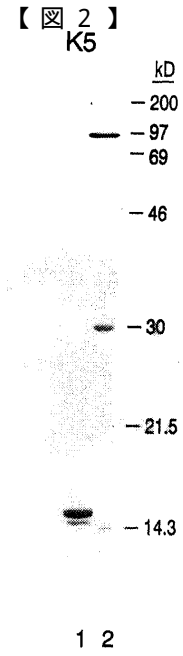
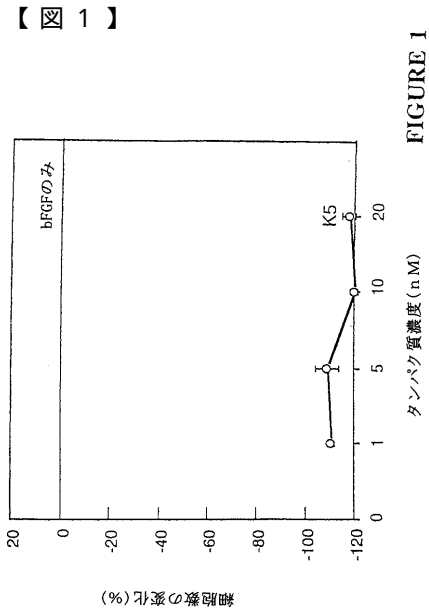
図3はヒトプラスミノゲンのクリングル領域1,2,3,4,5由来の同じ80のアミノ酸配列を比較したものである。

10

20

30

40



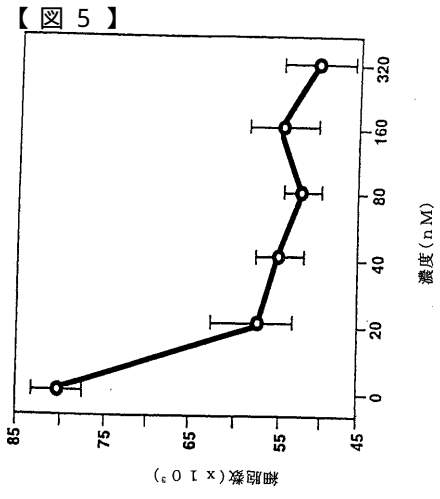


FIGURE 5

フロントページの続き

- (74)代理人 100090516
弁理士 松倉 秀実
- (74)代理人 100098268
弁理士 永田 豊
- (74)代理人 100089244
弁理士 遠山 勉
- (72)発明者 カオ, イーハイ
スウェーデン ストックホルム プロマ プロンモヌアゲン ナンバー 27
- (72)発明者 フォークマン, モーゼズ, ジューダ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02115 ブルックリン チェイサム サークル 18番
地
- (72)発明者 オーレイリー, マイケル エス.
アメリカ合衆国 テキサス 77499 ミズーリ シティ サリヴァンズ ランディング 22
- (72)発明者 デービッドソン, ドナルド ジェイ.
アメリカ合衆国 イリノイ 60031 グルニー キングスウェイ ウェスト 4835

審査官 八原 由美子

- (56)参考文献 国際公開第95/029242(WO, A1)
Michael S. O'Reilly et al., Cell, 1994年, Vol.79, p.315-328
Theresa Thewes et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990年, Vol.265, No.7,
p.3906-3915

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
A61K 38/00
CA(STN)
MEDLINE(STN)