

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6181088号  
(P6181088)

(45) 発行日 平成29年8月16日(2017.8.16)

(24) 登録日 平成29年7月28日(2017.7.28)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395 Z N A N
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 K 39/395 D
A 61 P 35/02	(2006.01)	A 61 P 35/00
C 12 N 15/113	(2010.01)	A 61 P 35/02
C 07 K 16/22	(2006.01)	C 12 N 15/00 G

請求項の数 22 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-560445 (P2014-560445)
(86) (22) 出願日	平成25年3月8日(2013.3.8)
(65) 公表番号	特表2015-516370 (P2015-516370A)
(43) 公表日	平成27年6月11日(2015.6.11)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2013/050580
(87) 国際公開番号	W02013/132267
(87) 国際公開日	平成25年9月12日(2013.9.12)
審査請求日	平成28年1月25日(2016.1.25)
(31) 優先権主張番号	61/608,872
(32) 優先日	平成24年3月9日(2012.3.9)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	505367464 ユーシーエル ビジネス ピーエルシー イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ ーピー ロンドン, トッテンハム コート ロード 97, ザ ネットワーク ビル ディング
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌の治療

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

増殖のために血管増殖に依存しない癌、または抗血管新生薬もしくは抗血管増殖薬による治療に反応しない癌の治療のための、ロイシンリッチ 2グリコプロテイン1(Lrg1)のアンタゴニストを含む医薬組成物であって、該アンタゴニストが、Lrg1に結合する抗体である、前記医薬組成物。

## 【請求項 2】

非血管性細胞に作用する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記アンタゴニストが腫瘍細胞増殖をダウンレギュレーションする、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。 10

## 【請求項 4】

Lrg1アンタゴニストが、

- (a) 腫瘍細胞遊走のダウンレギュレーション；
- (b) 腫瘍細胞間の細胞間相互作用のダウンレギュレーション；
- (c) 腫瘍細胞による腫瘍性遺伝子発現のダウンレギュレーション；ならびに
- (d) 腫瘍細胞に対する抗腫瘍因子から発癌促進因子へのTGF の切替え阻止、から選択される、少なくとも1つの追加の影響を腫瘍細胞に及ぼす、請求項 3 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記アンタゴニストが、

- (a) 腫瘍細胞遊走をダウントレギュレーションする；
- (b) 腫瘍細胞間の細胞間相互作用をダウントレギュレーションする；
- (c) 腫瘍細胞による腫瘍性遺伝子発現をダウントレギュレーションする；または
- (d) 腫瘍細胞に対する抗腫瘍因子から発癌促進因子へのTGF の切替えを阻止する、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項6】

癌の治療が、Lrg1に対する腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響によるものである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項7】

10

前記アンタゴニストが、末梢血単核細胞(PBMC)集団内のCD14陽性CD11b陽性細胞のパーセンテージを、アンタゴニストを投与しない対照と比べて低下させる、請求項6に記載の医薬組成物。

【請求項8】

前記アンタゴニストが、ROR $\tau$ 陽性CD4 T細胞のパーセンテージを、アンタゴニストを投与しない対照と比べて増加させる、請求項6または7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

前記アンタゴニストが、TGF もしくはBMPシグナル伝達において、

- (a) Lrg1とTGF 受容体II(TGF RII)；および/または
- (b) Lrg1とTGF ；および/または
- (c) Lrg1とアクチビン受容体様キナーゼ(ALK)；および/または
- (d) Lrg1とエンドグリン；および/または
- (e) Lrg1とベータグリカン；および/または
- (f) Lrg1と骨形成タンパク質(BMP)；および/または
- (g) Lrg1と骨形成タンパク質受容体(BMPR)；および/または
- (h) ALKとBMPR；および/または
- (i) Lrg1とアクチビン受容体II型(ACVRII)；および/または
- (j) エンドグリンとALK；および/または
- (k) ALKとBMPR；および/または
- (l) ALKとTGF RII

20

との間の相互作用を遮断する、請求項1～8のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【請求項10】

30

前記アンタゴニストによる前記遮断が、

- (a) エンドグリンとLrg1との間の相互作用を低下させ、それによってALKとTGF 受容体II(TGF RII)との間の相互作用を調節する；および/または
- (b) ベータグリカンとLrg1との間の相互作用を低下させ、それによってALKとTGF RIIとの間の相互作用を調節する；および/または
- (c) BMP、BMPRおよびALK複合体の形成、もしくは前記複合体によるシグナル伝達を妨害する；および/または
- (d) 非標準的なTGF シグナル伝達を妨害する；および/または
- (e) BMP、ACVRIIおよびALK複合体の形成、もしくは前記複合体によるシグナル伝達を妨害する、

40

請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記アンタゴニスト抗体が、モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体のフラグメントである、請求項1～10のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記アンタゴニストモノクローナル抗体が、Lrg1のL1-24(配列番号3)、L169-192(配列番号4)、またはL227-252(配列番号5)の配列内のエピトープを特異的に認識する、請求項11に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 1 3】

前記アンタゴニストモノクローナル抗体が、Lrg1のL227-252（配列番号5）の配列内のエピトープを特異的に認識する、請求項1\_2に記載の医薬組成物。

## 【請求項 1 4】

他の抗癌治療薬と併用して使用するための、請求項1～1\_3のいずれか1つに記載の医薬組成物。

## 【請求項 1 5】

他の抗癌治療薬が、細胞毒性薬、化学療法薬、増殖抑制薬、および抗癌モノクローナル抗体から選択される、請求項1\_4に記載の医薬組成物。

## 【請求項 1 6】

抗血管新生化合物と併用して使用するための、請求項1～1\_5のいずれか1つに記載の医薬組成物。

## 【請求項 1 7】

抗血管新生化合物が、血管内皮増殖因子（VEGF）のアンタゴニスト、アンジオポエチンアンタゴニスト、胎盤増殖因子（PLGF）のアンタゴニスト、エンドグリンのアンタゴニスト、CD160アンタゴニスト、またはアクチビン受容体様キナーゼ1（ALK1）のアンタゴニストである、請求項1\_6に記載の医薬組成物。

## 【請求項 1 8】

前記VEGFアンタゴニストが抗VEGF抗体である、請求項1\_7に記載の医薬組成物。

## 【請求項 1 9】

骨髄腫、白血病、脳腫瘍、乳腺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、肺腫瘍、前立腺腫瘍、頭頸部腫瘍、胃腫瘍、膵臓腫瘍、皮膚腫瘍、頸部腫瘍、骨腫瘍、卵巣腫瘍、精巣腫瘍および肝腫瘍から選択される癌の治療に使用するための、請求項1～1\_8のいずれか1つに記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 0】

静脈内、筋肉内、皮内、眼球内、腹腔内、皮下、脊髄、非経口、局所、表皮、硬膜下、頭蓋内、脳室内、もしくは粘膜投与用である、請求項1～1\_9のいずれか1つに記載の医薬組成物。

## 【請求項 2 1】

増殖のために血管増殖に依存しない癌、または抗血管新生薬もしくは抗血管増殖薬による治療に反応しない癌の治療のための薬剤の製造における、Lrg1のアンタゴニストの使用であって、該アンタゴニストがLrg1に結合する抗体である、前記使用。

## 【請求項 2 2】

癌の治療が腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響によるものである、請求項2\_1に記載のLrg1のアンタゴニストの使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

本発明は分子生理学の分野に属し、癌の治療もしくは予防用のロイシンリッチ 2グリコプロテイン1（Lrg1）のアンタゴニストの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0 0 0 2】

癌という用語は、広範な悪性新生物増殖に関するものであって、それは多くの正常な細胞型の形質転換に起因する可能性がある。癌は細胞表現型の多様な変化をともなう可能性がある。多数のさまざまなタイプの抗癌剤がある。しかしながら、これらの多くは、たいていの場合、非癌性細胞を非特異的に標的とした結果として、望ましくない副作用を伴う。また、癌特異性の高い従来の薬は、限られた数の特定の癌に対して特異的となる傾向がある。

10

20

30

40

50

## 【0003】

シスプラチ�などの従来の化学療法薬は、有糸分裂を阻害することによって作用する。しかしながら、こうした薬剤は癌細胞に特異的でなく、それどころか分裂の速いあらゆる細胞に作用するものである。したがって、非癌性であるが分裂の速い細胞、たとえば腸上皮を置き換える細胞は、意図しない影響を受ける可能性が高い。

## 【0004】

同様に、増殖因子活性を遮断する薬剤、たとえばイマチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤、または増殖因子もしくはそれらの受容体に対する抗体の影響は、腫瘍細胞に限定されない。インターフェロン（IFN）およびインターロイキン2（IL2）などの薬剤は、腎臓癌の治療に使用することができるが、やはり非癌性細胞にも影響を及ぼす可能性がある。10

## 【0005】

ホルモン療法は、もう1つの一般的な癌治療である。このタイプの治療は、特定の癌、すなわちホルモン感受性もしくはホルモン依存性の癌にしか適さない。たとえば、タモキシフェンはエストロゲン受容体を遮断するので、乳癌の治療に使用することができる。しかしながら、ホルモンに感受性であるか、または依存性である、非癌性細胞が標的とされて、ホルモン療法によって影響を受ける可能性もあり、望ましくない副作用につながる可能性がある。

## 【0006】

モノクローナル抗体などの他の抗癌剤は、より特異的であるが、特定の癌型、たとえば乳癌、または、ある癌の特定のサブグループにしか作用しない。たとえば、トラスツズマブ（ハーセプチニン）は、HER2陽性癌、典型的にはHER2陽性乳癌および胃腺癌の治療にのみ使用することができる。別の治療的アプローチは、遺伝子治療を含めたアプローチによって、腫瘍内の限局された免疫抑制環境を標的とすることであった。20

## 【0007】

さらに、ある種の癌、特に固形腫瘍については、その癌が一定の大きさを超えて増殖すると、広がることはもはや、増殖を維持するために酸素および栄養を供給するのに十分ではない。そこで、こうした腫瘍は、その代謝要求を満たすために、典型的には血管新生によって、血管を発達させなければならない。したがって、他の従来の抗癌剤には、腫瘍血管系の発達に強い影響を及ぼして腫瘍増殖を制限する、抗血管新生薬が含まれる。たとえば、抗VEGFモノクローナル抗体ベバシズマブ（アバスチニン）は、周知の抗血管新生癌治療である。30

## 【0008】

しかしながら、必ずしもすべての癌が、持続的な増殖のために腫瘍血管系の発達を必要とするわけではない。たとえば骨髄腫および白血病であるが、ただしここでも、骨髄における腫瘍細胞増殖が抗血管新生薬に反応しうるという兆候はある。さらに、血管の成長を必要とする癌であっても、一部の腫瘍は、抗血管新生治療に反応しないこともある。あるいはまた、腫瘍血管新生、新生組織形成、および免疫系などの複数のプロセスを同時に標的とすることは、より大きな抗癌効果を引き出すために望ましいと考えられる。

## 【0009】

したがって、癌の治療のために、他に選択できる治療標的、ならびに、単独で、または既存の治療法と併用して、より有効で、広範な癌の治療に適合し、非特異的作用の少ない、新規薬剤を特定することが必要である。40

## 【発明の概要】

## 【0010】

ロイシンリッチ 2グリコプロテイン1（Lrg1遺伝子名：HGNC: 29480; Entrez Gene: 116844; Ensembl: ENSG00000171236; UniProtKB: P02750）は1977年に同定され（Haupt & Baudner, 1977）、その一次構造は1985年に決定された（Takahashi et al, 1985）。Lrg1はマウスとヒトの間で高度に、進化的に保存されており、ヒトLrg1に対するポリクローナル抗体が市販されているが、ある種の疾患においてトランスフォーミング増殖因子1（T

GF 1)、TGF 受容体II (TGF RII) およびLrg1のレベルが同時に増加するとの報告がある (Sun et al, 1995; Li et al, 1997)。他のグループは、Lrg1を特定の疾患のバイオマーカーとして (US 2005/0064516; WO 2008/092214) ならびにシトクロムcのリガンドとして (US 2007/0184503) 同定した。Lynchら (2012) は、マイクロRNA-335 (miRNA-335) が Lrg1を標的として、ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化状態を低下させることによって神経芽細胞腫細胞の遊走および浸潤の減少をもたらすことを実証している。

#### 【 0 0 1 1 】

本発明者らは以前に、ロイシンリッチ 2グリコプロテインが、発症血管リモデリングを調節するための、新薬につながる標的であることを明らかにした。したがって、本発明者らは、Lrg1をアンタゴナイズすることが、発症血管リモデリングもしくは発症血管新生の起こる病気、特に眼の病気、たとえば新生血管AMD (加齢黄斑変性症)、糖尿病性網膜症、および未熟児網膜症の治療に有用であると予想した (WO 2011/027129)。しかしながら、今回、本発明者らは、Lrg1が免疫細胞機能のみならず腫瘍細胞に直接影響を及ぼすこと、そしてそれゆえに、これらの細胞に直接影響を及ぼすことにより癌の治療および/または予防の標的として使用できることを見いだした。

10

#### 【 0 0 1 2 】

本発明者らは今回、癌の治療および/または予防のための、新薬につながる標的としてLrg1を同定した。詳細には、本発明者らは、Lrg1ターゲティングが、腫瘍細胞に直接影響をおよぼし、したがってこの直接的な癌細胞への効果、具体的には、腫瘍血管新生への影響によるのではなく、腫瘍細胞の増殖をダウンレギュレートすることによって、癌の治療および/または予防のためにLrg1ターゲティングを使用することもできることを実証した。本発明者らはまた、Lrg1が、発癌促進環境の一因となる免疫細胞の性質を改変することも明らかにした。

20

#### 【 0 0 1 3 】

本発明者らは、これまで、Lrg1とTGF シグナル伝達経路との関連性を検討してきた。

#### 【 0 0 1 4 】

内皮細胞において、TGF シグナル伝達は、広範に存在するTGF I型受容体アクチビン受容体様キナーゼ5 (ALK5) もしくはALK1のいずれか一方と結合した、またはALK5およびALK1にともに結合した、TGF 受容体IIによって生じ、細胞性応答は、優位となる経路によって決まる。ALK5の場合、一定の条件下で、細胞外マトリクス (ECM) の蓄積の増加および細胞休止が見られるのに対して、ALK1については、遊走および増殖の増加として明らかに、内皮細胞の活性化が見られる。こうした差異のあるシグナル伝達は、一つにはTGF 、アクセサリー分子たとえばエンドグリン、およびベータグリカンの濃度/バイオアベイラビリティによって制御され、Smadと呼ばれる下流エフェクタータンパク質ファミリーのメンバーによっても制御されるが、それによってSmad 2および3はALK5で活性化され、Smad 1、5および8はALK1により活性化される。あるいはまた、TGF 受容体活性化は、Rho GTPaseおよびMAPキナーゼなどのシグナル伝達経路に関わる非標準的な経路を活性化することができる。

30

#### 【 0 0 1 5 】

癌において重要であることが知られている、もう一つのタンパク質群は、骨形成タンパク質 (BMP) およびその受容体、骨形成タンパク質受容体 (BMPR) である。アクチビン受容体様キナーゼ (ALK) は、BMP/BMPR複合体にリクルートされ、腫瘍細胞内でシグナル伝達を仲介することができる。本発明者らは、Lrg1がBMPシグナル伝達をもたらすことを示した。

40

#### 【 0 0 1 6 】

本発明者らによって、Lrg1がTGF RII、ALK5、およびALK1と複合体を形成することがこれまでに明らかにされたが、そのことは、Lrg1がこの受容体複合体の形成を仲介して、ALK1/Smad 1、5および8経路の下流へのシグナル伝達を駆動する役割を果たすことを示唆する (WO 2011/027129)。これを実現するメカニズムの1つは、Lrg1が、その後の受容体複合体形成を促すアクセサリー分子エンドグリンに直接、結合することによるものである。

50

したがって、本発明者らはこれまでに、Lrg1がTGF シグナル伝達のモジュレーターとして機能して、ALK1-およびALK5-活性化シグナル伝達カスケード間の微調整を引き起こすとの仮説を立てた。

#### 【0017】

TGF は、癌の発生に関与することが判明している。腫瘍進行の初期の段階で、TGF 経路はおもに抑制的である。しかしながら、腫瘍細胞は、上皮間葉転換（EMT）、腫瘍浸潤、転移性播種、および免疫系回避を促進するように、TGF に対する応答を切替えることができる（Meulmeester and ten Dijke., 2011）。これはTGF 切替えとして知られている。この理論にはとらわれないが、本発明者らは、腫瘍細胞におけるLrg1のアップレギュレーションが、それらの細胞のTGF シグナル伝達応答の変化を引き起こし、その結果、発癌の抑制から刺激への切替えをもたらすと仮定する。

