

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-500045  
(P2005-500045A)

(43) 公表日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/06</b>	C 1 2 N 5/00	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 17/06</b>	A 6 1 P 17/06	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 174 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-511907 (P2003-511907)	(71) 出願人	501142928
(86) (22) 出願日	平成14年7月12日 (2002.7.12)		ルードビッヒ、インスティテュート、フォー、
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月13日 (2004.1.13)		キャンサー、リサーチ
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/022164		LUDWIG INSTITUTE FO
(87) 国際公開番号	W02003/006104		R CANCER RESEARCH
(87) 国際公開日	平成15年1月23日 (2003.1.23)		アメリカ合衆国ニューヨーク州、ニューヨ
(31) 優先権主張番号	60/304, 889		ーク、サーティサード、フロアー、サード
(32) 優先日	平成13年7月12日 (2001.7.12)		、アベニュー、605
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(71) 出願人	501129435
(31) 優先権主張番号	60/317, 610		ライセンティア・リミテッド
(32) 優先日	平成13年9月6日 (2001.9.6)		フィンランド 00130 ヘルシンキ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		エロッタヤンカトゥ 19 ビー 5
		(74) 代理人	100075812
			弁理士 吉武 賢次
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 リンパ管内皮細胞材料および方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞の混合集団から、リンパ管内皮細胞を単離する方法および組成物に関する。より詳しくは、本発明者らは、VEGFR-3の細胞外ドメインを認識する特定の抗体を用いて、他の非リンパ管内皮細胞が実質的に混入していないリンパ管内皮細胞を特異的に単離することができることを発見した。前記細胞の作製および前記細胞の使用のための方法および組成物を記載する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リンパ管内皮細胞を含む生物学的サンプルからリンパ管内皮細胞を単離する方法であって、

a) 前記サンプルと、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞を優先的に認識する抗体とを、該抗体がリンパ管内皮細胞と結合する条件下にて接触させ、さらに

b) 前記抗体と結合しているリンパ管内皮細胞を単離すること

を含んでなる、方法。

## 【請求項 2】

前記抗体が、リンパ管内皮細胞に特異的な V E G F R - 3 の細胞外ドメインのエピトープと免疫反応性のある抗体である、請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 3】

前記生物学的サンプルが、ヒト患者由来のものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記抗体が固相支持体上に固定化され、かつ、前記生物学的サンプルが該支持体と接触して、前記リンパ管内皮細胞が前記抗体と結合することを可能とするものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記抗体を蛍光ラベルにて標識し、かつ、前記リンパ管内皮細胞が蛍光活性化セルソーティングによって単離するものである、請求項 1 に記載の方法。 20

## 【請求項 6】

前記抗体を磁気ラベルにて標識し、かつ、前記リンパ管内皮細胞が磁気活性化セルソーティングによって単離するものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記リンパ管内皮細胞が、免疫組織化学によって単離するものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

リンパ管内皮細胞が免疫クロマトグラフィーによって単離するものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記抗体がポリクローナル抗体であるものである、請求項 1 に記載の方法。 30

## 【請求項 10】

前記抗体がモノクローナル抗体であるものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記抗体が、2 E 1 1 D 1 1 の抗原結合フラグメントを含んでなる結合試薬であるものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記抗体が、2 E 1 1 D 1 1 によって認識される V E G F R - 3 タンパク質の同じエピトープを認識するものである、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記抗体が、2 E 1 1 D 1 1 であるものである、請求項 1 に記載の方法。 40

## 【請求項 14】

前記抗体が、抗ポドプラニンであるものである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

微小血管内皮細胞のサンプルから血管内皮細胞を単離する方法であって、

a) 前記細胞と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを、前記抗体がリンパ管内皮細胞と結合する条件下にて接触させ、さらに

b) 前記抗体と結合していない微小血管細胞から、前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を取り除くものであり、ここで、前記抗体と結合していない前記微小血管細胞が、リンパ管内皮細胞を実質的に含まない血管内皮細胞集団を含んでなること 50

を含んでなる、方法。

【請求項 16】

前記抗体が、VEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体である、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

a) リンパ管内皮細胞を含む生物学的サンプルと、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを、前記抗体がリンパ管内皮細胞と結合する条件下にて接触させ、さらに

b) 該抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を単離すること

を含んでなる方法によって単離されたものである、リンパ管内皮細胞集団。

10

【請求項 18】

前記抗体がVEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体である、請求項17に記載のリンパ管内皮細胞集団。

【請求項 19】

細胞の前記生物学的サンプルが、内皮細胞の異種集団を含んでなるものである、請求項17に記載のリンパ管内皮細胞集団。

【請求項 20】

細胞の前記生物学的サンプルが、微小血管内皮細胞集団であるものである、請求項17に記載のリンパ管内皮細胞集団。

【請求項 21】

血管内皮細胞が実質的に混入していない、請求項17に記載のリンパ管内皮細胞集団。

20

【請求項 22】

前記リンパ管内皮細胞を増殖させることを含んでなる、請求項17に記載の方法。

【請求項 23】

a) 微小血管内皮細胞集団と、血管内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを、該抗体がリンパ管内皮細胞と結合する条件下にて接触させ、さらに

b) 前記抗体と結合していない微小血管細胞から、前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を取り除き、ここで、前記抗体と結合していない微小血管細胞が、リンパ管内皮細胞を実質的に含まない血管内皮細胞集団を含んでなること

を含んでなる方法によって単離された、血管内皮細胞集団。

30

【請求項 24】

前記抗体が、VEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体である、請求項23に記載の血管細胞集団。

【請求項 25】

前記血管内皮細胞集団を増殖させることをさらに含んでなる、請求項23に記載の血管細胞集団。

【請求項 26】

他の内皮細胞が実質的に混入していない、リンパ管内皮細胞集団。

【請求項 27】

他の内皮細胞が実質的に混入していない、血管内皮細胞集団。

40

【請求項 28】

リンパ管内皮細胞の部分集団が実質的に富化されたものである組成物を得る方法であって、

(a) 微小血管内皮細胞を含んでなる細胞源を用意し、

(b) 該細胞と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合するモノクローナル抗体とを、該抗体がリンパ管内皮細胞と結合しうる条件下にて接触させ、

(c) 前記モノクローナル抗体が特異的に結合する細胞を分離して、リンパ管内皮細胞の部分集団が実質的に富化されたものである組成物を得ること

を含んでなる、方法。

【請求項 29】

50

前記抗体が、抗ポドプラニン抗体である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体が、2E11D11 である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 28、29 または 30 に記載の方法によって得られ、実質的に富化されたリンパ管内皮細胞部分集団を含んでなるものである、組成物。

【請求項 32】

リンパ管内皮細胞障害を改善する方法であって、治療剤を用いてリンパ管内皮細胞を標的化することを含んでなり、前記治療剤が、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を用いてリンパ管内皮細胞を標的化し、前記抗体が、VEGFR-3 の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であるものである、方法。

10

【請求項 33】

前記障害が、リンパ腫、遺伝性リンパ水腫、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、および頸部水嚢胞からなる群から選択されるものである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

ex vivo 治療を含んでなるものである、リンパ系疾患を改善する方法であって、前記 ex vivo 治療が、

- a) 該治療を必要とする患者の微小血管内皮細胞を用意し、
  - b) 微小血管内皮細胞と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを、該抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて接触させ、
  - c) 前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を単離し、
  - d) 該リンパ管内皮細胞を発現構築物にてトランスフェクトし、ここで、該発現構築物は、プロモーターに作動可能に連結された治療用タンパク質をコードする核酸を含んでなり、前記細胞内にて前記タンパク質を発現させるのに有効な量であり、さらに
  - e) 該トランスフェクト細胞を前記患者に再導入すること
- を含んでなる、方法。

20

【請求項 35】

前記抗体が、VEGFR-3 の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であるものである、請求項 34 に記載の方法。

30

【請求項 36】

リンパ管内皮細胞培養系の増殖を促進する方法であって、

- a) 請求項 1 に記載のようにリンパ管内皮細胞を用意し、
  - b) 該細胞を VEGFR-3 リガンドにより刺激すること
- を含んでなり、

ここで、前記 VEGFR-3 リガンドによる前記細胞の増殖刺激が、該刺激の不在下における増殖に比べて前記培養細胞の生存を促進するものである、方法。

【請求項 37】

前記 VEGFR-3 リガンドが、VEGF-C、VEGF-C156S または VEGF-D である、請求項 36 に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記細胞を、VEGFR-2 リガンドにより刺激することをさらに含んでなる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記細胞の刺激が、該細胞をアポトーシスから防護するものである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

前記細胞の防護が、Akt または p42 / MAPK シグナル伝達分子の活性化により媒介されるものである、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 41】

50

前記刺激が前記細胞の分化内皮細胞の特性の維持を可能にするものである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 2】

哺乳類生物体のリンパ管内皮細胞を選択的に調節する方法であって、

- a) 請求項 1 に記載の方法によって哺乳類生物体からリンパ管内皮細胞を単離し、
  - b) 単離された前記リンパ管内皮細胞を、リンパ管内皮細胞を調節する薬剤と接触させ、さらに
  - c) 該リンパ管内皮細胞を、前記生物体に再導入すること
- を含んでなる、方法。

【請求項 4 3】

前記接触工程が、外因性ポリヌクレオチドを前記細胞へ導入することを含んでなる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記生物体が、リンパ管内皮細胞内で発現される遺伝子内の遺伝子突然変異を特徴とする疾患を有し、かつ、前記接触が、外因性ポリヌクレオチドを前記細胞へ導入して前記遺伝子内の遺伝子突然変異の影響を克服することを含んでなる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記疾患が、遺伝性リンパ水腫である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

脊椎動物生物体由来の組織のリンパ管内皮細胞をイメージングする方法であって、  
( a ) リンパ管内皮細胞含有の疑いのある脊椎動物組織と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を含んでなる組成物とを、該抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて接触させ、  
( b ) 前記組織のリンパ管内皮細胞と結合した前記抗体を検出し、さらに  
( c ) 前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を同定することによって前記組織のリンパ管内皮細胞をイメージングすることを含んでなり、ここで、リンパ管内皮細胞と前記抗体との結合が前記組織内のリンパ管内皮細胞の存在および位置を示すものである、方法。

【請求項 4 7】

前記組織がヒト組織を含んでなる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

接触工程の後、イメージング工程の前に、前記組織のリンパ管内皮細胞と結合していない抗体を、前記組織から取り除く条件下にて、前記組織を洗浄する工程をさらに含んでなる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記抗体が、VEGFR - 3 の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記抗体が抗ポドプラニン抗体である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記抗体が、共有結合した検出可能なラベルをさらに含んでなる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記組織を、血管内皮には実質的に存在しないリンパ管内皮マーカーと特異的に結合する第 2 の化合物と接触させ、さらに  
前記組織の細胞と結合した前記第 2 の化合物を検出すること  
をさらに含んでなり、ここで、前記イメージング工程が、前記抗体および第 2 の化合物の両方にて標識されたリンパ管を同定することを含んでなり、前記抗体および第 2 の化合物の両方にて標識されたリンパ管が、前記組織におけるリンパ管内皮細胞の存在および位置と相関するものである、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 3】

10

20

30

40

50

前記抗体が V E G F R - 3 の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であり、かつ、前記第 2 の化合物が抗ポドプラニン抗体であるものである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

リンパ管内皮細胞における変化を特徴とする疾病についてスクリーニングする方法であって、

( a ) リンパ管内皮細胞における変化を特徴とする病態の疑いのある脊椎動物生物体から組織サンプルを用意し、

( b ) 該組織サンプルを、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を含んでなる組成物に対し、前記抗体と前記生物体のリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて曝し、

( c ) 前記組織サンプルを洗浄し、さらに

( d ) 前記組織サンプル中の前記結合抗体の存在、量、または分布を検出することにより、前記疾病についてスクリーニングすること

を含んでなる、方法。

10

【請求項 5 5】

哺乳類のリンパ管内皮細胞を特異的に検出する方法であって、

( a ) 前記哺乳類に、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を含んでなる組成物を、該抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて投与し、さらに

( b ) リンパ管内皮細胞と結合した前記抗体を検出して、前記生物体におけるリンパ管内皮細胞を検出すること

を含んでなる、方法。

20

【請求項 5 6】

前記哺乳類に、リンパ管内皮細胞マーカーと特異的に結合する第 2 の化合物を投与することをさらに含んでなり、ここで、前記検出工程が、リンパ管内皮細胞と結合した前記抗体および第 2 の化合物の検出を含んでなるものである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

リンパ管内皮細胞を改変する方法であって、

a ) 微小血管内皮細胞を用意し、

b ) 該微小血管内皮細胞と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを、該抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて接触させ、

c ) 前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を単離し、さらに

d ) 該リンパ管内皮細胞を、発現構築物にてトランスフェクトし、該発現構築物はプロモーターに作動可能に連結された治療用タンパク質をコードする核酸を含んでなり、前記細胞内にて前記タンパク質を発現させるのに有効な量であり、ここで、前記トランスフェクションが、リンパ管内皮細胞を改変すること

を含んでなる、方法。

30

【請求項 5 8】

請求項 5 7 に記載の方法によって作製されたものである、リンパ管内皮細胞。

【発明の詳細な説明】

40

【発明の分野】

【0001】

本発明は、一般に、内皮細胞の単離に関する材料および方法、ならびに本発明により単離される細胞に関する。さらに詳しくは、本発明は、単離されたリンパ管内皮細胞集団の獲得に関する。

【発明の背景】

【0002】

リンパ系は、循環系に匹敵する組織化された複雑な構造である。血液を全身に送り込むのに心臓を用いる循環系とは対照的に、リンパ系はリンパ管本来の収縮性を利用してリンパ液を送り込む。リンパ管は血管と同じ様に相互に連結していないが、毛細リンパ管に流れ

50

込む最初のリンパ洞 [Jeltsch et al., *Science*, 276: 1423-1425 (1997); および Castenholz, A., in Olszewski, W. L. (ed.), *Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. CRC Press: Boca Raton, Florida (1991), pp. 15-42]、さらにリンパ本幹に流れ込む集合リンパ管に続いて、最後に静脈循環に流れ込む胸管を含む一連の組織的構造を形成している。リンパ液が流れるチャンネルの構成は、最初のリンパ管の単一内皮層、内皮、筋層および外膜層を含む集合リンパ管の多層、ならびにリンパ節の複雑な組織をはじめとして様々である [Olszewski, W. L., in Olszewski, W. L. (ed.), *Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. CRC Press: Boca Raton, Florida (1991), pp. 235-258; および Kinmonth, J. B., in Kinmonth, J. B. (ed.), *The Lymphatics: Diseases, Lymphography and Surgery*. Edward Arnold Publishers: London, England (1972), pp. 82-86]。皮膚、肺、および胃腸管などの体の様々な器官のリンパ成分は様々な独特の特徴を有する [Ohkuma, M., in Olszewski (1991), 前記, at pp. 157-190; Uhley, H. and Leeds, S., in Olszewski (1991), 前記, at pp. 191-210; および Barrowman, J. A., in Olszewski (1991), at pp. 221-234]. を参照]。

10

20

30

40

50

### 【0003】

血管内皮増殖因子 (VEGF) は内皮細胞増殖、血管新生 (angiogenesis)、脈管形成 (vasculogenesis) および血管透過性の最も重要なレギュレーターである (Ferrara, *J Mol Med* 77: 527-543, 1999)。VEGF の他、増殖因子の VEGF ファミリーには現在、その他の5種の周知のメンバー、すなわち、胎盤増殖因子 (PIGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D およびオルフウイルス VEGF ホモログが存在する (Eriksson and Altalo, *Curr Top Microbiol Immunol.*, 237: 41-57; 1999)。さらに新規な VEGF 様ヘパリン結合タンパク質が最近ヘビ毒から単離されている (Gasmi et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 268(1): 69-72, 2000; Gasmi et al., *Biochim Biophys Acta* 1481(1): 209-12, 2000; Komori et al., 1999)。VEGF または VEGF ファミリーの3種の受容体、VEGFR-1 / Flt1、VEGFR-2 / Flt1 / KDR もしくは VEGFR-3 / Flt4 のいずれかをコードする遺伝子の破壊によって血管発生の不全による胚の致死が起こる (Dumont et al., *Science*, 282: 946-949, 1998; Fong et al., *Nature*, 376: 66-70, 1995; Shalaby et al., *Nature*, 376: 62-66, 1995)。これらの受容体およびそれらのリガンドについての詳細な説明は、米国特許第 5, 776, 755 号; 同第 5, 607, 918 号; 同第 5, 840, 693 号; 同第 5, 928, 939 号; 同第 6, 130, 071 号; 同第 6, 221, 839 号; 同第 6, 235, 713 号; 同第 6, 245, 530 号; 1999年10月26日出願の米国特許出願第 09 / 427, 657 号; 2000年3月24日出願の同第 09 / 534, 376 号; 2001年1月17日出願の同第 60 / 262, 476 号; ならびに 1998年2月2日出願の PCT 出願第 PCT / US 98 / 01973 号で示されている。これら各々の文献は、特に全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる。血管内皮増殖因子およびそれらの受容体に関するさらなる開示は、例えば、米国特許第 6, 245, 512 号; 同第 6, 168, 778 号; 同第 6, 100, 071 号; 同第 6, 051, 698 号; 同第 6, 040, 157 号; 同第 6, 020, 473 号; および同第 6, 011, 003 号において得られるものであり、これらは各々、引用することにより本明細書の一部とされる。

### 【0004】

VEGFR-2 は血管新生および内皮細胞の有糸分裂についての主要なシグナル伝達 VEGF 受容体であると考えられる。VEGF は、VEGFR-2 の活性化、さらにその後の、MAP (有糸分裂促進物質活性化タンパク質) キナーゼ / ERK (細胞外シグナル調節キナーゼ) およびホスファチジルイノシトール (PI) 3 - キナーゼ経路をはじめとするシグナル変換経路によって内皮細胞増殖、移動および生存を誘導する (総説については、Petrova et al., *Exp. Cell. Res.* 253: 117-130, 1999; Shibuya et al., In Claesson-Welsh, L (ed.) *Vascular growth factors and angiogenesis*. Springer Verlag, GmbH & Co., KG, Heidelberg, 237: 59-83, 1999 を参照)。p42 / p44 MAPK (ERK1 / ERK2) カスケードの活性化は多数の細胞の増殖応答に関連している。さらに、この経

路は生存促進遺伝子の転写の刺激、さらに細胞死機構の要素の翻訳後修飾および不活性化により細胞生存の高まりをもたらさうる(Bonni et al., Science, 286: 1358-1362, 1999; Gupta et al., Exp. Cell. Res., 247: 495-504, 1999)。また、当初、P I 3 - キナーゼ経路は有糸分裂にも関連しているとされていたが、後にいくつかの研究によってこの経路がセリン/トレオニンキナーゼ Akt (タンパク質キナーゼ B) の活性化による細胞生存の調節において重要な機能を有することが示された(Datta et al., Genes Dev. 13: 2905-2927, 1999)。さらに、最近の研究ではMAPKおよびP I 3 - キナーゼシグナル伝達経路間のいくつかのクロストーク(crosstalk): AktによるRafのリン酸化反応によってRaf - MEK (MAPキナーゼキナーゼ) - ERK経路の阻害がもたらされることも示された(Rommel et al., Science 286: 1738-1741, 1999; Zimmermann and Moelling, Science 286: 1741-1744, 1999)。

10

## 【0005】

分子生物学ではリンパ系の増殖および/または胚発生を媒介する役割を有すると仮定される少なくともいくつかの遺伝子およびタンパク質を同定してきた。1つのこのような遺伝子/タンパク質がFlt4 (fms - like tyr os i ne kin a s e 4; 血管内皮細胞増殖因子受容体3またはVEGFR - 3ともいう)と称するヒト赤白血球細胞および胎盤cDNAライブラリーからクローニングされた受容体チロシンキナーゼである[米国特許第5, 776, 755号および同第6, 107, 046号; Aprelikova et al., Cancer Res., 52: 746-748 (1992); Galland et al., Genomics, 13: 475-478 (1992); Galland et al., Oncogene, 8: 1233-1240 (1993);およびPajusola et al., Cancer Res., 52: 5738-5743 (1992)を参照。ここで全開示内容は引用することにより本明細書の一部とされる。]。研究ではマウス胚におけるVEGFR - 3遺伝子の標的破壊によって一次血管網再構築が不全となり、さらに9.5日後の胚が死に至ることが示された[Dumont et al., Science, 282: 946-949 (1998)]。さらなる研究によってVEGFR - 3における特定の変異には明らかに遺伝性リンパ水腫の原因となる役割があることがわかってきた(PCT公報第WO 00 / 58511号)。しかしながら、VEGFR - 3はリンパ管だけに限定されていない。VEGFR - 3はリンパ管の発生前に胚血管構造の形成において重要な役割を有する。しかしながら、さらなる研究によって、さらに進んだ発達段階ではVEGFR - 3の発現が主としてリンパ管に限定されるようになることがわかった[Kaipainen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3566-3570 (1995)]。しかし、VEGFR - 3発現は少なくともいくつかの腫瘍の新生血管(neovascular blood vessel)にも認められる(PCT公報第WO 00 / 21560号)。

20

30

## 【0006】

VEGFR - 3遺伝子の発現は、血管が発生するマウス8.5日胚時に始まるが、VEGFR - 3欠損胚は、一次血管網再構築の欠如により妊娠中期に死に至る(Dumont et al., Science, 282: 946-949, 1998)。しかしながら、成体組織ではVEGFR - 3発現は、主としてリンパ管内皮で起こり(Kaipainen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 3566-3570, 1995; Partanen et al., FASEB J., 14: 2087-2096, 2000)、VEGFR - 3リガンド、VEGF - CおよびVEGF - Dはリンパ管の増殖を誘導しうる(Jeltsch et al., Science, 276: 1423-1425, 1997; Veikkola et al., EMBO J. 20: 1223-1231, 2001)。

その一方、可溶性VEGFR - 3タンパク質の使用によるVEGFR - 3シグナル伝達の遮断によって内皮細胞アポトーシスの誘導によるリンパ管の発生の退行がもたらされる(Makinen et al., Nature Med., 7: 199-205, 2001)。しかしながら、VEGFR - 3を介して活性化される生化学的シグナル伝達経路はVEGFR - 2のものほど特徴付けられておらず、リンパ管内皮細胞機能のこれらの重要なレギュレーター的作用機構を解明するまでにはなかなか至らない。このような情報がないために、これらの相互作用の機能障害に関する治療的・診断的関連は依然として解明されていない。

40

## 【0007】

例えば、米国特許第6, 107, 046号(引用することにより本明細書の一部とされる)に見られるように、これまでに多くのVEGFR - 3抗体が記載されてきた。さらに、

50

最近、ポドプランニン (podoplanin) がリンパ管内皮の特異的マーカーとして同定され (Breiteneder-Geleff et al., Am. J. Pathol., 154(2) 385-394, 1999)、さらに、LYVE-1、すなわち、CD44糖タンパク質のホモログがヒアルロンのリンパ特異的受容体であるとされている (Banerji et al., J. Biol. Chem., 144(4) 789-801, 1999)。しかしながら、これらのマーカーが利用できるにもかかわらず、現在のところ単離されたリンパ管内皮細胞を得る適切な方法がない。このような単離内皮細胞が得られ、分子研究に提供しうるならば、種々のリンパ管細胞障害の診断および治療と関連する研究の大きな助けとなるであろう。さらに、このような細胞が利用できることによりリンパ管内皮細胞の特性についての有用な情報が提供され、それにより治療的介入のための特定の領域のさらなる特定が容易になる。

10

**【0008】**

遺伝性リンパ水腫、癌転移および手術後浮腫など、リンパ管内皮細胞およびそれについての受容体の異常に關与する多くの病態がある。リンパ管内皮細胞を単離し、増殖させ、さらに置換する能力があれば、このような疾患に対して有効な緩和介入、治療またはその他の改善法となるだろう。このような介入は例えば、創傷誘導性リンパ水腫に対して特に有効であろう。さらに、このような細胞が利用できるならば、細胞特異的な治療法に特に用い易く、それによって、例えば、非細胞特異的な遺伝子療法または化学療法プロトコールに見られるような望ましくない副作用がかなり軽減されると思われる。

**【発明の概要】****【0009】**

本発明は、医薬および分子生物学において、多くの実用性がある内皮細胞ならびにリンパおよび血管系を操作する能力の向上を提供する。より詳しくは、本発明はリンパ管内皮細胞を含む生物学的サンプルからリンパ管内皮細胞を単離する方法であって、前記生物学的サンプルと、その他の内皮細胞と比較してリンパ管内皮細胞を優先的に認識するものである抗体とを、その抗体がリンパ管内皮細胞と結合する条件下にて接触させ、さらにその抗体と結合しているリンパ管内皮細胞を単離することを含んでなる方法を提供する。本明細書において使用する「抗体」とは、標的抗原（例えば、リンパ管内皮細胞）と特異的に結合する全ての抗体薬または抗原を特異的に認識する抗原結合フラグメントを含んでなる全てのポリペプチドをいう。より詳しくは、上記抗体はリンパ管内皮細胞に特異的なVEGFR-3の細胞外ドメインのエピトープと免疫反応性のあるものである。本発明において、「優先的な」または「特異的な」とは、抗体が標的抗原（例えば、リンパ管内皮細胞におけるVEGFR-3）と、その他の細胞の類似抗原（例えば、血管内皮細胞におけるVEGFR-3）と結合するよりも高い親和性またはアビディティにて結合することを意味する。この結合の違いによって、ある細胞種を別のものから単離することが可能になる。

20

30

**【0010】**

生物学的サンプルはどんな哺乳類生物体由来のものであってもよく、さらにリンパ管内皮細胞を含むと考えられるあらゆる組織または体液サンプルであってよいことは分かるであろう。特に好ましくは、生物学的サンプルはヒト患者由来のものである。好ましい態様によれば抗体を固相支持体上に固定化し、この支持体に前記生物学的サンプルを接触させ、リンパ管内皮細胞が前記抗体と結合し、それによって支持体と結合することが可能となる。他の好ましい態様によれば、抗体を蛍光ラベルで標識し、さらにリンパ管内皮細胞を蛍光活性化セルソーティング (cell sorting) によって単離する。別の好ましい態様によれば、抗体を磁気ラベルで標識し、さらにリンパ管内皮細胞を磁気活性化セルソーティングによって単離する。生物学的サンプル中のリンパ管内皮細胞は、免疫組織化学によって単離しうると考えられる。他の態様によれば、リンパ管内皮細胞を単離するための免疫クロマトグラフィーの使用が意図される。

40

**【0011】**

抗体はポリクローナル抗体であってよいし、またはモノクローナル抗体であってよいことは分かるであろう。好ましい態様によれば、抗体は2E11D11の抗原結合フラグ

50

メントを含んでなる結合剤である。他の態様によれば、抗体が 2 E 1 1 D 1 1 の誘導体である。さらなる態様によれば、抗体は、リンパ管内皮細胞に特異的な V E G F R - 3 エピトープに対して高い結合特異性を有するように変異または改変させた 2 E 1 1 D 1 1 の抗原結合フラグメントから誘導された抗原結合フラグメントを含んでなる結合剤である。他の態様によれば、抗体は、2 E 1 1 D 1 1 によって認識される V E G F R - 3 タンパク質の同じエピトープを認識する。特に好ましい態様によれば、抗体は 2 E 1 1 D 1 1 である (European Collection of Cell Cultures, Center for Applied Microbiology and Research, Porton Down Salisbury, U.K. において受託番号 01083129 として寄託)。この抗体の作製については米国特許第 6, 107, 046 号 (引用することにより本明細書の一部とされる) に記載されている。他の好ましい態様によれば、抗体は抗ポドプラニンである。特定の態様によれば、抗体はリンパ管内皮細胞に対して結合特異性を有する抗ポドプラニン抗体変異体または誘導体である。

10

**【0012】**

本発明の特定の態様によれば、微小血管内皮細胞を含む生物学的サンプルから血管内皮細胞を単離する方法であって、生物学的サンプルと、その他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞を優先的に認識する抗体とを接触させ、ここで、前記抗体は V E G F R - 3 の細胞外ドメインと免疫性を有する抗体であり、さらに前記抗体と結合していない微小血管細胞から、前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を取り除くこと (ここで、前記抗体と結合していない微小血管細胞は、リンパ管内皮細胞を実質的に含まない血管内皮細胞集団を含む) を含んでなる方法が提供される。

20

**【0013】**

本発明の他の態様によれば、リンパ管内皮細胞集団であって、リンパ管内皮細胞を含む生物学的サンプルと、ここで前記抗体は、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを接触させ、V E G F R - 3 の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であり、さらに前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を単離することを含んでなる方法によって単離されるものである、リンパ管内皮細胞集団が提供される。好ましい態様によれば、生物学的サンプルは内皮細胞の異種集団を含んでなる。他の好ましい態様によれば、細胞のサンプルは微小血管内皮細胞集団である。特に好ましい態様によれば、リンパ管内皮細胞集団には血管内皮細胞が実質的に混入していない。好ましい態様によれば、細胞を単離する方法は、リンパ管内皮細胞を培養増殖させることを含んでなる。

30

**【0014】**

本発明のさらなる態様によれば、血管内皮細胞集団であって、微小血管内皮細胞集団と、血管内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体とを接触させ、ここで、前記抗体は、V E G F R - 3 の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であり、さらに前記抗体と結合していない微小血管細胞から前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を取り除くこと (ここで、前記抗体と結合していない微小血管細胞はリンパ管内皮細胞を実質的に含まない血管内皮細胞集団を含む) を含んでなる方法によって単離されるものである、血管内皮細胞集団が提供される。特定の態様によれば、血管細胞集団は、血管内皮細胞集団を増殖させることをさらに含んでなる方法によって作製される。

40

**【0015】**

本発明の好ましい態様によれば、特にその他の内皮細胞が実質的に混入していないリンパ管内皮細胞集団が意図される。本発明のもう 1 つの好ましい態様では、その他の内皮細胞が実質的に混入していない血管内皮細胞集団を記載している。

**【0016】**

本発明の他の好ましい態様はリンパ管内皮細胞の部分集団が実質的に富化された組成物を得る方法であって、微小血管内皮細胞を含む細胞源を準備し、その細胞と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合するモノクローナル抗体とを、その抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて接触させ、モノクローナル抗体が特異的に結合するそれらの細胞を分離することによって、リンパ管内皮細胞の部分集団が実質的に富化された組成物を得ることを含んでなる、方法に関する。好ましい態様によれば、抗体

50

は、リンパ管内皮細胞にて発現される抗原の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体である。さらに好ましい態様によれば、抗原はVEGFR-3である。また、本発明は、好ましい態様において、このような方法によって得られる実質的に富化されたリンパ管内皮細胞の部分集団を含んでなる組成物を含む。好ましい態様によれば、抗体は抗ポドプラニンである。他の好ましい態様によれば、抗体はリンパ管内皮細胞にて発現されるVEGFR-3を優先的に認識する2E11D11である。

【0017】

他の態様によれば、リンパ管内皮細胞障害を改善(ameliorate)する方法であって、治療剤によってリンパ管内皮細胞を標的化することを含んでない、ここで、この治療剤は、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を用いてリンパ管内皮細胞を標的とするものであり、前記抗体はVEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体である、方法が提供される。特定の態様によれば、前記障害はリンパ腫、遺伝性リンパ水腫、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症、および頸部水嚢胞からなる群から選択される。

10

【0018】

本発明によれば、さらに、リンパ系疾患を改善する方法であって、ex vivo治療を含んでなり、このex vivo治療は、その治療を必要とする患者から微小血管内皮細胞を含む生物学的サンプルを得て、この微小血管内皮細胞と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体であって、VEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体と接触させ、その抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を単離し、そのリンパ管内皮細胞を、発現構築物であって、プロモーターに作動可能に連結してタンパク質をコードする核酸を含んでなる発現構築物を前記細胞内でそのタンパク質を発現させるのに有効な量で用いてトランスフェクトし、さらにそのトランスフェクト細胞を前記患者に再導入することを含んでなる、方法を提供する。このコードされるタンパク質は(例えば、疾病を治療する、疾病の症状を緩和する、または診断またはイメージング(imaging)を向上させるために)リンパ管内皮細胞内で発現させようとするタンパク質であってよい。

20

【0019】

本発明はまた、リンパ管内皮細胞培養系の増殖を改善する方法であって、本発明の方法によってリンパ管内皮細胞を得て、さらにその細胞をVEGFR-3リガンドにより刺激することを含んでなり、ここで、VEGFR-3リガンドによる前記細胞の増殖刺激が、その刺激の不在下における増殖に比べて前記培養細胞の生存を促進するものである、方法を提供する。特に好ましい態様によれば、VEGFR-3リガンドは、VEGF-C、VEGF-C156SまたはVEGF-Dである。この方法は、細胞をVEGFR-2リガンドにより刺激することをさらに含んでいてもよい。特定の態様によれば、細胞の刺激はその細胞をアポトーシスから防護するものとされる。好ましい態様によれば、細胞のアポトーシスからの防護は、Aktまたはp42/MAPKシグナル伝達分子の活性化により媒介される。好ましい態様によれば、細胞の刺激は、前記細胞の分化内皮細胞の特性の維持を可能にする。

30

【0020】

また、哺乳類生物体のリンパ管内皮細胞を選択的に調節する方法であって、本発明に記載のように哺乳類生物体からリンパ管内皮細胞を単離し、単離されたリンパ管内皮細胞をリンパ管内皮細胞と、調節するための薬剤とを接触させ、さらにそのリンパ管内皮細胞を前記生物体に再導入することを含んでなる、方法も本発明に含まれる。好ましい態様によれば、接触工程が、外因性ポリヌクレオチドを前記細胞へ導入することを含んでなる。他の好ましい態様によれば、生物体がリンパ管内皮細胞内にて発現される遺伝子内の遺伝子突然変異を特徴とする疾患を有し、かつ前記は、接触外因性ポリヌクレオチドを前記細胞へ導入して前記遺伝子内における遺伝子突然変異の影響を克服することを含んでなる。特定の態様によれば、前記疾患は遺伝性リンパ水腫である。例えば、前記疾患はVEGFR-3変異を特徴とする遺伝性リンパ水腫であり、かつ治療は野生型VEGFR-3対立遺伝子を導入することを含んでなる。

40

50

## 【0021】

本発明の他の態様によれば、脊椎動物生物体由来の組織のリンパ管内皮細胞をイメージング(imaging)する方法であって、リンパ管内皮細胞含有の疑いのある脊椎動物組織と、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を含んでなる組成物とを、その抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて接触させ、その組織におけるリンパ管内皮細胞と結合した前記抗体を検出し、さらに前記抗体が結合しているリンパ管内皮細胞を同定することによってその組織のリンパ管内皮細胞をイメージングすることを含んでなり、ここで、リンパ管内皮細胞と前記抗体との結合が、その組織内におけるリンパ管内皮細胞の存在および位置を示すものである、方法が記載される。より詳しくは、前記組織は、ヒト組織を含んでなるものである。特定の態様によれば、この方法は、接触工程の後、イメージング工程の前に前記組織から前記組織のリンパ管内皮細胞と結合していない抗体を取り除く条件下にて前記組織を洗浄する工程をさらに含んでなる。抗体はVEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であってよい。その他の態様によれば、抗体は抗ポドプラニン抗体である。好ましい態様によれば、抗体は、それと共有結合した検出可能なラベルをさらに含んでなる。

10

## 【0022】

この方法は、前記組織と、血管内皮には実質的に存在しないリンパ管内皮マーカースと特異的に結合する第2の化合物とを接触させ、さらに前記組織の細胞と結合したその第2の化合物を検出することを含んでなり、ここで、イメージング工程が抗体および第2の化合物の両方で標識されたリンパ管を同定することを含んでなり、抗体および第2の化合物の両方にて標識されたリンパ管がその組織におけるリンパ管内皮細胞の存在および位置と相関するものであってもよい。好ましい態様によれば、抗体がVEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のある抗体であり、かつ第2の化合物が抗ポドプラニン抗体である。

20

## 【0023】

さらに、リンパ管内皮細胞における変化を特徴とする疾病についてスクリーニングする方法であって、リンパ管内皮細胞における変化を特徴とする病態の疑いのある脊椎動物生物体から組織サンプルを得て、その組織サンプルを、その他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を含んでなる組成物に、その抗体と前記生物体のリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて曝し、その組織サンプルを洗浄し、さらにその組織サンプル中の前記結合抗体の存在、量、または分布を検出することにより前記疾病についてスクリーニングすることを含んでなる方法も本発明に含まれる。

30

## 【0024】

他の態様によれば、哺乳類のリンパ管内皮細胞を特異的に検出する方法であって、哺乳類に、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞と優先的に結合する抗体を含んでなる組成物を、その抗体とリンパ管内皮細胞との結合を可能にする条件下にて投与し、さらにリンパ管内皮細胞と結合したその抗体を検出することによって前記生物体におけるリンパ管内皮細胞を検出することを含んでなる、方法が挙げられる。この方法は、哺乳類にリンパ管内皮細胞マーカースと特異的に結合する第2の化合物を投与することをさらに含んでなり、ここで、検出工程はリンパ管内皮細胞と結合した前記抗体および第2の化合物を検出することを含んでいてもよい。本発明の全てのイメージング方法において、イメージング方法がリンパ管の疾患において疾患の存在を決定するだけでなく、疾患の治療の効果をモニタリングするのも用いられると考えられる。このような方法は特にリンパ水腫、例えば、遺伝性リンパ水腫または創傷誘導性水腫およびその他のリンパ管疾患の評価において有用であろう。

40

## 【0025】

本願全体から当業者ならば本発明のさらなる特徴および変形が明らかであろう。このような全ての特徴が本発明の態様とされる。同様に、本明細書に記載の特徴を組み合わせてさらなる態様とすることができ、その組合せが本発明の態様または具体例として上文で明示されているかどうかによらず、本発明の態様とされる。さらに、本明細書において、本発明にとって重要であると記載した限定だけを、それとして見るべきであり、本明細書にお

50

いて重要であるとは記載していない、限定されない本発明の変形は本発明の態様とされる。

【0026】

本発明の態様は分類ごとに要約されているが、その分類に属する個々のものが本発明の個々の態様とされることが分かるであろう。

【発明の具体的説明】

【0027】

本発明において、本発明者らは V E G F - C およびその V E G F R - 3 特異的変異体 ( V E G F C 1 5 6 S ) を用いて V E G F R - 3 シグナル伝達の研究を行い、このシグナル伝達をさらに詳細に特徴付けた。ヒト皮膚内皮細胞の初代培養物が、異なる系統の血管およびリンパ管内皮細胞からなること、さらに後者が V E G F R - 3 に対する抗体を用いて単離できることが初めて示される。

10

【0028】

特に、 V E G F R - 3 がリンパ管内皮細胞で特異的に発現され、その刺激がこれらの細胞を血清飢餓誘発性アポトーシスから防護し、さらに細胞移動を増進することが示されている。さらに、本明細書で示したデータでは、 V E G F R - 3 P K C は、依存的 p 4 2 / p 4 4 M A P K 活性化および A k t のワートマニン (wortmannin) 感受性リン酸化反応を誘導しうることが示される。これらの 2 つの重要なシグナル伝達カスケードは細胞生存に関連するとされている (Bonni et al., Science, 286: 1358-1362, 1999; Datta et al., Genes Dev. 13: 2905-2927, 1999)。

20

【0029】

当業者ならば本明細書で提供される詳細に鑑みて、リンパ管内皮細胞の単離に V E G F R - 3 などの分子マーカーを使用することができるであろう。さらに、本発明では、特異的増殖因子の存在下でのこれらの細胞の培養は、これらの細胞の分化特性の喪失なく行うことができることを教示している。さらに、特異的 V E G F R - 3 リガンドは細胞移動を誘導し、さらに細胞生存に関連した 2 つの重要なシグナル伝達分子、 A k t および p 4 2 / p 4 4 M A P K の活性化を介して血清飢餓状態のリンパ管内皮細胞をアポトーシスから防護しうることが示している。リンパ管内皮細胞を培養する能力によって、 V E G F R - 3 シグナル伝達経路、ならびにリンパ管内皮細胞と対比した血管内皮細胞の分子の特徴および遺伝子発現プロファイルのさらなる特徴付けが可能となる。

30

【0030】

A. 内皮細胞培養物の作製および使用方法

本発明者らは微小血管内皮細胞が内皮細胞、すなわち、リンパ管内皮細胞および血管内皮細胞の 2 つの異なる集団からなることを見出した。本発明は、初めて、微小血管内皮細胞の混合集団からリンパ管内皮細胞を単離する方法を提供するものである。これに関連して、リンパ管内皮細胞を除去した単離血管内皮細胞を提供することができるということが出来る。本節では本発明の概要を示すが、本明細書を通じ他の場所においても本発明の種々の態様のさらなる詳細を示している。

【0031】

本発明の教示により、両方の種類の内皮細胞を培養することが可能となる。このような培養物は、内皮細胞の細胞シグナル伝達および機能を理解する上での手掛かりとするのに有用なだけでなく、血管新生、リンパ管新生、遺伝性リンパ水腫などをはじめとする新生脈管形成 (neovascularization) を伴う疾病の治療的介入も提供する。

40

【0032】

当業者が利用可能な微小血管内皮細胞についての商業的に入手可能な供給元は数多くある。このような商業的に入手可能な供給元としては、例えば、Promocell (Heidelberg, Germany; H D M E C の供給業者、増殖させたまたは低温保存した微小血管内皮細胞); Cell Applications Inc., (San Diego, Ca, USA, C A D M E C (商標) の供給業者、正常ヒト新生児包皮 (または成人皮膚) 毛細血管から単離した微小血管内皮細胞) が挙げられる。また、さらなる商業的に入手可能な供給元については当業者ならば周知であろう。これらの

50

供給元は、細胞の他、通常、細胞を増殖状態に維持するのに用いるべき、典型的な増殖培養条件を提供する。このように、市販にて供給される細胞系および培養物が本発明の特に有用な出発材料である。微小血管内皮細胞を含んでなる全ての細胞培養物が本発明において用いることができると考えられる。このような細胞培養物は、好ましくは微小血管内皮細胞のみ含むものであるが、培養細胞の一部がリンパ管内皮細胞である限り、リンパ管および血管内皮細胞以外の細胞を含む細胞培養物もまた十分に本発明の出発宿主細胞培養物であることが分かるであろう。

#### 【0033】

商業的に入手可能な提供元の他、ヒトをはじめとする様々な種から微小血管内皮細胞を単離してもよい。また、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ウマ、および霊長類をはじめとするその他の種由来の細胞であってもよい。よって、本発明では特に、一次細胞培養物、とりわけ、一次ヒト微小血管細胞培養物の使用が意図される。出発一次細胞培養物は内皮細胞のみ含むものであるが、一次細胞培養物が被験体から最初に単離される場合、このような細胞培養物は、繊維芽細胞、平滑筋細胞、周皮細胞、および内皮細胞が単離されている組織に特異的な他の細胞など、さらなる細胞も含む。このような混入細胞は、例えば、密度勾配遠心分離法、細胞の特異的マーカーを用いる免疫吸着クロマトグラフィー、蛍光活性化細胞スクリーニング、磁気活性化細胞スクリーニングおよびその他のセルソーティング技術を用いて容易に除去することができる。

10

#### 【0034】

一般に、微小血管内皮細胞の重大な器官特異性が存在する場合においては、一次微小血管内皮細胞培養物は、研究または調節することが望まれる疾病に関与する組織から誘導されるべきである。一般に、これらの細胞を単離する方法については当業者ならば周知であり、所定の組織のトリプシンおよびコラゲナーゼによる消化、例えば、ヒト血漿への暴露により誘導される微小血管内皮細胞の凝集、密度遠心分離、例えば、パーコール密度遠心分離、および光学顕微鏡使用下、トリプシン/EDTAによる局部消化後の細胞の最終的な選抜および培養を伴うものであろう。

20

#### 【0035】

本発明の細胞は内皮細胞の増殖に好適な培地、例えば、ハムF12培地 - 10%ウシ胎児血清(FCS)で増殖させる。ひとたび、このような培養物が生じると、当業者ならば、例えば、接触阻止(すなわち、単層に増殖する)、およびフォン・ヴィレブランド(von Willebrand)因子(vWF)、血小板内皮細胞接着分子1(PECAM-1、CD31)、およびアンジオテンシン変換酵素(ACE)の転写物をはじめとする従来の内皮マーカーの発現の存在、毛細血管様構造の形成などの微小血管内皮細胞に関係のある特徴を観察することによって微小血管内皮細胞の存在を確認することができる。微小血管内皮細胞の典型的な機能アッセイについての詳細は本明細書の他の場所に示している。

30

#### 【0036】

上記のように、当業者ならば、一般に微小血管内皮細胞を増殖させる条件が分かっている。本発明では、細胞の培地に種々の増殖因子および刺激因子を添加することができる。好ましい態様では、以下に限定されるものではないが、VEGF、VEGF-C、VEGF-C156S、VEGF-DおよびORFV2-VEGFをはじめとするVEGFR-3の刺激因子および/またはVEGFR-2の刺激因子の存在下にて細胞を増殖させてもよい。これらおよび他の関連薬剤については、当業者ならば十分に周知であり、本明細書の他の場所にさらに詳細に記載している。

40

#### 【0037】

本発明の好ましい使用においては、単離された内皮細胞を長期間培養増殖させることが有利でありうる。一般に、このような細胞の培地での増殖は、細胞のアポトーシスによって妨げられることが多い。本発明では、VEGFR-3および/またはVEGFR-2の刺激因子での細胞の刺激によって細胞のアポトーシスが阻害され、遅延され、あるいは回避されうることを示している。特に好ましい態様によれば、微小血管内皮細胞の混合集団におけるリンパ管内皮細胞または他の内皮細胞が実質的に混入していない実際に単離された

50

リンパ管内皮細胞の培養物の生存は、VEGF-CまたはVEGF-C156Sを培地に添加することにより促進または高められる。

【0038】

内皮細胞培養物を増殖させたことから、本発明の方法は、他の内皮細胞に比べてリンパ管内皮細胞を優先的に認識する抗体を用いることによって、混合細胞集団の微小血管内皮細胞からリンパ管内皮細胞を単離する方法を提供する。さらに詳しくは、抗体はVEGFR-3の細胞外ドメインと免疫反応性のあるものである。本発明の特に好ましい態様によれば、抗VEGFR-3抗体2E11D11はリンパ管内皮細胞に特異的であることが示されている。リンパ管内皮細胞に特異的な他の典型的な抗体は、抗ポドプラニン抗体である。本明細書における多くの例ではこれらの抗体を使用しているが、本発明の教示を考えれば、本発明における単離の目的に役立つ他の抗体を同定しうることが分かるであろう。例えば、以下に記載するように、このような他の抗体はモノクローナル抗体を作製するための従来方法にて作製され、これらの典型的な抗体によって認識される同じエピトープを使用するものである。あるいは、そのような他の抗体を作製し、当業者に周知のファージディスプレイ技術により単離してもよい。さらに他の代替法は、2E11D11または抗ポドプラニン抗体に関連する抗体の作製であり、リンパ管内皮細胞に特異的な第二世代抗体を作製する抗体の特定部位での部位特異的突然変異誘発であろう。このような抗体を作製する方法については、以下においてさらに詳細に記載する。

10

【0039】

「リンパ管内皮細胞に特異的な」とは、この抗体が内皮細胞の混合集団中のリンパ管内皮細胞を優先的に認識するが、血管内皮細胞系統の内皮細胞は認識しないか、または認識してもその程度は低いことを意味する。この結合の違いによって、ある細胞種を混合集団から単離することが可能になる。

20

【0040】

本発明が微小血管内皮細胞が一般に血管内皮細胞とリンパ管内皮細胞の混合集団からなることを示し、さらに本発明が初めて、リンパ管内皮細胞に他の内皮細胞、例えば、血管内皮細胞が実質的に混入しないように、微小血管内皮細胞培養物からリンパ管内皮細胞を単離する方法の詳細を提供していることを示していることから、本発明が他の内皮細胞、例えば、リンパ管内皮細胞が実質的に混入していない血管内皮細胞を単離する方法もまた包含することもわかるであろう。

30

【0041】

ある細胞が「実質的に混入していない」細胞集団とは、本発明では、細胞培養物において、混入細胞が全く存在しないことが求められるという意味ではない。むしろ、培養細胞の大半が所定の細胞種のものであるという意味である。例えば、その他の内皮細胞が実質的に混入していないリンパ管内皮細胞培養物では、少なくとも51%の細胞がリンパ管内皮細胞であると考えられる。さらに好ましくは、少なくとも60%の細胞がリンパ管内皮細胞である。なおさらに好ましくは、少なくとも70%のリンパ管内皮細胞、いっそう好ましくは75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%のリンパ管内皮細胞を含んでなる細胞培養物であろう。本発明の特に好ましい方法は、培養物が90%を超えるリンパ管内皮細胞を含んでなるようにリンパ管内皮細胞を単離するものである。言うまでもなく、培養物をより精製すれば培養物中のリンパ管内皮細胞の割合は高まり、95%、96%、97%、98%、99%、さらに当然のことではあるが、100%のリンパ管内皮細胞を含んでなる細胞培養物が最も好ましいであろう。当然のことではあるが、これらの数値はリンパ管内皮細胞に限定されるものではなく、血管内皮細胞のかなり精製された集団にも適用されることが分かるであろう。当業者は、細胞種を決定するために、所定の細胞に特異的なマーカーの存在を調べてもよい。例えば、リンパ管内皮細胞はVEGFR-3の存在、ポドプラニンの存在、およびLYVE-1などの他のリンパ管細胞マーカーによって同定してもよい。上記のマーカーと組み合わせると有用であるその他のVEGFR-3特異的抗体としては、9D9F9および7B3F9、および米国特許第6,107,046号に記載の抗体が挙げられる。当然のことではあるが、マーカーの組合

40

50

せが特に有用であることは分かるであろう。細胞機能を調べる他のアッセイについては本明細書に記載しているが、当業者ならば周知である。

【0042】

別の態様によれば、本発明の方法によって作製した細胞培養物は、混入細胞が最少量であるという点から、極めて精製されたものであるリンパ管内皮細胞培養物または極めて精製されたものである内皮細胞培養物と定義される。混入細胞とは、培養物の大部分を構成する細胞種ではない全ての細胞を意味する。例えば、リンパ管内皮細胞培養物における混入細胞は、リンパ管内皮細胞でない全ての細胞である。同様に、血管内皮細胞培養物における混入細胞は、血管内皮細胞でない全ての細胞である。リンパ管内皮細胞培養物の混入細胞の例としては、血管内皮細胞であり、その逆もまた同様である。当然のことではあるが、例えば、繊維芽細胞などのその他の細胞種も混入細胞のカテゴリーに入る。例えば、特異的マーカーを調査することにより混入細胞を同定することは比較的容易である。よって、好ましい態様によれば、本発明による方法によって、49%未満の混入細胞を含有する細胞培養物が生じ、さらに好ましくは、これらの培養物が45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、14%未満の混入細胞、13%未満の混入細胞、12%未満の混入細胞、11%未満の混入細胞または10%未満の混入細胞を含有む。言うまでもなく、培養物をより精製すれば培養細胞中に存在する混入細胞の割合は減少し、特に好ましくは、細胞培養物は、9%未満の混入細胞、8%未満の混入細胞、7%未満の混入細胞、6%未満の混入細胞、5%未満の混入細胞、4%未満の混入細胞、3%未満の混入細胞、2%未満の混入細胞、さらに当然のことではあるが、1%未満の混入細胞しか含んでいないことができる。

10

20

【0043】

本発明の特定の態様によれば、本発明は、本発明の単離細胞集団を用いた治療および診断方法を提供することができる。例えば、リンパ管内皮細胞に関するまたは実際には血管内皮細胞に関する疾患を有する疑いのある個体から細胞を単離するのに本発明の方法を用いてもよい。診断用途では、患者個体の細胞を解析して、特定の細胞の、または生化学的なマーカーまたは病態を示すと思われる細胞の特徴の存在、不在もしくは変化を調べる。予後用途では細胞に関連する疾患の治療に対して行われる特別な治療法の実施前後に細胞を単離し、同様の解析を行って治療的介入が望ましい効果を及ぼすかどうかの判定ができる。さらなる態様によれば、本発明の単離細胞は、細胞の物理的、生化学的または分子特性における異常に関連する疾患の有効な治療を促進するのに用いてもよい。典型的な態様によれば、可能性ある治療法の効果を、*in vitro*にて患者の細胞を用いて試験し、その患者の細胞がこのような介入に反応するかどうかを判定することにより治療を促進する。あるいは、患者から単離した細胞を*in vitro*において遺伝子発現構築物で変換し、増殖させ、さらに個体に再送達して患者の疾患を分子レベルで矯正するものである*ex vivo*遺伝子療法に、前記細胞を用いてもよい。なおもう1つの代替法では、本発明の単離、増殖した細胞を、治療効果を特定部位に送達するのに用いてもよい。例えば、細胞の患者への再送達の前に、細胞を細胞傷害性薬剤と結合させることによって、例えば、個体のリンパ管内皮細胞だけを特異的にターゲティングする。本発明のこれらおよびその他の態様については本明細書の下記でさらに詳細に記載する。