10

#### 【0018】

実際、本発明者らは、内皮細胞において、Lrg1がTGF の分裂促進作用を強めることを見いだした。したがって、Lrg1<sup>-/-</sup> マウスの脳の内皮細胞は、野生型（WT）動物の内皮細胞よりゆっくりと増殖した。TGF 1の添加は、WT動物由来の内皮細胞増殖を有意に増強したが、Lrg1<sup>-/-</sup> マウス由来細胞の増殖を阻害し、このことは、ALK1-Smad1/5/8経路の活性化なしでの、ALK5-Smad2/3シグナル伝達の増強によると推定できる。Lrg1の添加は、そのままで影響を与えたかったが、TGF 1およびLrg1をともに添加すると、細胞増殖は、WT とLrg1ヌル細胞のいずれにおいても有意に増加した。これらの所見は、脳の内皮細胞株GP NTにおけるLrg1の過剰発現がSmad1/5リン酸化の増加、ならびにTGF 1による細胞増殖の増強をもたらすのに対して、siRNAを用いたLrg1のノックダウンは結果としてSmad1/5リン酸化の減少、ならびに細胞分裂の低下をもたらすことを示す研究によってさらに実証された。これは、Lrg1がTGF の有糸分裂誘発性を増強することを意味する。腫瘍形成においてLrg1の果たす役割の裏付けとして、癌の公表文献およびデータベース（表1）の調査から、Lrg1遺伝子およびタンパク質発現は、卵巣、乳房、肺および前立腺などの腫瘍において増加していることが多いと判明している。

20

#### 【0019】

発癌促進性であることに加えて、TGF は、抗腫瘍免疫を阻み、腫瘍の増殖および生存をサポートする腫瘍環境において、免疫抑制的であることも知られている（Flavell et al., 2010）。この理論にはとらわれないが、本発明者らはやはり、腫瘍環境におけるLrg1のアップレギュレーションが、抗腫瘍免疫応答から免疫抑制へのシフトを引き起こす、免疫細胞におけるTGF シグナル伝達の切替えをもたらすと仮定する（炎症促進性T細胞の阻止、制御性T細胞および制御性マクロファージを含めた制御性免疫細胞のアップレギュレーション、アネルギーの誘導もしくは免疫寛容原性メカニズムのアップレギュレーション、ならびに活性化誘発性細胞死の促進、といったメカニズムによる）。

30

#### 【0020】

本発明者らは、いくつかの腫瘍（たとえば乳房および神経膠腫）において、Lrg1の発現が大きくアップレギュレートされている（図1b）こと、ならびにマウスルイス肺癌細胞株LL/2およびマウス悪性黒色腫細胞株B16/F10において発現されている（図1a、下図）ことを明らかにした。これらの細胞株を、同じ基礎環境で、野生型C57BL/6マウスおよびLrg1ノックアウトマウスに皮下移植すると、腫瘍の増殖速度は、後者において有意に阻害される（図1a、グラフ）。こうした所見は、Lrg1が、TGF に対する腫瘍細胞応答を、抑制から発癌促進へと切替えることに関与することを示唆する。このことの裏付けとして、本発明者らは、Lrg1阻止抗体が結果として、アガロースゲル中で浮遊培養したマウスルイス肺癌（LL/2）細胞コロニーのサイズの有意な減少をもたらすことを明らかにした（図2）。

40

#### 【0021】

このアイデアは、TGF によるシグナル伝達がTGF RII/ALK5/ALK2/3-Smad1/Smad5軸に沿って起こりうるという新たに出現した見解によってさらに裏付けられる。したがって、最近の報告によれば、さまざまな上皮細胞において、TGF は、ALK2および/またはALK3がALK5とともに関与するBMP非依存性経路によってSmad1およびSmad5を活性化することがで

50

きるということである (Daly et al., 2008)。

#### 【0022】

本発明者らは、LL/2細胞と同様に、ヒト乳腺細胞株MCF10A、ヒト上皮性肺癌細胞株A549、およびヒト乳腺癌細胞株MDA MB 468を含む他の細胞株もLrg1を分泌することを明らかにした (表2)。さらに、MCF10AおよびA549細胞は、Lrg1が直接結合することが判明しているアクセサリー受容体エンドグリンも発現する。

#### 【0023】

それに加えて、本発明者らは、これらの細胞においてLrg1が標準的 (カノニカル) および非標準的なTGF シグナル伝達をいずれも誘導することができるこことを示す証拠を提示している。したがって、本発明者らは、Lrg1が、ALK1の存在下で、Smad 1/5のリン酸化をMDA MB 468細胞において (図4a) 誘導し、Rho/Rhoキナーゼ活性化を示唆するミオシン軽鎖の (Thr18/Ser19での) リン酸化を、MCF10A (図4b) およびA549 (図4c) 細胞において誘導することを明らかにした。Lrg1は細胞遊走にも影響を及ぼす。したがって、MCF10A上皮細胞において、外因性Lrg1の添加は、創傷スクラッチアッセイで測定されるように細胞遊走の有意な増加を引き起こし (図5a)、さらに5時間の経時アッセイで測定されるように細胞遊走の方向性の減少を引き起こす (図5b)。

#### 【0024】

本発明者らは、ヒトLrg1に対するマウスモノクローナル抗体を作製したが、そうした抗体の1つがヒト上皮性肺癌細胞株A549の増殖速度を有意に抑制したことを示す (図3)。しかしながら、別のマウスモノクローナル抗Lrg1抗体は、Lrg1を認識するのに、A549細胞増殖の有意な低下を引き起こさなかった。このことは、癌治療においてLrg1活性を遮断することの可能性を実証する。

#### 【0025】

免疫系において、本発明者らは、抗CD3/CD28刺激による5日間のT細胞活性化後、CD4 T細胞でのTh17関連転写因子ROR  $\alpha$ の発現がLrg1存在下で有意に阻害されることも明らかにした (図6)。これは、他の免疫調節効果のなかで、Lrg1が炎症促進性T細胞の抑制を引き起こす能力を有することを実証する。実際、一定の条件下で、Th17細胞は抗腫瘍性となることがあり、腫瘍におけるそれらのダウントレギュレーションは、腫瘍細胞の生存および増殖をサポートする可能性があることが提唱されてきた (Zou and Restifo., 2010)。

#### 【0026】

その上、ヒト末梢血単核細胞において、Lrg1は、Lrg1に対する主要な受容体 (図7) であり、TGF シグナル伝達および細胞機能を変化させる、TGF アクセサリー受容体エンドグリンを発現するCD14/CD11b細胞集団を誘導する。

#### 【0027】

本発明者らはまた、Lrg1処理した単球が発現するHLA-DRは対照よりずっと少ないと明らかにした (図8)。これが癌と関係しているのは、MHCクラスIIの発現の低い腫瘍関連マクロファージ (TAM) が免疫抑制的であり、腫瘍血管新生を促進するからである。また、TAMの発現変動遺伝子を検討する遺伝子プロファイリング研究において、Lrg1がアップレギュレートされていることが判明したことも注目に値する (Schmieder et al., 2011)。また、ごく一部のTAMは、Tie2および低レベルのMHCクラスIIを発現しており、いわゆるTie2発現マクロファージ (TEM) であるが、TEMの欠失は腫瘍治療の有効性を大いに向上させることが明らかになった (Welford et al., 2011)。本発明者らは、Lrg1により促進されるENG<sup>hi</sup>、HLA-DR<sup>lo</sup>マクロファージ表現型が、Tie2陽性でもあるということを示すデータを提供する (図8)。

#### 【0028】

Lrg1は、従来の抗癌剤の標的より優れた標的となる可能性がある。それは多くの癌細胞で高度に発現されているだけでなく、その特異性を高めて、多数のさまざまなタイプの腫瘍細胞でも発現されており、そのことは、さまざまな癌治療に有効な標的となり得ることを示唆する。Lrg1の標的としてのもう1つの魅力は、それが細胞外にあるので、全身性の治療経路によって利用しやすいことである。

10

20

30

40

50

## 【0029】

したがって、本発明は：

腫瘍細胞に及ぼす影響によって癌の治療もしくは予防法に用いられる、ロイシンリッチ2グリコプロテイン1(Lrg1)のアンタゴニストを提供する。

## 【0030】

このアンタゴニストは好ましくは非血管性細胞に作用する。好ましい実施形態において、本発明のアンタゴニストの腫瘍細胞に及ぼす影響は、腫瘍細胞増殖のダウンレギュレーションであるが、少なくとも1つの追加の影響を腫瘍細胞に及ぼす可能性があり、それは腫瘍細胞の遊走のダウンレギュレーション、腫瘍細胞の細胞間相互作用のダウンレギュレーション、腫瘍細胞による腫瘍遺伝子発現のダウンレギュレーション、ならびに腫瘍細胞に對してTGF $\beta$ を抗腫瘍因子から発癌促進因子へと切替えるのを阻止すること、から選択される。10

## 【0031】

本発明のLrg1アンタゴニストの腫瘍細胞に及ぼす影響はまた、腫瘍細胞の遊走のダウンレギュレーション、腫瘍細胞の細胞間相互作用のダウンレギュレーション、腫瘍細胞による腫瘍遺伝子発現のダウンレギュレーション、ならびに腫瘍細胞に對してTGF $\beta$ を抗腫瘍因子から発癌促進因子へと切替えるのを阻止すること、から選択されることもある。

## 【0032】

本発明はさらに、腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響によって癌の治療もしくは予防法に用いられる、ロイシンリッチ2グリコプロテイン1(Lrg1)のアンタゴニストを提供する。Lrg1アンタゴニストは、末梢血単核細胞(PBMC)集団内のCD14陽性CD11b陽性細胞のパーセンテージを、アンタゴニストを投与しない対照と比べて低下させること、および/または、ROR $\gamma$ t陽性CD4 T細胞のパーセンテージを、アンタゴニストを投与しない対照と比べて増加させることができる。20

## 【0033】

本発明のLrg1アンタゴニストは、次の二者間の相互作用を遮断することができるが、それはLrg1とTGF $\beta$ 受容体II(TGF $\beta$ RII)、および/またはLrg1とTGF $\beta$ 、および/またはLrg1とアクチビン受容体様キナーゼ(ALK)、および/またはLrg1とエンドグリン、および/またはLrg1とベータグリカン、および/またはLrg1と骨形成タンパク質(BMP)、および/またはLrg1と骨形成タンパク質受容体(BMPR)、および/またはTGF $\beta$ もしくはBMPシグナル伝達におけるALKとBMPR、および/またはLrg1とアクチビン受容体II型(ACVRII)、および/またはエンドグリンとALK、および/またはALKとBMPR、および/またはALKとTGF $\beta$ RIIとの間の相互作用である。本発明のLrg1アンタゴニストによる遮断は、エンドグリンとLrg1との間の相互作用を低下させてALKとTGF $\beta$ 受容体II(TGF $\beta$ RII)との間の相互作用を調節すること、および/またはベータグリカンとLrg1との間の相互作用を低下させてALKとTGF $\beta$ RIIとの間の相互作用を調節すること、および/またはBMP、BMPRおよびALK複合体の形成、もしくは前記複合体のシグナル伝達を妨害すること、および/または非標準的なTGF $\beta$ シグナル伝達を妨害すること、および/またはBMP、ACVRIIおよびALK複合体の形成、もしくは前記複合体のシグナル伝達を妨害することができる。30

## 【0034】

好ましい実施形態において、Lrg1アンタゴニストは、増殖のために血管増殖に依存しない癌、または抗血管新生薬もしくは抗血管増殖薬による治療に反応しない癌の治療に用いられる。

## 【0035】

本発明のLrg1アンタゴニストは、別の抗癌治療薬と併用することができるが、この抗癌治療薬は、細胞毒性薬、化学療法薬、増殖抑制薬、および抗癌モノクローナル抗体から任意に選択することができる。

## 【0036】

本発明のLrg1アンタゴニストは、抗血管新生化合物と併用することができるが、この抗血管新生化合物は、血管内皮増殖因子(VEGF)のアンタゴニスト、アンジオポエチンアン50

タゴニスト、胎盤増殖因子（PLGF）のアンタゴニスト、エンドグリンのアンタゴニスト、CD160アンタゴニスト、またはアクチビン受容体様キナーゼ1（ALK1）のアンタゴニストから任意に選択され、前記VEGFアンタゴニストは抗VEGF抗体であることが好ましい。

【0037】

本発明はさらに、本発明のLrg1アンタゴニストを同定する方法を提供するが、その方法は：

- (a) 候補となるアンタゴニストを提供すること、ならびに
  - (b) 前記の候補アンタゴニストが、腫瘍細胞に及ぼすLrg1の直接的な影響を遮断するか否かを判定すること；
- を含んでおり、この前記候補アンタゴニストは、腫瘍細胞に及ぼすLrg1の影響を遮断することが観察されれば、Lrg1のアンタゴニストとして同定される。

【0038】

Lrg1アンタゴニストは、エンドグリンとLrg1、および/またはLrg1とTGF受容体II（TGF RII）、および/またはLrg1とアクチビン受容体様キナーゼ（ALK）、および/またはLrg1とTGF、および/またはLrg1とベータグリカン、および/またはLrg1と骨形成タンパク質（BMP）、および/またはLrg1と骨形成タンパク質受容体（BMPR）、および/またはALKとBMPR、および/またはLrg1とアクチビン受容体II型（ACVRII）、および/またはエンドグリンとALK、および/またはALKとBMPR、および/またはALKとTGF RIIとの間の相互作用を任意に遮断することができる。

【0039】

本発明はまた、腫瘍細胞に及ぼす影響によって癌を治療もしくは予防するための薬剤の製造における、Lrg1のアンタゴニストの使用を提供する。

【0040】

本発明はまた、腫瘍細胞に及ぼす影響によって癌を治療する方法を提供するが、その方法は、それを必要とする患者に有効量のLrg1アンタゴニストを投与することを含む。

【0041】

本発明はまた、腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響によって癌を治療もしくは予防するための薬剤の製造における、Lrg1のアンタゴニストの使用を提供する。

【0042】

本発明はまた、腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響によって癌を治療する方法を提供するが、その方法は、それを必要とする患者に有効量のLrg1アンタゴニストを投与することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】野生型およびLrg1-/マウスに皮下移植したLL/2（上のグラフ）およびB16/F10（下のグラフ）マウス腫瘍の増殖。下のパネル：LL/2およびB16/F10細胞株から得られた馴化培地のLrg1ウェスタンプロット。b) Lrg1に対して染色された正常（上）および癌性（下）ヒト乳腺組織の組織切片。

【図2】ポリクローナル抗Lrg1抗体によるLrg1の遮断は、アガロースゲル中のLL/2コロニーのサイズを小さくした。LL/2細胞は、500 nM IgGもしくは500 nM抗Lrg1の存在下、またはいずれも存在しない条件下、10%FCS添加DMEMで作製された0.5%アガロースに、 $6.7 \times 10^4$  細胞/mlで懸濁された。懸濁物を、DMEMで作製された1%アガロースでコートされたウェルに播種した。培地および対応する処理を半固体懸濁物の上部に加え、毎週交換した。コロニーサイズは、20日後に、ImageJソフトウェアを用いて分析した。

【図3】ある1つのモノクローナル抗Lrg1抗体の添加は、MTTアッセイ（n=3）で評価されるように、ヒト肺上皮癌細胞株A549の増殖の有意な減少をもたらしたが、別のモノクローナル抗体はそうした結果をもたらさなかった。細胞は10%FCS含有DMEMで5日間培養し、3日目に培地を交換した。

【図4】Lrg1は、正常な上皮細胞株および腫瘍由来上皮細胞株において、標準もしくは非標準的なTGFシグナル伝達経路を誘導する。細胞は一晩、血清飢餓とした後、翌日、ウ

10

20

30

40

50

エスタンプロット分析のために細胞を溶解する前に、a)、b) 60分間、またはc) 10分間、5 ng/ml TGF もしくは200 ng/ml Lrg1により処理、両方を組み合わせて処理、または両方ともなしで処理した。a) Lrg1は、ヒト乳腺腺癌細胞株MDA MB 468においてSmad 1/5リン酸化を引き起こす。b) Lrg1は、ヒト乳腺上皮細胞株MCF10Aにおいてミオシン軽鎖 (MLC) のThr18/Ser19リン酸化を引き起こす。c) Lrg1は、ヒト肺上皮癌細胞株A549においてミオシン軽鎖 (MLC) のThr18/Ser19リン酸化を引き起こす。ヒストグラムは、ImageJソフトウェアを用いたウェスタンプロットの半定量 (n = 3) を示す。

【図5】5 ng/ml TGF もしくは200 ng/ml Lrg1の存在下、両方とも存在下、または両方ともなしでの、MCF10Aヒト乳腺上皮細胞の浸潤および方向性。a) コンフルエントなMCF10 A細胞を、適当な処理培地中で一晩放置した。滅菌ピペットチップを用いて「ひっかき」傷を作り、細胞単層をこすり取った。対応する処理条件の新鮮培地を上に追加した。ImageJを用いて25時間にわたって、標準化されたひっかき傷のサイズの分析を評価した。Lrg1の添加は、MCF10A細胞単層を横断するひっかき傷の閉じる速度の、有意な増加を引き起こす。TGF の同時添加は、その効果を逆転させる (n = 3)。b) MCF10A細胞は、1x10<sup>4</sup> 細胞/mlで播種した。翌日、それを適当な因子で処理した。細胞追跡は、15分ごとに低速度撮影で画像化してImageJソフトウェアを用いて分析し、方向性は、起源からの距離/累積した距離の尺度となる。Lrg1は、MCF10A細胞 (n=3) の移動の方向性の有意な減少を引き起こす。