30

40

【0044】

B. VEGFR - 3シグナル伝達経路の役割の解明

本発明が初めて、混入細胞を実質的に含まないリンパ管内皮細胞集団の単離を可能にするということから考えれば、リンパ管内皮細胞におけるVEGFR - 3シグナル伝達の分かりにくい役割、リンパ管新生などの現象およびリンパ系疾患におけるこれらの細胞の役割が解明できる。

【0045】

VEGFR - 2による刺激は細胞生存能力を促進するが、VEGFの中断により内皮細胞アポトーシスが起り、血管新生が阻害され、さらに*in vivo*にて血管退行がもたらされる(Aiello et al., Proc. Nat'l Acad. Sci., 92:10457-10461, 1995; Ferrara et al.,

50

Nature Med., 4: 336-340, 1998; Gerber et al., Development, 126: 1149-1159, 1999)。同様に、VEGFR-3シグナル伝達の阻害によってリンパ管発生の退行が起こる(Makinen et al., Nature Med., 7: 199-205, 2001)。これまでに公開された研究に一致して、VEGFR-2による刺激は、血清飢餓状態の一次内皮細胞をアポトーシスから強く防護した。この効果は、VEGFR-2単独(ORFV2-VEGFによる刺激)にて、およびVEGFR-1による刺激(VEGFによる)またはVEGFR-3による刺激(VEGF-Cによる)との組み合わせによっても生じた。しかしながら、VEGFR-1(PIGFによる刺激)では細胞生存シグナルがあっても伝達は非常に弱かった。さらに、血清飢餓誘発性アポトーシスの阻害には、VEGFR-3シグナル伝達単独で十分であった。興味深いことに、VEGF-Cは血管内皮細胞に対してVEGFよりも弱い生存因子であったが、VEGFR-3を発現するリンパ管内皮細胞の生存を強く促進した。

10

## 【0046】

VEGFR-3は2つの重要な生存シグナル伝達分子、p42/p44 MAPKおよびAktのリン酸化反応を誘導した。PKC阻害剤によってVEGFR-3が媒介するp42/p44 MAPKリン酸化反応が大幅に減少したことから、この経路がVEGFR-2に関してこれまでに示されたものと同様に、RasではなくPKCによって主として伝達されていることが示唆される(Doanes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 255: 545-548, 1999; Takahashi et al., Oncogene, 18: 2221-2230, 1999; Yoshiji et al., Cancer Res., 59: 4413-4418, 1999)。一般に、PKC依存的MAPK活性化は主として特定の7回膜貫通型Gタンパク質結合受容体により必要とされていると考えられるため、このような経路は受容体チロシンキナーゼの中では特異である。PKCは、内皮細胞増殖および移動をはじめとする血管新生に関連する多くの内皮細胞プロセスを調節する(Harrington et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 271: 499-508, 2000; Harrington et al., J. Biol. Chem., 272: 7390-7397, 1997; Ilan et al., J. Cell Sci., 111: 3621-3631, 1998)が、PKCの阻害により腫瘍新生脈管形成を遮断することができた(Yoshiji et al., Cancer Res., 59: 4413-4418, 1999)。

20

## 【0047】

VEGFまたはVEGF-Cにより刺激されたHMVE細胞においてp42/p44 MAPK活性化は類似の動態によって起こったが、後者はより持続した応答を誘導した。活性化期間およびp42/p44 MAPKの細胞内分布の違いによって、異なる細胞応答が誘導されることが報告された(Kaiser et al., Exp. Cell Res., 249: 349-358, 1999; Marshall, Cell 80: 179-185, 1995; Pang et al., J. Biol. Chem., 270: 13585-13588, 1995)。この違いはVEGF-CだけがVEGFR-2およびVEGFR-3を介して同時にシグナル伝達ができるという事実にあると考えられる。しかしながら、VEGFにより誘導されたVEGFR-1とVEGFR-2とのホモまたはヘテロダイマー複合体が有糸分裂を異なった形で調節することが示されていたにもかかわらず(Rahimi et al., J. Biol. Chem., 275: 16986-16992, 2000)、VEGF-Cにより刺激された細胞でのVEGFR-2およびVEGFR-3によるヘテロダイマー形成は我々には検出できなかった。

30

## 【0048】

VEGF-CのVEGFR-3特異的変異型、VEGF-C156SがVEGFR-3が媒介するシグナル伝達の研究に向けた有益なツールであることが分かった(Joukov et al., EMBO J., 15: 290-298, 1998; Veikkola et al., EMBO J., 20: 1223-1231, 2001; 米国特許第6,130,071号)。バイオセンサー解析では、VEGF-C156SのVEGFR-3に対する親和性が、野生型VEGF-Cに比べて低下していた。さらに、VEGF-C156Sによって誘導される最大VEGFR-3リン酸化反応またはp42/p44 MAPK活性化は、VEGF-Cほど強くはなかった。この理由は分からないが、シスチンノット増殖因子ドメインを形成する8つの保存されたシステイン残基の1つがセリン残基に変化したことから、VEGF-C156Sは野生型VEGF-Cよりも不安定であると考えられる。しかしながら、トランスジェニックモデルでは、VEGF-C156Sは、リンパ管新生の促進において、野生型VEGF-Cと同じくらい有効であった

50

(Veikkola et al., EMBO J., 20: 1223-1231, 2001)。さらに、本明細書に記載のアッセイに用いる濃度は、VEGFR-3飽和状態にしておくとよい。その結果、最高濃度のVEGF-C156Sでさえも、細胞のアポトーシスからの防護においては、VEGF-Cほど有効ではなかったため、VEGF-Cにより誘導されるリンパ管内皮細胞の最大生存には、VEGFR-2およびVEGFR-3の同時活性化が必要であると思われる。

【0049】

#### C. リンパ管内皮細胞特異的抗体

本発明では、培養したヒト一次微小血管内皮細胞を、VEGFR-3の細胞外ドメインに対する特定の抗体を用いることにより、血管およびリンパ管内皮細胞の識別可能な安定した系統に分けることができ、さらに両系統が培養増殖できることを示している。本節では、これらの分離技術に用いた抗体を説明し、本発明に使用しうるさらなる抗体の作製方法をさらに説明する。

【0050】

本発明の特に好ましい抗体としては、例えば、2E11D11 (Jussila et al., Cancer Res. 58: 1599-1604, 1998; 米国特許6,107,046号)、および抗ヒトポドプラニン (Breiteneder-Geleff et al., et al., Am. J. Pathol., 154(2) 385-394, 1999) が挙げられる。これらの抗体は当業者ならば周知である。VEGFR-3に特異的な抗体 (Flt4としても知られる) の作製については、特に引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第6,107,046号で詳述されている。

【0051】

2E11D11および抗ポドプラニンがリンパ管内皮細胞を特異的に認識するという本発明の教示を考えれば、当業者ならば、これらの抗体が認識する特異的エピトープを認識するさらなる抗体を作製できる。従って、当業者ならば、2E11D11が認識するVEGFR-3の部分を用いて、リンパ管内皮細胞を認識するさらなる抗体を作製できる。このように、前記抗体は、好ましくは2E11D11が認識するVEGFR-3分子の部分、または前記抗体に他の細胞種に比べて優先的にリンパ管内皮細胞を特異的に認識させることを可能とするVEGFR-3の他の部分、と免疫反応性のあるものである。「他の細胞種に対して優先的に」とは、前記抗体が、血管内皮細胞などの他の内皮細胞をはじめとするその他の細胞と比べて、リンパ管内皮細胞とより強い反応性があることを意味する。

【0052】

さらに、2E11D11抗体が、血管内皮細胞で発現されるVEGFR-3に比べて、リンパ管内皮細胞で発現されるVEGFR-3を優先的に認識するという発見によって、従来の免疫法およびスクリーニング技術を用いて、前記抗体を単離することが実現可能性であることが示されている (例えば、Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988を参照)。VEGFR-3抗体の集団は、本明細書に記載の異なる細胞集団に対する結合特異性または交差反応性についてスクリーニングすることができる。

【0053】

本発明に用いられる抗体としては、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、FabフラグメントおよびFab発現ライブラリーにより作製されたフラグメント、二価性/二重特異性抗体、ヒト化抗体、CDR移植抗体、ヒト抗体ならびにVEGFR-3に特異的であるCDR配列の部分を含む抗体が挙げられる。中和抗体、すなわち、VEGFR-3活性を阻害するものも、また有用でありうる。好ましい態様によれば、抗体は、モノクローナル抗体である。抗体を作製し、特性決定する手段については当技術分野では十分に公知である (例えば、Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988を参照)。

【0054】

要するに、ポリクローナル抗体は、本発明のポリペプチドを含んでなる免疫原にて動物を免疫化し、その免疫化した動物から抗血清を採取することにより準備する。抗血清の作製

10

20

30

40

50

には様々な動物種が使用できる。一般には、抗血清の作製に使用する動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ヤギ、ヒツジ、ブタまたはウマをはじめとする非ヒト動物である。ウサギは血液量が比較的多いため、ポリクローナル抗体の作製にとってウサギが好ましい選択である。

#### 【0055】

宿主種に応じて、種々のアジュバントを用いて免疫反応を高めてもよい。このようなアジュバントとしては、限定されるものではないが、フロイント、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、ならびにリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルション、キーホールリンペット・ヘモシニアンおよびジニトロフェノールなどの界面活性物質が挙げられる。BCG(弱毒ウシ結核菌株(Bacilli Calmette-Guerin))およびコリネバクテリウム・パルヴム(*Corynebacterium parvum*)が潜在的に有用性のあるヒトアジュバントである。

10

#### 【0056】

一般に当業者には周知であるが、イソ型の抗原に特異的なポリクローナルおよびモノクローナル抗体のいずれも、従来免疫化技術を用いて作製しうる。本明細書において使用する「特異的な」とは、抗体の可変領域が、前記抗体に特異的かつ優先的にリンパ管内皮細胞を認識させるエピトープを認識して結合し、さらに、このようなエピトープを、その他の抗原、例えば、他のVEGF受容体または非リンパ管細胞で発現される同じ受容体と識別しうることを意味する。2E11D11または抗ポドプラニンが認識するような抗原性エピトープを含む組成物を用いて、ウサギまたはマウスなどの1種以上の実験動物を免疫化することができるが、後にこれらによって、本発明の化合物に対する特異的抗体の作製を行う。ポリクローナル抗血清は、抗体産生の時間を考慮に入れ、単に動物から血を抜き、全血から血清サンプルを調製することによって作製する。

20

#### 【0057】

本発明で用いるモノクローナル抗体は、連続継代性培養細胞系によって、抗体分子の産生を提供するいずれかの技術を用いて作製しうる。これらとしては、限定されるものではないが、最初にKoehler and Milsteinが記載したハイブリドーマ技術(Nature 256: 495-497, 1975)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., Immunol Today 4: 72, 1983; Cote et al., Proc Natl Acad Sci 80: 2026-2030, 1983)およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96, (1985)が挙げられる。

30

#### 【0058】

ハイブリドーマ技術を用いる場合には、骨髄腫細胞系を用いてもよい。このようなハイブリドーマを作製する融合法で用いるのに好適な細胞系は、好ましくは抗体産生をせず、高い融合効率を有し、かつ、目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)の増殖だけを助ける特定の選択培地において、増殖できない酵素の欠乏を有するものである。例えば、免疫化した動物がマウスである場合には、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7およびS194/5XX0 Bu1を用い、ラットの場合には、R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983Fおよび4B210を用いるが、細胞融合に関してはU-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2およびUC729-6全てが有用である。モノクローナル抗体を作製するこれらの技術によって作製されるハイブリドーマおよび細胞系が、本発明の新規な組成物であると考えられることには注目すべきである。

40

#### 【0059】

選択されたVEGFR-3エピトープと免疫反応性のあるポリクローナル抗血清を作製する典型的な方法では、ウサギの免疫化のため、50μgのVEGFR-3抗原をフロイントの完全アジュバントに乳化させる。例えば、21日おきに、追加免疫のため、50μgのエピトープを、フロイントの不完全アジュバントに乳化させる。

#### 【0060】

50

モノクローナル抗体を作製するために、抗体をする惹起するものである組換え V E G F R - 3 を、マウスに定期的に注射する（例えば、10 ~ 20  $\mu$ g をフロイントの完全アジュバントに乳化する）。P B S 中のリンパ管内皮細胞の特異的認識を可能にするエピトープを含む V E G F R - 3 ポリペプチドの融合前最終の追加免疫を、マウスに施し、4 日後にマウスを犠牲にし、その脾臓を取り出す。脾臓を 10 mL 血清フリー R P M I 1640 に入れ、2 mM L - グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、100 単位 / mL ペニシリン、および 100  $\mu$ g / mL ストレプトマイシン ( R P M I ) (Gibco, Canada) を添加した血清フリー R P M I 1640 に浸漬した 2 枚の顕微鏡用ガラススライドのフロスト処理した端部間にて、脾臓を強くこすり付けて、単一細胞懸濁物を調製する。この細胞懸濁物を滅菌 70 メッシュ N i t e x 細胞濾過器 (Becton Dickinson, Parsippany, New Jersey) で濾過し、さらに 200 g にて 5 分間遠心分離し、ペレットを 20 mL 血清フリー R P M I に再懸濁させることにより 2 回洗浄する。3 匹の実験未使用の B a l b / c マウスから採取した脾臓細胞を同様に準備し、対照として用いる。融合に先立ち、3 日間、11% ウシ胎児血清 ( F B S ) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah) を加えた R P M I において対数期 (log phase) に維持した N S - 1 骨髄腫細胞を、上記のパラグラフに記載したように 200 g にて 5 分間遠心分離し、ペレットを 2 回洗浄する。

#### 【0061】

1  $\times$  10<sup>8</sup> 脾臓細胞を 2.0  $\times$  10<sup>7</sup> N S - 1 細胞と合わせて遠心分離し、上清を吸引する。管を軽くたたいてこの細胞ペレットを取り出し、1 mL の 37 P E G 1500 (75 mM H e p e s、pH 8.0 中 50%) (Boehringer, Mannheim) を攪拌しながら 1 分間にわたって添加し、次に、7 分間にわたって 7 mL の血清フリー R P M I を添加する。さらに 8 mL R P M I を添加し、細胞を 200 g で 10 分間遠心分離する。上清を廃棄した後、ペレットを 15% F B S、100  $\mu$ M ヒポキサンチンナトリウム、0.4  $\mu$ M アミノプテリン、16  $\mu$ M チミジン ( H A T ) (Gibco)、25 単位 / mL I L - 6 (Boehringer, Mannheim) および 1.5  $\times$  10<sup>6</sup> 脾臓細胞 / mL を含有する 200 mL R P M I に再懸濁し、10 の Corning 平底 96 ウェル組織培養プレート (Corning, Corning New York) に播種する。

#### 【0062】

融合後 2、4 および 6 日目に融合プレートのウェルから 100  $\mu$ L の培地を取り除き、新鮮培地と交換する。8 日目に融合物を E L I S A によりスクリーニングし、マウス I g G の V E G F R - 3 との結合の存在については次のように試験する。I m m u l o n 4 プレート (Dynatech, Cambridge, MA) を、25 mM T r i s、pH 7.5 で希釈した V E G F R - 3 100 ng / ウェルで 37 にて 2 時間コーティングする。コーティング液を吸引し、ブロッキング溶液 ( C M F - P B S にて希釈した 0.5% 魚皮ゼラチン (Signia) ) 200  $\mu$ L / ウェルを添加し、37 で 30 分間インキュベートする。プレートを 0.05% T w e e n 20 ( P B S T ) を含有する P B S で 3 回洗浄し、50  $\mu$ L 培養上清を添加する。37 で 30 分間のインキュベーション後、上記のように洗浄し、P B S T で 1 : 3500 希釈したホースラディッシュ・ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス I g G ( f c ) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) 50  $\mu$ L を添加する。プレートを上記のようにインキュベートし、P B S T で 4 回洗浄し、1 mg / mL o - フェニレンジアミン (Sigma) および 0.1  $\mu$ L / mL 100 mM クエン酸塩、pH 4.5 中 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> からなる 100  $\mu$ L 基質を添加する。5 分間後に 50  $\mu$ L の 15% H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> を添加して、呈色反応を停止させる。A<sub>490</sub> をプレートリーダー (Dynatech) で読み取る。

#### 【0063】

選択された融合ウェルを、96 ウェルプレートへの希釈および 5 日後のコロニー数 / ウェルの目視評価により、2 回クローニングする。ハイブリドーマにより産生されたモノクローナル抗体は、I s o s t r i p システム (Boehringer, Mannheim, Indianapolis, IN) を用いてイソ型決定する。

#### 【0064】

モノクローナル抗体の作製に加え、「キメラ抗体」の作製に向けて開発された技術である、好適な抗原特異性および生物活性を有する分子を得るためのマウス抗体遺伝子のヒト抗体遺伝子へのスプライシングを用いることができる(Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81: 6851-6855, 1984; Neuberger et al., Nature 312: 604-608, 1984; Takeda et al., Nature 314: 452-454; 1985)。あるいは、単鎖抗体の作製に関して記載される技術(米国特許第4,946,778号)を、VEGFR-3特異的単鎖抗体の作製に適合させることもできる。

**【0065】**

VEGFR-3またはその他のリンパ管内皮細胞抗原と結合することが分かっている抗体集団から、血管内皮細胞を用いて、VEGFR-3またはその細胞の他のエピトープと交差反応する抗体を「取り去る」ことができる。残る抗体集団は、リンパ管内皮細胞エピトープに特異的な抗体に富むことになる。

10

**【0066】**

また、Orlandi et al(Proc Natl Acad Sci 86:3833-3837; 1989)、およびWinter G and Milstein C(Nature 349: 293-299, 1991)で開示されたように、リンパ球集団におけるin vivo産生を誘導するか、または組換え免疫グロブリンライブラリーまたは高特異性結合試薬のパネルをスクリーニングすることにより、抗体を作製してもよい。

**【0067】**

本発明による抗体は、本発明による単離方法における使用に加え、ELISAおよびウエスタンブロット法などの標準的な免疫化学法および組織染色などの免疫組織化学法、なら

20

**【0068】**

一般に、本発明に向けて作製したポリクローナルおよびモノクローナル抗体は、いずれも種々の他の態様において用いてよい。特定の態様では、抗体は、VEGFR-3活性の阻害が望まれる治療用途に用いられる。抗体を用いてVEGF-C作用およびVEGFR-3受容体機能を遮断し、それによってリンパ管新生に関連した過増殖性疾患を治療しうる。また、本発明の抗体は、診断用途、例えば、疑わしい病態部位のサンプルを含む組織サンプル内のVEGFR-3タンパク質の増加または減少を検出するのにも有用であることが示される。さらなる態様によれば、抗体クローニングプロトコールにおいて本発明の抗体を使用し、その他のVEGFR-3タンパク質をコードするcDNAまたは遺伝子を得る。また、それらを阻害研究に用いて、細胞または動物におけるVEGFR-3関連ペプチドの効果を解析してもよい。さらに、本発明に向けて作製された抗体は、種々の細胞事象中のVEGFR-3の分布を解析するものであり、例えば、細胞周期の異なる時点におけるVEGFR-3ポリペプチドの細胞または組織特異的分布を解明する免疫学的局在性研究においても有用である。このような抗体の特により有用な用途は、未変性または組換えVEGFR-3を精製する場合、例えば、抗体アフィニティークラムを用いて精製する場合にある。このような免疫学的技術全ての操作は本開示に照らしてみると、当業者ならば分かるであろう。

30

**【0069】**

また、本発明で用いる抗体を作製する上記の「従来」法に加えて、本明細書において使用する抗体についてスクリーニングするファージディスプレイ法も提供されるものである。2E11D11および抗ポドプラニン抗体がリンパ管内皮細胞を特異的に認識することが、現在判っている。これら2種の抗体を使用して単離された細胞は、2E11D11または抗ポドプラニン関連分子のあらゆる可能性ある変異のファージディスプレイを利用して提示されるその他の関連抗体を、読み出す(read out)ために使用できる。また、提示された抗体は、2E11D11または抗ポドプラニンが認識する特定のエピトープに対する結合能によって選択することができる。新規抗体を単離する方法については、当業者には周知公知であり、さらに例えば、引用することにより本明細書の一部とされる、結合タンパク質の定向進化を記載する米国特許第5,223,409号で詳述されている。ま

40

50

た、関連法が米国特許第 5,403,484 号；同第 5,571,698 号；同第 5,837,500 号；同第 5,702,892 号にも記載されている。さらに、米国特許第 5,780,279 号；同第 5,821,047 号；同第 5,824,520 号；同第 5,855,885 号；同第 5,858,657 号；同第 5,871,907 号；同第 5,969,108 号；同第 6,057,098 号；同第 6,225,447 号に記載の技術も本発明に向けた抗体の作製に有用である。

#### 【0070】

さらに、本発明で用いる抗体を作製するもう 1 つの有用な技術は、合理的設計様式のアプローチを用いるものであってよい。合理的設計の目的は、生物学的に活性なポリペプチドまたはそれらが相互作用する化合物（アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤、ペプチドミメティクス、結合パートナーなど）の構造的類似体を作製することである。この場合の活性なポリペプチドは、本明細書を通じて記載される 2E11D11 および抗ポドプラニン抗体である。このような類似体を作製することにより、未変性または天然 2E11D11 または抗ポドプラニン分子よりも高い免疫反応性のある他の抗体を作出することができる。あるアプローチによれば、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの 3 次元構造を作成する。これは X 線結晶写真、コンピューターモデリングまたは両アプローチの組合せにより行うことができる。別のアプローチ、「アラニンスキャン」では、分子中の残基のアラニンによるランダム置換、およびその結果として機能に及ぼされる影響の判定を伴う。

10

#### 【0071】

また、特異的抗体の結晶構造を解明することもできる。原則的には、このアプローチによれば、今後の医薬品設計の基本となりうるファーマコアが得られる。機能的、薬理的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作製することによって、タンパク質結晶写真は全て省くことができる。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプの結合部位は最初の抗原の類似体であると考えられる。そこで、抗イディオタイプを用いて同定し、化学的または生物学的に作製されたペプチドのバンクからさらなる抗体を単離することができる。

20

#### 【0072】

##### D. 細胞の単離方法

本発明は、混合細胞培養物からリンパ管内皮細胞を単離する方法を提供する。特に、この単離方法では、リンパ管内皮細胞を優先的に認識する抗体を使用する。このような抗体の作製およびその例については上記した。本節では、抗体と併せて用いて細胞を単離しうる特定の技術を記載した。これらは典型的な技術にすぎず、本明細書に記載の方法と組み合わせ使用可能な細胞を単離する他の方法について、当業者ならば周知のことであろう。

30

#### 【0073】

本発明による細胞の分離には、種々の技術が用いられる。抗体を固相支持体と結合させると粗分離が可能である。用いる分離技術は、回収すべき画分の生存能力の保持を最大にするものであるべきである。異なる効果の種々の技術を用いると、「比較的粗」な分離がもたらされる。このような分離では、マーカーを有していない現存全細胞の最大 10%、通常約 5% 以下、好ましくは約 1% 以下が細胞集団に保持される。用いる特定の技術は、分離効率、関連細胞傷害性、動作の容易さおよび速度、ならびに最新式の設備および技術的熟練の必要性に依存する。

40

#### 【0074】

分離の手法としては、限定されるものではないが、磁気分離、抗体被覆磁気ビーズの使用、アフィニティークロマトグラフィー、限定されるものではないが、補体および細胞毒素をはじめとするモノクローナル抗体と結び付けたまたはモノクローナル抗体と併せて用いる細胞傷害性薬剤、および固相マトリックス、例えば、プレートに結合させた抗体との「パンニング(panning)」、水簸またはその他の便宜な技術が挙げられる。

#### 【0075】

分離技術の使用においては、限定されるものではないが、物理性（密度勾配遠心分離法および向流遠心水簸法）、細胞表面（レクチンおよび抗体アフィニティー）、ならびに生体

50

染色特性（ミトコンドリア結合色素 r h o 1 2 3 および D N A 結合色素 H o e c h s t 3 3 3 4 2 ）の違いに基づくものが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

精密な分離を提供する技術としては、限定されるものではないが、種々の精度、例えば、複数の色成分、小角および鈍角光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなど、を有する蛍光活性化セルソーティング（F A C S ）F A C S が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

F A C S は浮遊状態の細胞を細胞表面マーカーの違いに基づいて分離できるセルソーティング法である。本発明においては、F A C S を用いて細胞の混合集団からリンパ管内皮細胞を特異的に取り出す。F A C S は異種集団から目的とする細胞または粒子を物理的に分離する。この技術を用いて、回収した細胞の培養を可能にする滅菌環境にて細胞を選別できる。リンパ管内皮細胞は本明細書に記載の抗体が認識する抗原の存在によって選別される。さらに、F A C S を用いて、細胞培養物から、抗原発現の認識、G F P 発現、混入細胞の D N A 含量または細胞機能（例えば、カルシウム流動またはアポトーシス）により混入細胞を除去してもよい。混入細胞はリンパ管内皮細胞が単離される前、後または前後のいずれもにおいて除去しうる。

10

【 0 0 7 8 】

F A C S は、細胞または粒子が浮遊状態で検出点を過ぎて 1 個 1 個進むため、それらの特定の物理的および化学的特性を測定する手段であるフローサイトメトリーに基づいている。そのため、フローサイトメーターは特殊化した蛍光顕微鏡であると考えられる。現在あるフローサイトメーターは光源、集光系 (collector)、電子機器およびコンピューターからなり、シグナルをデータに変換する。最新のサイトメーターにおいては、指定の波長で干渉性光を放つレーザーが光源として最適である。散乱放射された蛍光は 2 つのレンズ（1 枚は光源の前に置き、1 枚は直角に置く）、さらに一連の構成部分、ビームスプリッターおよびフィルターにより集められ、特定バンドの蛍光性が測定できる。フローサイトメトリー技術により測定できる物理的特性としては、細胞の大きさ、形態および内部複雑性などの特性が挙げられるが、さらに当然のことではあるが、蛍光化合物によって検出できる細胞成分または機能を調べることができる。