【図6】200ng/ml Lrg1存在下および非存在下での、抗CD3/CD28刺激による5日間のT細胞活性化後の、CD4 T細胞集団でのTh17関連転写因子ROR $\gamma$ tの発現。

【図7】ヒト末梢単核細胞におけるエンドグリン陽性、CD14/CD11b陽性単球細胞集団（枠で囲まれた領域）のLrg1/TGF 誘導。a) 未処理細胞。b) 5ng/ml TGF で4日処理後。c) 200ng/ml Lrg1で4日処理後、ならびに、d) 5ng/ml TGF + 200ng/ml Lrg1で4日処理後。

【図8】a) 培地のみ、TGF 1、Lrg1、もしくはTGF 1 + Lrg1で48時間処理されたヒト単球におけるHLA-DRの発現。b) 48時間後のCD4 $^{+}$ マクロファージ上HLADR $^{hi}$  およびHLADR $^{lo}$  集団の比較。NT: 無処理；L: Lrg1；T: TGF 1；L+T: Lrg1+ TGF 1。c) Lrg1存在下48時間のHLADR $^{lo}$  CD14 $^{+}$ 集団は、エンドグリン (CD105) 陽性である（実線）。アイソタイプ対照（点線）。d) Lrg1存在下48時間のHLADR $^{lo}$  CD14 $^{+}$ 集団は、TIE2陽性である（実線）。アイソタイプ対照（点線）。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0044】

#### 発明の詳細な説明

#### Lrg1の遮断

本発明のアンタゴニストは、Lrg1の機能を遮断する。Lrg1の遮断は、腫瘍細胞への影響、または腫瘍環境免疫細胞機能への影響をもたらす、その活性もしくは機能の何らかの低下を含む。腫瘍細胞への影響には、腫瘍細胞増殖をダウンレギュレートすること、腫瘍細胞遊走および/または遊走方向性をダウンレギュレートすること、腫瘍細胞の細胞間相互作用の調整、腫瘍遺伝子の発現のダウンレギュレーション、ならびに腫瘍細胞に対してTGF を抗腫瘍因子から発癌促進因子へと切替えるのを阻止することが含まれる。Lrg1の遮断は、Lrg1によって引き起こされる標準および/または非標準的なTGF シグナル伝達を阻害する可能性がある。たとえば、本発明のアンタゴニストは、Lrg1によるALK1非依存性Smad 1/5リン酸化、Lrg1によるミオシン軽鎖リン酸化、および/またはLrg1によるRho/Rhoキナーゼ活性化を遮断することができる。好ましい実施形態において、腫瘍細胞に及ぼす影響は、腫瘍細胞増殖のダウンレギュレーションである。腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響には、末梢血単核細胞 (PBMC) 集団内のCD14陽性CD11b陽性細胞のパーセンテージの減少、ならびにPOP $\gamma$ t陽性CD4 T細胞のパーセンテージの増加が含まれる。本発明のアンタゴニストはまた、単球およびマクロファージ、特に腫瘍関連マクロファージ (TAM) におけるMHCクラスII発現のLrg1による減少を阻止することができる。特に、本発明のアンタゴニストは、Lrg1によるHLA-DR発現の減少を阻止することができる。本発明のアンタゴニストはまた、TAM、特にTie2発現マクロファージ (TEM) におけるTie2発現のLrg1による増

10

20

30

40

50

加を阻止することができる。

【0045】

たとえば、Lrg1の遮断は、Lrg1と、エンドグリン、ベータグリカン、アクチビン受容体様キナーゼ(ALK)、アクチビン受容体II型(ACVRII)、TGF RIIおよび/またはTGF との相互作用を遮断することによると考えられる。Lrg1の遮断はまた、結果としてTGF のバイオアベイラビリティの低下をもたらす可能性がある。Lrg1の遮断は、ALK-BMP、ALK-BMPR、エンドグリン-ALK、および/またはALK-TGF RIIの間の相互作用を遮断することに関与する可能性がある。

【0046】

遮断は、Lrg1の活性もしくは機能の全面的な減少および部分的な減少をいずれも含んでおり、それはたとえば、エンドグリン-Lrg1、ベータグリカン-Lrg1、ALK-Lrg1、TGF RII-Lrg1、ACVRII-Lrg1、および/またはTGF -Lrg1相互作用の全面的もしくは部分的阻止である。遮断は、Lrg1の活性もしくは機能の全面的な減少および部分的な減少をいずれも含んでおり、それはたとえば、ALK-BMP、ALK-BMPR、エンドグリン-ALK、および/またはALK-TGF RII間の相互作用の全面的もしくは部分的阻止である。たとえば、本発明のブロッキングアンタゴニストは、Lrg1の活性を10から50%まで、少なくとも50%、または少なくとも70%、80%、90%、95%、もしくは99%だけ減少させることができる。

【0047】

Lrg1活性もしくは機能の遮断は、任意の適当な方法によって測定することができる。たとえば、エンドグリン-Lrg1、ベータグリカン-Lrg1、ALK-Lrg1、ACVRII-Lrg1、TGF RII-Lrg1、TGF -Lrg1、ALK-BMP、ALK-BMPR、エンドグリン-ALK、および/またはALK-TGF RII相互作用の遮断は、下流のシグナル伝達中間体のリン酸化の阻害を測定することによって、決定することができる。こうした下流シグナル伝達中間体は、Smad転写因子などの標準的なシグナル伝達分子、またはMAPキナーゼ、PI3K、Rho GTPアーゼ、およびPKCなどの非標準的なシグナル伝達分子から選択することができる。

【0048】

Lrg1の遮断はまた、Lrg1遮断の影響のうち1つを測定するアッセイによって評価することもできる。たとえば、増殖および/または遊走試験を用いることができる。足場非依存性増殖を、腫瘍形成能の指標として使用することができる。Lrg1遮断はまた、たとえば、動物モデルで腫瘍増殖速度を測定するような、in vivoアッセイによって評価することも可能であって、こうした動物モデルにおいて、腫瘍誘導は、ホルボールエステルなどの発癌促進剤の投与、もしくは腫瘍細胞株の移植によって、またはRIP-Tagマウスのような腫瘍形成性の動物モデルで、達成することができる。

【0049】

遮断は、たとえば使用されるアンタゴニストの性質(下記参照)に応じて、何らかの適当なメカニズムで起こると考えられるが、それはたとえば、直接もしくは間接的なエンドグリン-Lrg1、ベータグリカン-Lrg1、ALK-Lrg1、ACVRII-Lrg1、TGF RII-Lrg1、TGF -Lrg1、ALK-BMP、ALK-BMPR、エンドグリン-ALK、および/またはALK-TGF RII相互作用における立体障害、またはLrg1発現のノックダウンである。

【0050】

Lrg1のアンタゴニスト

任意の適当なアンタゴニストを本発明にしたがって使用することができるが、それはたとえば、ペプチドおよびペプチドミメティクス、抗体、小分子阻害剤、二本鎖およびアンチセンスRNA、アプタマー、およびリボザイムである。好ましいアンタゴニストとしては、Lrg1のペプチド断片、二本鎖RNA、アプタマー、および抗体が挙げられる。

【0051】

ペプチド

ペプチドアンタゴニストは、典型的には、TGF RII、TGF 、エンドグリン、ベータグリカン、BMP、BMPR、および/またはアクチビン受容体様キナーゼ(ALK)との結合について全長Lrg1と競合し、したがってLrg1と拮抗する、Lrg1の断片である。このようなペプチド

10

20

30

40

50

は直鎖状または環状である。ペプチドアンタゴニストは典型的には、5から50、好ましくは10-40、10-30、もしくは15-25アミノ酸長であって、概してLrg1の中から得られる連續した配列と同一であるが、Lrg1を遮断する性質を保持する限り、その同一性は100%未満であってもよく、たとえば、95%以上、90%以上、または80%以上とすることができます。遮断ペプチドは、任意の適当な方法で、たとえばLrg1配列の一部または全体に及ぶ、連續したペプチドもしくはオーバーラップしたペプチドの体系的なスクリーニングによって、同定することができる。このような遮断ペプチドを模してペプチドミメティクスを設計することもできる。

#### 【0052】

本発明のペプチドアンタゴニストは、Lrg1の、付表1のL1-24もしくは付表2のL94-117(配列番号3)、付表1のL169-192もしくは付表2のL262-285(配列番号4)、または付表1のL227-252もしくは付表2のL320-345(配列番号5)の配列、またはこれらの配列のいずれか1つの一部分を有する、Lrg1の断片とすることができます。あるいはまた、本発明のペプチド抗体は、Lrg1の別の領域に由来するアミノ酸配列、またはその一部を含んでいてもよい。

10

#### 【0053】

##### 二本鎖RNA

既知の技術を使用し、Lrg1の配列に関する知見に基づいて、二本鎖RNA(dsRNA)分子は、Lrg1 RNAの配列相同性に基づくターゲティングによってLrg1と拮抗するように、デザインすることができる。このようなdsRNAは典型的には、通常ステムループ(「ヘアピン」)構造をとる低分子干渉RNA(siRNA)、またはマイクロRNA(miRNA)である。こうしたdsRNAの配列は、Lrg1をコードするmRNAの一部の配列に相当する部分を含んでいる。この部分は、通常、Lrg1 mRNA内の標的部位に100%相補的であるが、相補性はもっと低レベル(たとえば90%以上、または95%以上)であってもよい。

20

#### 【0054】

##### アンチセンスRNA

既知の技術を使用し、Lrg1の配列に関する知見に基づいて、一本鎖アンチセンスRNA分子は、Lrg1 RNAの配列相同性に基づくターゲティングによってLrg1と拮抗するように、デザインすることができる。このようなアンチセンスの配列は、Lrg1をコードするmRNAの一部の配列に相当する部分を含んでいる。この部分は、通常、Lrg1 mRNA内の標的部位に100%相補的であるが、相補性はもっと低レベル(たとえば90%以上、または95%以上)であってもよい。

30

#### 【0055】

##### アプタマー

アプタマーは総じて、特異的な標的分子と結合する核酸分子である。アプタマーは完全に *in vitro*で操作することが可能であり、化学合成によって容易に作製され、望ましい保存特性を有しており、加えて治療的応用において免疫原性をほとんど、もしくはまったく生じない。これらの特徴により、アプタマーは、製薬上および治療上の実用性において特に有用となる。

#### 【0056】

本明細書で使用される「アプタマー」は、総じて、一本鎖もしくは二本鎖オリゴヌクレオチド、またはそういったオリゴヌクレオチドの混合物を表し、このオリゴヌクレオチドもしくは混合物は、標的と特異的に結合することができる。オリゴヌクレオチドアプタマーは本明細書で検討されるが、同等の結合特性を有する他のアプタマー、たとえばペプチドアプタマーなども使用できることは、当業者に当然理解されるであろう。

40

#### 【0057】

概して、アプタマーには、ヌクレオチドの長さが少なくとも5、少なくとも10、または少なくとも15ヌクレオチドである、オリゴヌクレオチドが含まれるといえる。アプタマーは、ヌクレオチドが40以下、60以下、もしくは100以下、またはそれ以上の長さの配列を含有することができる。たとえば、アプタマーは5から100ヌクレオチド、10から40ヌクレオチド、または15から40ヌクレオチドまでの長さとすることができます。可能であればより

50

長さの短いアプタマーが好ましいが、それは、こうしたアプタマーが他の分子もしくは材料による干渉の減少をもたらすことが多いからである。

【0058】

未修飾のアプタマーは、数分から数時間の半減期で、血流から速やかに除去されるが、これは主として、ヌクレアーゼ分解および腎臓による体からのクリアランスに起因する。こうした未修飾アプタマーは、たとえば、血液凝固を刺激するような一過性疾患の治療に有用である。あるいはまた、アプタマーを修飾して半減期を改善することができる。いくつかのこうした修飾、たとえば2'-フッ素置換ピリミジンもしくはポリエチレングリコール(PEG)結合の付加が利用できる。

【0059】

アプタマーは、試験管内人工進化 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment) (SELEX) 法のような常法によって作製することができる。SELEXは、標的分子への高度に特異的な結合を用いた、核酸分子の *in vitro* 進化のための方法である。それはたとえば、US 5,654,151、US 5,503,978、US 5,567,588 および WO 96/38579 に記載されている。

【0060】

SELEX法は、オリゴヌクレオチド集団からの、核酸アプタマーの選択、特に、望ましい標的に結合する能力を有する一本鎖核酸の選択に関わるものである。一本鎖核酸(たとえば、DNA、RNA、またはそれらのバリアント)の集団は、結合に適した条件下で標的と接触させ、混合物中で標的と結合した核酸を、結合していない核酸から分離し、その核酸-標的複合体を解離させ、標的と結合していた核酸を増幅して、望ましい結合活性を有する核酸が濃縮された集団もしくはライブラリーを生じさせるが、次にこの一連のステップを必要に応じて繰り返して、関連標的に特異的な結合親和性を有する核酸(アプタマー)ライブラリーを作製する。

【0061】

抗体

本明細書で使用される「抗体」という用語は、全抗体および任意の抗原結合フラグメント(すなわち、「抗原結合部分」)またはそれらの一本鎖を含んでいる。抗体は、ジスルフィド結合で相互に連結された、少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含んでなる糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域(本明細書では  $V_H$  と略す)および重鎖定常領域で構成される。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書では  $V_L$  と略す)および軽鎖定常領域で構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。 $V_H$  および  $V_L$  領域は、さらに、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性領域に細分化することができ、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存性の高い領域が散在している。

【0062】

抗体の定常領域は、免疫グロブリンと、宿主組織もしくは因子、たとえば免疫系のさまざまな細胞(例、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1成分(C1q)などの結合を仲介することができる。

【0063】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、モノクローナル抗体が好ましいといえる。本発明の抗体は、キメラ抗体、CDR-グラフト化抗体、ナノボディ、ヒトもしくはヒト化抗体、またはそれらのいずれかの抗原結合部分とすることができる。モノクローナルおよびポリクローナル抗体を作製するために、実験動物は、典型的にはヒト以外の哺乳類、たとえばヤギ、ウサギ、ラットもしくはマウスであるが、他の種、たとえばラクダ科動物などで產生させることもできる。

【0064】

ポリクローナル抗体は、当該抗原を用いた適当な動物の免疫化といった常法によって作製することができる。その後、動物から血液を採取して IgG 画分を精製することができる。

10

20

30

40

50

## 【0065】

本発明のモノクローナル抗体(mAb)は、従来のモノクローナル抗体の手法、たとえばKohlerおよびMilsteinの標準的な体細胞ハイブリダイゼーション法を含めて、さまざまな技術によって作製することができる。ハイブリドーマを調製するために好ましい動物系は、マウスの系である。マウスにおけるハイブリドーマ作製は、非常によく確立された手法であって、当技術分野で周知の技術を用いて達成することができる。

## 【0066】

本発明の抗体は、下記を含んでなる方法によって作成することができる：全長Lrg1、Lrg1のペプチド断片、Lrg1の、付表1のL1-24もしくは付表2のL94-117(配列番号3)、付表1のL169-192もしくは付表2のL262-285(配列番号4)、または付表1のL227-252もしくは付表2のL320-345(配列番号5)の配列に含まれるエピトープ、またはLrg1の他の領域に含まれるエピトープなどの免疫原で、ヒト以外の哺乳類を免疫化すること；前記哺乳類から抗体標品を得ること；それから、前記エピトープを特異的に認識するモノクローナル抗体を得ること。

10

## 【0067】

抗体の「抗原結合部分」という用語は、抗原と特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つもしくは複数のフラグメントを意味する。全長抗体のフラグメントが抗体の抗原結合機能を果たすことができる事が明らかになっている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合フラグメントの例には、Fabフラグメント、 $F(ab')_2$  フラグメント、 $F(ab')$  フラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、dAbフラグメント、および個別の相補性決定領域(CDR)がある。scFv抗体などの一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれるものとする。こうした抗体フラグメントは、当業者に知られている従来技術を用いて得ることができるが、フラグメントはインタクトな抗体と同様に、有用性のためにスクリーニングすることができる。

20

## 【0068】

本発明の抗体は、組換え法によって調製、発現、作製または単離することができるが、たとえば(a)抗体は、当該免疫グロブリン遺伝子に関するトランスジェニック動物、または染色体導入(transchromosomal)動物(たとえばマウス)から、またはそれから調製されたハイブリドーマから単離される；(b)抗体は、当該抗体を発現するよう形質転換された宿主細胞から、たとえばトランスフェクトーマから、単離される；(c)抗体は、組換えコンピナトリアル抗体ライブラリーから単離される；ならびに(d)抗体は、免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライスすることを含む、任意の他の手法により、調製、発現、作製または単離される。

30

## 【0069】

本発明の抗体は、ヒト抗体もしくはヒト化抗体とすることができます。本発明で使用される「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク領域およびCDR領域とともにヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する、可変領域を有する抗体を含めるものとする。さらに、抗体が定常領域を含んでいる場合、その定常領域もヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸配列を含んでいてもよい(たとえば、in vitroのランダムもしくは部位特異的変異、またはin vitro体細胞変異によって導入される変異)。しかしながら、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語には、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列をヒトフレームワーク配列に接合した抗体は含まれないものとする。