20

【 0 0 7 9 】

一般に、フローサイトメーターは帯電液滴の静電偏向に関する原則を用いる。細胞をサンプルから吸引し、通常 P B S であるがイオン化液でもよいシース液の流れ中にあるノズルから 1 個 1 個出す。細胞がレーザー光線を遮るため、散乱光および蛍光シグナルが生じ、ソートロジックボードが細胞を選別すべきか否かを（ユーザー定義の基準により）判断する。この場合、リンパ管内皮細胞を選別するためのユーザー定義の基準は、細胞が 2 E 1 1 D 1 1、抗ポドプラニンなどのようなリンパ管内皮細胞特異的抗体と結合するまたはそれらによって認識されるか否かである。

30

【 0 0 8 0 】

レーザーインターセプトとブレイクオフポイント (break-off point) 間の距離がドロップデレイ (drop delay) と呼ばれる。目的の細胞、すなわち選別しようとするもの、が検出されると、その細胞がインターセプトからブレイクオフポイントまで進むまでサイトメーターは待機し、その後その流れにチャージをかける。目的の細胞を含む液滴は、固体を液体流にするために正または負のいずれかの電荷を帯びる。帯電液滴は流れに沿ってさらに進み 2 枚の高電圧偏向板を通過し、異極性のプレートに引き付けられる。このように、同じサンプルから 2 つの別個の集団が選別できる。

40

【 0 0 8 1 】

第 1 の分離では、典型的には約  $1 \times 10^8 - 9$ 、好ましくは約  $5 \times 10^8 - 9$  細胞で開始して、リンパ管細胞特異的抗体をある蛍光色素で標識し、様々なその他の細胞に対する抗体または抗 g p 8 0 抗体を少なくとも 1 つの異なる蛍光色素と結合させてもよい。各システムを分離工程で分離しすることができ、所望により、2 E 1 1 D 1 1 および / またはその他のリンパ管内皮マーカーが認識するエピトープについて陽性選抜すると同時にシステムを分

50

離する。細胞を死滅細胞に関連する色素（限定されるものではないが、ヨウ化プロピジウム（PI）など）を使用することによって、死滅細胞について選択してもよい。好ましくは、細胞の増殖または保存に好適な培地に細胞を回収する。細胞は光散乱特性、ならびに種々の細胞表面抗原のそれらの発現に基づいて選抜してもよい。当業者ならば、本発明に向けた細胞のFACS選抜に用いる特定のプロトコールについては十分に周知である。

#### 【0082】

典型的なFACS手法では、微小血管内皮細胞を、リンパ管内皮細胞を認識する1種以上の抗体とともに4で40分間インキュベートすることにより浮遊状態で標識する。選別前後の細胞を4で好適な培地で維持する。抗体標識完了後、最終濃度10 $\mu$ g/mLでヨウ化プロピジウム（死滅細胞の確認用）を各サンプル試験管に添加した。蛍光活性化セルソーティングは、出力60mWおよびノズル100 $\mu$ mで4Wアルゴンレーザーを用いるBecton Dickinson FACS T A R P <sup>1</sup> <sub>4</sub> <sup>5</sup> (San Jose, Calif.)により実施する。また、FACSは、細胞のFSCおよびSSC散乱を調べることにより物理的特性を測定するのにも使用できる。

10

#### 【0083】

FACSの他、MACSもまたセルソーティングには有用な技術である。細胞の単離方法として免疫蛍光検査を用いる代わりに、細胞を免疫磁気標識し、磁場を用いて分離する。また、抗体を付けた磁気ビーズに用いても混合集団培養物からリンパ管内皮細胞を分離することができる。抗体を提示する磁気ビーズは、磁場を帯びたカラム内で結合される。そこで、微小血管細胞集団がカラムを通り抜け、リンパ管内皮細胞は抗体と結合した状態となり、残りの細胞はカラムフロースルーで回収される。

20

#### 【0084】

また、従来の免疫吸着アフィニティークロマトグラフィーも、リンパ管細胞の単離に用いることができる。このような技術では、抗体を不活性カラムクロマトグラフィービーズと結合させ、ビーズをカラムに充填する。微小血管細胞集団がカラムを通り抜けると、リンパ管内皮細胞は抗体と結合した状態にあり、非リンパ管内皮細胞は通り抜けてカラムフロースルーに入る。

#### 【0085】

また、パンニング技術を用いて、本発明のリンパ管内皮細胞を単離してもよい。細胞のパンニングは、抗体を用いて細胞をペトリ皿などの固相支持体と結合させるというよく知られた技術である。基本的には、例えば、リンパ管内皮細胞に特異的な2E11D11についてパンニングしようとする細胞特異的な抗体を付着細胞培養プレートにコーティングする。その後、細胞の混合集団をプレートに添加し、細胞がプレート表面に固定化した抗体と十分に接触するようにプレートを回転させる。抗体によって認識されない細胞を含む残りの細胞培養培地をプレートから除去し、抗体と結合した、混入細胞を実質的に含まないリンパ管内皮細胞を残す。細胞は回収するか、または増殖用の新鮮培地に移すことが可能である。あるいは新鮮培地を抗体と付着した細胞に添加してもよい。微小血管細胞集団の場合、浮遊状態にあり、かつ付着したリンパ管細胞から除去された細胞が、リンパ管内皮細胞が実質的に混入していない血管内皮細胞集団であることは分かるであろう。

30

#### 【0086】

典型的なパンニングプロトコールでは、9mLの好適なバッファーで希釈した抗体（0.5mg/皿）を100mm<sup>2</sup>細菌用ポリスチレンペトリ皿(Falcon, Lincoln Park, N.J.)に注ぐ。表面を均一にコーティングするようその皿を回転させ、室温で40分間インキュベートする。使用前にコーティングした皿をバッファーで洗浄し、ペトリ皿の表面には付着しなかった残留抗体を除去する。例えば、最大3 $\times$ 10<sup>7</sup>細胞を含む10mL量の微小血管細胞懸濁物を4で10分間抗体にてコーティングした皿でインキュベートする。非付着細胞を吸引除去し、プレートをバッファーまたは細胞に好適な培地で洗浄する。非付着細胞を遠心分離沈降させて、再び培養することができる。

40

#### 【0087】

E. VEGFR - 3 活性の存在を調べるアッセイ

50

VEGF-C/DのVEGFR-3受容体ファミリーとの結合によって媒介される多くの生物学的活性(限定されるものではないが、血管内皮細胞および血管の増殖および移動に影響を与える;リンパ管内皮細胞およびリンパ管の増殖を促進する;血管透過性を高める;ならびに骨髓造血に影響を与えるなど)は本発明の単離細胞に関する多くのin vitroおよびin vivo臨床的有用性を裏付ける。非リンパ管内皮細胞が原因と考えられてきた汚染の影響のないリンパ管内皮細胞培養物において初めてこのような活性が明確にモニタリングできる。これらの細胞ではVEGFR-3結合およびVEGF-C/Dの活性、ならびに結合を調節する化合物についてモニタリングできる。従って、本発明による細胞は、モジュレーター、好ましい具体例ではVEGF-C/Dが媒介する生物学的反応の阻害剤の同定に有効である。本節では、VEGFR-3結合および/または活性の存在を調べるための種々のアッセイについて説明する。本発明によって単離された細胞におけるこのような活性の存在を用いて、このような細胞がリンパ管内皮細胞であることを示す。

10

**【0088】**

リンパ管内皮細胞の存在は、VEGFR-3結合活性を示す細胞の能力によってモニタリングしうる。典型的な結合アッセイについては全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる、Achen et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 548-53 (1998)に記載されている。一般に、これらのアッセイはVEGFR-3受容体を発現する本発明の細胞と受容体のリガンド(例えば、VEGF-C)とを混合し、さらに受容体結合を調べることを含んでなる。

**【0089】**

細胞をVEGFR-3受容体の阻害における薬剤の治療効果が望まれる用途に用いて薬剤を個体に投与する前に調べることができる。活性の指標として、治療薬の細胞におけるVEGFR-3受容体の自己リン酸化反応を変化させる能力も調べることができる。候補治療薬を細胞に添加した後、細胞を溶解し、抗VEGF受容体抗血清により免疫沈降させ、抗ホスホチロシン抗体を用いたウエスタンブロット法により解析してVEGF受容体のリン酸化反応を調べる。

20

**【0090】**

これらのアッセイでは、細胞を当業者ならば十分に周知の技術を用いて増殖させる。例えば、細胞をハムF12培地-10%ウシ胎児血清(FCS)で増殖させる。細胞を0.2%ウシ血清アルブミン(BSA)を添加したDMEM培地またはハムF12で一晩飢餓状態にした後、VEGF-C単独またはVEGF-Cとともに治療薬を加えて5分間インキュベートする。

30

**【0091】**

VEGF-Cの添加後、細胞を100mMオルトバナジウム酸ナトリウムを含有する氷冷Tris緩衝溶液(TBS)で2回洗浄し、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)、0.1U/mLアプロチニンおよび1mMオルトバナジウム酸ナトリウムを含有するRIPAバッファーに溶解する。溶解物を超音波処理し、16,000xgで20分間の遠心分離により明澄化し、VEGFR-3またはVEGFR-2に特異的な抗血清3~5μLとともに氷上にて3~6時間インキュベートする。免疫沈降物をプロテインA-セファロースと結合させ、1mM PMSF、1mMオルトバナジウム酸ナトリウムを含有するRIPAバッファーにて3回洗浄し、10mM Tris-HCl(pH7.4)にて2回洗浄し、7%ゲルを用いてSDS-PAGEに付す。ポリペプチドをウエスタンブロット法によりニトロセルロースに移し、PY20ホスホチロシン特異的モノクローナル抗体(Transduction Laboratories)または受容体特異的抗血清およびECL検出法(Amersham Corp.)を用いて解析する。

40

**【0092】**

候補治療物質の自己リン酸化反応に影響を与える能力(抗ホスホチロシン抗体を用いて検出される)を受容体の調節として評価する。既知の濃度のVEGF-Cに対して種々の濃度の治療薬で認められる変化のレベルが、受容体調節に関する有効性の判定の指標となる。受容体と結合することは分かっているが受容体リン酸化反応を刺激することができな

50

い治療用物質を阻害剤として評価する。組換え V E G F - C などの既知の受容体アゴニストを培地単独または濃縮したならし培地のいずれかと混合することによって、阻害活性をさらにアッセイし、濃縮したならし培地によって V E G F - C が媒介する受容体リン酸化反応が阻害されるか否かを調べることができる。

【 0 0 9 3 】

また、リンパ管内皮細胞の存在は、V E G F R - 3 の天然または組換えリガンドの結合アッセイを用いてモニタリングできる。選択されたリガンドの結合親和性を測定するために E L I S A タイプのアプローチを用いてもよい。例えば、V E G F R - 3 の結合親和性を調べるため、競合する V E G F R - 3 - I g G 融合タンパク質の連続希釈物と m y c エピトープでタグ付けした亜飽和濃度の候補リガンドを V E G F R - 3 でコーティングしたマイクロタイプレートに添加し、平衡が成立するまでインキュベートする。次いで、このプレートを洗浄して結合していないタンパク質を除去する。V E G F R - 3 コーティングしたプレートと結合した状態にあるリガンドは容易に検出可能な標識、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼと結合した抗 m y c 抗体を用いて検出される。結合親和性 ( E C <sub>50</sub> ) は競合する V E G F R - I g G 融合タンパク質の半最大量の結合を生じる濃度として算出できる。

10

【 0 0 9 4 】

V E G F - C はコラーゲンゲル中の内皮細胞移動を刺激する。本発明による細胞を調べて、V E G F - C が媒介するコラーゲンゲル中の内皮細胞移動を解明することにより、単離された細胞が確かにリンパ管内皮細胞であるというもう 1 つの証が提供される。典型的な細胞移動アッセイについては引用することにより本明細書の一部とされる、国際特許公開番号第 W O 9 8 / 3 3 9 1 7 号に記載されている。要するに、本発明において単離されたリンパ管内皮細胞を、組織培養プレートのコラーゲン層の上に播種する。V E G F - C を付けたリンパ管内皮細胞の位置から約 4 m m 離してコラーゲンゲルで作製したウェルに入れる。その後、コラーゲンゲルに付けた最初の範囲から V E G F - C を含有するウェルに向かって移動した内皮細胞数を計数して V E G F - C により誘導された細胞移動を評価する。

20

【 0 0 9 5 】

これらのアッセイでのコラーゲンゲルは I 型コラーゲン原液 ( 1 m M H C l 中 5 m g / m L ) を等容量の 2 × M E M および 2 容量の 1 0 % 新生仔ウシ血清を含有する M E M と混合することによって調製して最終コラーゲン濃度 1 . 2 5 m g / m L を得る。組織培養プレート ( 5 c m 径 ) を約 1 m m 厚の溶液層で覆い、これを 3 7 ° C で重合させる。本発明のリンパ管内皮細胞をこの層の上に播種する。

30

【 0 0 9 6 】

移動アッセイでは、細胞を第 1 のコラーゲン層の上に置かれたプラスチックリング ( 1 c m 径 ) の内側に付着させる。30 分後、リングを取り除き、付着していない細胞を洗い流す。0 . 7 5 % 低融点寒天 ( F M C BioProducts, Rockland, ME ) によって凝固させたコラーゲンの第 2 の層および増殖培地の層 ( 5 % 新生仔ウシ血清 ( N C S ) ) を添加する。細胞スポットの両側に 4 m m 離して、全ての層を打ち抜くウェル ( 3 m m 径 ) を設け、V E G F - C ポリペプチドを含有する培地を毎日ピペットでウェルに取る。スポット端部から移動し始めた細胞の顕微鏡写真を、例えば、6 日後に Olympus C K 2 倒立型位相差顕微鏡によって撮影する。蛍光色素ピスベンズイミド ( 1 m g / m L 、 H o e c h s t 3 3 2 5 8 , Sigma ) での核染色後に移動細胞を計数する。

40

【 0 0 9 7 】

付着させた最初の範囲から V E G F - C を含有するウェルに向かって異なる距離を移動する細胞数を培地の添加 6 日後に判定する。付着させた最初のリングから移動し始めている細胞数を蛍光顕微鏡の顕微鏡接眼レンズのグリッドおよび倍率 1 0 × を用い、隣接する 5 箇所の 0 . 5 m m × 0 . 5 m m 四方において計数する。0 . 5 m m より先に移動している細胞はグリッドを 0 . 5 m m 動かして同様に計数する。本発明の細胞の V E G F - C が媒介する移動を行う能力によって単離された細胞が V E G F R - 3 を発現するリンパ管内皮

50

細胞であることが示される。

【0098】

さらに、VEGF-Cの細胞分裂誘起活性を全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる、Breier et al., Dev 114: 521-532 (1992)に記載されたものなどの内皮細胞増殖アッセイを用いて調べることができる。VEGF-Cを細胞に添加することにより細胞のこの作用についてアッセイしうる。3日後、細胞をトリプシンにより解離し、サイトメーターを用いて計数してペプチドのリンパ管内皮細胞の増殖活性への影響を調べる。

【0099】

F. VEGFR-3の刺激因子

本明細書に示すように、単離されたリンパ管内皮細胞は、培養中のそれらの生存が促進されるような様式で培養増殖しうると考えられる。特定の態様によれば、細胞を、限定されるものではないが、VEGF、VEGF-C、VEGF-C156S、VEGF-DおよびORFV2-VEGFをはじめとするVEGFR-3の刺激因子および/またはVEGFR-2の刺激因子の存在下にて増殖させてもよい。これらの刺激因子およびVEGF受容体へのそれらの影響は本節においてさらに詳細に記載する。これらの因子を、それらと本発明の細胞との併用を可能にする製剤に調製しうることは分かるであろう。さらに、これらの刺激因子は、単独またはリンパ管内皮細胞培養系のアポトーシスの阻害、抑制、減少、あるいは阻止の混用にて本発明の細胞に供給してもよい。

【0100】

上記の刺激因子はPDGF/VEGFファミリーの増殖因子に属しており、これらのものとしては、少なくとも次のメンバー：PDGF-A（例えば、GenBank受託番号X06374を参照）、PDGF-B（例えば、GenBank受託番号M12783を参照）、VEGF（例えば、GenBank受託番号Q16889を参照、本明細書においてはVEGF-Aとしてまたは特定のイソ型により明確に示される）、PIGF（例えば、GenBank受託番号X54936を参照、胎盤増殖因子）、VEGF-B（例えば、GenBank受託番号U48801を参照；VEGF関連因子（VRF）としても知られる）、VEGF-C（例えば、GenBank受託番号X94216を参照；VEGF関連タンパク質（VRP）としても知られる）、VEGF-D（c-fos-誘導性増殖因子（FIGF）としても知られる；例えば、GenBank受託番号AJ000185を参照）、VEGF-E（NZ7 VEGFまたはOV NZ7としても知られる；例

えば、GenBank受託番号S67522を参照）、NZ2 VEGF（OV NZ2としても知られる；例えば、GenBank受託番号S67520を参照）、D1701 VEGF様タンパク質（例えば、GenBank受託番号AF106020を参照；Meyer et al., EMBO J 18: 363-374）、ならびにNZ10 VEGF様タンパク質（国際特許出願PCT/US99/25869に記載）[Stacker and Achen, Growth Factors 17: 1-11(1999); Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22(1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527-543(1999)]が挙げられる。

【0101】

VEGF-Cはアミノ酸レベルにおいてVEGF-Aと約30%同一であるVHDを含んでなる。VEGF-Cは当初、広範なアミノおよびカルボキシ末端ペプチド配列がフランキングするVHDとバルビアニ環3タンパク質に典型的なモチーフにおいて、タンデム反復システイン残基を含有するC末端ペプチドとを有する大型前駆体タンパク質、プレプロVEGF-Cとして表されている。プレプロVEGF-Cはシグナルペプチド、C末端プロペプチド、およびN末端プロペプチドの連続切断を伴う広範なタンパク質分解性成熟を受ける。分泌されたVEGF-Cタンパク質は各モノマーがVHDを含有する非共有結合ホモダイマーからなる。部分的タンパク質分解プロセッシングによって生成された中間体VEGF-Cは、VEGFR-3受容体に対する親和性を高め、さらに成熟タンパク質はVEGFR-2受容体と結合することもできる[Joikov et al., EMBO J., 16: (13): 3898-3911(1997).]. また、156位のただ1つのシステインが別のアミノ酸で置換されているか、または欠失している変異型VEGF-CはVEGFR-2との結合能は喪失している

が、VEGFR-3と結合し、活性化することは依然可能であることも示されてきた[国際特許公開番号第WO98/33917号]。マウス胚では、VEGF-C mRNAは、主として尿嚢、頸部領域、および後腎で発現される。[Joikov et al., J Cell Physiol 173: 211-215 (1997)]。VEGF-Cはリンパ管新生の調節に参与している。VEGF-Cがトランスジェニックマウスの皮膚で過剰発現された場合には、過形成性リンパ管網が観察され、VEGF-Cによってリンパ管増殖が誘導されたことが示される[Jeltsch et al., Science, 276: 1423-1425 (1997)]。また、成体におけるVEGF-Cの継続発現によっても、分化したリンパ管内皮の維持における役割が示される[Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。さらに、VEGF-Cは血管形成特性も示す。これはコラーゲンにおけるウシ毛細管内皮(BCE)細胞の移動を刺激して、ヒト内皮細胞の増殖を促進することができる[例えば、引用することにより本明細書の一部とされる、国際特許公開番号第WO98/33917号を参照]。VEGF-C<sub>156</sub>Sは、VEGFR-3と結合するVEGF-Cシステイン欠変異体であるが、(VEGF-Cと比べて)VEGFR-2との結合が低下していることが示されている。本発明において用いるVEGFR-3に特異的なVEGF-C<sub>156</sub>Sおよび関連リガンドについては、特に全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第6,130,071号に記載されている。VEGF-C材料および方法については、引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第6,245,530号および第6,221,839号に記載されている。

#### 【0102】

VEGF-Dは、構造的にも機能的にもVEGF-Cと最も密接な関係がある[引用することにより本明細書の一部とされる、国際特許公開番号第WO98/07832号および米国特許第6,235,713号を参照]。VEGF-Cのように、VEGF-Dは、N末端およびC末端タンパク質分解性プロセッシングを受けるプレプロペプチドとして初期発現され、非共有結合ダイマーを形成する。VEGF-Dはin vitroにおいて内皮細胞における細胞分裂誘起反応を刺激する。胚形成時、VEGF-Dは時間的および空間的複合パターンにて発現され、その発現は成体の心臓、肺、および骨格筋において可能である。VEGF-D<sub>N</sub>Cと呼ばれるVEGF-Dの生物学的に活性な断片の単離については、引用することにより本明細書の一部とされる、国際特許公開番号第WO98/07832号に記載されている。VEGF-D<sub>N</sub>Cは、アフィニティータグペプチドFLAG(登録商標)と連結したVEGF-Dのアミノ酸残基93~201番からなる。

#### 【0103】

VEGF-Aは当初、数種類の起源から内皮細胞に対するその細胞分裂誘起活性に基づいて、さらには微小血管透過性を誘導するその能力によっても精製されたことから、血管透過性因子(VPF)とも呼ばれている。後に、VEGF-Aは、細胞内カルシウムの移行、プラスミノゲンアクチベーターおよびプラスミノゲンアクチベーター阻害剤-1合成の誘導、in vitroにおける単球移動の促進、ヒト内皮細胞における抗アポトーシスタンパク質発現の誘導、内皮細胞における窓形成の誘導、内皮細胞における細胞接着分子発現の促進ならびに一酸化窒素を介した血管拡張および低血圧の誘導をはじめとする多くの生物学的過程を誘導することが分かってきた[Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999); Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22(1999); Zachary, Intl J Biochem Cell Bio 30: 1169-1174 (1998)]。

#### 【0104】

VEGF-Aは、23kDサブユニットからなる分泌性ジスルフィド結合ホモダイマー糖タンパク質である。異なるmRNAプライス変異体によってコードされる121、145、165、189または206アミノ酸長のヒトVEGF-Aイソ型5種(VEGF<sub>121-206</sub>)については記載されており、その全てが内皮細胞において有糸分裂を刺激することができる。しかしながら、各々のイソ型は生物活性、受容体特異性、およびVEGF-Aの低親和性受容体として挙動する細胞表面および細胞外マトリックス関連ヘパラン硫酸プロテオグリカンに対する親和性の点で異なる。VEGF<sub>121</sub>は、ヘパリンおよびヘパラン硫酸のいずれとも結合しない。VEGF<sub>145</sub>およびVEGF<sub>165</sub>(Ge 50

nBank 受託番号 M32977) はいずれもヘパリンと結合できる。さらに VEGF<sub>189</sub> および VEGF<sub>206</sub> はヘパリンおよびヘパラン硫酸に対する最も強い親和性を示す。VEGF<sub>121</sub>、VEGF<sub>145</sub> および VEGF<sub>165</sub> は可溶性で分泌されるが、大部分の VEGF<sub>165</sub> は細胞表面および細胞外マトリックスプロテオグリカンに限定される。一方、VEGF<sub>189</sub> および VEGF<sub>206</sub> は細胞外マトリックスと結合してとどまっている。VEGF<sub>189</sub> および VEGF<sub>206</sub> はいずれもヘパリンまたはヘパリナーゼでの処理により放出させることができることから、これらのイソ型がプロテオグリカンを介して細胞外マトリックスと結合されることが示される。また、細胞結合 VEGF<sub>189</sub> はプラスミンなどのプロテアーゼによって切断され、その結果として活性可溶性 VEGF<sub>110</sub> の放出が起こる。VEGF を発現する大部分の組織では数種類の VEGF イソ型の同時発現が観察されるが、VEGF<sub>121</sub> および VEGF<sub>165</sub> がプレドミナント型であり、VEGF<sub>206</sub> はほとんど検出されない [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。VEGF<sub>145</sub> は主として生殖器官由来の細胞で発現されるという点で異なる [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22(1999)]。

10

20

30

40

50

#### 【0105】

VEGF-A 発現のパターンは正常な脈管系の形成および維持、および腫瘍増殖および慢性関節リウマチなどのその他の病的状態に関係する血管新生へのその関与を示唆している。VEGF-A は脈管系の形成に関係する胎児組織で発現され、多くの腫瘍細胞系によって分泌される。標的遺伝子破壊によって VEGF-A をノックアウトしたマウスの解析では VEGF-A が生存に重要であること、さらに心臓血管系の形成が VEGF-A 濃度勾配に高感受性であることがわかる。単一コピーの VEGF-A を欠いたマウスは、妊娠 11~12 日間に死ぬ。これらの胚は増殖異常および心臓血管構造の形成不全をはじめとするいくつかの発達異常を示す。また、VEGF-A は生後の生育、器官形成、成長板形態形成の調節および軟骨内性骨形成にも必要とされる。VEGF-A の必要性は年齢とともに、特に生後 4 週後に減少する。成熟動物では、VEGF-A は主として創傷治癒および黄体の形成などのプロセスにおいて活性な血管新生に必要である [Neufeld et al., FASEB J 13: 9-22(1999); Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。VEGF-A 発現は主として低酸素状態、ならびに多くのホルモン類および上皮細胞増殖因子 (EGF)、TGF- $\beta$ 、および種々のインターロイキン類をはじめとするサイトカイン類の影響を受ける。調節は転写により、さらには mRNA 安定性の高まりによるなど転写後に生じる [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999)]。

#### 【0106】

VEGF サブファミリーのさらなる 4 種のメンバーがヒト、ヒツジおよびヤギに感染するポックスウイルスで同定された。オルフウイルスによってコードされる VEGF-E および NZ2 VEGF は有力な有糸分裂促進物質であり、透過性増強因子である。いずれも哺乳類 VEGF-A と約 25% アミノ酸同一性を示し、ジスルフィド結合ホモダイマーとして表される。これらのウイルスによる感染はこれらのウイルス VEGF タンパク質によって誘導される内皮細胞増殖および血管透過性に関連すると考えられる膿疱性皮膚炎を特徴とする [Ferrara, J Mol Med 77: 527-543 (1999); Stacker and Achen, 増殖 Factors 17: 1-11 (1999)]。