40

## 【0070】

こうしたヒト抗体は、ヒトモノクローナル抗体とすることができます。このようなヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合させたB細胞を含むハイブリドーマによって產生されるが、このB細胞は、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含有するゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、たとえばトランスジェニックマウスから得られたものである。

50

## 【0071】

ヒト抗体は、ヒトリンパ球を *in vitro* で免疫化した後、そのリンパ球をエプスタイン-バールウイルスで形質転換することによって調製することができる。

## 【0072】

「ヒト抗体の誘導体」という用語は、ヒト抗体の修飾された形、たとえばヒト抗体と別の薬剤もしくは抗体とのコンジュゲートを意味する。

## 【0073】

「ヒト化抗体」という用語は、別の哺乳動物種、たとえばマウス、の生殖細胞系列由來のCDR配列をヒトフレームワーク配列にグラフト化した抗体を指すものとする。ヒトフレームワーク配列内に追加的なフレームワーク領域修飾を行うことができる。

10

## 【0074】

本明細書に記載のスクリーニング法を用いて、Lrg1と結合する能力を有する適当な抗体を同定することができる。したがって、本明細書に記載のスクリーニング法は、テスト化合物として、関心のある抗体を用いて実施することができる。

## 【0075】

本発明の抗体は、たとえば標準的なELISAもしくはウェスタンプロッティングによって、Lrg1との結合を調べることができる。ELISAアッセイを用いて、標的タンパク質と陽性の反応性を示すハイブリドーマをスクリーニングすることもできる。抗体の結合特異性は、標的タンパク質を発現する細胞に対する抗体の結合を、たとえばフローサイトメトリーでモニターすることによっても決定することができる。このように、本発明のスクリーニング法は、ELISAもしくはウェスタンプロッティングの実施により、またはフローサイトメトリーによって、Lrg1と結合する能力を有する抗体を同定するステップを含んでいるといえる。次に、必要とされる結合特性を有する抗体をさらにテストして、上記のLrg1の活性に及ぼす影響を明らかにすることができます。

20

## 【0076】

本発明の抗体は、上記のようにLrg1アンタゴニスト（遮断）特性を有すると考えられる。ある実施形態において、モノクローナル抗体は、Lrg1内のエピトープを特異的に認識して、Lrg1の活性を遮断する。ある実施形態において、モノクローナル抗体は、Lrg1内のエピトープを特異的に認識して、TGF RII、TGF 、ALK、エンドグリン、ベータグリカン、BMPもしくはBMPRとLrg1との相互作用を遮断する。ある実施形態において、モノクローナル抗体は、付表1のアミノ酸L1-24もしくは付表2のL94-117（配列番号3）、付表1のL169-192もしくは付表2のL262-285（配列番号4）、または付表1のL227-252もしくは付表2のL320-345（配列番号5）内のエピトープを特異的に認識し、Lrg1の活性を遮断する。ある実施形態において、モノクローナル抗体は、付表1のアミノ酸L1-24もしくは付表2のL94-117（配列番号3）、付表1のL169-192もしくは付表2のL262-285（配列番号4）、または付表1のL227-252もしくは付表2のL320-345（配列番号5）内のエピトープを特異的に認識し、TGF RII、TGF 、ALK、エンドグリン、ベータグリカン、BMP、BMPRIIもしくはアクチビン受容体II型（ACVRII）とLrg1との相互作用を遮断する。

30

## 【0077】

本発明の抗体は、Lrg1を、すなわちLrg1内のエピトープを、特異的に認識する。抗体もしくは他の化合物は、あるタンパク質と「特異的に結合」する、または、あるタンパク質を「特異的に認識する」が、それは、その抗体もしくは他の化合物が、特異性の対象となるタンパク質と、優先的または高度な親和性で結合するが、他のタンパク質とは実質的に結合しないか、または低い親和性で結合する場合である。本発明の抗体の、標的タンパク質に対する特異性は、抗体が上記のように他の関連タンパク質と結合するか否か、または抗体がそれらを区別するかどうかを判定することによって、さらに検討することができる。たとえば、本発明の抗体はヒトLrg1と結合することができるが、マウスもしくは他の哺乳類のLrg1とは結合しない。

40

## 【0078】

本発明の抗体は、Lrg1と高親和性で結合することが望ましいが、好ましくはピコモルレ

50

ベルで、たとえば表面プラズモン共鳴法もしくは他の任意の適当な方法で測定される親和性定数 ( $K_D$ ) が10nM未満、1nM 未満、500pM未満または100pM 未満で結合することが望ましい。

#### 【 0 0 7 9 】

適当な抗体が特定され、選択されたら、その抗体のアミノ酸配列を、当技術分野で知られている方法によって同定することができる。抗体をコードする遺伝子は縮重プライマーを用いてクローニングすることができる。抗体は常法により組換え技術で作製することができる。

#### 【 0 0 8 0 】

Lrg1内のエピトープは、当技術分野で既知の方法により同定することができるが、特に "PEPSCAN" 法による、連續ペプチドもしくはオーバーラッピングペプチドの、系統的スクリーニングによって、またはLrg1を遮断すると判明しているペプチド断片（上記参照）に対する抗体の作製によって、検討することができる。ペプチド内のエピトープは抗体作製のために特定することができるが、そうしたペプチドの例は、本明細書で検討される付表1のL1-24もしくは付表2のL94-117（配列番号3）、付表1のL169-192もしくは付表2のL26 2-285（配列番号4）、および付表1のL227-252もしくは付表2のL320-345（配列番号5）ペプチドである。上記および他のエピトープ含有ペプチドは、抗体作製のための免疫原として使用することができる。

#### 【 0 0 8 1 】

##### 腫瘍細胞に及ぼす影響

10

本明細書に記載のように、本発明者らはすでに、Lrg1アンタゴニストを用いて血管新生を阻害することができることを示した。抗血管新生薬は、既知の一群の抗癌治療薬である。しかしながら、本発明者らは今回、Lrg1アンタゴニストが腫瘍細胞に影響を与えることができること、すなわち、Lrg1アンタゴニストが、これらのアンタゴニストの血管新生阻害能力と無関係な、抗癌治療効果をもたらすことができるこことを明らかにした。

#### 【 0 0 8 2 】

本発明のLrg1アンタゴニストが腫瘍細胞に及ぼす影響は、直接的であっても間接的であってもよく、すなわちアンタゴニストは1つもしくは複数の腫瘍細胞と直接相互作用するか、または、アンタゴニストは他の細胞型もしくは化合物と相互作用して、中間段階を経て腫瘍細胞にその影響を及ぼす。好ましくは、Lrg1アンタゴニストが腫瘍細胞に及ぼす影響は直接的である。

20

#### 【 0 0 8 3 】

Lrg1アンタゴニストが腫瘍細胞に及ぼす影響には、腫瘍細胞増殖のダウンレギュレーション、上皮間葉転換（EMT）のダウンレギュレーション、腫瘍浸潤、転移性播種、免疫系の回避、腫瘍細胞遊走のダウンレギュレーション、腫瘍細胞の細胞間相互作用のダウンレギュレーションを含めた調節、腫瘍細胞による腫瘍遺伝子（癌遺伝子など）発現のダウンレギュレーションもしくは抗腫瘍遺伝子（腫瘍抑制遺伝子など）発現のアップレギュレーション、または腫瘍細胞に対する抗腫瘍因子から発癌促進因子へのTGF 切替えの阻止がある。

#### 【 0 0 8 4 】

30

本発明のLrg1アンタゴニストは、たとえば、増殖、遊走、細胞間相互作用、腫瘍遺伝子発現、またはTGF 切替えを10から50%、少なくとも50%、または少なくとも70%、80%、90%、95%もしくは99%だけ低下させるように、Lrg1活性を低下させることができる。Lrg1アンタゴニストの影響が、腫瘍細胞による抗腫瘍遺伝子の発現を増加させることであるならば、そのアンタゴニストは、この発現を10 から50%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%だけ増加させ、またはアンタゴニストなしでの抗腫瘍遺伝子の発現を少なくとも2倍にすることができる。

40

#### 【 0 0 8 5 】

Lrg1アンタゴニストの影響は、アンタゴニストが、エンドグリン-Lrg1、betaglycan-Lrg1、TGF RII-Lrg1、TGF -Lrg1、アクチビン受容体様キナーゼ(ALK)-Lrg1、骨形成タン

50

パク質(BMP)-Lrg1、骨形成タンパク質受容体(BMPR)-Lrg1、BMP-ALK、BMPR-ALK、アクチビン受容体II型(ACVRII)-Lrg1、エンドグリン-ALK、またはALK-TGF RII間の相互作用を遮断することによってもたらされる。骨形成タンパク質受容体は好ましくはBMPRIIである。

【0086】

本発明のLrg1アンタゴニストの、腫瘍細胞に及ぼす影響は、直接的に、たとえば、アンタゴニスト存在下で腫瘍細胞の増殖、遊走および/または遊走方向性を測定して(さらに必要に応じて、これを、アンタゴニスト非存在下での腫瘍細胞の増殖、遊走および/または遊走方向性と比較して)、あるいは、エンドグリン-Lrg1、ベータグリカン-Lrg1、TGF RII-Lrg1、TGF -Lrg1、アクチビン受容体様キナーゼ(ALK)-Lrg1、骨形成タンパク質(BMP)-Lrg1、骨形成タンパク質受容体(BMPR)-Lrg1、BMP-ALKもしくはBMPR-ALK、アクチビン受容体II型(ACVRII)-BMPR、ACVRII-Lrg1、エンドグリン-ALK、もしくはALK-TGF RII間の相互作用のレベル、または下流のシグナル伝達分子の存在を測定することによって、評価することができる。このようなパラメーターを測定するための標準的な方法は、当技術分野で知られている。

【0087】

本発明者らの研究は、エンドグリンがLrg1受容体である可能性があること、さらにまた、Lrg1は特定の細胞において分裂促進的となりうることを示唆する。したがって、Lrg1は、エンドグリンを発現する細胞を介して増殖効果を発揮する可能性がある。さらに、TGF は、分裂促進性を有することが知られているが、本発明者らは、Lrg1がTGF シグナル伝達を調節することをすでに明らかにした。したがって、Lrg1アンタゴニストは、エンドグリンおよびTGF を介してもたらされるLrg1の増殖効果を阻害することによって、間接的に、抗癌効果を腫瘍細胞に及ぼすことができるかもしれない。

【0088】

治療適応症

Lrg1が腫瘍細胞もしくは腫瘍環境免疫細胞機能への影響を取り持つような、いかなる癌も、原則として、本発明にしたがって、治療、予防、もしくは改善することができる。本明細書で使用される「腫瘍細胞に及ぼす影響」または類似の用語は、腫瘍細胞に及ぼすLrg1のありとあらゆる直接的な影響を包含するものであって、これには、腫瘍細胞増殖、腫瘍細胞遊走、腫瘍細胞の他の腫瘍細胞との接着、腫瘍遺伝子もしくは癌の増殖および進行に必要な遺伝子の発現、または抗癌因子から発癌促進因子へのTGF の切替えに及ぼす影響が含まれる。本明細書で使用される「腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響」または類似の用語は、腫瘍に近接する、すなわち腫瘍細胞内もしくは腫瘍増殖境界において直接もしくは間接的に接触するあらゆる細胞に及ぼす、Lrg1のありとあらゆる影響を包含するものであって、これには、末梢血単核細胞(PBMC)集団におけるCD14陽性CD11b陽性細胞のパーセンテージの減少、もしくはROR  $\alpha$ 陽性CD4 T細胞のパーセンテージの増加、ならびに炎症性T細胞を遮断するなどの免疫系のメカニズムによる、制御性T細胞および制御性マクロファージを含めた制御性免疫細胞のアップレギュレート(アネルギーを含む)、または免疫寛容原性メカニズムのアップレギュレート、および活性化誘発性細胞死の促進が含まれる。本発明に関して、本明細書で使用される「免疫細胞」という用語もしくは類似用語は、多形核白血球および単核白血球の両者を含む。多形核白血球は、好中球、好酸球、および好塩基球の1つもしくは複数とすることができる。単核白血球は、Bリンパ球、Tリンパ球、単球、マクロファージ、および樹状細胞の1つもしくは複数とすることができる。好ましい実施形態において、免疫細胞は単核白血球である。特に好ましい実施形態において、単核白血球は、単球またはTリンパ球である。さらにより好ましい実施形態では、免疫細胞は、CD4陽性(Tヘルパリンパ球)である。

【0089】

本発明のLrg1アンタゴニストの、単独での、または他の抗癌治療薬と組み合わせた、あらゆる影響を、適當な対照と比較して評価することができるが、その場合、Lrg1アンタゴニストを投与するか、または必要に応じてLrg1アンタゴニストと他の抗癌治療薬を組み合わせて投与した。

10

20

30

40

50

## 【0090】

したがって、Lrg1による影響が生じるが腫瘍増殖のために血管新生に依存しない腫瘍もまた、本発明にしたがって治療、予防、もしくは改善することができる疾患である。また、抗血管新生治療薬に対して非反応性もしくは抵抗性の腫瘍も、本発明にしたがって治療、予防、もしくは改善することができる。さらに、腫瘍血管新生の阻害、および腫瘍細胞へのLrg1の直接的な影響の阻害が有効となる腫瘍は、本発明にしたがって治療、予防、もしくは改善することができる。

## 【0091】

好ましくは、たとえ正常細胞がテストした腫瘍細胞の近傍にあたり、腫瘍細胞と直接接觸している場合でも、正常細胞への影響はないか、最小限である。

10

## 【0092】

本発明にしたがって治療、予防、もしくは改善することができる腫瘍には、骨髄腫、白血病、脳、乳腺、腎臓、結腸直腸、肺、前立腺、頭頸部、胃、脾臓、皮膚、頸部、骨、卵巣、精巣、および肝の腫瘍がある。

## 【0093】

医薬組成物、投与量、および投与計画

本発明のアンタゴニストは、典型的には製薬上許容される担体とともに製剤して、医薬組成物とする。

## 【0094】

本明細書で使用される「製薬上許容される担体」としては、生理的に適合性のある、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌性および抗真菌性物質、等張性および吸収遅延物質などがある。キャリアは、非経口投与、たとえば、静脈内、筋肉内、皮下、眼球内もしくは硝子体内投与（たとえば注射または点滴による）に適していることが好ましい。投与経路に応じて、モジュレーターは、化合物を不活化する可能性のある酸および他の自然条件の作用から化合物を保護するために、材料に覆われていてもよい。

20

## 【0095】

本発明の医薬品は、1つもしくは複数の製薬上許容される塩を含んでいてもよい。「製薬上許容される塩」とは、親化合物の望ましい生物活性を保持し、望ましくない毒生物学的影響を与えない塩を指す。こうした塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩がある。

## 【0096】

好ましい製薬上許容される担体には水性キャリアもしくは希釈剤が含まれる。本発明の医薬組成物に使用することができる適当な水性キャリアの例には、水、緩衝水および生理食塩水がある。他のキャリアの例としては、エタノール、ポリオール（たとえば、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など）、およびそれらの適当な混合物、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挙げられる。多くの場合、等張剤、たとえば糖類、ポリアルコール類、たとえばマンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物中に含んでいることが好ましいと思われる。

30

## 【0097】

治療用組成物は典型的には、製造および保存の条件の下で、無菌的で、しかも安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または他の、高い薬物濃度に適した規則的な組成系として製造することができる。

40

## 【0098】

本発明の医薬組成物は、本明細書に記載の追加の活性成分を含んでいてもよい。

## 【0099】

本発明の範囲には、本発明のアンタゴニストおよび使用説明書を含むキットも含まれる。キットはさらに、下記の追加的な治療薬もしくは予防薬のような、1つもしくは複数の追加薬を含有することができる。

## 【0100】

本発明のアンタゴニストおよび組成物は、予防的および/または治療的処置のために投

50

与することができる。

【0101】

治療的応用において、モジュレーターもしくは組成物は、以前から上記疾患に罹患している被験体に、その疾患を、またはその症状のうち1つもしくは複数を治癒させ、軽減し、または部分的に進行を止めるのに十分な量が投与される。こうした治療的処置の結果、病徵の重篤度が低下し、症状のない期間の回数もしくは持続時間が増加する可能性がある。これを達成するために適切な量は、「治療に有効な量」として定義される。

【0102】

予防的応用では、製剤は、上記疾患のリスクのある被験体に対して、上記疾患、またはその症状の1つもしくは複数の、その後の影響を防止し、または減少させるのに十分な量が投与される。これを達成するために適切な量が、「予防に有効な量」として定義される。それぞれの目的のために有効な量は、疾病もしくは傷害の重篤度、ならびに被験体の体重および全身状態によって決まってくる。

10

【0103】

本発明のアンタゴニストを投与する被験体は、ヒトもしくは非ヒト動物とすることができる。「非ヒト動物」という用語には、すべての脊椎動物、たとえば哺乳類および非哺乳類、たとえば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などが含まれる。ヒトへの投与が好ましい。

【0104】

本発明のアンタゴニストは、当技術分野で知られているさまざまな方法の1つもしくはいくつかを用いて、1つもしくは複数の投与経路によって投与することができる。当業者には当然のことであるが、投与の経路および/または方法は、求められる結果に応じてさまざまである。本発明のモジュレーターに好ましい投与経路としては、たとえば、注射もしくは点滴による、静脈内、筋肉内、皮内、眼球内、腹腔内、皮下、脊髄もしくは他の非経口投与経路が挙げられる。本明細書で使用される「非経口投与」という表現は、腸内投与および局所投与以外の、通常は注射による、投与法を意味する。あるいはまた、本発明の抗体は、非経口以外の経路、たとえば局所、表皮もしくは粘膜などの投与経路で、投与することができる。

20

【0105】

本発明のアンタゴニストの適当な投与量は、熟練した医師ならば決定することができる。本発明の医薬組成物中の活性成分の、実際の投与量レベルは、患者に対して毒性を示すことなしに、個別の患者、組成物、および投与方法について望ましい治療反応を達成するのに有効となる活性成分の量が得られるように、さまざまに変更することができる。選択される投与量レベルは、使用される本発明の個別の組成物の活性、投与経路、投与時間、使用される個別の化合物の排泄速度、治療期間、使用される特定の組成物と併用される他の薬物、化合物および/または物質、治療すべき患者の年齢、性別、体重、疾患、全身健康状態および既往歴、ならびに医学分野で周知の類似要因などの、さまざまな薬物動態学的要因に応じて決まってくる。

30

【0106】

適当な投与量はたとえば、治療すべき患者の体重について約0.1 μg/kgから約100mg/kgまでの範囲内とすることができます。たとえば、適当な投与量は、1日当たり約1 μg/kgから約10mg/kg体重まで、または1日当たり約10 μg/kgから約5 mg/kg体重までとすることができます。

40

【0107】

投与計画は、最適な望ましい反応（たとえば治療反応）を与えるように調整することができる。たとえば、単回投与を行ってもよく、いくつかに分割された用量を時間経過とともに投与してもよいが、治療状況の緊急性で必要とされるように相応して用量を増減することもできる。本明細書で使用される投与単位形態は、単位投与量として治療すべき被験体に適した、物理的に個々別々の単位を意味する；それぞれの単位は、必要な医薬キャリアを伴って望ましい治療効果をもたらすように計算された、所定量の活性化合物を含有す

50

る。

【0108】

投与は、単回投与でも複数回投与でもよい。複数回投与は、同一経路または異なる経路で、同一部位または異なる部位に投与することができる。あるいはまた、投与は、徐放性製剤によることも可能であるが、そのばあい必要な投与回数は少なくなる。投与量および回数は、患者におけるアンタゴニストの半減期、および望ましい治療期間に応じてさまざまとするとなる。

【0109】

下記で詳細に検討するように、本発明のアンタゴニストは、他の1つもしくは複数の治療薬とともに同時投与してもよい。

10

【0110】

併用療法

上記のように、本発明のLrg1アンタゴニストは、任意の他の適切な活性化合物と併用して投与することができる。詳細には、本発明のLrg1アンタゴニストは、1つもしくは複数の追加の抗癌治療薬、および/または1つもしくは複数の抗血管新生薬と併用して投与することができる。併用療法には、本発明のLrg1アンタゴニストおよび1つもしくは複数の追加の治療薬を含有する単一の医薬投与製剤の投与；ならびに本発明のLrg1アンタゴニストおよび1つもしくは複数の追加の治療薬を、独自の別々の医薬投与製剤として投与することができる。たとえば、本発明のLrg1アンタゴニスト、および細胞傷害性薬、化学療法薬、増殖抑制薬、もしくは抗癌モノクローナル抗体を、複合製剤のような単一の投与組成物として、合わせて患者に投与することができるが、それぞれの薬剤を別々の投与製剤として投与することもできる。別々の投与製剤を使用する場合、本発明のLrg1アンタゴニストおよび1つもしくは複数の追加の治療薬は、同時に、または別々にずらした時点で、すなわち順次、投与することができる。Lrg1アンタゴニストおよび別の抗癌治療薬の併用によって発揮される抗癌効果は、好ましくは、単独で投与されるLrg1アンタゴニストまたは別の抗癌治療薬のいずれか一方の抗癌効果より大きくなる。

20

【0111】

本明細書で使用される「細胞傷害性薬」という用語は、細胞の機能を阻害もしくは阻止する、および/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語には、放射性同位元素（たとえば $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  および $Re^{186}$ ）、化学療法薬、および毒物、たとえば細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒物、またはそれらの断片を含めるものとする。

30

【0112】

「化学療法薬」は癌の治療に有用な化合物である。化学療法薬の例には、アルキル化剤、たとえばチオテバおよびシクロホスファミド(Cytoxin(登録商標))；アルキルスルホネート系、たとえばブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン(piposulfan)；アジリジン類、たとえばベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)およびウレドーパ(uredopa)；エチレンイミン類およびメチラメラミン類、たとえばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロールメラミン；ナイトロジエンマスターード、たとえばクロラムブシリ、クロルナファジン、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン(novembichin)、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスターード；ニトロソウレア系、たとえばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、たとえばアクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カリケアミシン、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイシン、ミコフ

40

50

エノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(*p* offiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(*quelamycin*)、ロドルビシン(*rodorubicin*)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗薬、たとえばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、たとえばデノプテリン、メトトレキサート、ブテロプテリン、トリメトレキサート；プリンアナログ、たとえばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、たとえばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン類、たとえばカルステロン、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；副腎阻害薬、たとえばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、たとえばフォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル(*bestrabucil*)；ビサントレン(*bisantrone*)；エダトレキサート；デフォファミン(*defofamine*)；デメコルシン；ジアジクオン；エフロルニチン；エリブチニウム酢酸塩；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK(登録商標)；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン(*gacytosine*)；アラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン系、たとえばパクリタキセル(タキソール(*Taxol*))(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)およびドセタキセル(タキソテール(*Taxotere*))(登録商標)、Aventis Antony, France)；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナアナログ、たとえばシスプラチニンおよびカルボプラチニン；ビンプラスチニン；白金；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトイマイシンC；ミトキサントロン；ビンクリスチニン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネット；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害薬RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの製薬上許容される塩、酸、または誘導体がある。この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を制御もしくは阻害するように作用する抗ホルモン薬も含まれるが、それはたとえば、抗エストロゲン、たとえばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼを阻害する4(5)-イミダゾール類、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナブリストン、およびトレミフェン(フェアストン(*Fareston*)))；ならびに抗アンドロゲン、たとえばフルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびに上記のいずれかの製薬上許容される塩、酸、または誘導体である。

## 【0113】

「増殖抑制薬(増殖阻害薬)」は、本明細書で使用される場合、細胞、特に癌細胞の増殖を *in vitro* または *in vivo* で阻害する化合物もしくは組成物を指す。増殖抑制薬の例としては、細胞周期進行を(S期以外の段階で)阻止する薬剤、たとえばG1停止およびM期停止を引き起こす薬剤がある。古典的なM期プロッカーには、ビンカ系(ビンクリスチニンおよびビンプラスチニン)、タキソール(*Taxol*)(登録商標)、およびトポイソメラーゼII阻害薬、たとえばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンがある。G1停止させる薬剤はS期停止にも波及するが、それはたとえば、DNAアルキル化剤、たとえばタモキシフェン、ブレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、およびシタラビン(Ara-C)である。

## 【0114】

「抗癌モノクローナル抗体」は、本明細書で使用される場合、抗癌効果が達成されるメ

カニズムに関わらず、抗癌効果を発揮するために使用することができる任意のモノクローナル抗体を意味する。抗癌モノクローナル抗体の例としては、慢性リンパ球性白血病治療用のアレムツズマブ(Campath)、脳腫瘍、結腸癌、腎臓癌、および肺癌治療用のベバシズマブ(アバストン(Avastin))、結腸癌および頭頸部癌治療用のセツキシマブ(Erbtux)、非ホジキンリンパ腫治療用のイブリツモマブ(Zevalin)、慢性リンパ球性白血病治療用のオファツムマブ(Arzerra)、結腸癌治療用のパニツムマブ(Vectibix)、慢性リンパ球性白血病および非ホジキンリンパ腫治療用のリツキシマブ(Rituxan)、非ホジキンリンパ腫治療用のトシツモマブ(Bexxar)、乳癌および胃癌治療用のトラスツズマブ(Herceptin)、ならびに結腸癌治療用のエドレコロマブ(Panorex)が挙げられる。

【0115】

10

本発明のLrg1アンタゴニストは、1つもしくは複数の抗血管新生薬もしくは化合物と併用して投与することができる。抗血管新生化合物は、任意の血管新生促進分子のアンタゴニストから選択することができる。アンタゴニストは、Lrg1に関して上記で検討された適当なペプチドおよびペプチドミメティクス、抗体、小分子阻害剤、二本鎖RNA、アブタマーおよびリボザイムから選択することができる。たとえば、抗血管新生化合物は、血管内皮増殖因子(VEGF)のアンタゴニスト、アンジオポエチンアンタゴニスト、胎盤増殖因子(PLGF)のアンタゴニスト、エンドグリンのアンタゴニスト、CD160アンタゴニスト、またはアクチビン受容体様キナーゼ1(ALK1)のアンタゴニストから選択することができる。抗血管新生薬はVEGFまたはPLGFアンタゴニストであることが好ましい。VEGFアンタゴニストは、アバストン(Avastin)および/またはルセンティス(Luentis)のような抗VEGF抗体、および/またはアフリベルセプト(Aflibercept)のような、受容体ベースのVEGFトラップであれば好ましい。

20

【0116】

以下の実施例は本発明の説明する。

【0117】

(実施例)

【実施例1】

【0118】

#### Lrg1ノックアウトマウスでは腫瘍増殖は減少する

腫瘍増殖に及ぼすLrg1の影響を調べた。B16-F0(悪性黒色腫)またはLL/2(ルイス肺癌)細胞を、10% FCS、4mM L-グルタミン、ならびに100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを添加したDMEM中で、接着培養として増殖させた。サブコンフルエンツな細胞をトリプシン処理して、無血清培地に再懸濁した。100μl中1x10<sup>6</sup>腫瘍細胞を、2ヶ月齢の野生型(WT)またはLrg1ノックアウト(KO)マウスの大脚近傍の背部に皮下注射した。腫瘍は、注射の7日後から週3回、カリパスで計測した。腫瘍が1.5cm<sup>3</sup>を超える体積に達したら、マウスを屠殺した。実験の終了時点で、腫瘍を回収し、組織学的分析のために加工処理した。

30

【0119】

B16-F0およびLL/2腫瘍のいずれについても、腫瘍増殖は、Lrg1 KOマウスで、WTマウスより減少していた(図1a)。図1aに提示されるデータは、WTとLrg1 KOマウスとの間の腫瘍増殖の差異を実は小さく評価しているが、それはWTマウスの腫瘍が多くの場合1.5cm<sup>3</sup>の最終体積に達したためであり、それで、実験の終点より前に屠殺しなければならなかつたからである。このデータは、内因性のLrg1発現を欠いたマウスにおいて、腫瘍増殖、すなわち全腫瘍細胞数が減少したことを示している。このことは、Lrg1が腫瘍細胞増殖を刺激することを示す。

40

【0120】

B16-F0およびLL/2細胞株のサンプルから培養培地をウェスタンプロッティングで分析し、2つの癌細胞株がいずれもLrg1タンパク質を発現して分泌することが明らかになった(図1a、下図)。ヒト乳癌(乳房上皮細胞由来)および対照の非癌性ヒト乳房組織からの組織アレイを組織学的分析に供して、Lrg1発現を調べた(図1b)。Lrg1に特異的な抗体を用

50

いてアレイを染色し、Lrg1発現はサンプルの褐色の染色によって示された。非癌性乳房組織はLrg1をほとんど発現せず、上皮細胞には最小限の染色しか見られなかつた（図1b、上図）。しかしながら、ヒト乳癌組織アレイは、Lrg1について強く染色された（図1b、下図）。もっとも強く染色された細胞は、Lrg1を発現し、それを腫瘍の細胞外環境中に分泌していると考えられるので、Lrg1染色のバックグラウンドレベルは、乳癌アレイの全域で観察される（対照サンプルではバックグラウンド染色はほとんど観察されない）。この分泌されたLrg1は、そこで他の腫瘍細胞に作用するだけでなく、腫瘍環境の他の細胞、たとえば免疫細胞にも作用する。

## 【0121】

こうしたウェスタンプロットおよび組織学的データから、腫瘍細胞はそれ自体のLrg1供給を生み出すことができると結論付けた。Lrg1非存在下で腫瘍増殖が低下することが示されたので（図1a）、この腫瘍産生Lrg1の非存在下では、または腫瘍細胞が産生するLrg1の生物活性が遮断されるならば、腫瘍細胞増殖および腫瘍成長のレベルは、Lrg1 KOマウスであってもさらに低下すると予想される。KOマウスによって産生されるLrg1は存在せず、腫瘍細胞によって産生されるLrg1の活性は阻害されるので、これは達成される可能性がある。

10

## 【実施例2】

## 【0122】

Lrg1発現はさまざまな腫瘍でアップレギュレートされている

Lrg1の発現がない状態で腫瘍増殖は減少することが明らかになったので、本発明者らは次に、さまざまな腫瘍型においてLrg1の発現を調べた。癌の公表文献およびデータベースの探索（表1）は、Lrg1遺伝子およびタンパク質発現が、多くの場合、卵巣、乳房、肺、および前立腺で増加していることを示す。実施例1の結果と併せて、このことは、Lrg1が癌治療のための新薬開発につながる標的であることを示す。

20

## 【実施例3】

## 【0123】

抗Lrg1抗体はin vitroで腫瘍細胞増殖を低下させる

ルイス肺癌（LL/2）細胞がLrg1<sup>-/-</sup>マウスにおいてWT対照よりゆっくりと増殖することが確認されたので、本発明者らは次に、抗Lrg1ポリクローナル抗体によるLrg1遮断が足場依存性の細胞増殖を低下させるかどうかを、標準的な軟寒天コロニー形成アッセイによって判定した。LL/2細胞は、500 nM IgG、500 nM 抗Lrg1ポリクローナル抗体の存在下、または培地のみで、10% FCSを添加したDMEMで作製された0.5%アガロース中に $6.7 \times 10^4$  細胞/mlで懸濁した。懸濁物を、DMEMで作製した1%アガロースでコートしたウェル上に播種した。培地および付随する処理を、半固体懸濁物の上に加え、毎週交換した。20日後にコロニーの大きさを、ImageJソフトウェアを用いて分析した。Lrg1遮断の結果、培地のみ、または無関係のIgG対照と比較して、コロニーの大きさに有意な減少が生じた（図2）。

30

## 【0124】

ヒトLrg1に対するモノクローナル抗体（mAb）が作製されたので、本発明者らは次に、これらの抗体がいずれも、ヒト肺上皮癌細胞株A549の増殖を阻止することができるかどうかを判定した。1つのモノクローナルの添加は、MTTアッセイによる評価で、A549細胞のin vitro増殖の有意な低下をもたらしたが、もう一つの添加はそうではなかった（n = 3）（図3）。この実験では、培地には100nM mAbを加え、細胞は5日間培養中に維持された。その結果は、Lrg1の機能的な遮断が細胞増殖速度の低下をもたらすことを示しており、さらに、癌に存在するLrg1を標的とすることが治療の上で価値があるという考えを裏付ける。

40

## 【実施例4】

## 【0125】

Lrg1は標準的および非標準的TGF-βシグナル伝達を誘導する

Lrg1が、正常な上皮細胞株および腫瘍由来の上皮細胞株において標準的もしくは非標準的TGF-βシグナル伝達経路を誘導することができるかどうかを判定するために、in vitro

50

でLrg1およびTGF のさまざまな組み合わせで処理した。細胞は、一晩血清飢餓とした後、5 ng/ml TGF 、または200 ng/ml Lrg1、または両者を組み合わせて処理し、その10-60分後に溶解してウェスタンプロットで分析した。ヒト乳腺腺癌細胞株MDA MB 468において、Lrg1はSmad 1/5リン酸化を引き起こすことが明らかになったが（図4a）、それは標準的なシグナル伝達経路を誘導することができることを示している。さらに、ヒト乳腺上皮細胞株MCF10Aおよびヒト肺上皮癌細胞株A549のいずれにおいても、Lrg1は、EMTの活性化と合致するミオシン軽鎖（MLC）Thr18/Ser19リン酸化（図4bおよびc）から明白であるよう に、Rho/ROCK経路の非標準的な活性化を引き起こすことが明らかになった。ヒストグラムは、ImageJソフトウェアを用いたA549細胞に関するウェスタンプロットの半定量を示す（n = 3）。