#### 【0107】

また、VEGF 様タンパク質も、オルフウイルスのさらなる 2 種類の株、D1701 [GenBank 受託番号 AF106020; Meyer et al., EMBO J 18: 363-374 (1999) に記載されている] および NZ10 [引用することにより本明細書の一部とされる、国際特許出願 PCT/US99/25869 に記載されている] から同定された。これらのウイルス VEGF 様タンパク質は、宿主の内皮に存在する VEGFR-2 と結合することが示されており、この結合は感染の進行および血管新生のウイルス誘導に重要なものである [Meyer et al., EMBO J 18: 363-374 (1999); 国際特許出願 PCT/US99/25869]。

#### 【0108】

## G. VEGF-C 関連疾患の治療方法

また、本発明は、また、他の態様において、リガンドが媒介する VEGFR-3 の活性を特徴とする病状の診断および治療を含んでなる。このように、介入によって恩恵を受けると考えられる、限定されるものではないが、癌、慢性炎症性疾患、慢性関節リウマチ、乾癬、糖尿病性網膜症などをはじめとする多くの疾患がある。特定の態様によれば、リンパ系疾患の治療に本発明の治療方法が用いられる。本発明の細胞は、VEGF-C と VEGFR-3 との結合により媒介されるこのような疾患を有する疑いのある患者から単離される。

### 【0109】

「リンパ系疾患」とは、リンパ系に影響を与える、限定されるものではないが、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症および頸部水嚢胞をはじめとする臨床症状を意味する。好ましい態様は、ヒト被験体をリンパ水腫疾患、すなわち、医師がリンパ水腫と診断する、リンパ液の貯留に関係する腫脹を特徴とする非遺伝的原因（例えば、寄生生物、外科処置）であることが分かっているリンパ水腫以外の疾患、を発症する高い危険性についてスクリーニングする方法である。例証として、リンパ水腫疾患は、一般に独立した存在として記載され、いずれもが優性遺伝を特徴とする、ミルロイ-ノンネ (OMIM 153100) 症候群 - 早期リンパ水腫 [Milroy, N.Y. Med. J., 56: 505-508 (1892); および Dale, J. Med. Genet., 22: 274-278 (1985)] および早発性リンパ水腫 (メージ症候群、OMIM 153200) - 遅発性リンパ水腫 [Lewis et al., J. Ped., 104: 641-648 (1984); Holmes et al., Pediatrics 61: 575-579 (1978); および Wheeler et al., Plastic Reconstructive Surg., 67: 362-364 (1981)] が挙げられる。しかしながら、文献においてこれらの疾患の区別に関する混乱がある。ミルロイ症候群では、一般に下肢で比較的重症である水腫の存在が出生直後から認められる。早発性リンパ水腫は同様に現われるが、腫脹の徴候は通常思春期頃である。思春期後に発症したといういくつかの症例が報告されている。本明細書に記載の特定の分析では、5q34-q35 との関連を示すリンパ水腫系は罹患した個体の大部分において早期のものであったが、これらの系統の個体では思春期中または後に現れた。

### 【0110】

特に、本発明の治療では、遺伝子的原因が特定できる遺伝性リンパ水腫を意図している。例えば、国際特許公開番号第 WO 00 5 / 5 8 5 1 1 号では、VEGFR-3 変異に関連するリンパ水腫についてのスクリーニングおよび治療法が記載されている。このような患者からリンパ管内皮細胞を単離する能力は、*ex vivo* において標的細胞を治療薬と接触させ、さらにその細胞を再導入することによるタンパク質または遺伝子に基づく治療法を向上させる。

### 【0111】

さらに、本発明により治療する他の種類の疾患は VEGF-C および / または VEGFR-3 が関与するということによってのみ限定される。従って、例えば、本発明の細胞を用いて脳 (膠芽細胞腫、星状細胞腫、乏突起膠腫、上衣細胞腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、膵臓、小腸、血液細胞、大腸、胃、乳房、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭頸部、食道、骨髄、血液またはその他の組織の癌をはじめとする様々な腫瘍を評価することを意図する。これらの疾病を有する患者から単離した細胞は個体に治療法を提供するために用いる。

多くの状況では、治療法を提供するにあたり腫瘍細胞を死滅させる、または正常な細胞死または「アポトーシス」を誘導する必要がない。むしろ、有意義な治療をなし遂げるのに必要なことは腫瘍増殖をある程度遅延させるか、または特定の場所に限局して本質的に異なる部位への拡大を阻害することだけである。これは腫瘍増殖を完全に阻止すること、または幾分か腫瘍の退行 (regression) をなし遂げることであろう。また、「緩解 (remission)」および「全身腫瘍組織量の減少 (reduction)」などの臨床医学用語が一般的に用いられる。本発明に関しては、治療効果は血管形成の阻害および / またはリンパ管新生の阻害によってもたらされる。

## 【 0 1 1 2 】

## L. 遺伝子に基づく治療法

本発明によって単離された細胞は核酸形態で提供される遺伝子に基づく治療法を用いて処置され、患者に再導入されて *ex vivo* 遺伝子治療効果を達成する。*ex vivo*における態様によれば、患者由来の細胞を取り出し、少なくともしばらくの間体外で維持する。この期間中には治療効果が送達されるため、その後、細胞を患者に再導入する；うまくいけば、サンプル中のいずれの腫瘍細胞も死滅する。特に、細胞を治療用遺伝子をリンパ管または血管細胞の腫瘍に提供しうる発現構築物とその脈管構造における V E G F R - 3 の障害が可能になる様式で接触させる。

## 【 0 1 1 3 】

これらの態様では、典型的な発現構築物はウイルスまたはウイルスゲノムから誘導した操作構築物を含む。一般に、発現構築物は発現させようとする治療用遺伝子をコードする核酸と、さらにそれが投与される細胞において遺伝子の発現を達成させるさらなる調節領域を含んでなる。このような調節領域としては、例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルなどが挙げられる。

現在では種々のウイルスベクターを用いて DNA を細胞に導入しうることは広く知られている。このような態様では、目的とする遺伝子を含むウイルスベクターを含んでなる発現構築物が、アデノウイルス（例えば、各々が引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第 5, 8 2 4, 5 4 4 号；同第 5, 7 0 7, 6 1 8 号；同第 5, 6 9 3, 5 0 9 号；同第 5, 6 7 0, 4 8 8 号；同第 5, 5 8 5, 3 6 2 号を参照）、レトロウイルス（例えば、各々が引用することにより本明細書の一部とされる米国特許第 5, 8 8 8, 5 0 2 号；同第 5, 8 3 0, 7 2 5 号；同第 5, 7 7 0, 4 1 4 号；同第 5, 6 8 6, 2 7 8 号；同第 4, 8 6 1, 7 1 9 号を参照）、アデノ随伴ウイルス（例えば、各々が引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第 5, 4 7 4, 9 3 5 号；同第 5, 1 3 9, 9 4 1 号；同第 5, 6 2 2, 8 5 6 号；同第 5, 6 5 8, 7 7 6 号；同第 5, 7 7 3, 2 8 9 号；同第 5, 7 8 9, 3 9 0 号；同第 5, 8 3 4, 4 4 1 号；同第 5, 8 6 3, 5 4 1 号；同第 5, 8 5 1, 5 2 1 号；同第 5, 2 5 2, 4 7 9 号を参照）、アデノウイルス - アデノ随伴ウイルスハイブリッド（例えば、引用することにより本明細書の一部とされる米国特許第 5, 8 5 6, 1 5 2 号を参照）またはワクシニアウイルスもしくはヘルペスウイルス（例えば、各々が引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第 5, 8 7 9, 9 3 4 号；同第 5, 8 4 9, 5 7 1 号；同第 5, 8 3 0, 7 2 7 号；同第 5, 6 6 1, 0 3 3 号；同第 5, 3 2 8, 6 8 8 号を参照）ベクターであってよい。

## 【 0 1 1 4 】

その他の態様によれば、非ウイルス性送達を提供される。これらとしては、リン酸カルシウム沈降 (Graham and Van Der Be, *Virology*, 52: 456-467, 1973; Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7: 2745-2752, 1987; Rippe et al., *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990)、D E A E - デキストラン (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5: 1188-1190, 1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspa et al., *Mol. Cell Biol.*, 6: 716-718, 1986; Potter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7161-7165, 1984)、直接マイクロインジェクション (Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101: 1094-1099, 1985)、DNA 封入リポソーム (Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721: 185-190, 1982; Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979; Felgner, *Sci Am.* 276 (6): 102-6, 1997; Felgner, *Hum Gene Ther.* 7(15): 1791-3, 1996)、細胞超音波処理 (Fechheimer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467, 1987)、高速マイクロプロジェクトイルを用いる遺伝子衝撃 (gene bombardment) (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9568-9572, 1990)、および受容体媒介性トランスフェクション (Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262: 4429-4432, 1987; Wu and Wu, *Biochemistry*, 27: 887-892, 1988; Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12: 159-167, 1993) が挙げられる。

## 【 0 1 1 5 】

本発明の特定の態様によれば、発現構築物（すなわち、実際には上記のペプチド）をリポ

10

20

30

40

50

ソームに封入する。リポソームはリン脂質二重層膜と内部水性媒質とを特徴とする小胞構造である。多重膜リポソームは水性媒質によって隔てられた多重脂質層である。これらはリン脂質が過剰の水性溶液に懸濁されると自然に形成される。脂質成分は閉構造形成前に自己再構成し、脂質二重層間の水および溶解した溶質を取り込む(Ghosh and Bachhawat, In: Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and ligands, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991)。DNAのカチオン性リポソームへの導入によりリポソームから光学的複屈折液晶凝縮球への位相遷移が起こる(Radler et al., Science, 275(5301): 810-4, 1997)。これらのDNA-脂質複合体が遺伝子療法および送達用に有望な非ウイルスベクターである。

【0116】

in vitroにおける異質DNAのリポソーム媒介性核酸送達および発現では、非常によい結果が得られた。さらに、本発明では「リポフェクション」テクノロジーを要する種々の商業的アプローチも意図する。本発明の特定の態様によれば、リポソームとセンダイウイルス(HVJ)とで複合体を形成する。これが細胞膜との融合を容易にし、リポソームカプセル封入したDNAの細胞侵入を促進することは分かっている(Kaneda et al., Science, 243: 375-378, 1989)。その他の態様によれば、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と複合体化するか、またはそれと併用する(Kato et al., J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991)。なおさらなる態様によれば、リポソームをHVJおよびHMG-1の両方と複合体化するか、またはそれらと併用する。このような発現構築物はin vitroおよびin vivoでの核酸移入および発現における使用に成功したことから、これらは本発明に適用できる。

10

20

【0117】

治療用遺伝子をコードする核酸の細胞への送達に使用できるその他のベクター送達系としては、受容体媒介性送達ビヒクルが挙げられる。これらはほぼ全ての真核生物細胞における受容体媒介性エンドサイトーシスによる高分子の選択的取込みをうまく利用する。種々の受容体は細胞種特異的な分布をしているため、送達は高度に特異的でありうる(Wu and Wu, 1993, 上記)。

【0118】

一般に、受容体媒介性遺伝子ターゲティングビヒクルは、2成分：細胞受容体特異的リガンドおよびDNA結合剤からなる。いくつかのリガンドは受容体媒介性遺伝子移入に用いられてきた。最も広く知られているリガンドが、アシアロオロソムコイド(ASOR)(Wu and Wu, 1987, 上記)およびトランスフェリン(Wagner et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 87(9): 3410-3414, 1990)である。最近では、ASORと同じ受容体を認識する合成ネオ糖タンパク質が、遺伝子送達ビヒクルとして用いられ(Ferkol et al., FASEB J., 7: 1081-1091, 1993; Pexales et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91: 4086-4090, 1994)、さらに上皮細胞増殖因子(EGF)が遺伝子を扁平上皮癌細胞へ送達するのに用いられている(Myers, EPO 0273085)。

30

【0119】

その他の態様によれば、送達ビヒクルがリガンドとリポソームとを含んでなる。例えば、Nicolau et al.(Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987)はラクトシルセラミド、ガラクトース末端アシアログリオシドを使用し、リポソームに組み込んで肝細胞によるインスリン遺伝子の取込みの増大が観察された。このように、リポソームを用いてまたは用いなくとも多くの受容体-リガンド系によって治療用遺伝子をコードする核酸を特定の細胞種に特異的に送達することが可能である。

40

【0120】

本発明の他の態様によれば、発現構築物がnaked組換えDNAまたはプラスミドだけからなる。構築物の導入は物理的または化学的に細胞膜を透過させることが可能な上記のいずれかの方法によってなし遂げられる。これはin vitroにおける導入に特に適しており、またin vivoにおける使用にも適合する。Dubensky et al.,(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81: 7529-7533, 1984)は、ポリオーマウイルスDNAのCaPO<sub>4</sub>沈降物としての

50

成体および新生マウスの肝臓および脾臓への注入に成功し、活性ウイルス複製および急性感染を証明した。また、Benvenisty and Neshif(Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9551-9555, 1986)はプラスミド C a P 0<sub>4</sub> 沈降物の直接腹腔内注射によってトランスフェクトした遺伝子の発現が生じることも証明した。

#### 【0121】

n a k e d DNA発現構築物の細胞への導入についての本発明の他の態様は、粒子衝撃に関するものである。この方法は、DNA被覆したマイクロプロジェクタイトを、それらが細胞膜を貫通し、それらを死滅させることなく細胞に侵入することが可能な高速に加速する能力によるものである(Klein et al., Nature, 327: 70-73, 1987)。小粒子を加速するためのいくつかの装置が開発された。あるこのような装置は高圧放電を利用するものであり、生じた電流がその推進力となる(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87: 9568-9572, 1990)。用いるマイクロプロジェクタイトは、タングステンまたは金ビーズなどの生物学的に不活性な物質で構成される。

10

#### 【0122】

遺伝子送達を *in vivo* および *ex vivo* 状況に適合させる方法については、当業者ならば十分に周知なことである。ウイルスベクターの場合には通常ウイルスベクター材料を調製する。ウイルスの種類および達成可能な力価に応じて、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$  または  $1 \times 10^{12}$  感染粒子を患者に送達する。リポソームまたはその他の非ウイルス製剤の場合でも、相対的取り込み効率を比較することによって同様の数字が予想される。医薬上許容される組成物としての製剤は以下で説明する。

20

#### 【0123】

種々の腫瘍型に対して様々な経路が考えられる。経路についての以下の節では有力な候補経路についての広範なリストを示している。実際にはいずれの腫瘍にも全身送達を意図する。これは特に、顕微鏡的または転移性の癌の攻撃に重要であることが分かる。離散性の腫瘍塊が確認される場合には様々な直接、局部的および限局性アプローチが採られる。例えば、腫瘍に直接発現ベクターまたはタンパク質を注射してもよい。切除前、切除中または切除後に腫瘍床を治療してもよい。一般的には、切除後、外科処置後にも配置されているカテーテルによってベクターを送達する。

#### 【0124】

### II. 免疫療法

一般に、免疫療法では癌細胞を標的化して破壊する免疫エフェクター細胞および分子の使用を利用する。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞表面のいくつかのマーカーに対して特異的な抗体である。抗体単独で治療用のエフェクターとして作用しうるし、または実際に細胞致死をもたらすその他の細胞を補充もしうる。また、抗体を薬剤または毒素(化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など)と結合して単に標的化剤として用いてもよい。別法では、エフェクターが直接または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球であってもよい。種々のエフェクター細胞としては、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。

30

#### 【0125】

本発明に関しては、抗体、抗体複合体または免疫エフェクター細胞によって治療に向けて選択された腫瘍を標的化し、さらに免疫療法と併用される本発明のペプチドによって腫瘍の脈管構造を標的化することにより複合的な治療効果を得ることが可能である。

40

#### 【0126】

併用療法での一般的なアプローチについては、以下で説明する。本発明に関しては、2E11D11および抗ポドプラニン抗体がリンパ管内皮細胞を特異的に認識できることが判明したため、細胞傷害性薬剤によってこれらの細胞を標的化することができる。従って、種々の癌に関連するリンパ管新生を本明細書に記載の方法を用いて阻害してもよい。

#### 【0127】

いくつかの態様では、抗体を用いて治療用タンパク質をリンパ管内皮細胞に向ける。これ

50

らの治療法は、抗リンパ管新生および/または抗血管形成治療として特に有用であるが、本発明はこれらの有益な効果に限定されるものではないと考えられる。組成物の投与は全身または局部的であってよく、治療上有効な量のタンパク質の単一箇所への注射も含まれる。本発明の治療用組成物の投与では、例えば、静脈内、筋肉内、皮下または長期投与用のカテーテルをはじめとする当業者ならば周知のいずれの経路も考えられる。また、治療用組成物を患者の複数箇所に送達させてもよいと考えられる。同時に複数箇所の投与を行ってもよいし、または数時間にわたって投与してもよい。特定の症例では、治療用組成物の連続流を提供することが効果的である。付加治療として定期的に、例えば、1日1回、週1回または月1回管理する。さらに、化学療法薬をリンパ管内皮細胞に向けてもよい。本発明の治療用途に有用なこのような薬剤については以下でさらに詳細に記載している。

10

#### 【0128】

#### III. 免疫療法、従来の化学または放射線療法との併用療法

DNA損傷剤耐性の腫瘍細胞は、臨床腫瘍学における大きな問題となっている。現在の癌研究の1つの目標は化学および放射線療法の効果を向上させる方法を見つけることである。1つには、このような従来の治療法と遺伝子療法とを併用した方法がある。例えば、単純ヘルペス-チミジンキナーゼ(HS-tk)遺伝子をレトロウイルスベクター系により脳腫瘍に送達すると、抗ウイルス薬ガンシクロビル感受性がうまく誘導された(Culver et al., 1992)。本発明のある具体例では、本発明のペプチドを化学または放射線療法的介入、免疫療法と、またはその他の抗血管形成/抗リンパ管新生療法と併せて投与してもよいと考えられる。

20

#### 【0129】

一般に、本発明の方法および組成物を用いて、細胞を死に至らしめる、T細胞増殖を阻害する、転移を阻害する、血管形成を阻害する、あるいはそうでなければ、悪性表現型の腫瘍細胞を改善するまたは減少させるためには「標的」細胞、腫瘍またはその脈管構造を少なくとも2つの異なる治療用組成物と接触させる。これらの組成物は、癌細胞および/または癌細胞を供給してそれを発する血管およびリンパ管の内皮の増殖を絶つおよび/または阻害することによって、癌の増殖を絶つおよび/または阻害するのに有効な混合量で提供されるであろう。この方法では、細胞をペプチドまたは発現構築物および薬剤または因子と同時に接触させる必要がある。これは細胞を両方の薬剤を含有する単一組成物または薬理的製剤と接触させることにより、または細胞を2つの異なる組成物または製剤と

30

#### 【0130】

あるいは、2つの異なる処置を数分間~数週間という間隔で分割してもよい。2種類の療法を別々に管理する態様では、一般に、第1および第2の療法がなお有利な併用効果を与えうように、各送達の合間に有効期限が終了しないようにする。このような場合では、両方の治療を互いに約12~24時間以内、さらに好ましくは、互いに約6~12時間以内に行い、遅延時間が約12時間のみであることが最も好ましいと考えられる。しかしながら、治療期間をかなり延長することが望ましいと思われる状況もあり、その場合には各投与の間に数日(2、3、4、5、6または7)~数週(1、2、3、4、5、6、7または8)間が経過する。1種または両方の療法による反復治療が特に意図される。特定の態様によれば、癌細胞を死に至らせる、阻害する、または壊死させるように癌細胞を直接攻撃する抗癌治療を遂行し、併せて、抗血管形成および/または抗リンパ管新生効果に基づく治療用組成物も投与する。抗リンパ管新生組成物はその他の抗癌剤の後、その他の抗癌剤の前、または実際にはその他の抗癌剤と同時に投与してもよい。

40

#### 【0131】

併用療法での使用に好適な薬剤または因子は、細胞に適用するとDNA損傷を誘導する全ての化合物または治療方法である。このような薬剤または因子としては、線照射、X線、UV照射、マイクロ波、電子放出などのようなDNA損傷を誘導する放射線および波動が挙げられる。「化学療法薬」としても記載される種々の化合物は、DNA損傷を誘導する働きをするものであり、その全てが本明細書に記載の併用療法に有用であるとされる。

50

有用と考えられる化学療法薬としては、例えば、アドリアマイシン、5 - フルオロウラシル (5 F U)、エトポシド (V P - 1 6)、カンプトセシン、アクチノマイシン - D、マイトマイシン C、シスプラチン (C D D P) および過酸化水素までも挙げられる。また、本発明は、放射線に基づくものであっても、または実際の化合物であつてもよい、X線とシスプラチンとの併用またはシスプラチンとエトポシドとの併用などの1種以上のDNA損傷作用因子の組合せの使用も包含する。

#### 【0132】

本発明による癌の治療においては、腫瘍細胞および/または腫瘍血管の内皮を抗リンパ管新生治療薬と併せて作用因子と接触させる。これは限局した腫瘍部位にX線、UV光線、線あるいはマイクロ波などの放射線を照射することによって達成されうる。あるいは、被験体にアドリアマイシン、5 - フルオロウラシル、エトポシド、カンプトセシン、アクチノマイシン - D、マイトマイシン C、またはシスプラチンなどの化合物を含んでなる治療上有効な量の医薬組成物を投与することによって腫瘍細胞を薬剤と接触させてもよい。また、キナーゼ阻害剤も本発明のペプチドとの併用療法に有用であると考えられる。この薬剤は、引用することにより本明細書の一部とされる、2001年1月17日出願の米国特許第60/262、476号に記載のものなどのVEGF - C/D阻害剤ペプチドと合わすことによって、併用療法用組成物、またはキットとして調製され、用いられる。

10

#### 【0133】

核酸、特にDNAを直接架橋する薬剤はDNA損傷を促進するため、抗リンパ管新生薬との相乗的抗新生物性の組合せを生み出すと考えられる。シスプラチンなどの薬剤、およびその他のDNAアルキル化剤が用いられる。シスプラチンは臨床応用に用いる有効用量3週間おきに5日間20mg/m<sup>2</sup>、合計3クールにより癌の治療に広く用いられている。シスプラチンは経口摂取されないため、静脈内、皮下、腫瘍内または腹腔内注射によって送達する必要がある。

20

#### 【0134】

また、DNAを損傷させる薬剤としては、DNA複製、有糸分裂および染色体分離を妨げる化合物が挙げられる。このような化学療法化合物としては、ドキシソルピシンとしても知られるアドリアマイシン、エトポシド、ペラパミル、ポドフィロトキシンなどが挙げられる。新生物の治療で広く臨床応用されるこれらの化合物は、アドリアマイシンの場合の21日おきに25~75mg/m<sup>2</sup>からエトポシドの場合の35~50mg/m<sup>2</sup>までの範囲の量での静脈内ボラスによる、静脈内または静脈内用量を2倍にした経口投与が行われる。

30

#### 【0135】

また、核酸前駆体およびサブユニットの合成および忠実性を混乱させる薬剤によつてもDNA損傷が起こる。それによつて、多くの核酸前駆体も開発された。広範な試験を受けた、容易に入手可能な薬剤が特に有用である。従つて、5 - フルオロウラシル (5 - F U) などの薬剤は、この薬剤が新生物細胞を標的化するのに特に有用なものとなる新生物組織付近で、優先的に用いられる。5 - F Uは相当な毒性があるが、様々な担体により、一般的に用いられる3~15mg/kg/日の範囲の用量での局所、または静脈内投与などによつて適用できる。

40

#### 【0136】

例証として、以下に化学療法薬およびこのような薬剤の投与によつて管理されることがわかってきた癌を挙げる。これらの化学療法薬と本発明のペプチドとの併用が種々の新生物性疾患の軽減に有用であることが分かるであろう。これらの化合物の例としては、アドリアマイシン (ドキシソルピシンとしても知られる)、V P - 1 6 (エトポシドとしても知られる) など、ダウノルピシン (DNAにインターカレートし、DNA依存性RNAポリメラーゼを遮断し、DNA合成を阻害する) が挙げられる。マイトマイシン (ミュータマイシンおよび/またはマイトマイシン Cとしても知られる) は抗腫瘍活性を有することがわかってきた放線菌 (*Streptomyces caespitosus*) のプロスから単離された抗生物質である。全身療法に反応しない腫瘍が放射線療法を増強することでも知られるダクチノマイシンの

50

局所滯留に反応することもあることから、アクチノマイシンDもまた本発明のペプチドと組み合わせて使用するのに有用な薬剤であると考えられる。また、これは一次手術、放射線療法、およびその他の薬剤、特に、ピンクリスチンおよびシクロホスファミドとの組み合わせでも用いられ、ユーイング腫瘍、カポジ肉腫および軟組織肉腫、絨毛癌、転移性睾丸癌、ホジキン病および非ホジキンリンパ腫に対して有効であることが見出された。

【0137】

ブレオマイシンは放線菌(*Streptomyces verticillus*)株から単離された細胞傷害性糖ペプチド抗生物質の混合物であり、単一薬剤としてまたは頭頸部(口、舌、扁桃、鼻咽頭、中咽頭、洞、口蓋、唇、頬粘膜、歯肉、喉頭蓋、喉頭を含む)、皮膚、陰茎、子宮頸管、および外陰部などの扁平上皮細胞癌において立証されたその他の承認化学療法薬との組み合わせで、以下の新生物の管理に有効である。また、これはリンパ腫および睾丸癌の治療においても用いられている。

10

【0138】

シスプラチンは転移性睾丸または卵巣癌、進行性膀胱癌、頭部または頸部癌、子宮頸癌、肺癌またはその他の腫瘍などの癌の治療に広く用いられてきたが、本発明のペプチドと組み合わせても有用であると考えられる。VP16(エトポシド)は睾丸腫瘍の治療には主としてブレオマイシンおよびシスプラチンと組み合わせて用いられるが、肺の小細胞癌にはシスプラチンと組み合わせて用いられる。これは非ホジキンリンパ腫、急性非リンパ性白血病、乳癌、および後天性免疫不全症候群(AIDS)に伴うカポジ肉腫に対しても活性である。ある種類の癌細胞を死に至らしめ、サイトカイン産生を活性化し、マクロファージおよび内皮細胞を活性化し、コラーゲンおよびコラゲナーゼの生成を促進する腫瘍壊死因子[TNF;カケクチン]糖タンパク質は炎症メディエーター、さらに敗血性ショックのメディエーターでもあり、異化、発熱および睡眠を促す。TNFは単独で有効量で用いた場合にはかなりの毒性があるため、最善の計画では恐らくその他の薬剤と組み合わせて低用量で用いられるであろう。その免疫抑制作用がインターフェロンによって増強されるため、その組合せは潜在的に危険である。また、TNFとインターフェロンとのハイブリッドも抗癌活性を有することが認められた。