10

#### 【実施例5】

##### 【0126】

#### Lrg1は標準的および非標準的TGF シグナル伝達を誘導する

Lrg1がこれらの細胞において標準的および非標準的シグナル伝達を誘導することが示されたので、本発明者らは次に、このことが細胞機能に変化をもたらすかどうかを判定した。MCF 10Aヒト乳腺上皮細胞の遊走機能を、培地のみ、または5 ng/ml TGF 、200 ng/ml Lrg1、もしくは両者の組み合わせの存在下で評価した。遊走を測定するために、本発明者らは広く使用されているスクラッチ（創傷閉鎖）アッセイを用いたが、このアッセイでは、滅菌ピペットチップを用いてMCF10A細胞のコンフルエントな単層を貫通して、ひっかき傷を作った。付随する処理を行って新鮮培地を加え、遊走する細胞による創傷の閉鎖を25時間にわたって記録した。その後創傷サイズをImageJによって測定した。Lrg1の添加は、未処理細胞と比較して、閉鎖速度の有意な増加を引き起こすことが明らかになった（図5a）。TGF は単独では、閉鎖速度を変化させなかったが、Lrg1と組み合わせるとその効果を減弱させた（n=3）。次に細胞遊走の方向性をMCF10A細胞で判定した。細胞は低密度（1 x10<sup>4</sup> 細胞/ml）で播種し、上記のように処理した。細胞の移動跡は15分ごとにタイムラスプ顕微鏡で撮影して、Image Jソフトウェアを用いて分析し、方向性は起源からの距離/累積距離の指標となる。分析から、Lrg1がMCF10A細胞の遊走方向性の有意な低下を引き起こすに明らかになった（n=3）（図5b）。データは、細胞のシグナル伝達の誘導に加えてLrg1は細胞の挙動にも影響を及ぼすことを示す。

20

#### 【実施例6】

##### 【0127】

#### Lrg1発現は免疫細胞集団を調節する

C57/BL6マウス由来の脾臓を単個細胞懸濁液とし、血球計で計数した。CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> T細胞分離キット（Miltenyl Biotech）を用いて、1 x 10<sup>8</sup>細胞からナイーブT細胞を分離した。96ウェルプレートで、1 x 10<sup>6</sup>/mlの密度で細胞を培養し、200ng/ml 組換えヒトLrg1あり、およびなしで、1 μg/ml可溶性抗CD3および2 μg/ml可溶性抗CD28で刺激し、5% CO<sub>2</sub>下で37 °Cに維持した。5日後、細胞をCD4（APC）に対して表面染色し、核内転写因子ROR  $\alpha$ （PE）およびFoxP3（FITC）に対して内部染色した。データはFACSCaliburで得られ、FlowJoソフトウェアを用いて解析された。

30

#### 【0128】

マウス脾細胞のLrg1による処理は、Th17 CD4+ T細胞の集団をほぼ20%から5%未満まで減少させた（図6）。したがって、これらのデータは、Lrg1が免疫細胞を調節することができることを示している。具体的には、本発明者らは、Lrg1が、もし存在すれば癌細胞を攻撃することができるT細胞集団を減少させるように、マウス脾細胞を調節することを示した。

40

#### 【0129】

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を健康なドナーの全血から、Ficoll-Histopaque密度勾配遠心分離法を用いて分離した。PBMCは、10% 熱失活FBS、2mM非必須アミノ酸類、2mM ピルビン酸ナトリウム、50mM 2-メルカプトエタノール、100U/mlペニシリン、100ug/ml ストレプトマイシンおよび50 μg/mlゲンタマイシンを含有するRPMI Glutamax中、2.5 x 10<sup>6</sup>

50

細胞/mlの密度で、96ウェルプレートにおいて培養した。細胞を組換えヒトLrg1 200ng/mlおよび/またはヒトTGF 1 5ng/mlで処理し、5% CO<sub>2</sub>下で37℃に維持した。4日後に細胞を回収し、PBSで1回洗浄した後、FACSCaliburフローサイトメーターでサンプル当たり20,000細胞を得た。FACSデータは、Flow Joソフトウェアを用いて、FSC対SSCによって解析した。

### 【0130】

PBMCのTGF 1による処理は、CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>細胞集団を、0.362%（対照、図7、上の左図）から1.23%（図7、上の右図）へと増加させた。PBMCのLrg1による処理も、CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>細胞集団を、対照PBMCサンプルより増加させた（1.79%に増加、図7、下の左図）。しかしながら、TGF 1およびLrg1の両者によるPBMCの処理は、CD14<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>細胞集団を4.74%まで増加させた。これらのデータは、Lrg1が、TGF 1依存性の様式で免疫応答を調節することができることを示し、さらにその上、腫瘍が産生するLrg1は（上記実施例1で示すように）このLrg1産生によって患者の免疫応答を調節することができることを示唆する（図8）。

### 【0131】

本発明者らは次に、Lrg1が腫瘍の生存および増大に関して、単球/マクロファージ表現型に及ぼしうる影響を調べた。ヒト末梢血単核細胞から回収された単球は、培地のみ、TGF 1、Lrg1、またはTGF 1 + Lrg1で48時間処理し、HLA-DRの発現をフローサイトメトリーによって測定した。200ng/ml Lrg1、または200ng/ml Lrg1および5ng/ml TGF 1の組み合わせによる処理は、HLA-DRの発現の有意な低下をもたらした（図8a）。Lrg1またはLrg1 + TGF 1で処理したCD14<sup>+</sup>マクロファージにおいて、HLA DR<sup>hi</sup>細胞のパーセンテージは減少し、HLA DR<sup>lo</sup>細胞のパーセンテージは増加した（図8b）。このことは癌にとって適切であるが、それは、低いMHCクラスIIを発現する腫瘍関連マクロファージ（TAM）が免疫抑制的であって、腫瘍血管新生を促進するからである。TAMの少ない割合の一部は、Tie2および低レベルのMHCクラスIIを発現し、いわゆるTie2発現マクロファージ（TEM）であるが、TEMの欠失は腫瘍治療の有効性を大いに改善することが判明した。したがって、本発明者らは、Lrg1存在下で48時間で誘導されるHLA DR<sup>lo</sup> CD14<sup>+</sup>集団がエンドグリン（CD105）およびTIE2陽性であるかどうかを調べた。フローサイトメトリーから、HLA DR<sup>lo</sup> CD14<sup>+</sup>集団がやはりエンドグリン（図8c）およびTIE2（図8d）を発現することが明らかになった。Lrg1が、HLA DR<sup>lo</sup>、ENG<sup>hi</sup>、TIE2<sup>+</sup>であるCD14<sup>+</sup>マクロファージ集団を誘導するという本発明者らの説明は、TAM/TEM発癌促進性マクロファージ集団と一致する。

### 【0132】

したがって、本発明者らは、Lrg1が腫瘍細胞、特に腫瘍細胞増殖に、直接刺激的な影響を及ぼすことができるることを実証しただけでなく、一部の腫瘍がそれ自体の内因的なLrg1供給を生じることができることも実証した。さらに本発明者らは、はじめて、腫瘍がLrg1発現を介して免疫応答を調節することができるかもしれないことを示し、Lrg1発現に拮抗することによって腫瘍環境免疫細胞機能を標的とすることは、有望な抗癌治療法とされた。

本発明の実施形態として、例えば以下を挙げることができる。

- (1) 腫瘍細胞に及ぼす影響によって癌の治療もしくは予防法に使用するための、ロイシンリッチ 2グリコプロテイン1（Lrg1）のアンタゴニスト。
- (2) 非血管性細胞に作用する、(1)に記載のLrg1アンタゴニスト。
- (3) 腫瘍細胞に及ぼす影響が腫瘍細胞増殖のダウンレギュレーションである、(1)または(2)に記載のLrg1アンタゴニスト。
- (4) Lrg1アンタゴニストが、
  - (a) 腫瘍細胞遊走のダウンレギュレーション；
  - (b) 腫瘍細胞間の細胞間相互作用のダウンレギュレーション；
  - (c) 腫瘍細胞による腫瘍性遺伝子発現のダウンレギュレーション；ならびに
  - (d) 腫瘍細胞に対する抗腫瘍因子から発癌促進因子へのTGF の切替え阻止、から選択される、少なくとも1つの追加の影響を腫瘍細胞に及ぼす、(3)に記載のLrg1アンタゴニスト。

10

20

30

40

50

(5) 腫瘍細胞に及ぼす影響が、

- (a) 腫瘍細胞遊走のダウンレギュレーション；
- (b) 腫瘍細胞間の細胞間相互作用のダウンレギュレーション；
- (c) 腫瘍細胞による腫瘍性遺伝子発現のダウンレギュレーション；ならびに
- (d) 腫瘍細胞に対する抗腫瘍因子から発癌促進因子へのTGF の切替え阻止、から選択される、(1)または(2)に記載のLrg1アンタゴニスト。

(6) 腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響によって癌の治療もしくは予防法に使用するための、ロイシンリッチ 2グリコプロテイン1 (Lrg1) のアンタゴニスト。

(7) 前記アンタゴニストが、末梢血単核細胞 (PBMC) 集団内のCD14陽性CD11b陽性細胞のパーセンテージを、アンタゴニストを投与しない対照と比べて低下させる、(6)に記載のLrg1アンタゴニスト。  
10

(8) 前記アンタゴニストが、ROR  $\tau$ 陽性CD4 T細胞のパーセンテージを、アンタゴニストを投与しない対照と比べて増加させる、(6)または(7)に記載のLrg1アンタゴニスト。

(9) 前記アンタゴニストが、TGF もしくはBMPシグナル伝達において、

- (a) Lrg1とTGF 受容体II (TGF RII)；および/または
- (b) Lrg1とTGF 、および/または
- (c) Lrg1とアクチビン受容体様キナーゼ (ALK)、および/または
- (d) Lrg1とエンドグリン；および/または
- (e) Lrg1とベータグリカン；および/または
- (f) Lrg1と骨形成タンパク質 (BMP)；および/または
- (g) Lrg1と骨形成タンパク質受容体 (BMPR)；および/または
- (h) ALKとBMPR、および/または
- (i) Lrg1とアクチビン受容体II型 (ACVRII)；および/または
- (j) エンドグリンとALK；および/または
- (k) ALKとBMPR；および/または
- (l) ALKとTGF RII

との間の相互作用を遮断する、(1)～(8)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(10) 前記アンタゴニストによる前記遮断が、

- (a) エンドグリンとLrg1との間の相互作用を低下させ、それによってALKとTGF 受容体II (TGF RII) との間の相互作用を調節する；および/または
- (b) ベータグリカンとLrg1との間の相互作用を低下させ、それによってALKとTGF RIIとの間の相互作用を調節する；および/または
- (c) BMP、BMPRおよびALK複合体の形成、もしくは前記複合体によるシグナル伝達を妨害する；および/または
- (d) 非標準的なTGF シグナル伝達を妨害する；および/または
- (e) BMP、ACVRIIおよびALK複合体の形成、もしくは前記複合体によるシグナル伝達を妨害する、

(9)に記載のLrg1アンタゴニスト。

(11) Lrg1機能を遮断する、抗体、二本鎖RNA、アンチセンスRNA、アプタマー、またはペプチドもしくはペプチドミメティクスを含む、(1)～(10)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(12) Lrg1の断片である、(11)に記載のアンタゴニストペプチド。

(13) L1-24 (配列番号3)、L169-192 (配列番号4)、およびL227-252 (配列番号5) の配列、またはそれらの一部を含む、(12)に記載のアンタゴニストペプチド断片。

(14) Lrg1のアミノ酸227-252からなる、またはそれを含んでなる、(13)に記載のアンタゴニストペプチド断片。

(15) モノクローナル抗体、またはモノクローナル抗体のフラグメントである、(11)に記載のアンタゴニスト抗体。

(16) Lrg1のL1-24 (配列番号3)、L169-192 (配列番号4)、またはL227-252 (配列番号5) の配列内のエピトープを特異的に認識する、(15)に記載のアンタゴニストモノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

ル抗体。

(17) Lrg1のL227-252(配列番号5)の配列内のエピトープを特異的に認識する、(16)に記載のアンタゴニストモノクローナル抗体。

(18) 低分子干渉RNA(siRNA)またはマイクロRNA(miRNA)である、(11)に記載のアンタゴニスト二本鎖RNA。

(19) 増殖のために血管増殖に依存しない癌、または抗血管新生薬もしくは抗血管増殖薬による治療に反応しない癌の治療に使用するための、(1)~(18)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(20) 別の抗癌治療薬と併用して使用するための、(1)~(19)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(21) 他の抗癌治療薬が、細胞毒性薬、化学療法薬、増殖抑制薬、および抗癌モノクローナル抗体から選択される、(20)に記載のLrg1アンタゴニスト。

(22) 抗血管新生化合物と併用して使用するための、(1)~(21)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(23) 抗血管新生化合物が、血管内皮増殖因子(VEGF)のアンタゴニスト、アンジオポエチンアンタゴニスト、胎盤増殖因子(PLGF)のアンタゴニスト、エンドグリンのアンタゴニスト、CD160アンタゴニスト、またはアクチビン受容体様キナーゼ1(ALK1)のアンタゴニストである、(22)に記載のLrg1アンタゴニスト。

(24) 前記VEGFアンタゴニストが抗VEGF抗体である、(23)に記載のLrg1アンタゴニスト。

(25) 骨髄腫、白血病、脳腫瘍、乳腺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、肺腫瘍、前立腺腫瘍、頭頸部腫瘍、胃腫瘍、膵臓腫瘍、皮膚腫瘍、頸部腫瘍、骨腫瘍、卵巣腫瘍、精巣腫瘍および肝腫瘍から選択される癌の治療に使用するための、(1)~(24)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(26) 静脈内、筋肉内、皮内、眼球内、腹腔内、皮下、脊髄、非経口、局所、表皮、硬膜下、頭蓋内、脳室内、もしくは粘膜投与用である、(1)~(25)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニスト。

(27) (1)~(26)のいずれかに記載のLrg1アンタゴニストを同定する方法であって、その方法は

(a) 候補となるアンタゴニストを提供すること、ならびに

(b) 前記の候補アンタゴニストが、腫瘍細胞に及ぼすLrg1の直接的な影響を遮断するか否かを判定すること；

を含み、前記候補アンタゴニストは、腫瘍細胞に及ぼすLrg1の影響を遮断することが観察されれば、Lrg1のアンタゴニストとして同定される、前記方法。

(28) (a) エンドグリンとLrg1；および/または

(b) Lrg1とTGF受容体II(TGFRII)；および/または

(c) Lrg1とアクチビン受容体様キナーゼ(ALK)；および/または

(d) Lrg1とTGF；および/または

(e) Lrg1とベータグリカン；および/または

(f) Lrg1と骨形成タンパク質(BMP)；および/または

(g) Lrg1と骨形成タンパク質受容体(BMPR)；および/または

(h) ALKとBMPR；および/または

(i) Lrg1とアクチビン受容体II型(ACVRII)；および/または

(j) エンドグリンとALK；および/または

(k) ALKとBMPR；および/または

(l) ALKとTGFRII

との間の相互作用をLrg1アンタゴニストが遮断する、(27)に記載の方法。

(29) 肿瘍細胞に及ぼす影響による癌の治療もしくは予防のための薬剤の製造における、Lrg1のアンタゴニストの使用。

(30) Lrg1のアンタゴニストの有効量を、それを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍細胞に及ぼす影響による癌の治療法。

10

20

30

40

50

(31) 腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響による癌の治療もしくは予防のための薬剤の製造における、Lrg1のアンタゴニストの使用。

(32) Lrg1のアンタゴニストの有効量を、それを必要とする患者に投与することを含む、腫瘍環境免疫細胞機能に及ぼす影響による癌の治療法。

【0133】

参考文献

WO 96/38579

WO 2011/027129

US 2005/0064516

WO 2008/092214

US 2007/0184503

US 5,654,151

US 5,503,978

US 5,567,588

Haupt H, Baudner S; Hoppe Seylers Z (1977) Isolation and characterization of an unknown, leucine-rich 3.1-S-alpha2-glycoprotein from human serum Physiol Chem. J un; 358(6): 639-46. (Title translated from original German)

Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW; (1985) Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alp ha 2-glycoprotein of human serum Proc Natl Acad Sci USA. Apr;82(7):1906-10.

Lynch J, Fay J, Meehan M, Bryan K, Watters K, Murphy D, Stallings R (2012) MiRNA -335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGF signalling pathway Carcinogenesis Mar 1 (epub ahead of print)

Sun D, Kar S, Carr BI (1995) Differentially expressed genes in TGF-beta 1 sensitive and resistant human hepatoma cells Cancer Lett. Feb 10; 89(1):73-9.

Li X, Miyajima M, Jiang C, Arai H (2007) Expression of TGF-betas and TGF-beta type II receptor in cerebrospinal fluid of patients with idiopathic normal pressure hydrocephalus Neurosci Lett. Feb 14; 413(2):141-4. Epub 2006 Dec 27.

Meulmeester, E. and ten Dijke, P. (2011). The dynamic roles of TGF- in cancer. J. Pathol. 223: 205-218.

Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H. and Licona-Limon, P. (2010). The polarisation of immune cells in the tumour environment by TGF . Nat. Rev. Immunol. 10:554-567.

Daly, A.C., Randall, R.A and Hill, C.S. (2008). Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. Mol. Cell Biol. 28:6889-6902

Zou, W. and Restifo, N.P. (2010). Th17 cells in tumour immunity and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. 10: 248-256.

Schmieder A, Schledzewski K, Michel J, Tuckermann JP, Tome L, Sticht C, Gkaniatsou C, Nicolay JP, Demory A, Faulhaber J, Khyshkowska J, Geraud C, Goerdt S. (2011). Synergistic activation by p38MAPK and glucocorticoid signaling mediates induction of M2-like tumor-associated macrophages expressing the novel CD20 homolog MS4A8A. Int J Cancer. 129: 122-132.

Welford AF, Biziato D, Coffelt SB, Nucera S, Fisher M, Pucci F, Di Serio C, Naldini L, De Palma M, Tozer GM, Lewis CE. (2011). TIE2-expressing macrophages limit the therapeutic efficacy of the vascular-disrupting agent combretastatin A4 phosphate in mice. J Clin Invest. 121: 1969-1973.

10

20

30

40

【表 1】

病態	研究名	実験	サ ン プ ル	上 昇/ 下 降	結果	基本方針方法	データソース	学術誌リンク	データリンク
卵 巣 が ん	ヒト ロイシンリッヂ α2 グリコプロテイン 1は卵巣がん患者の血清および腫瘍液においてアッブレギュレートされている	卵巣がんおよび良性婦人科疾患(BDG)患者の2コート由来 血清中のLRG1をELISAにより定量	血清	上昇	卵巣がん患者 58人の平均血清LRG1は健常者56人より高い(2倍増)。III/IV期患者で最高。	ELISA	Journal of Ovarian Research · Andersen et al 2010	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849730/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849730/</a>	
	組織サンプル - 遺伝子アレイ用に92卵巣がん(さまざまな型)および57正常卵巣。追加して7卵巣がんおよび13正常卵巣サンプルをRT-PCRウェスタンに使用。		組織	上昇	LRG1 mRNAおよびタンパク質レベルは卵巣がん組織で正常对照より高い(3.4倍高い)。	遺伝子アレイ (Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0)およびRT-PCR			
	13卵巣がん細胞株および7不死化正常卵巣表層上皮(INOSE)細胞株を使用		細胞株	上昇	LRG1 mRNAおよびタンパク質レベルは卵巣細胞株で正常对照より高い。肝臓と同様に、卵巣がん細胞もLRG1を產生して分泌する。	免疫細胞化学、ウエスタン blot、ELISA			



卵 巣 が ん	ヒト	3つの卵巣がん細胞株、CaOV3、OVCAR3およびES2、ならびに腹水から濃縮された卵巣腫瘍細胞の、細胞表面プロテオーム、および細胞外環境に放出されたタンパク質の評価	液体クロマトグラフーおよびMS分析	PLOS one -Faca et al 2006	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1824255/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1824255/</a>
	ヒト	卵巣がん細胞株	細胞株	CodeLink Human 20K ver4.1	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1824255/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1824255/</a>
卵 巣 が ん	ヒト	卵巣がん細胞株で測定し、がん患者の血清と比較	卵巣がん細胞株で測定し、がん患者の血清と比較	GEO - GDS3523	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3523">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3523</a>
	ヒト	卵巣がん上皮細胞	細胞	[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3523">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3523</a>
卵 巣 が ん	ヒト	正常な卵巣表層上皮(OSE)および卵巣がん上皮細胞(CEPI)の比較。CERIはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションで卵巣液性乳頭状腺がんから分離した。結果は卵巣腺がん発生におけるOSEの役割を理解する洞察をもたらす	正常な卵巣表層上皮(OSE)および卵巣がん上皮細胞(CEPI)の比較。CERIはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションで卵巣液性乳頭状腺がんから分離した。結果は卵巣腺がん発生におけるOSEの役割を理解する洞察をもたらす	GEO - GDS3592	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3592">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GDS3592</a>
	ヒト	さまざまながん細胞株のトランスクリプトームプロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を3通りで行った	さまざまながん細胞株のトランスクリプトームプロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を3通りで行った	Microarray Ex E-MTAB-37	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=37">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=37</a>

卵 巣 が ん	正常な卵巣表層上皮(OSE)および卵巣上皮上皮細胞がん上皮細胞	正常な卵巣表層上皮(OSE)および卵巣上皮(CEP)の比較。CERIはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションで卵巣液性乳頭状腺がんから分離した。結果は卵巣腺がん発生におけるOSEの役割を理解する洞察をもたらす	細胞	卵巣がん上皮細胞でLRG1がアップレギュレートされる	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	GEO GDS3532	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles/PMC205370">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles/PMC205370</a> [GEO] [PubMed]
	細胞培養化培地のプロトオーム解析による前立腺がん用腫瘍マーカー候補の発見	前立腺がん細胞株(PC3/AR16)を用いて、新規前立腺腫瘍マーカー候補を探索した	細胞株	前立腺がん細胞株由来培養培地中にLRG1が分泌された	液体クロマトグラフィーおよびMS分析	Clinical chemistry: Sardana et al 2007	<a href="http://www.clinicalchemistry.org/cgi/content/full/53/3/459">http://www.clinicalchemistry.org/cgi/content/full/53/3/459</a> [GEO] [PubMed]
	転移性前立腺がん(HG-U95B)アレイによる発現プロファイリング	転移性前立腺腫瘍および原発性前立腺腫瘍の解剖。腫瘍に隣接した正常組織および正常ドナー組織も調べた。転移は最悪の臨床転帰を示す。結果は、転移プロセスの根底にある分子機構を理解する洞察をもたらす	組織	正常前立腺組織と比較して転移性前立腺がんにおいてLRG1が過剰発現される	[HG_U95B] Affymetrix Human Genome U95B Array	GEO - GDS2545	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles/PMC2545">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles/PMC2545</a> [GEO] [PubMed]

ヒト 前立腺がん	前立腺がんの進行	組織 上昇	原発性および良性 前立腺がん腫瘍 の発現プロファイリング。 結果は、mRNA およびタンパク質レベルの一致した変化を識別するためにイムノプロッティングから得られた結果と比較する	[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	GEO - GDS1439	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/records?term=GDS1439">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/records?term=GDS1439</a> [GACCNI+LRG1]
ヒト 前立腺がん	前立腺がんの進行	組織 上昇	原発性および良性 前立腺がん腫瘍 の発現プロファイリング。 結果は、mRNA およびタンパク質レベルの一致した変化を識別するためにイムノプロッティングから得られた結果と比較する	[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	GEO - GDS1439	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/records?term=GDS1439">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/records?term=GDS1439</a> [GACCNI+LRG1]
ヒト 前立腺がん	転移性前立腺がん(HG-U95B)	組織 上昇	転移性前立腺腫瘍 および原発性前立腺 腫瘍の解析。腫瘍に 隣接する正常組織および正常ドナー組織 も調べた。転移は最 悪の臨床転帰を示す。 結果は、転移ブロセスの根柢にある 分子機構を理解する 洞察をもたらす	Affymetrix Human Genome U95B Array	GEO - GDS2546	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/records?term=GDS2546">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/records?term=GDS2546</a> [GACCNI+LRG1]

乳がん	ヒト	3 株の細胞株、1)MCF-10A(対照)、2)BT474(がん)、3)MDA-MB-468(末期転移)のプロテオームプロファイルを比較した。	細胞培地	上昇	LRG1 MDA-MB-464 は 最高に発現された。LRG1の発現は対照 MCF10A 細胞で最小であった。	強陽イオン交換液 体クロマトグラフィー <sup>一</sup> MS/MS	Molecular and cellular proteomics - Kulasingham et al 2007	<a href="http://www.proteome-expert.com/6/1/1937/full.pdf">http://www.proteome-expert.com/6/1/1937/full.pdf</a>
	マウス	腫瘍浸潤を促進するマクロファージの遺伝子発現解析は原発性乳腺腫瘍において活性をもたらす Wnt シグナル伝達の役割を裏付ける	細胞	上昇	浸潤促進マクロファージにおいて LRG1 発現が 3 倍増加。浸潤性 TAM は血管新生と腫瘍浸潤を関連づける	Journal Immuno-Oncology et al 2010	<a href="http://www.jimmuno.org/15/184/2702.full.pdf+html">http://www.jimmuno.org/15/184/2702.full.pdf+html</a>	
	ヒトおよびマウス	乳がんマウスモルデルの血漿プロテオーム解析は、ヒト乳がん細胞のアッブレギュレートされたタンパク質を同定する	組織	上昇	PYMT ドランジエニック担がんマウスおよび対応对照の血漿を、腫瘍増殖中 2 つの時点で採取した。合計 133 タンパク質が一方の時点で、または 2 つの時点で 1.5 倍以上増加していることが判明した。この一連のタンパク質と、ヒト乳がん細胞株のプロテオーム解析から得られた公開知見との比較は、マウス血漿中のレベルの増加した 49 タンパク質をもたらしたが、それは乳がん細胞株において同定されたものである。	Journal proteome Res - Pitem et al 2007	<a href="http://pubs.acs.org/doi/10.1021/00107904">http://pubs.acs.org/doi/10.1021/00107904</a>	

乳がん	ヒト	腫瘍微小環境由来タンパク質は血漿プロテオームの乳がん誘発および進行中の反応を支配する	腫瘍発生は腫瘍微小環境および宿主免疫系変化からのおよび寄与に依存する。こうした寄与は、がんの診断および予後診断のために利 用できるように、血漿プロテオームに伝達することができる。この研究において、生物学的アプローチシステムを用いて、腫瘍誘発、進行、およ び縮小時の乳がんの誘導 HER2/neu マウスモデルで、血漿プロテオームの反応を特性評価した。	組織 上昇	LRG1 は	LC-MS/MS	Cancer Research - Pitten et al 2011	<a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/15/5020.full.pdf">http://cancerres.aacrjournals.org/content/71/15/5020.full.pdf</a>
乳がん	ヒト	種々のヒトがん細胞株の転写プロファイル	さまざまがん細胞株のトランスクリプトームプロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を 3 連で行った	細胞 株	上昇 LRG1 アップレギュレート	Affymetrix GeneChip Human U133 Plus 2.0	MicroArray Ex. E-MTAB-37	<a href="http://array.ebi.ac.uk/queries/permanent-MIAB-37/ENSG00000171236">http://array.ebi.ac.uk/queries/permanent-MIAB-37/ENSG00000171236</a>
肝細胞がん	ヒト	種々のヒトがん細胞株の転写プロファイル	さまざまがん細胞株のトランスクリプトームプロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を 3 連で行った	細胞 株	上昇 肝細胞がん細胞株で LRG1 がアップレギュレートされた	Affymetrix GeneChip Human U133 Plus 2.0	MicroArray Ex. E-MTAB-37	<a href="http://array.ebi.ac.uk/queries/permanent-MIAB-37/ENSG00000171236">http://array.ebi.ac.uk/queries/permanent-MIAB-37/ENSG00000171236</a>

胆道がん	ヒト	血清 LRG1 CA19-9 および IL-6 の組み合せは良性の構造から胆管がんを分化させる	健常者 30 人および BTC 患者 37 人から分析した血清プロテオーム	血清 上昇	健常ブールに対し BTC で 4.49 倍 (2D-DIAGE) および 2.7 倍 (ELISA) LRG1 アップリギュレート	2D-DIAGE、タンデム MS および ELISA	British Journal of Cancer Sandanayake et al 2011	<a href="http://www.nature.com/journal/10541/376a.pdf">http://www.nature.com/journal/10541/376a.pdf</a>
膀胱がん	ヒト	ティファレンシャーレルゲル電気泳動 (DIGE) によるヒト血清中の LRG1 は腫瘍がん患者 3 人および健常对照 3 人の血清のプロトオームプロファイルの比較	ティファレンシャーレル電気泳動 (DIGE) によるヒト血清中の LRG1 は腫瘍がん患者 3 人および健常对照 3 人の血清のプロトオームプロファイルの比較	血清 変化なし	LRG1 は腫瘍がん患者の血清中で特異的に発現しているとは見なされなかった	2D-DIAGE および LC-MS/MS	Journal Proteome Res - Yu et al 2005	<a href="http://links.elsevier.com/retrieve/pii/1051010204039174">http://links.elsevier.com/retrieve/pii/1051010204039174</a>
膀胱がん	ヒト	二次元ゲル電気泳動および質量分析法で検出される膀胱がんのタンパク質発現プロファイルの正常な膀胱組織および膀胱癌組織との比較	二次元ゲル電気泳動および質量分析法で検出される膀胱がんのタンパク質発現プロファイルの正常な膀胱組織および膀胱癌組織との比較	組織 変化なし	LRG1 は腫瘍がん患者の血清中で特異的に発現しているとは見なされなかった	2D-DIAGE および LC-MS/MS	Cancer Research - Shen et al 2004	<a href="http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/24/20101">http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/24/20101</a>
膀胱がん	ヒト	定量的プロテオミクスアプローチおよび免疫組織学的検証による膀胱癌進行の分析	マイクロダイセクションした 1000 細胞のタンパク質は、蛍光染色サチュレーションペーリングと高分解能二次元ゲル電気泳動 (2-DE) を組み合わせた手順を受けた。	細胞 変化なし	LRG1 は腫瘍がん患者の血清中で特異的に発現しているとは見なされなかった	マイクロダイセクションおよび 2D-DIAGE	Journal Proteome Res - Sitek et al 2009	<a href="http://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr800894q">http://pubs.acs.org/doi/10.1021/pr800894q</a>

肺 臓 が ん	ヒ ト	種々のヒトがん細胞株の転写プロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を3連で行った。	さまざまながん細胞株のトランスクリプトームプロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を3連で行った。	上 昇 細 胞 株	肺臓がん細胞株でLRG1がアップレギュレートされていた。	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	MicroArray Ex E-MTAB-37	<a href="http://www.ebi.ac.uk/ebiarray/Permeate/EMTAB_37/ENSG00000171236">http://www.ebi.ac.uk/ebiarray/Permeate/EMTAB_37/ENSG00000171236</a>
肺 が ん	ヒ ト	NSCLC を検出するための尿中バイオマーカーとならないエキソソーム LRG1 のプロトオーム同定	健常对照 10 人および NSCLC 患者 8 人の尿中エキソソームのプロテオームを比較することにより、尿中エキソソームの非小細胞肺がん(NSCLC) 患者の肺、20 サンプルを関連タンパク質を探索。NSCLC 患者の肺、20 サンプルを LRG1 について染色し、隣接する非腫瘍肺組織と比較した。	尿	LRG1 が NSCLC 患者の尿サンプルで過剰発現(6 倍増加)。NSCLC 患者の肺サンプルの 65% が LRG1 過剰発現に対して染色陽性。	nano-HPLC-chip-MS/MS およびウェスタンプロット	Electrophoresis - Li et al 2011	<a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.20100281593/pdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.20100281593/pdf</a>
肺 が ん	ヒ ト	モノクローナル抗体ライブラリを用いた血漿プロトオームのプロファイルによる肺がんバイオマーカーの発見	ステージ I 非小細胞肺がん(NSCLC) 発見のために適用される mAB プロテオミクス。肺がん患者 301 人および健常対照 235 人を比較した。LRG1 のための ELISA によってチャーチルして cysIC を使用した	上 昇 血 漿	LRG1 が肺がん患者でアップレギュレート。2.13 -2.22 倍増加(サンディッヂ ELISA)	mAB プロテオミクス ELISA	Int. and Cell Proteomics - Guergova-Kuras et al 2011	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111010/pdf/26mc0283.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111010/pdf/26mc0283.pdf</a>
肺 が ん	ヒ ト	多次元液体クロマトグラフィーおよび二次元ディファレンシャルゲル電気泳動の連続による血漿プロトオミクス	肺がんの異常な血漿タンパク質を発見するためには、肺がん患者 5 人および健常対照 4 人の血清のプロテオームプロファイルを比較した。	血 漿	LRG1 の 1 つのアントイドが肺がん患者の血清中でアップレギュレート	2D-DIGE および LC-MS/MS	Proteomics - Okano et al 2005	<a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200500833/pdf">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200500833/pdf</a>

ヒト骨髓性白血病	種々のヒトがん細胞株の転写プロファイルリング	さまざまがん細胞株のトランスクリプトームプロファイルを評価するために複数のゲノムワイドマイクロアレイ研究を3連で行った	細胞株	上昇	2つの骨髓性白血病細胞株でLRG1がアップリゲートされた	Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	MicroArray EX. E-MTAB-37	MicroArray EX. E-MTAB-37	HuGE ARRAY EX. E-MTAB-37	HuGE ARRAY EX. E-MTAB-37
----------	------------------------	---	-----	----	------------------------------	--	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

10

20

30

40

## 【表2】

## ヒト正常および腫瘍上皮細胞株におけるLrg1およびエンドグリンの発現

細胞株	説明	分泌されたLrg1	エンドグリン
MCF10A	ヒト乳腺上皮細胞株	Y	Y
A549	ヒト上皮肺がん	Y	Y
MDA MB 468	ヒト乳腺腺がん	N	N
LL2	マウス ルイス肺がん	Y	N/D