20

【0139】

タクソール、トネリコ、セイヨウイチイ(*Taxus brevifolia*)の樹皮から最初に単離された細胞分裂抑制薬、およびその誘導体パクリタクソールは乳癌に対して有効であることが確認されており、本発明の併用療法においても用いられる。ピンクリスチンに対する有益な反応は、その他の様々な新生物、特に、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、脳腫瘍、横紋筋肉腫、および乳房、膀胱、および男性および女性生殖器官の癌を有する患者で報告されている。また、ピンブラスチンはピンクリスチンと同じ癌において有用な治療用物質として示されている。ピンブラスチンは転移性睾丸腫瘍の治療的治療においてブレオマイシンおよびシスプラチンともに頻りに臨床に用いられる。また、これはカポジ肉腫、神経芽細胞腫およびレットレル・シヴェ病(ヒスチオサイトーシスX)、ならびに女性の乳癌および絨毛癌においても活性である。

30

【0140】

アルケラン、L-フェニルアラニンマスタード、フェニルアラニンマスタード、L-PAM、またはL-サルコリシンとしても知られるメルファランはナイトロジェンマスタードのフェニルアラニン誘導体である。メルファランは選択的ヒト新生物性疾患に対して活性である二官能性アルキル化剤である。メルファランは、メドファランとして知られるD-異性体の活性なL-異性体であり、これは特定の動物腫瘍に対する活性が低く、染色体に影響を与えるのに必要な量はL-異性体で必要な量よりも多い。メルファランは経口投与に好適な形態で入手可能であり、多発性骨髄腫の治療に用いられている。多発性骨髄腫を有する患者の約3分の1~2分の1が、薬剤の経口投与に好反応を示すことを示唆する確証も得ることができる。メルファランは上皮性卵巣癌の治療においても用いられている。

40

【0141】

シクロホスファミドは、胃腸管内で安定し、耐受性に優れ、経口および非経口経路によっ

50

て有効であり、局部的発疹、壊死、静脈炎または痛みすら生じない。クロラムブシルは、ナイトロジェンマスタード種の二官能性アルキル化剤であり、選択されたヒト新生物性疾患に対して活性であることが認められている。クロラムブシルは、慢性リンパ性（リンパ球性）白血病、リンパ肉腫、巨大濾胞性リンパ腫およびホジキン病をはじめとする悪性リンパ腫の治療において必要である。これは、これらの疾患のいずれにおいても治療効果はないが、臨床的に有用な苦痛緩和をもたらさう。

【0142】

DNA損傷を引き起こす、広範に用いられているその他の因子としては、線、X線および/または放射性同位元素の腫瘍細胞への直接送達として一般的に知られているものが挙げられる。また、その他の種類のDNA損傷因子としてマイクロ波およびUV照射なども考えられる。これらの因子が全て、多様なDNA損傷をDNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の構成および維持において行う可能性が最も高い。X線の線量範囲は長期（3～4週間）の場合の1日線量50～200レントゲンから1回線量2000～6000レントゲンまでの範囲である。放射性同位元素の線量範囲は、広く多様であり、同位元素の半減期、照射する放射線の強度および種類、ならびに新生物細胞による取込みに依存している。

10

【0143】

当業者は"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, chapter 33、特にpages 624-652を教示とする。治療する被験体の症状に応じて線量の変更を行う必要がある。いずれにせよ、投与責任者が各被験体に好適な線量を決定する。さらに、ヒト投与では、調製物がFDA Office of Biologics standardsの定めるところによる無菌性、発熱性、総合的な安全性および純度基準を満たさなければならない。

20

【0144】

本発明者らは、治療効果のVEGFR-3関連癌を有する患者への局所送達、疾患の影響を弱めるための治療上有効な遺伝子の送達には極めて有効な方法であることを提示している。同様に、化学または放射線療法も被験体の特定の罹患部位を対象としてよい。もう一つの方法として、発現構築物および/または薬剤の全身送達も特定の状況において、例えば、広範な転移が起こっている場合には好適でありうる。

【0145】

上記の抗癌治療用物質の他、本発明のペプチドをその他の血管形成阻害剤と組み合わせてもよいと考えられる。本発明のペプチドは、抗リンパ管新生および抗血管形成特性のいずれもを有すると思われる。また、多くの抗血管形成剤もリンパ管新生特性を有しうる。http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angiは米国国立衛生研究所(National Institutes of Health)が維持する、抗血管形成剤を用いて現在行われている試験に関する最新情報を提供するウェブサイトである。これらの薬剤としては、例えば、マリマスタット(British Biotech, Annapolis MD; 非小細胞肺、小細胞肺および乳癌に用いられる); AG3340 (Agouron, LaJolla, CA; 多形性膠芽腫); COL-3 (Collagenex, Newtown PA; 脳腫瘍); ネオバスタット (Aeterna, Quebec, Canada; 腎臓および非小細胞肺癌); BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; 転移性非小細胞肺癌); サリドマイド (Celgen; 黒色腫、頭頸部癌、卵巣、転移性前立腺、およびカボジ肉腫; 再発性または転移性結腸直腸癌(補助薬を使用); 婦人科肉腫、肝臓癌; 多発性骨髄腫; CLL、再発性または進行性脳癌、多発性骨髄腫、非小細胞肺、非転移性前立腺、難治性多発性骨髄腫、および腎癌); スクアラミン (Magainin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; 非小細胞癌および卵巣癌); エンドスタチン (EntreMed, Rockville, MD; 固形腫瘍); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; 再発性頭頸部、進行性固形腫瘍、IIIBまたはIV期乳癌; 再発性または進行性脳(小児)); 卵巣、AML; 神経膠腫、進行性悪性腫瘍、進行性結腸直腸、フォンヒッペルリンドウ病、進行性軟組織; 前立腺癌、結腸直腸癌、転移性黒色腫、多発性骨髄腫、悪性中皮腫; 転移性腎臓、進行性または再発性頭頸部、転移性結腸直腸癌); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; 進行性腫瘍); インターフェロン- ; 抗VEGF抗体 (National Cancer Institute, Bethesda MD; Genen

30

40

50

tech San Francisco, CA; 難治性固形腫瘍; 転移性腎細胞癌、未治療進行性結腸直腸); EMD 121974 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; HIV 関連カポジ肉腫、進行性または再発性異型性神経膠腫); インターロイキン 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA; カポジ肉腫) および IM 862 (Cytran, Kirkland, WA; 卵巣癌、結腸および直腸起源の未治療転移性癌ならびにカポジ肉腫) が挙げられる。薬剤の後に続く説明的な情報はこれらの試験で薬剤を用いる対象となる癌を示している。これらの疾患は本発明のペプチド単独または列挙した薬剤と組み合わせて治療しようと考えられる。

【0146】

今後、これらの治療がリンパ管内皮細胞に与える効果は、本発明によって単離されたリンパ管内皮細胞を用いて試験することができることであるということが出来る。これらの細胞を単離する方法の適用性によって、リンパ管内皮細胞の疾患の管理についてのより有効な治療プロトコルの開発が可能になる。

10

【0147】

F. さらに治療薬を同定するためのアッセイ方法

また、本発明は、これらの細胞の VEGFR - 3 受容体活性、細胞増殖、リンパ管新生能力などのようなこれらの細胞の特徴を調節する(増強するまたは減弱する)化合物のスクリーニングにおける本発明のリンパ管内皮細胞の使用も提供する。これらのアッセイでは種々の異なる方法を利用するが、スクリーニングを行う対象となる「活性」の種類に応じたものとなる。考えられる機能的「読み出し」機構としては、VEGFR - 3 と基質との結合; リガンドと受容体との結合が挙げられ、通常移動アッセイまたはその他の機能的アッセイは内皮細胞活性をモニタリングするのに使用される。内皮細胞のこのような機能的アッセイについては当業者ならば十分に周知であり、いくつかの典型的なアッセイについては本文書の他の場所に記載している。

20

【0148】

a. アッセイ方法

本発明は、このような活性を候補物質の存在および不在下でモニタリングし、さらにこのような結果を比較することによって、VEGFR - 3 活性の阻害剤についてスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング技術が VEGFR - 3 活性を阻害し、低下させ、抑制するために働く化合物の一般的な同定に有用であることは立証されたと考えられる。このような化合物は、新生脈管形成を特徴とし、例えば、リンパ腫、リンパ水腫、固形癌、および特に引用することにより本明細書の一部とされる、PCT/US99/06133 に記載されたものなどのその他の疾患、VEGFR - 3 受容体関連疾患の例を挙げるならば、特に、限定されるものではないが、遺伝性リンパ水腫、リンパ水腫、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ管腫症、リンパ管拡張症および頸部水嚢胞をはじめとする疾患などの様々な疾患の治療に有用である。

30

【0149】

これらの態様では、本発明は候補物質の本発明のリンパ管内皮細胞の VEGFR - 3 活性を阻害する能力を調べる方法を対象とする。一般に、この方法は以下の:

(i) 本発明の単離リンパ管内皮細胞培養物を準備し、

(ii) 前記培養物を候補物質と接触させ、さらに

40

(iii) 工程(ii)の細胞培養物の活性または特徴を候補物質の不在下で観察された細胞培養物の活性または特徴と比較する

工程を含み、

なおここで、細胞培養物の活性または特徴における変化が、前記候補物質が前記細胞のモジュレーターであることを示す。

【0150】

活性を調節し、または本発明の細胞の特徴を改変することが可能な候補物質を上記のアッセイにおいて同定するため、添加される候補物質の不在下での活性または特徴を測定し、または調べる。次いで、候補物質を細胞培養物に添加し、候補物質の存在下での活性または特徴を調べる。その不在下で観察される活性に対して活性を改変する候補物質がモジュ

50

レーター能力を有する候補物質であることを示す。

【0151】

上記の方法では、本発明の培養細胞の活性または特徴を一般に記載しているが、候補物質がVEGFR-3の生成を改変し、それによってVEGFR-3の単位当たり活性と対比して存在するVEGFR-3量を増加させるまたは減少させる薬剤であることは分かるであろう。同様に、候補は細胞の増殖を数および/または大きさにおいて拡大または縮小するものであると思われる。さらに、上文での記載は単離リンパ管内皮細胞培養物の使用を対象にしたものであるが、血管内皮細胞に作用するまたは受容体およびその成分を調節する治療薬の同定にも同様のアッセイが提供しうることは分かるであろう。

【0152】

b. 候補物質

本明細書において使用する「候補物質」とは、リンパ管内皮細胞の活性または特徴を調節することが可能な分子をいう。特定の態様によれば、この分子はVEGFR-3のそのリガンドとの結合活性を調節するものである。別の場合では、候補物質はVEGFR-3受容体/リガンド相互作用の下流での影響、例えば、受容体自己リン酸化反応を調節すると考えられる。候補物質はタンパク質またはその断片、小分子阻害剤、または核酸分子ですらありうる。これはスクリーニングアッセイを用いた同定に最も有用な薬理的化合物が、VEGFR-3活性のその他の公知のモジュレーターと構造に関係がある化合物である場合であることは分かるであろう。活性な化合物は天然化合物の断片または一部を含んでいるか、またはそうでなく不活性な公知の化合物の活性な組合せとしてしか見つけられないであろう。しかしながら、ヒトまたは動物モデルでのこのような化合物の試験に先立ち、種々の候補を試験してこれらが治療薬としての可能性があるか否かを調べる必要がある。

【0153】

従って、活性な化合物は天然化合物の断片または一部を含んでいるか、またはそうでなく不活性な公知の化合物の活性な組合せとして見つけられるであろう。よって、本発明は細胞VEGF受容体を調節する薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。動物、細菌、真菌、葉および樹皮をはじめとする植物起源、ならびに海洋サンプルなどの天然起源から単離された化合物を候補として潜在的に有用性のある医薬物質の存在についてアッセイすることを提示している。

【0154】

また、スクリーニングしようとする医薬物質が、化学合成品または合成化合物から誘導し、または合成することができることは分かるであろう。よって、本発明によって同定された候補物質がポリペプチド、ポリヌクレオチド、小分子阻害剤または合理的医薬品設計によってVEGF受容体の公知のモジュレーターから設計しうるその他の無機もしくは有機化合物でありうることも分かるであろう。

【0155】

候補スクリーニングアッセイは計画および実施が簡単である。上文で述べたように、候補物質についてのアッセイでは、本発明の単離リンパ管内皮細胞集団を準備した後、候補物質をリンパ管内皮細胞の特異な測定可能な活性が生じ、または特異な特徴が観察できる条件下で細胞集団と混合する。この方法で、候補物質の不在下での候補物質の細胞の活性または特徴を調節する能力も測定できる。

【0156】

「有効な量」とは、ある特定の状況では、特定の事象、すなわち、細胞の活性または表現型をそれら正規のレベルと比較して再生可能な方法で改変するのに有効な量である。活性において重大なる適切な変化を達成する化合物が用いられる。

【0157】

例えば、移動アッセイ、細胞増殖アッセイ、受容体結合、自己リン酸化反応などを用いて測定される活性または機能的特徴における重大な変化は、少なくとも約30%~40%の活性の増強/減弱、最も好ましくは、少なくとも約50%(当然のことではあるが、もっ

10

20

30

40

50

と高い値をとる可能性もある)の変化によって表される。また、本発明の活性化合物は、後にさらなるこのようなモジュレーターを検出し、定量する分析および調製技術において用いる抗体の作製にも用いられる。

【0158】

本発明の単離細胞培養は、当技術分野で公知の多くのハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイに改めることができる。総説については、Jayawickreme and Kost, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 629-634 (1997)を参照。また、自動化および小型化HTSアッセイも、例えば、Houston and Banks *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 734-740 (1997)に記載されるように意図される。

【0159】

小分子モジュレーターの同定に用いられる、化学物質ライブラリー、天然物ライブラリーおよびランダムまたは設計ペプチド、オリゴヌクレオチドまたは有機分子で構成されるコンビナトリアルライブラリーをはじめとする多くの異なるライブラリーがある。化学物質ライブラリーは、公知の化合物の構造的類似体または天然物スクリーニングまたは潜在的な治療標的に対するスクリーニングによるヒットまたはリードとして同定された化合物で構成される。天然物ライブラリーは微生物、動物、植物、昆虫、または海洋生物由来の生成物質のコレクションであり、これらは、例えば、土壌、植物または海洋生物のプロスの発酵および抽出による混合スクリーニングの開発に用いられる。天然物ライブラリーにはポリペプチド、非リボソーム性ペプチドおよびその非天然型変異体が含まれる。総説については、*Science* 282:63-68 (1998)を参照。コンビナトリアルライブラリーは多数のペプチドオリゴヌクレオチドまたは有機化合物の混合物で構成されている。従来の自動合成方法、PCRクローニングまたはその他の合成方法による作製は比較的簡単である。特に注目すべきは、ペプチド、タンパク質、ペプチドミメティック、マルチパラレル合成コレクション、組換えおよびポリペプチドライブラリーを含むライブラリーであることである。コンビナトリアルライブラリーおよびそれから作製されるライブラリーの総説については、Myers *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 701-707 (1997)を参照。記載した様々なライブラリーを使用して同定された候補モジュレーターは、その後、例えば、合理的医薬品設計によって細胞の活性を調節するよう最適化される。

【0160】

当然のことではあるが、本発明の全てのスクリーニング方法は、有効な候補が発見されな

【0161】

c. In vitroアッセイ

ある特定の態様によれば、本発明は種々の結合アッセイを包含する。これらではリガンド-受容体複合体の阻害剤または受容体機能に代わる、VEGFR-3と結合しうる分子についてスクリーニングし、さらにそれによって天然リガンドとこの受容体との結合を改変し、さらにその活性に作用することを含めることができる。このようなアッセイでは、細胞は溶液中に遊離しているか、または支持体と結合している。リガンドか、または細胞の受容体のいずれかを標識することによって、結合の判定が可能になる。

【0162】

このようなアッセイは、自動化およびハイスループットに大いに改めることができる。化合物のハイスループットスクリーニングについてはWO 84/03564に記載されている。多数の小ペプチド試験化合物がプラスチックピンまたはその他の表面などの固相マトリックス上で合成されている。ペプチド試験化合物を細胞と反応させ、洗浄する。結合したポリペプチドを種々の方法によって検出する。特に、好適なペプチド試験化合物を作出するコンビナトリアル法が意図される。

【0163】

この方法において特に注目すべきは、これらの細胞におけるVEGFR-3受容体の天然

10

20

30

40

50

リガンドの種々の異なる変異体のスクリーニングである。欠失、末端切断、挿入および置換変異体をはじめとするこれらの変異体は、リガンド/受容体相互作用と関係しているドメインを同定する手助けする。ひとたび、この領域を解明すれば、これらの変異体のうち、改変構造を有するが、この相互作用の機能の一部または全てを保持しているものを同定することができる。

#### 【0164】

精製したリガンドは、上記の薬剤スクリーニング技術で用いるプレートに直接コーティングすることができる。また、ポリペプチドに対する非中和抗体を用いて、ポリペプチドを固相に固定することもできる。さらに、反応領域（好ましくは末端領域）を含む融合タンパク質を用いて、リガンド活性領域を固相と連結してもよい。

10

#### 【0165】

その他の種類の *in vitro* アッセイでは、機能の読み出しを含むものがある。このようなアッセイでは、物質を適宜調製し、その化学的性質を受けて、さらに細胞と接触させる。アッセイによっては培養が必要となる場合がある。その後、上記のような多くの異なる生理学的アッセイによって、細胞を調べる。あるいは、分子解析を行って細胞の特徴を調べてもよい。これにはアッセイ、例えば、タンパク質発現、酵素機能、基質の利用、mRNA発現（全細胞またはポリA RNAのディファレンシャル・ディスプレイなど）などについてのものである。

#### 【0166】

##### G. 診断アッセイにおける細胞の使用

特定の態様によれば、本発明の方法が細胞の成分の機能または活性、例えば、VEGFR-3/リガンド相互作用における異常を有する状態または疾病の診断に用いられる。例えば、本発明の方法を用いてリンパ管内皮細胞関連疾患を有する疑いのある患者の細胞を単離する。細胞のポリヌクレオチド配列をハイブリダイゼーションまたはPCRアッセイに用いて、発現に関連する疾病の存在を検出する。このような方法は本質的に定性的または定量的であり、サザンもしくはノーザン解析、ドットプロットまたはその他のメンブレンテクノロジー；PCRテクノロジー；ディップスティック、ピン、チップおよびELISAテクノロジーが挙げられる。これらの技術の全てが当技術分野では十分に周知のものであり、商業的に入手可能な多くの診断キットの基礎である。

20

#### 【0167】

さらに、このようなアッセイは、動物研究における特定の治療上の処置計画の効果の評価、臨床試験、または各患者の治療のモニタリングにおいて有用である。疾病診断の基礎を提供するためには、例えば、VEGFR-3受容体発現についての正常または標準プロフィールを確立する必要がある。一般に、これには正常被験体からリンパ管内皮細胞を準備し、さらにそれ由来の疾病マーカーの好適なハイブリダイゼーションまたは増幅を実施する必要がある。標準ハイブリダイゼーションは、正常被験体で得られた値を希釈した一連のマーカーと比較することにより定量しうる。正常サンプルから得られた標準値と、特定の疾患について診断しようとする被験体の細胞サンプルから得られた値とを比較する。標準および被験体値間の偏差によって、疾病の存在を確立する。

30

#### 【0168】

ひとたび、疾病が確立されたら、治療薬を投与し、さらに治療プロフィールを作成する。このようなアッセイを定期的に繰り返してプロフィールの値が正常または標準パターンに向かっているか、または戻っているかを評価する。一連の治療プロフィールを用いて数日または数ヶ月間にわたる治療の効果が示される。

40

#### 【0169】

米国特許第4,683,195号および第4,965,188号に記載のPCR。このようなアッセイに用いるオリゴマーは一般に化学合成されるが、本明細書の上文に記載したように、これらを酵素的に作製してもよいまたは組換え源から作製してもよい。一般に、オリゴマーは2つのヌクレオチド配列（一方はセンス方向、もう一方はアンチセンス方向）を含んでおり、特定遺伝子または病気の同定に最適な条件下で用いられる。密接な関

50

係があるDNAまたはRNA配列の検出および/または定量では、同じ2つのオリゴマー、入れ子構造のオリゴマー、または変性オリゴマープールが、あまりストリンジェントでない条件下で用いられる。

【0170】

さらに、特定分子の発現を定量する方法としては、ヌクレオチドの放射性同位体標識(Melby et al., J Immunol Methods 159: 235-44, 1993)またはビオチン化(Duplaa et al., Anal Biochem 229-36, 1993)、対照核酸の同時増幅、および試験結果が補間された標準曲線が挙げられる。複数サンプルの定量は、目的のオリゴマーが種々の希釈物として提供され、分光学的または比色反応によって迅速な定量が得られるELISA様式でアッセイを実施することにより迅速化するであろう。保健専門家は、この種の確定診断によって積極的治療を開始し、病状のさらなる悪化を防ぐことが可能になる。同様に、治療中の患者の経過をモニタリングするためにもさらなるアッセイを用いることができる。

10

【0171】

H. キット

本発明は、上記の方法を用いてリンパ管内皮細胞を単離するためのキットに関する。このようなキットには、キット、標準VEGF受容体リガンド、バッファーなどが含まれる。本発明では、リンパ管内皮細胞を特異的に検出するのに使用しうる特異的抗体を同定するため、このような成分のいずれかまたはその両方がキットにおいて提供される。従って、キットでは好適な容器手段内に、標準となるリンパ管または血管内皮細胞成分、リンパ管内皮細胞と優先的に結合する一次抗体、および免疫検出試薬が含まれている。

20

【0172】

キット形式内に供給できる本発明のさらに別の組成物は、非リンパ管系統のその他の細胞が実質的に混入していないリンパ管内皮細胞および非血管系統のその他の細胞が実質的に混入していない血管内皮細胞である。細胞は培養フラスコでの増殖培養物として供給するか、または低温保存細胞として提供する。また、細胞系キットには好適な培地、増殖サプリメントおよび細胞の増殖に用いるべき増殖条件についての説明書も含まれる。

【0173】

特定の態様によれば、リンパ管内皮細胞と結合する一次抗体をカラムマトリックスまたはマイクロタイタープレートのウェルなどの固相支持体と結合させる。

【0174】

このキットの免疫検出試薬には、既定の抗体または抗原と結合するまたは連結する検出可能な標識、および二次結合リガンドと結合するまたは接着する検出可能な標識をはじめとする種々の形式のうちのいずれか1つが採用される。典型的な二次リガンドが、一次抗体または抗原に対する結合親和性を有する二次抗体、およびヒト抗体に対する結合親和性を有する二次抗体である。

30

【0175】

本キットに用いるさらなる好適な免疫検出試薬としては、一次抗体または抗原に対する結合親和性を有する二次抗体とともに、二次抗体に対する結合親和性を有する検出可能な標識と連結した三次抗体を含む二成分試薬が挙げられる。

【0176】

キットには、検出アッセイ用の標準曲線を作成するのに用いる適宜等分した量の増殖または低温保存細胞(標識したもので非標識のものでよい)をさらに含めてもよい。

40

【0177】

キットには抗体-標識複合体を、完全結合形、中間体形、またはキットの使用者によって結合される独立した部分、のいずれかとして含めてもよい。キットの成分は水性媒質または凍結乾燥形態のいずれかにパッケージングされる。

【0178】

一般に、キットの容器手段としては、抗体または抗原を入れ、好ましくは、適宜等分ための、少なくとも1個のバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジ、または他の容器手段が挙げられる。二次もしくは三次結合リガンドまたはさらなる成分を提供する場合、一般

50

にキットにはこのリガンドまたは成分を入れるための二次、三次またはその他のさらなる容器がさらに含まれる。一般に、本発明のキットは市販用に厳重な管理下で抗体、抗原およびその他の試薬容器を収容するための手段も含む。このような容器としては、所望のバイアルを入れておく射出形成または吹込形成プラスチック容器が挙げられる。

【0179】

#### I. リンパ管内皮細胞のイメージング

本発明による方法のさらなる使用は、特定組織のリンパ管内皮細胞の存在を調べるための組織イメージングである。このような診断イメージングの使用は、例えば、リンパ系疾患患者の組織像を捉えるのに特に好適である。さらに、腫瘍塊またはその近隣のリンパ管も本発明によりイメージングしうる。これまで、当業者はVEGFR-3抗体を、例えば、

10

【0180】

本発明のイメージング剤（すなわち、本明細書を通じて記載する抗体または抗体誘導体）を、好適な超磁性、常磁性、高電子密度、音響発生または放射性物質と共有または非共有結合させて標的とされるイメージング剤とする。このような態様によれば、イメージング剤が上記の技術を用いてイメージングされるリンパ管内皮細胞および局在部位に集中する。

20

【0181】

当技術分野では多くの好適なイメージング剤が知られているが、標識剤と本発明のペプチドとを接着する方法も同様である（例えば、引用することにより本明細書の一部とされる、米国特許第4,965,392号、同第4,472,509号、同第5,021,236号および同第5,037,630号を参照）。イメージング剤は、医薬上許容される担体により被験体に投与され、リンパ管内皮細胞を有する標的部位に集積する。そして、このイメージング剤が標的部位のX線、磁気共鳴、超音波またはシンチグラムイメージングの造影剤として働く。本発明の抗体は便宜であり、癌、リンパ水腫およびその他のリンパ管内皮細胞障害の診断調査用の医用イメージングツールの有効な蓄積への重要な追加となる。当然のことではあるが、被験体の組織を生検によって準備し、リンパ管内皮細胞の存在を本明細書に記載のイメージング剤と、組織を調製し、固定するための組織化学的な技術とを組み合わせる用いて検出するイメージングがin vitroにおいて実施されることは分かるであろう。

30

【0182】

本発明のイメージング剤に有用な常磁性イオンとしては、例えば、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、およびエルビウム(III)が挙げられる。X線イメージングに有用なイオンとしては、限定されるものではないが、ランタナム(III)、金(III)、鉛(II)、および特にピスマス(III)が挙げられる。診断用の放射性同位元素としては、例えば、<sup>211</sup>アスタチン、<sup>14</sup>炭素、<sup>51</sup>クロム、<sup>36</sup>塩素、<sup>57</sup>コバルト、<sup>67</sup>銅、<sup>152</sup>Eu、<sup>67</sup>ガリウム、<sup>3</sup>水素、<sup>123</sup>ヨウ素、<sup>125</sup>ヨウ素、<sup>111</sup>インジウム、<sup>59</sup>鉄、<sup>32</sup>リン、<sup>186</sup>レニウム、<sup>75</sup>セレン、<sup>35</sup>硫黄、<sup>99m</sup>テクネチウム、および<sup>90</sup>イットリウムが挙げられる。

40

【0183】

本発明による抗体は、当業者には十分に公知な技術により標識しうる。例えば、ペプチドをヨウ化ナトリウムまたはカリウムと次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素酸化剤と接触させることによってペプチドをヨウ素化することができる。抗体を、例えば、錫(II)溶液で過テクネチウム酸塩(pertechnate)を

50

還元し、還元したテクネチウムをセファデックスカラムとキレート化させ、さらに抗体をカラムに注入することによるリガンド交換によってテクネチウム - 99m で標識してもよい。タンパク質およびペプチドを標識するためのこれらおよびその他の技術については、当業者ならば十分に周知である。

【0184】

#### J. 医薬組成物

多くの態様によれば、本発明において論ずる細胞またはその他の組成物は臨床用途に用いられる。従って、これらの製剤を医薬組成物として、すなわち、*in vivo* 使用に好適な形態で製造しなければならない。一般に、これには発熱物質、ならびにヒトまたは動物にとって有害である可能性のあるその他の夾雑物を本質的に含まない組成物を製造することが必要とされる。

10

【0185】

一般的には、送達ベクターを安定させ、標的細胞による取込みを可能にさせる好適な塩およびバッファの使用が望まれる。また、バッファは、組換え細胞の患者への導入の際にも使用される。本発明の水性組成物は医薬上許容される担体または水性媒質に溶解したまたは分散した有効量のペプチドまたは細胞の発現ベクターを含む。また、このような組成物は接種材料としても見られる。「医薬上または薬理学上許容される」とは、動物またはヒトに投与した場合に副作用、アレルギー反応、またはその他の有害作用が生じない分子化合物および組成物をいう。本明細書において使用する「医薬上許容される担体」としては、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌薬、等張化および吸収遅延剤などが挙げられる。医薬上活性な物質におけるこのような媒質および薬剤の使用については、当技術分野では十分に知られている。従来の媒質または薬剤が本発明のベクターまたは細胞と不適合である場合を除き、治療用組成物におけるその使用も考えられる。また、補助的有効成分も組成物に配合することができる。

20

【0186】

本発明の活性組成物として、古典的医薬製剤を包含する。本発明のこれらの組成物の投与は、一般的な経路を介して標的組織に有効である限り、その一般的な経路を介したものとなる。医薬組成物は、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内、くも膜下、球後、肺臓内（例えば、期間放出）を経由し、経口、舌下、経鼻、肛門、膺、または経皮送達により、または特定部位への外科的植込みによって、従来の方法にて、被験体に導入される。治療は、単回投与またはある期間にわたっての複数回投与で構成される。

30

【0187】

活性化合物は、投与に向けて、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適宜混合した遊離塩基または薬理学上許容される塩の水溶液として調製される。また、分散液はグリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびその混合物、ならびにオイルにより調製できる。通常の場合での保存および使用において、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための防腐剤を含有する。

【0188】

注射用に好適な製剤形態としては、滅菌水性溶液または分散液および滅菌注射溶液または分散液の即時調製用滅菌散剤が挙げられる。あらゆる場合において、この形態は無菌でなければならず、かつ容易に注射針を通過する範囲内において流動性がなければならない。製造および保存条件下では安定していなければならない。細菌および真菌などの微生物の汚染作用を防がねばならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、好適なその混合物、ならびに植物油を含有する溶媒または分散媒でありうる。例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散液の場合には必要な粒径の維持により、界面活性剤の使用により、好適な流動性を維持することができる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌および抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによってもたらされる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含めることが好ましい。注射用組成物の長期吸収は、吸収を遅延する薬剤、

40

50

例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に使用することによってもたらされる。

【0189】

滅菌注射溶液は、必要な量の活性化化合物を、上記の種々の他の成分とともに好適な溶媒に配合し、必要により、この後に濾過滅菌を行うことによって調製する。一般に、分散液は、種々の滅菌有効成分を、基本分散媒と上記のものから必要な他の成分とを含有する滅菌ビヒクルに、配合することによって調製する。滅菌注射溶液調製用の滅菌散剤の場合、好ましい調製方法は予め滅菌濾過したその溶液から、有効成分と所望の追加的成分との粉末を得る真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0190】

本明細書において使用する「医薬上許容される担体」としては、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌薬、等張化および吸収遅延剤などが挙げられる。医薬上活性な物質におけるこのような媒質および薬剤の使用については、当技術分野では十分に知られている。従来媒質または薬剤が有効成分と不適合である場合を除き、治療用組成物におけるその使用も考えられる。また、補助的有効成分も組成物に配合することができる。

【0191】

経口投与では、組成物に賦形剤を配合し、非内服口腔洗浄液および歯磨剤として用いてもよい。口腔洗浄液は、必要な量の有効成分を、ホウ酸ナトリウム溶液（ドーベル液）などの好適な溶媒に配合することによって調製する。また、有効成分をホウ酸ナトリウム、グリセリン、および重炭酸カリウムを含有する殺菌洗浄剤に配合してもよい。さらに、有効成分をゲル剤、ペースト剤、散剤、およびスラリー剤といった歯磨剤に分散させてもよい。有効成分を治療上有効な量において水、結合剤、研磨剤、香味剤、発泡剤および湿潤剤を含有する歯磨ペースト剤に添加してもよい。

【0192】

本発明による組成物は、中性または塩形態で製造しうる。医薬上許容される塩としては、酸添加塩（タンパク質の遊離アミノ基とで形成）、および、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸とにより形成したものが挙げられる。また、遊離カルボキシル基とで形成する塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第2鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から誘導することができる。

【0193】

調剤において、溶液は投与形態に適合する様式で、かつ治療上有効な量にて投与される。製剤は注射溶液、薬剤放出カプセルなどの種々の剤形で容易に投与される。水性溶液での非経口投与では、例えば、必要であれば溶液を適宜緩衝剤で処理し、液体希釈剤を最初に十分な生理食塩水またはグルコースで等張にする必要がある。これらの特殊な水性溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に好適である。

【0194】

「単位投与量」とは、好適な担体に分散した治療用組成物を分割した量と定義される。例えば、ポリペプチドを非経口投与する場合、一般にポリペプチド組成物を  $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$  体重/日の範囲の用量、好ましくは  $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 約 50 \text{mg} / \text{kg}$  体重/日の範囲の用量にて注射する。非経口投与は、最初はボーラスにて、続いて製剤の治療的循環レベルを維持するために持続注入により実施する。当業者ならば、優良医療規範および各患者の臨床症状によって判断するため、有効な投与量および投与計画を容易に最適化するであろう。

【0195】

投与回数は、薬剤の薬物動態学的パラメーターおよび投与経路によって異なる。最適な医薬製剤は、投与経路および所望の投与量に応じて当業者により決定される。例えば、引用することにより本明細書の一部とされる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th

10

20

30

40

50

Ed. (1990, Mack Publ. Co, Easton PA 18042) pp 1435-1712を参照。このような調剤は、投与される薬剤の物理的状态、安定性、in vivo放出速度およびin vivoクリアランス速度に影響を与える。好適な用量は、投与経路に応じて、体重、体表面積または器官の大きさにより算出される。通常、当業者は試験を行うことなく、特に、本明細書で開示する投薬情報およびアッセイ、ならびに動物またはヒト臨床試験で観察された薬物動態学的データを踏まえて、好適な治療用量の決定に必要な計算のさらなる調整を行う。

【0196】

好適な投与量は、関連する用量反応データと併せて血液凝固レベルを調べるための確立されたアッセイを使用することによって確定される。最終的な投与計画は、薬剤の作用を調節する因子、例えば、薬剤の特異的活性、患者の損傷および反応性の重篤度、患者の年齢、状態、体重、性別および食習慣、感染の重篤度、投与期間およびその他の臨床的因子を考慮して医師により決定される。特定の疾患および症状についての好適な投与量レベルおよび治療期間に関しては、調査を行うにつれて情報がさらに集まるであろう。

10

【0197】

ウイルス送達を用いる遺伝子療法の態様によれば、単位投与量が投与するウイルス粒子の量という形で算出される。ウイルス投与量には、指定数のウイルス粒子またはブランク形成単位(pfu)がある。アデノウイルスに関する具体例では、指定単位投与量として、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{13}$ または $10^{14}$  pfuが挙げられる。粒子投与量は感染不全粒子が存在するために少し高くなる(10~100倍)場合がある。

20

【0198】

本発明による医薬組成物および治療方法が、ヒト医療および獣医療の分野で有用であることは分かるであろう。よって、治療する被験体は哺乳類、好ましくはヒトまたはその他の動物である。獣医学的用途では、被験体として、例えば、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、およびヤギをはじめとする家畜、イヌおよびネコなどの伴侶動物、外来およびノまたは動物園動物、マウス、ラット、ウサギ、モルモットおよびハムスターをはじめとする試験動物、ならびにニワトリ、シチメンチョウ、アヒルおよびガチョウなどの家禽が挙げられる。

【実施例】

【0199】

以下の実施例は好ましい具体例を示すが、これに限定されるものではない。当業者ならば、本開示をかんがみて開示されている特定の材料および方法に様々な変更を行い、なお本発明の精神および範囲から逸脱することなく同様または類似の結果が得られることが分かるであろう。

30

【0200】

実施例 1

材料および方法

この例は本願を通じて、また本明細書の以下に示される実施例で用いられる材料および方法の詳細を示す。

【0201】

抗体および増殖因子 免疫蛍光法に用いた一次抗体は、ヒトCD31(Dako)、vWF(Dako)およびVEGFR-3に対するマウスmAbs(クローン9D9F9、2E11D11および7B3F9; Jussila et al., Gancer Res. 58:1599-1604, 1998)、ヒトLYVE-1に対するウサギ校血清(Banerji et al., J. Biol. Chem., 144(4)789-801, 1999)、アフィニティー精製ウサギ抗ヒトポドプラニン(Breiteneder-Geleff et al., Am. J. Pathol., 154(2) 385-394, 1999)またはウサギ抗ヒトVEGF-C(882; Joukov et al., EMBO J., 15:290-298, 1996)であった。増殖細胞核抗原に対するモノクローナル抗体(クローンPC10)は、Santa Cruz Biotechnologyから入手した。FITCまたはTRITCコンジュゲートヤギ抗ウサギIgG、ヤギ抗マウスIgGおよびロバ抗マウスIgGは、Jackson Immunoresearchから入手した。ヒトVEGFR-2に対するウサギ抗血清は、Lena

40

50

Claesson-Welsh (Uppsala Sweden)から厚意により譲渡されたものであり、アフィニティ精製ヤギ抗ヒトVEGFR-1はR&D Systemsから入手した。Akt、MAPKまたはCREBに対するウサギポリクローナル抗体は、New England Biolabsから入手した。ベシックFGF、組換えヒトVEGF165および組換え成熟ヒトVEGF-D(残基Phe93~Ser201からなる)は、R&Dから入手した。組換えヒトPIGF-1は、厚意によりGraziella Persico (Naples, Italy)から譲渡されたものであった。組換えヒトVEGF-C(Thr103~Leu215)、VEGF-C156S(Thr103~Ile225)、ORFV2-VEGFおよびヒトVEGFR-3-Igは、これまでに記載されているようにして製造および精製した(Joukov et al., EMBO J., 16:3898-3911, 1997; Makinen et al., Nature Med., 7:199-205, 2001; Wise et al., Proc. Nat'l Acad Sci., 96:3071-3076, 1999)。ウォルトマンニン、LY294002、PD98059およびビスインドリルマレイミドI(GF109203X)は、Calbiochemから、U0126はPromega (Madison, WI)から入手した。

10

#### 【0202】

細胞培養 HMEVおよびHUV細胞は、PromoCell(Heidelberg, Germany)から入手し、この供給者から提供されている内皮細胞培地で培養し、継代培養3~7代で用いた。ネズミBa/F3プレBリンパ球は、10%ウシ胎児血清、グルタミンおよび2ng/mLのIL-3(Calbiochem)を添加したDMEMで培養した。

#### 【0203】

免疫蛍光染色 カバーガラス上の細胞を、4%パラホルムアルデヒド(PFA)またはメタノール:アセトン(1:1)にて10分間固定した。必要であれば、PBS中0.1%のトリトンX-100中で5分間浸透処理した。5%ヤギ血清中でブロッッキングした後、細胞を室温で30分間一次抗体で染色し、次にFITCまたはTRITCコンジュゲート二次抗体(15μg/mL)にて30分間インキュベートした。核染色にはHoechst 33258フルオロクロム(Sigma, PBS中0.5μg/mL)を用いた。細胞が生きた状態で染色されたならば、氷上でこの手順を行った後、PFAで固定した。

20

#### 【0204】

リンパ管および血管内皮細胞の単離 モノクローナルVEGFR-3抗体(クローン2E11D11)またはポリクローナルポドプラニン抗体、MACSコロイドスーパーパラマグネチックマイクロビーズコンジュゲート-ラット抗マウスIgG1または-ヤギ抗ウサギIgG抗体(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)、MACS MSセパレーションカラムおよびMiniMACSセパレーター(Miltenyi Biotech)を、製造業者の説明書に従ってセルソーティングに用いた。

30

#### 【0205】

VEGFR刺激のバイオアッセイ VEGFR-2/EpoR(Achen et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:548-53 1998; Stacker et al., J. Biol. Chem., 274:34884-34892, 1999)またはVEGFR-3/EpoA(Achen et al., Eur. J. Biochem., 267: 2505-2515, 2000)を発現するBa/F3プレB細胞を用いた生存能アッセイを、これまでに記載されているように行った(Makinen et al., Nature Med., 7:199-205, 2001)。Ba/F3 VEGFR-1/EpoR細胞の作製のため、ヒトVEGFR-1cDNAのトランスメンブランドメインをコードする配列の前にBgIII部位3を導入した後に、マウスエリスロポイエチン受容体のトランスメンブランドメインと細胞内ドメインからなるBgIII-NotI断片を連結することでキメラ受容体を構築した(Achen et al., Eur J. Biochem, 267: 2505-2515, 2000)。VEGFR-1/EpoR cDNAをpEF-BOS発現ベクターへサブクローニングし(Mizushima and Nagata, NucleicAcid Res., 18:5322, 1990)、pCDNA3.1(+ )Zeoベクター(Invitrogen)とともにBa/F3細胞へ同時トランスフェクトした。250mg/mLゼオシンで選択することにより安定な細胞プールを作出した。

40

#### 【0206】

バイオセンサー分析 総てのタンパク質調製物を使用直前にSMART(商標)システム

50

(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)にインストールしたスクロース 12 (3.2 / 30) カラムを用いた微量分取サイズ排除 HPLC により均一性に関して分析し、バッファー交換した (Nise and Catimel, Bioessays, 21:339-352, 1999)。E 280 1% 1 cm の 0 - 65 を用いて 280 nm の吸光度により、VEGF - C および VEGF - D の濃度を求めた。BIA コア 2000 光バイオセンサー (BIAcore, Uppsala, Sweden) を用いるリガンド結合の分析に関しては、標準的なアミンカップリング化学 (Nise and Catimel, Bioessays, 21:339-352, 1999) を用い、CM5 センサーチップのカルボキシメチル化デキストラン層に受容体ドメインを連結した。固定化レベルは、VEGFR - 2 および VEGFR - 3 それぞれ 3,000 RU および 7,000 RU であった。固定化した後、活性化されたエステル残基を 1 M 塩酸エタノールアミン pH 8.5 で処理することによりブロッキングした後、10 mM ジエチルアミンで洗浄して非共有結合材料を除去した。10 mM ジエチルアミンまたは 10 mM HCl を用い、それぞれ VEGF - D または VEGF - C 結合に関するアッセイ間でセンサー面を再生した。サンプルをランニングバッファー (10 mM HEPES pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005% Tween 20) で希釈した。VEGF - C および VEGF - C156S の受容体ドメインへの見かけの結合親和性は最初の解離相を分析して  $k_d$  値を得ることで求め、次にこれを用いて会合領域の曲線のグローバルな分析を行い、1:1 ラングムリアンモデルを推定した。データはこれまでに記載されているように BIAevaluation3.0 (BIAcore, Uppsala, Sweden) を用いて解析した (Catimel et al., J. Chromatogr., 776:15-30, 1997)。

10

20

30

40

50

#### 【0207】

内皮細胞のアポトーシス分析 アポトーシス分析については、24 ウェルプレートにウェル当たり 70,000 の細胞を播種した。処理は 2 回行い、死細胞検出 ELISA PLUS キット (Roche, Indianapolis, IN) を用いて細胞質ヒストンと会合した DNA 断片を測定することにより、アポトーシスを検出した。以下の範囲の増殖因子濃度を試験した: bFGF 10 ~ 20 ng/mL、PIGF - 1 50 ~ 1000 ng/mL、VEGF 10 ~ 50 ng/mL、VEGF - C 50 ~ 1000 ng/mL、VEGF - D 50 ~ 1000 ng/mL、VEGF - C156S 50 ~ 1000 ng/mL および VEGF - E 50 ~ 1000 ng/mL。アネキシン - V - FLUOS (Roche, Indianapolis, IN) を用い、製造業者の説明書に従い蛍光顕微鏡によりアポトーシス細胞のホスファチジルセリンを検出した。壊死細胞を識別するにはヨウ化プロピジウム (1  $\mu$ g/mL) での同時染色を用いた。

#### 【0208】

ウエスタンブロット解析 内皮細胞を 35 mm ディッシュで密集付近まで培養し、血清フリー培地で 24 時間飢餓状態にし、示されたように刺激した。示されたように刺激の 1 ~ 3 時間前にウォルトマンニン (30 nM)、LY294002 (10 ~ 20  $\mu$ M)、PD98059 (10 ~ 25  $\mu$ M) または GF109203X (2.5 ~ 5  $\mu$ M) を加えた。阻害剤を溶かした DMSO を対照として用いた。刺激後、細胞を溶解バッファー (50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、10 mM EDTA、100 mM NaF、1% トリトン X - 100、これに 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、0.5 mM PMSF、100 U/mL アプロチニンおよび 10  $\mu$ g/mL ロイペプチンを添加) 中で溶解した。明澄化した溶解液を SDS - PAGE で分離し、ニトロセルロースに移し、Akt - Ser473、Akt - Thr308、p2/44 MAPK - Thr202/Tyr204 または CREB - Ser133 に対するリン特異的抗体を用いてマイクロブロットした。結合した抗体はホースラディッシュ・ペルオキシダーゼコンジュゲート二次抗体および増強化学発光検出系を用いて検出した。Multi-Analyst 2.0.1 プログラム (Bio-Rad) を用いてシグナルの光学濃度を読みとることで定量するため、これらのプロットを掻き取り、Akt、MAPK または CREB に対する抗体で再プロービングした。

#### 【0209】

細胞移動アッセイ 移動アッセイは、48 ウェル走化性 Boyden チャンバー (Neuropr

obe Inc.)で行った。8ミクロンのヌクレオポア・ポリカーボネートフィルター(Corning)を+4にて一晩100 $\mu$ g/mLのI型コラーゲン(Upstate Biotechnology)でコーティングし、風乾した。このフィルターを、0.2%BSAを添加した血清フリー増殖培地中に増殖因子の入った下のチャンパーウェルに置いた。ブロック実験については、VEGおよびVEGF-C156Sを10倍モル過剰の可溶性ヒトVEGFR-3とともに30分間プレインキュベートした。HMVE細胞を増殖培地に懸濁させ、上のチャンパーウェルの各ウェルに50 $\mu$ L中10,000細胞を加えた。細胞を37 $^{\circ}$ Cで6時間移動させた後、このフィルターを冷メタノールで固定し、ヘマトキシリン(Meyer)で染色した。フィルター上面の移動しなかった細胞を綿棒で掻き取って除去し、移動した細胞数を数えた。このアッセイを4回行い、3種類の異なるHMVECバッチを用いて繰り返した。

10

【0210】

#### 実施例2

ヒト皮膚微小血管内皮細胞は、血管およびリンパ管内皮細胞の異なる集団からなる。

トランスフェクト細胞系にて種々のVEGF受容体の機能が鋭意研究されてきたが、適当な細胞バックグラウンドがないために、このような研究から得られる結果は不十分なものである。従って、本発明者らは微小血管内皮細胞を、他種の内皮細胞を実質的に含まないある種の内皮細胞の特定の構成集団へと分離することにした。より詳しくは、発明者らは、血管内皮細胞を実質的に含まないリンパ管内皮細胞の集団およびその逆の集団を作製した。この作業を遂行し、内皮細胞の生存を増進するVEGFR-3シグナル伝達経路を解明するため、発明者らは一次内皮細胞、ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HMVEC)およびヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた。HMVEおよびHUVEC細胞の両培養物において、3種総てのVEGFチロシンキナーゼ受容体およびニューロピリン-1コレセプターが発現したことが判明した。これらの知見を本実施例にてさらに詳細に説明する。ヒト一次皮膚微小血管内皮細胞(HMVEC)、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)およびブタ大動脈内皮(PAE)細胞系でVEGFRのmRNAの発現を調べるため、8 $\mu$ gのmRNAを含有するノーザンブロットを、ヒトVEGF受容体の放射標識cDNA断片と、対照として同じ添加量のb-アクチンにてプロービングした。右側の数字は転写物の大きさ(kb)を表す。VEGFR-3mRNAの発現は、微小血管内皮細胞において強いことから、これらの細胞を次の実験でVEGFR-3シグナル伝達の研究に用いた。

20

30

【0211】

免疫蛍光を用い、発明者らは、HMVE細胞が血管およびリンパ管内皮細胞の2つの異なる集団からなることを示した。要するに、Hoechstフルオロクロムによる核の対比染色とともにVEGFR-3およびLYVE-1に対する抗体を用いて免疫蛍光二重染色を行った。この免疫蛍光染色により、VEGFR-3陽性細胞では、LYVE-1の発現は検出されないが、VEGFR-3陰性細胞にはLYVE-1抗体で弱く染色させるものもあることがわかった。また、ポドプラニン、vWFおよびCD31に対する抗体による免疫標識も行ったところ、ここでも核はHoechstフルオロクロムで染色された。この一連の二重染色実験により、vWFの発現が主としてポドプラニン陰性細胞で見られるが、ポドプラニン陽性細胞でも弱い発現が検出されることが明らかになった。VEGFR-3、LYVE-1に対する染色、Hoechstフルオロクロムによる核の対比染色およびポドプラニンに対する染色は氷上の生細胞を用いて行い、一方、vWFおよびCD31に対する染色はPFA固定の後に行った。

40

【0212】

このように免疫蛍光顕微鏡法によって、HMVE細胞の一部のみがVEGFR-3陽性であることがわかった。抗原ブロック実験および3種の異なるモノクローナル抗体の使用から、VEGFR-3染色が特異的なものであることがわかった。VEGFR-3発現細胞は、VEGFR-3陰性細胞に囲まれた明瞭な島(island)にて増殖した。ヒト組織からのこれまでの免疫染色結果に基づけば(Jussila et al., Cancer Res. 58:1599-1604, 1998; Lymboussaki et al., Am. J. Pathol., 153:395-403, 1998)、前者がリンパ管内皮細胞を、後者が血管内皮細胞を示すと推定される。これらの細胞の総てではないが、大

50

部分と VEGFR - 3 陰性細胞のいくつかは、リンパ管内皮細胞マーカー LYVE - 1 に関して染色された (Banerji et al., J. Biol. Chem., 144(4)789-801, 1999)。また VEGFR - 3 陽性細胞は、最近確認されたもう1つのリンパ管内皮マーカーであるポドプラニンでも特異的に染色された (Breiteneder-Geleff et al., Am. J. Pathol., 154(2)385-394, 1999)。同じ結果が FACS 分析でも得られた。vWF 抗原は、ポドプラニン陰性である血管内皮細胞でより旺盛に発現した。全内皮細胞マーカー CD31 は、総ての細胞で検出されたが、これにより非内皮細胞の混入がないことが確認される。またウエスタンブロット解析によれば、VEGFR - 1 および VEGFR - 2 は両内皮細胞集団で検出された。新しく単離された HMVE 細胞のうち、VEGFR - 3 陽性細胞集団は通常 50% を超え、継代培養を繰り返すと低下する。

10

## 【0213】

実施例 3細胞生存実験に用いる VEGFR 特異的リガンドの分析

VEGF は、VEGFR - 2 の活性を介して飢餓および TNF -  $\alpha$  誘導アポトーシスから内皮細胞を保護することがわかっている内皮細胞分裂促進物質である (Gerber et al., J. Biol. Chem., 273:30336-30343, 1998; Spyridopoulos et al., J. Mol. Cell. Cardiol., 29:1321-1330, 1997)。種々の VEGFR の内皮細胞の生存を増進する能力は、VEGFR 特異的 VEGF を用いることにより比較した。用いた増殖因子の特異性は、細胞生存バイオアッセイを用いて調べた。このバイオアッセイでは、Ba/F3 プレ B 細胞をマウス エリスロポイエチンのトランスメンブランドメインおよび細胞質ドメインと融合させたヒト VEGFR - 1、VEGFR - 2 または VEGFR - 3 の細胞外ドメインを含むキメラ受容体で安定的にトランスフェクトした。

20

## 【0214】

予測されたように、VEGF および PlGF は、VEGFR - 1 / EpoR 細胞の生存を増進することができた (図 1A)。VEGF、VEGF - C、VEGF - D および orf ウイルス NZ2 (ORFV2 - VEGF) は、VEGFR - 2 / EpoR 発現細胞の生存を助けることができたが、VEGF - 3 のみと結合してこれを活性化するものである突然変異変異体 VEGF - C156S (Joukov et al., EMBO J., 15:290-298, 1998) は、これらの細胞に影響を及ぼさなかった (図 1B)。代わりに、VEGF - 3 / EpoR 発現細胞は、VEGF - C、VEGF - C156S および VEGF - D の存在下で生存した (図 1C)。これらの実験を基に、次のアポトーシスおよびシグナル伝達実験のために、VEGFR - 3 / EpoR 細胞生存アッセイにおいて最大活性を示す VEGF - C 濃度 100 ng/ml および VEGF - C156S 濃度 500 ng/ml を選択した。