10

## 【0134】

## 付表1

Mirg1 1	LRELHLSSMRLQALSPPELLAPVPR 24 L+ELHLSSN L++LSPE L FVF+	LQELHLSSNGLESLSPEFLRPVPQ 24	
HLrg1 25	LRALDLTRNALRSLPPGLFSTSAN 48 LR LDLTRNAL LPPGLF SA	LRVLDLTRNALTGLPPGLFQASAT 48	
Mirg1 49	LSTLVLVRENQLREVSAQWLQGLDA 72 L TLVL+ENQL + WL GL A	LDTLVLKENQLEVLEVSWLHGLKA 72	20
HLrg1 49	LDTLVLKENQLEVLEVSWLHGLKA 72		
Mirg1 73	LGHLDLAAENQLSSLPSGLLASLGA 96 LGHLDL+ N+L LP GLLA+	LGHLDLSGMNRKLPFPGLLANFTL 96	
HLrg1 73	LGHLDLSGMNRKLPFPGLLANFTL 96		
Mirg1 97	LHTLDLGYNLLESLPEGLLRGPRR 120 L TLDLG N LE+LP LLRGP +	LRTLDLGENQLETLPFDLLRGPLQ 120	
HLrg1 97	LRTLDLGENQLETLPFDLLRGPLQ 120		
Mirg1 121	LQR LHLEG N RLQRLED SLLA P QPF 144 L+RLHLEG N+L Q L LL P QP	LER LHLEG NKLQVLGKD LLL P QPD 144	
HLrg1 121	LER LHLEG NKLQVLGKD LLL P QPD 144		
Mirg1 145	LRVLFNNDNQLVGVATGSFQGLQH 168 LR LFLN N+L VA G+FQGL+	LRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQ 168	30
HLrg1 145	LRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQ 168		
Mirg1 169	LDMLDLSSNN SLSSTPPGLWAFLGR 192 LDMLDLSSNN SLSSTPPGLWAFLGR	LDMLDLSSNN SLSASVPEGI WASLGQ 192	
HLrg1 169	LDMLDLSSNN SLSASVPEGI WASLGQ 192		
Mirg1 193	PTRDMQDGFDISHNPWICDKN LADL CRWLVANRN 226 P DM+DGFDIS NPWICD+NL+DL RWL A ++	PNWDMRDGFDISGNP WICDQNL SDLYRWLQ A QKD 226	
HLrg1 193	PNWDMRDGFDISGNP WICDQNL SDLYRWLQ A QKD 226		
Mirg1 227	KMFSQNDTRCAGPEAKKGQRLLDVAE 252 KMFSQNDTRCAGPEAKKGQRLLDVAE	KMFSQNDTRCAGPEAKKGQTLLAVAK 252	
HLrg1 227	KMFSQNDTRCAGPEAKKGQTLLAVAK 252		40
L1-24: LQELHLSSNGLESLSPEFLRPVPQ			
L169-192: LDMLDLSSNN SLSASVPEGI WASLGQ			
L227-252: KMFSQNDTRCAGPEAKKGQTLLAVAK			

## 【0135】

ロイシンリッチリピート（赤色）および高度に保存されたC末端ドメイン（緑色）を明らかにするように配列されたマウスおよびヒトLrg1の部分配列アラインメント。

## 【0136】

## 付表2

Human	1	MSSWSRQRPK SPGGIQPHVS RTLFLLLLLA ASAAGVTLSP M SW Q L LL G S	
Mouse	1	MVSQHQGSL QDLKTCLART LFLALL--- ---GRVSSL	
Human	41	KDCQVFRSDH GSSISCCOPPA EIPGYLPADT VHLAVEFFNL K+C + +S GS++SC P E P LPADT VHL+VEF NL	
Mouse	34	KECLILQSAE GSTVVSCHGPT EFPSSLPADT VHLSVEFSNL	
Human	81	THLPANLLOG ASKLQELHLS SNGLESLSPE FLRPVPQLRV T LPA LQG L+ELHLS SN L++LSPE L PVP+LR	
Mouse	74	TQLPAAALQG CPGIRELHLS SNRLQALSPE LLAPVPRLLRA	10
Human	121	LDLTRNALTG LPPGLFQASA TLDLVLKEN QLEVLEVSLL LDLTRNAL LPPGLF SA L TIVL+EN QI + WL	
Mouse	114	LDLTRNALRS LPPGLFSTSA NLSTLVLREN QLREVAQWL	
Human	161	HGLKALGHLD LSGNKLRLKLP PGLLANFTLL RTLDLGENQL GL ALGHLD L+ N+L LP GLIA+ L TLDLG N L	
Mouse	154	QGLDAALGHLD LAENQLSSLP SGLLASLGAI HTLDLGYNLL	
Human	201	ETLPPDILLRG PLQLERLHIE GNKLQVLGKD LLLPQPDLRV E+LP LLRGP +L+RLHIE GN+LQ L LL PQP LR	
Mouse	194	ESLPEGILLRG PRRLQRRLHIE GNRLQRLEDS LLAPQPFLRV	
Human	241	LFLNGNKLAR VAAGAFQGLR QLDMILDLSNN SLASVPEGLW LFLN N+L VA G+FQGL+ LDMILDLSNN SL+S P GLW	20
Mouse	234	LFLNDNQLVG VATGSFQGLQ HLDMDLDSNN SISSTPPGLW	
Human	281	ASLGQPNWDM RDGFDISGNP WICDQNLSDL YRWLQAQKDK A LG+P DM +DGFDIS NP WICD NL+DL RWL A ++K	
Mouse	274	AFLGRPTRDM QDGFDISHNP WICDKNLADL CRWLVANRNK	
Human	321	MFSQNDTRCA GPEAVKGQYL LAVAKSQ MFSQNDTRCA GPEA+KGQ L L VA+	
Mouse	314	MFSQNDTRCA GPEAMKGQRL LDVAELGSL	

## 【 0 1 3 7 】

30

Human:ヒト、Mouse:マウス

ロイシンリッチ グリコプロテイン1 (Lrg1) はリモデリングされた網膜血管において最大の変化を示した。ヒトおよびマウスLrg1のアラインされたアミノ酸配列。ロイシンリッチリピート領域は赤色、阻害ペプチドとして使用されるヒトC末端ドメイン領域は緑色とする。

## 【 0 1 3 8 】

## 配列情報

## ヒトLrg1の配列

## 配列番号 1 ヒトLrg1のDNA配列

[配列番号 2 のタンパク質をコードする配列は、下記配列番号 1 の中で太字として下線を付す]

40

GCAGAGCTACCATGTCCTCTGGAGCAGACAGCGACCAAAAGCCAG  
GGGGCATTCAACCCCATGTTCTAGAACTCTGTCCTGCTGCTGCTGT  
TGGCAGCCTCAGCCTGGGGGTACCCCTGAGCCCCAAAGACTGCCAG  
GTGTTCCGCTCAGACCATGGCAGCTCCATCTCCTGTCAACCACCTGCC  
GAAATCCCCGGTACCTGCCAGCCGACACCGTGCACCTGGCCGTGGA  
ATTCTCAACCTGACCCACCTGCCAGCCAACCTCCTCCAGGGCGCCTC  
TAAGCTCCAAGAATTGCACCTCTCCAGCAATGGGCTGGAAAGCCTCT  
CGCCCGAATTCTGCCAGTGCCAGCTGAGGGTGTGGATCTA  
ACCCGAAACGCCCTGACCGGGCTGCCCTGGCTTCCAGGCC  
AGCCACCCCTGGACACCCTGGTATTGAAAGAAAACCAGCTGGAGGTCC  
TGGAGGTCTCGTGGCTACACGGCCTGAAAGCTCTGGGATCTGGAC  
CTGTCTGGAACCGCCTCCGGAAACTGCCCTGGCTGCTGGCAA  
CTTCACCCCTCCTGCCACCCCTGACCTTGGGAGAACCAAGTTGGAGA  
CCTTGCCACCTGACCTCCTGAGGGTCCGCTGCAATTAGAACGGCTA  
CATCTAGAAGGCAACAAATTGCAAGTACTGGAAAAGATCTCCTCTG  
CCGCAGCCGGACCTGCCCTACCTCTGAACGGCAACAAGCTGGC  
CAGGGTGGCAGCCGGTGCCTCCAGGGCCTGCCAGCTGGACATGC  
TGGACCTCTCAAAACTCACTGCCAGCGTCCCCGAGGGGCTCTGG  
GCATCCCTAGGGCAGCAAACGGACATGCCGGATGGCTTCGACAT  
CTCCGGCAACCCCTGGATCTGTGACCAAGAACCTGAGCGACCTCTATC  
GTTGGCTTCAGGCCAAAAAGACAAGATGTTTCCCAGAATGACACG

10

20

30

CGCTGTGCTGGGCCTGAAGCCGTGAAGGGCCAGACGCTCCTGGCAGT  
GGCCAAGTCCCAGTGAGACCAGGGCTGGTTGAGGGTGGGGGTCTG  
GTAGAACACTGCAACCGCTTAACAAATAATCCTGCCCTTGGCCGGGTGC  
GGGGGCTCACGCCCTGTAATCCCAGCACTTGGGAGGCCAGGTGGCGGA  
TCACGAGGTCAAGGAGATCGAGACCATCTTGGCTAACATGGTAAACCTG  
TCTCTACTAAAAATATAAAAATTAGCCAGGCGTGGTGGTGGCACCTGT  
AGTCCCAGCAACTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAACGGTGAACCTGGG  
AGGCGGAGCTGCCGTGAGCCAAGATCGTGCCTGCACCTAGCCTGGG  
CGACAGAGCAAGACTGTCTAAAAAAATTAAAATTAAAATAAAAACAA  
ATAATCCTGCCCTTACAGGTGAAACTCGGGCTGTCCATAGCGGCTGGG  
ACCCCGTTCATCCATGCCCTGCTTAGAACACACGATGGCTTCCTTA  
CCCATGCCCAAGGTGTGCCCTCCGTGGAATGCCGTTCCCTGTTCCCAG  
ATCTCTGAACTCTGGGTTCTCCCAGCCCTGACTCTGTCTCCCAAGTCAGG  
CCTGGCCACACTGGGCTGCCCTCTGACTCTGTCTCCCAAGTCAGG  
GGGCTCTGAGTGCAGGGTCTGATGCTGAGTCCACTAGCTGGGTCA  
GAACCAAGGGTTAATAAAATAACCCCTGAAAAGTGG

40

50

## 【0139】

## 配列番号2 ヒトLrg1のアミノ酸配列

[配列番号3-5の配列は、下記配列番号2の中で太字として下線を付す]

MSSWSRQRPKSPGGIQPHVSRTLFLLLLLAASAWGVTLSPKDCQVFRSDHGSS  
 ISCQPPAEIPGYLPADTVHLAVEFFNLTHLPANLLQGASKLQELHLSSNGLES  
LSPEFLRPVPQLRVLDLTRNALTGLPPGLFQASATLDLTLKENQLEVLEVS  
 WLHGLKALGHLDLSGNRLRKLPPLGLLANFTLLRTLDLGENQLETLPFDLLRG  
 PLQLERLHLEGNKLVLGKDLLLQPDLRYLFLNGNKLARVAAGAFQGLRQ  
LDMQLDLSNNSLASVPEGLWASLGQPNWDMRDGFDISGNPWICDQNLSDLY  
 RWLQAQKDKMFSQNDTRCAGPEAVKGQTLLAVAKSQ

10

## 【0140】

## 配列番号3-5 Lrg1内のペプチドのアミノ酸配列

## 配列番号3 付表2のヒトLrg1のアミノ酸1-24(付表3のL94-117)

L1-24/L94-117: LQELHLSSNGLESLSPEFLRPVPQ

## 配列番号4 付表2のヒトLrg1のアミノ酸169-192(付表3のL262-285)

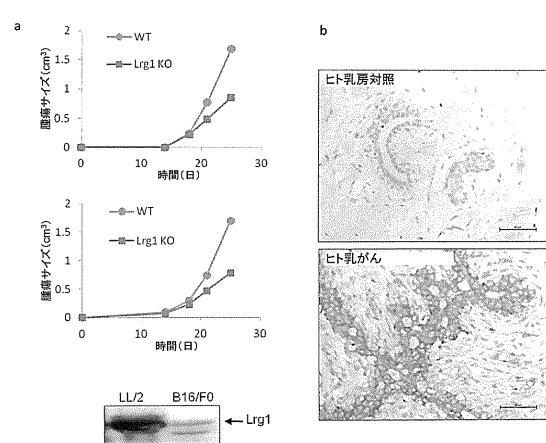
L169-192/L262-285: LDMQLDLSNNSLASVPEGLWASLGQ

20

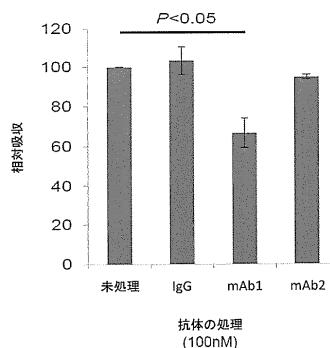
## 配列番号5 付表2のヒトLrg1のアミノ酸227-252(付表3のL320-345)

L227-252/L320-345: KMFSQNDTRCAGPEAVKGQTLLAVAK

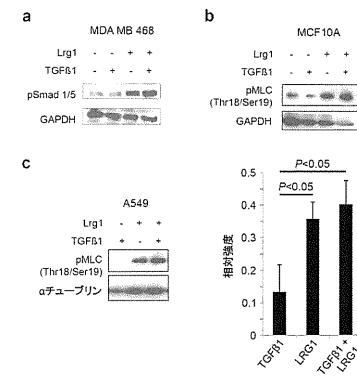
## 【図1】



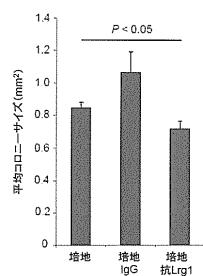
## 【図3】



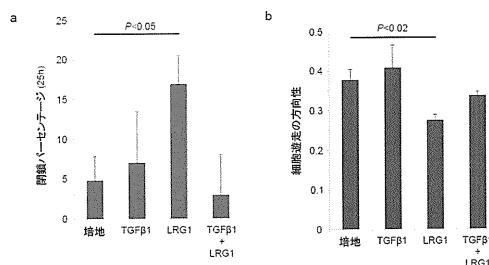
## 【図4】



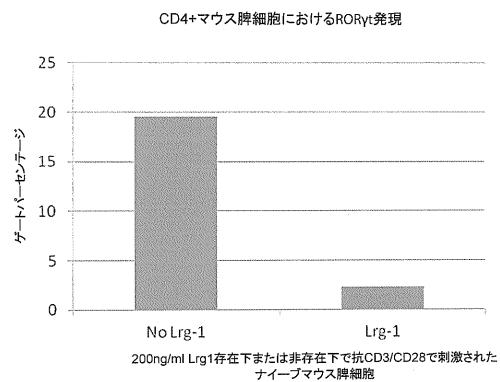
## 【図2】



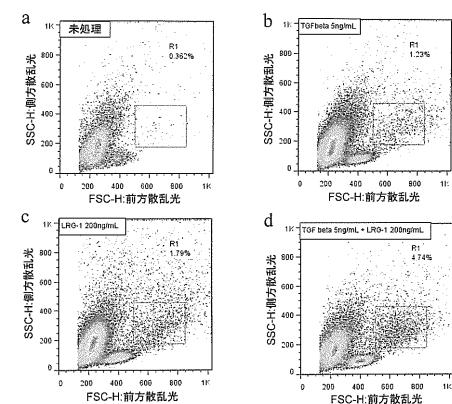
【図5】



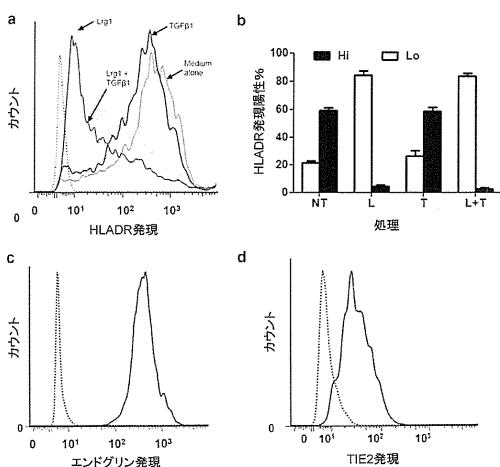
【図6】



【図7】



【図8】



【配列表】

0006181088000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) C 0 7 K 16/22  
 A 6 1 P 43/00 1 0 5

(74)代理人 100169971  
 弁理士 菊田 尚子  
 (74)代理人 100182992  
 弁理士 江島 孝毅  
 (72)発明者 グリーンウッド, ジョン  
 イギリス国 イーシー1ブイ 9イーエル ロンドン, バス ストリート 11-43, ユニバーサティ カレッジ ロンドン, インスティテュート オブ オフサルモロジー, ディパートメント オブ セル バイオロジー  
 (72)発明者 モス, スティーブン  
 イギリス国 イーシー1ブイ 9イーエル ロンドン, バス ストリート 11-43, ユニバーサティ カレッジ ロンドン, インスティテュート オブ オフサルモロジー, ディパートメント オブ セル バイオロジー  
 (72)発明者 ワン, シャオメン  
 イギリス国 イーシー1ブイ 9イーエル ロンドン, バス ストリート 11-43, ユニバーサティ カレッジ ロンドン, インスティテュート オブ オフサルモロジー, ディパートメント オブ セル バイオロジー

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 國際公開第2011/027129 (WO, A1)  
 Carcinogenesis, 2012年 3月 1日, vol.33, no.5, p.976-985

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 A 6 1 K 39 / 395  
 A 6 1 P 35 / 00  
 A 6 1 P 35 / 02  
 A 6 1 P 43 / 00  
 C 0 7 K 16 / 22  
 C 1 2 N 15 / 113  
 J ST Plus / J MED Plus / J ST 7580 (J Dream III)  
 Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)