30

## 【0215】

バイオセンサー分析を用いて、VEGF - C および VEGF - C156S と、VEGFR - 2 および VEGFR - 3 との相互作用をさらに調べた。バイオセンサー結合曲線を解析したところ、VEGF - C156S は、VEGFR - 3 の細胞外ドメインのみと結合し、野生型 VEGF - C は、VEGFR - 2 および VEGFR - 3 受容体の双方と結合することが確認された (図 1D ~ 図 1G)。VEGF - C / VEGF の相互作用の動態解析 (表 1) から、受容体発現培養細胞における放射活性リガンド結合分析を用い、これまでに報告されているもの (Joukov et al., EMBO J., 16:3898-3911, 1997) より低い KD 値が示された。しかし、どちらのアッセイでも、VEGFR - 3 に対する VEGF - C の親和性は VEGFR - 2 に対する親和性よりも高かった。VEGF - C に比べ、VEGFR - 3 に対する VEGF - C156S の親和性は有意に低かったが、マウス VEGF - D とマウス VEGFR - 3 との相互作用に関して報告されているものと同様の規模であった (Baldwin et al., J. Biol. Chem., 276:19166-19171, 2001)。

40

## 【0216】

VEGF - C および VEGF - C156S と、VEGFR - 2 および VEGFR - 3 との相互作用のバイオセンサー分析から得られた動態データ。これらのデータは大量変換の 1 : 1 ラングムリアンモデルを推定する BIAevaluation 3.0 を用いてグローバルフィッティ

50

ングにより導いた。

【表 1】

リガンド	受容体	$K_a(1/MS)$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
hVEGF-C	hVEGFR-2	$5.5 \times 10^4$	$12.3 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-8}$
hVEGF-C	hVEGFR-3	$13.6 \times 10^4$	$6.05 \times 10^{-4}$	$0.44 \times 10^{-8}$
hVEGF-C <sub>156S</sub>	hVEGFR-2	結合せず*	結合せず*	結合せず*
hVEGF-C <sub>156S</sub>	hVEGFR-3	$0.35 \times 10^4$	$4.0 \times 10^{-4}$	$11.5 \times 10^{-8}$
hVEGF-D*	hVEGFR-2	$1.3 \times 10^4$	$6.3 \times 10^{-4}$	$4.8 \times 10^{-8}$
hVEGF-D*	hVEGFR-3	$1.8 \times 10^4$	$12 \times 10^{-4}$	$6.5 \times 10^{-8}$
mVEGF-D*	mVEGFR-2	結合せず*	結合せず*	結合せず*
mVEGF-D*	mVEGFR-3	$0.8 \times 10^4$	$7.0 \times 10^{-4}$	$8.9 \times 10^{-8}$

\*=参照 : Baldwin et al., J. Biol. Chem., 276:19166-19171, 2000

略号 : h=ヒト ; m=マウス

Baldwin et al.による研究に用いられたリガンドは、本研究で用いたVEGF-CおよびVEGF-C156Sと同じ成熟型のVEGF-Dである。一価であるmVEGFR-2以外、用いた他の受容体は総て二価免疫グロブリン融合タンパク質であった。

【0217】

#### 実施例 4

VEGFR-3シグナル伝達は血清飢餓誘導性アポトーシスから内皮細胞を保護する

VEGF、VEGF-C、VEGF-C156S、VEGF-DおよびORFV2-VEGFをはじめ、VEGFR-2もしくはVEGFR-3またはその双方を刺激する総てのVEGFは、微小血管内皮細胞を飢餓誘発性のDNA分解から保護することができ、これを細胞質ヒストン会合DNA断片の量として測定した(図2A)。これに対してVEGFR-1としか結合しないPIGFは、有意な保護を示さなかった。VEGFR-2特異的リガンドであるORFV2-VEGFが、VEGFで得られたものにほぼ匹敵する保護を示すことから、VEGFR-1により媒介される生存シグナルが欠如していることも示唆された。VEGF-CおよびVEGF-C156Sは、オリゴヌクレオソームおよびモノヌクレオソームの血清飢餓リンパ管内皮細胞への蓄積を用量依存的に阻害した。VEGF-Cの最大作用は、100ng/mLに、そしてVEGF-C156Sの最大作用は500ng/mLに達した。

【0218】

#### 実施例 5

VEGFR-3発現リンパ管内皮細胞の単離

リンパ管内皮細胞と血管内皮細胞の生存に対するVEGFの作用を比較するため、特異的抗体と磁気マイクロビーズを用い、VEGFR-3陽性および陰性細胞を単離および培養した。すなわち、このプロトコールでは、個別の3つのVEGFR-3発現リンパ管内皮細胞セットを培養し、第一のセットは5%血清を含有する完全培地で培養し、第二のセットは5%血清を含有し、VEGF(10ng/mL)を添加した完全培地で培養し、第三のセットは5%血清を含有し、VEGF-C(100ng/mL)を添加した完全培地で培養した。VEGFR-3陽性細胞を血清またはVEGF-Cを添加した血清にて選別して5日間増殖させた後、ポドプラニンおよび増殖性細胞核抗原(PCNA)に関して染色

10

20

30

40

50

した。核はHoechstフルオロクロムにて染色した。VEGF-CまたはVEGFを添加した場合、細胞はPCNAに関して染色された。ポドプラニンまたはVEGFR-3に対する抗体により、無選別細胞、またはVEGFR-3陰性およびVEGFR-3陽性細胞集団の免疫蛍光二重染色も行った。

#### 【0219】

リンパ管内皮細胞培養物は、免疫蛍光染色に応じ95を超える%純度であった。単離されたVEGFR-3陽性細胞は、培養でディッシュの壁面に接着せず、血清を含む完全培養培地中に、わずかな細胞が増殖したに過ぎなかった。しかし、VEGFまたはVEGF-Cのいずれかを添加した場合、ほとんどのポドプラニン陽性細胞が容易に増殖した。これに対し、血管内皮細胞はこれらの因子を添加しなくても十分増殖した。

10

#### 【0220】

単離されたリンパ管内皮細胞の形態は細長く、特にVEGF-Cの存在下にて培養した場合には、細胞にはいくつかの突起が見られた。ポドプラニンおよびVEGFR-3に関する免疫蛍光は、無選別のVEGFR-3陰性細胞と陽性細胞集団では同じ細胞に同時に局在した。VEGF-Cを添加した培養系では、VEGFR-3の細胞染色だけが見られ、これはリガンド-受容体複合体のインターナリゼーションと一致している。これに対し、血清またはVEGFの存在下では、VEGFR-3は細胞表面に分布していた。

#### 【0221】

#### 実施例 6

VEGF-Cは主としてVEGFR-3発現リンパ管内皮細胞の生存を増進する

20

細胞質モノクローナルヌクレオソームおよびオリゴヌクレオソームの蓄積を、血清飢餓状態での2種の内皮細胞集団におけるアポトーシスの徴候として測定した。VEGFR-3発現細胞では、VEGF-CおよびVEGFの両者が細胞の生存を増進した(図2B)。しかし、VEGFR-3陰性細胞では、VEGF-Cは効果の低い生存因子であり、VEGFR-3陽性細胞で検出されたものと同等の作用に対して5~10倍高い濃度を要した。予測されたように、VEGF-C156SはVEGFR-3陽性細胞の生存のみ促進した(図2B)。これらの結果から、VEGFR-3単独で内皮細胞生存シグナルを伝達できること、また、VEGFおよびVEGF-Cが血管およびリンパ管内皮細胞を示差的にターゲティングすることが確認された。リンパ管内皮細胞集団の増殖を選択的に増進することができれば、これらの細胞種の細胞培養系をさらなる富化させることができる。

30

#### 【0222】

血清飢餓誘発性アポトーシスはまた、蛍光コンジュゲートリン脂質結合タンパク質アネキシン-Vを用い、細胞表面のホスファチジルセリンの露出を分析することによってもモニタリングした。アネキシン-Vで染色された細胞は、血清飢餓状態の24時間後から72時間まで検出され、接着細胞の約40%がアポトーシスと起こしていたが、継代初期および密集状態では細胞はアポトーシスに対する耐性が高かった。

#### 【0223】

飢餓培地にVEGFを添加すると、アネキシン-V陽性を示す細胞数も細胞の解離も減少した。HMVE細胞のアネキシン-V染色は、血清フリー培地単独(BSA)またはVEGFもしくはVEGF-Cの刺激を加えて、培養72時間後に行った。ポドプラニンに対する抗体を用いた同時染色を用いて、リンパ管内皮細胞と血管内皮細胞を識別した。この染色プロトコルを用いると、アポトーシスアネキシン-V陽性リンパ管内皮細胞およびアポトーシス血管内皮細胞の検出が可能であった。ここで再び、核をHoechstフルオロクロムで対比染色した。アネキシン-V陽性細胞は、ヨウ化プロピジウムで染色されないことから、それらは壊死ではなくアポトーシス細胞を呈した。一方、Hoechstフルオロクロムによる核染色では、アポトーシスを受けている細胞に典型的な濃縮核が明らかとなった。これらの濃縮核はまたTUNEL染色に関して陽性であった。興味深いことにVEGF-C特にVEGF-C156Sによる刺激で主としてリンパ管内皮細胞の生存が高まった(図3)。アネキシン-V陽性細胞の数はポドプラニン陰性細胞で、またBSAおよびVEGFで処理された培養物においても高かった(図3)。これは血管内皮細胞がVEGF

40

50

- Cを産生するがリンパ管内皮細胞は産生せず、それらはリンパ管内皮細胞の生存をおそらく増進しうることから、ある程度の直接的作用を示すと考えられる。

【0224】

#### 実施例 7

##### VEGFR-3のリン酸化はPI-3-キナーゼ依存性のAkt活性化をもたらす

背景で論じたように、増殖因子が細胞の生存を増進しうる主要なシグナル伝達経路は、PI-3-キナーゼと、その下流にある標的セリン-トレオニンキナーゼAktを用いている。Aktに対する種々のVEGFの作用を、リン特異的抗体を用い、セリン473およびトレオニン308におけるAktリン酸化を評価することによって分析した。Aktは、VEGF、ORFV2-VEGF、VEGF-C、VEGF-C156SまたはVEGF-Dにて刺激されたHMVE細胞ではSer473によりリン酸化されるが、PIGFにて刺激されたHMVE細胞ではリン酸化されないことがわかった。このことから、Aktは、VEGFR-2またはVEGFR-2により伝達される増殖因子シグナルによって活性化されるが、VEGFR-1によって伝達されるものでは活性化されないことが示された。Akt Thr308リン酸化においても同様の上昇が検出された。PI3-キナーゼ阻害剤ウォルトマンニン(30nM)およびLY294002(20μM)は、検討したVEGFの総てに应答してAktリン酸化を無効にしたが、このことはVEGFR-3により媒介されるAkt活性化はVEGFR-2に関してこれまでに示されているように(Gerber et al., J. Biol. Chem., 273:30336-30343, 1998; Thakker et al., J. Biol. Chem., 274:10002-10007, 1999)PI3-キナーゼによって伝達されることを示している。

【0225】

Aktは、HMVECのVEGFへの暴露から20~30分後に最大にリン酸化されるが、VEGF-Cにより誘導されるAktリン酸化は10分にピークがあることがわかった(図4)。明らかに対照的に、VEGF-C156Sで刺激するとAktリン酸化は遅くなり、30~40分にピークがある。下流標的の活性化に違いがあることは、VEGFR-2またはVEGFR-3によるAktのリン酸化は、異なる経路によって伝達されるのではないかと示唆される。VEGFR-2はPI3-キナーゼの調節p85サブユニットと構成的に会合するので(Thakker et al., J. Biol. Chem., 274:10002-10007, 1999)、おそらく従来経路によりAktリン酸化のシグナルを伝達する可能性がある。これに対し、本発明者らも他者も、VEGFR-3の自己リン酸化後のp85とVEGFR-3との会合、またはPI3-キナーゼ活性の刺激を検出することができていない(Borg et al., Oncogene, 10:973-984, 1995; Pajusola et al., Oncogene, 9:3545-3555, 1994)。

【0226】

#### 実施例 8

##### VEGF-CによるVEGFR-2およびVEGFR-3の同時刺激によって、p42/p44 MAPK活性化の持続が起こる

本発明者らは、VEGF-C刺激時にVEGFR-2およびVEGFR-3により同時にシグナル伝達されると、HMVE細胞においてp42/p44 MAPK活性化の持続が起こることを証明した。p42/p44 MAPKの活性化は、リン-Thr202/Tyr204-MAPK特異的抗体を用いたウエスタンブロット法およびリン-Ser133特異的抗体を用いたCREBリン酸化により検出した。増殖因子の使用濃度は、VEGF10ng/mL、VEGF-C100ng/mLおよびVEGF-C156S500ng/mLとした。さらに本試験から、HMVE細胞においてVEGFR-3により誘導されるp42/p44 MAPK活性化はタンパク質キナーゼCによって媒介されることがわかった。HMVE細胞におけるp42/p44 MAPK Thr202/Tyr204のリン酸化、CREB Ser133のリン酸化およびAkt Ser473のリン酸化に対するGF109203Xによるタンパク質キナーゼC、PD98059によるMEK1、およびLY294002によるPI-3キナーゼの阻害作用。増殖因子の使用濃度は、VEGF1ng/mL、VEGF-C10ng/mL、およびVEGF-C156S

500 ng/mLとした。

分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)シグナル伝達経路は、増殖因子に依存する細胞生存に関連するもう1つの機構である。本発明者らは、HMVE細胞においてVEGF-Cの刺激時に、VEGFR-2およびVEGFR-3による同時シグナル伝達がp42/p44 MAPKの活性化の持続をもたらすことを証明した。p42/p44 MAPKの活性化は、リン-Thr202/Tyr204-MAPK特異的抗体を用いたウエスタンブロット法およびリン-Ser133特異的抗体を用いたCREBリン酸化により検出した。

#### 【0227】

本発明者らは、HMVE細胞においてVEGF-C156SによるVEGFR-3刺激の後にはMAPKの活性化が検出されることを示した。しかし、これらの細胞ではVEGFR-2リガンドVEGFおよびVEGF-Cによって誘導されたMAPKのリン酸が有意に強かった。VEGF-C刺激後も、VEGF刺激後も、MAPKの活性化は10~20分にピークがあったが、VEGFにより誘導される活性化は、少なくとも6時間持続するVEGF-Cにより誘導されるものよりも一時的であった。

#### 【0228】

MAPキナーゼの下流では、MAPKにより活性化されるキナーゼRskは、Ser133において転写因子CREB(cAMP応答エレメント結合タンパク質)をリン酸化し、プロ生存遺伝子の転写を増強することにより細胞の生存を増進することがわかっている(Bonni et al., Science, 286:1358-1362, 1999)。p42/p44活性化と相関するCREBのリン酸化は、VEGFまたはVEGF-CによるHMVECの刺激後には検出されたが、VEGF-C156Sによる刺激後には検出されなかった。AktもまたCREBをリン酸化するが(Du and Montminy, J. Biol. Chem., 273:32377-32379, 1998)、LY294002によるAktの阻害はCREBのリン酸化には影響を及ぼさなかった。これに対して、PD98059またはU0126によるMEK1(MAPキナーゼキナーゼ)の阻害は、VEGF-Cを阻害したが、VEGFにより誘導されるCREBのリン酸化は阻害しなかった。

#### 【0229】

さらに本発明者らは、VEGFR-3により誘導されるMAPKの活性化がPKCを媒介とすることを見出した。VEGFにより誘導されるMAPKカスケードの活性化は従来のRas経路の代わりにタンパク質キナーゼC(PKC)を媒介とすることが示されている(Doanes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 255: 545-548, 1999; Takahashi et al., Oncogene, 18:2221-2230, 1999; Yoshiji et al., Cancer Res., 59:4413-4418, 1999)。VEGF-CおよびVEGF-C156Sにより誘導されるMAPK活性化に対するPKC阻害の作用を検討するため、VEGF、VEGF-CおよびVEGF-C156Sの最小濃度を滴定したところ、リン特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により測定すると最大のp42/p44 MAPK活性化が得られた。これらの条件で、GF109203XによるPKCの阻害は、VEGF、VEGF-CまたはVEGF-C156Sにより誘導されたp42/p44 MAPKのリン酸化およびVEGFまたはVEGF-Cにより誘導されたCREBのリン酸化を完全にブロックした。また、PD98059によるMEK1の阻害の結果、VEGF-C刺激時のCREBのリン酸化は低下した。驚くことに、この処理によってはVEGFにより誘導されるCREBのリン酸化は阻害されなかった。このことと合致して、最近の研究では、VEGFにより誘導されるCREBのリン酸化は、PKCおよびp38 MAPKを媒介とするが、p42/p44 MAPKは媒介としないことがわかっている。

#### 【0230】

##### 実施例9

##### VEGFR-3は内皮細胞の移動を誘導する

内皮細胞の移動は血管新生に重要な役割を果たし、VEGFにより誘導される移動シグナルの少なくともいくつかは、PI3-キナーゼによって伝達される(Gille et al., J. Bi 50

ol. Chem., 276:3222-3230, 2001; Gille et al., EMBO J., 19:4064-4073, 2000; Qi and Claesson-Welsh, Exp. Cell Res., 263:173-182, 2001)。V E G F R - 3 が欠損している胚は、血管が再構築できないために死に至るので (Dumont et al., Science, 282:946-949, 1998)、V E G F R - 3 シグナル伝達も内皮細胞の移動に関与するかどうかという問題は、さらに検討するに値するものであった。Boydenチャンバーアッセイにおいて、種々のV E G Fの存在下、H M V E細胞をインキュベートした。V E G Fは、10倍の細胞移動刺激を誘導し、V E G F - CまたはV E G F - Dの作用は、V E G Fの作用にほぼ匹敵するものであった (図5)。さらに、V E G F - C 1 5 6 Sは、H M V E細胞の移動も誘導し、これは10倍モル過剰の可溶性V E G F R - 3により特的にブロックされた (図5の右のグレーのバー)。これらの結果は、V E G F R - 3によるシグナル伝達が内皮細胞の移動誘導に十分なものであることを示している。

10

本発明の組成物および方法を好ましい実施形態として記載してきたが、当業者ならば本発明の概念、精神および範囲を外れることなく本明細書に記載の方法にバリエーションを加えることができるであろう。当業者に明らかなこのような同等の代替法および改変は総て本発明の精神、範囲および概念の中にあるものとする。発現ライブラリーの作製および組換えペプチドの作製および単離のための技術は当業者に周知のものであり、本発明とともに用いることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0231】

次の図面は本明細書の一部をなし、本発明の態様をさらに例示するために含めるものである。本明細書に示した特定の具体例の詳細な説明と組み合わせて1つ以上の図面を参照することにより、本発明はよりよく理解されるであろう。

20

【図1】 A - C B a / F 3 バイオアッセイを用いた種々のV E G Fの受容体特異性の解析。示された濃度における種々のV E G Fの存在下でのキメラ受容体V E G F R - 1 / E p o R (図1 A)、V E G F R - 2 / E p o R (図1 B)またはV E G F R - 3 / E p o R (図1 C)を発現するB a / F 3細胞の生存能力の測定。細胞生存能力はM T Tアッセイを用いて決定した。データは3回のアッセイの平均値を示している (平均 ± s . d . )。 D - G V E G F - C (図1 D、図1 E) およびV E G F - C 1 5 6 S (図1 F、図1 G) と、V E G F R - 3 (図1 D、図1 F) およびV E G F R - 2 (図1 E、図1 G) との相互作用のバイオセンサー解析。キメラ受容体タンパク質を、カルボキシメチル化したデキストラン表面に固定化した。増殖因子は、指定濃度で流速20 μ L / 分にて表面上に注入した。示されたセンサーグラム (sensorgram) から、同じサンプルをブランク対照チャンネルに通した場合に得られる対応シグナルを減じた。バイオセンサー解析より得た動的データを表Iに示す。

30

【図2】 A - B V E G F R - 1ではなく、V E G F R - 2およびV E G F R - 3活性化リガンドが血清飢餓状態のH M V B細胞のアポトーシスを阻害する。血管およびリンパ管内皮細胞の2つの細胞集団からなる血清飢餓状態のH M V B細胞 (図2 A) またはV E G F R - 3抗体を用いた磁気セルソーティング (magnetic cell sorting) 後に単離された細胞集団 (図2 B) の細胞質ヒストン関連DNA断片 (モノおよびオリゴヌクレオソーム) の測定。血清フリー培地 (B S A) にて24時間増殖させたアポトーシス細胞の細胞質オリゴヌクレオソームの強化因子を100 (%) とした。データは3回の独立した試験の平均値を示している (平均 ± s . d . )。次の濃度の増殖因子を用いた: b F G F 10 ng / mL、P l G F 500 ng / mL、V E G F 50 ng / mL、V E G F - C 100 ng / mL、V E G F - C 1 5 6 S 500 ng / mL、V E G F - D 500 ng / mL、O R F V 2 - V E G F 500 ng / mL および無関係の対照タンパク質としてのミエリン塩基性タンパク質 (M B P) 500 ng / mL。

40

【図3】 72時間の血清飢餓後のポドプラニン陽性および陰性細胞集団におけるアネキシン (Annexin) - V 陽性細胞 (付着細胞の割合%) の定量。データは5つの計数領域の平均値 (× 400) を示している (平均 ± s . d . )。

【図4】 V E G F R - 2 または V E G F R - 3 刺激により P I 3 - キナーゼ 依存的 A k t

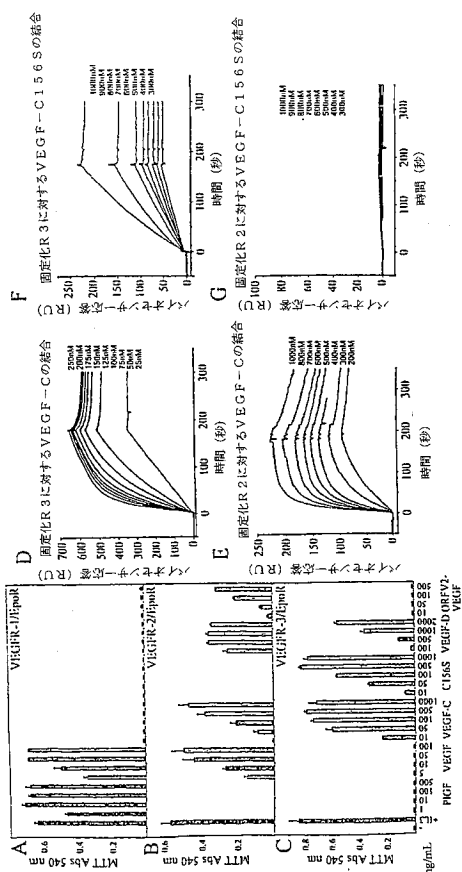
50

リン酸化反応が誘導される。VEGF (グレーの円)、VEGF-C (黒色のボックス) およびVEGF-C156S (白い三角形)は、異なる動態によってAktのリン酸化反応を誘導した。データは3回の独立した試験における全Aktタンパク質と対比したリン酸化Aktタンパク質のシグナルの光学濃度の評価を示している(平均±s.d.)。

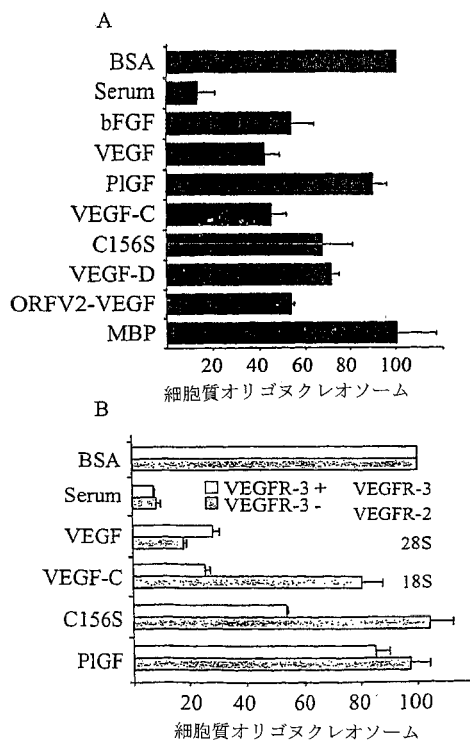
【図5】VEGFR-3が内皮細胞移動を媒介する。Boyden chamberアッセイにおける異なるVEGFの存在下でのHMVE細胞の移動。VEGFではなくVEGF-C156Sにより刺激された移動が、VEGF-C156Sと10モル過剰の可溶性VEGFR-3 (薄いグレーのバー)とをプレインキュベートすることによってブロックされた。データは3回の独立した試験の平均値を示している(平均±s.d.)。用いた増殖因子濃度は: VEGF 10 ng/mL、VEGF-C 500 ng/mL、VEGF-D 500 ng/mLおよびVEGF-C156S 3 μg/mLである。

10

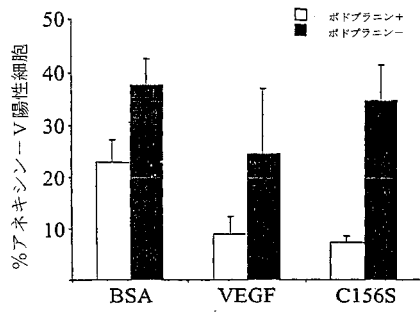
【図1】



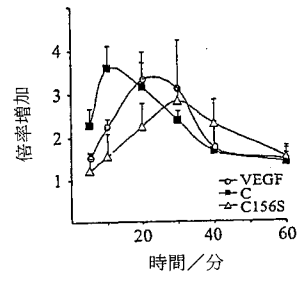
【図2】



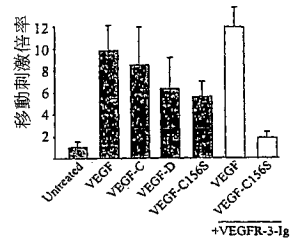
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/006104 A2

- (51) International Patent Classification: A61N (74) Agent: MCMILLIAN, Nabeela, R.; Marshall, Gerstein & Boran, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/22164
- (22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002) (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 12 July 2001 (12.07.2001) US 60/304,880 6 September 2001 (06.09.2001) US 60/317,610
- (71) Applicants (for all designated States except US): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US]; 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US); LICENTIA, LTD [FI/FI]; Erottajankatu 19 B, 6th Floor, FIN-001300 Helsinki (FI).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): ALITALO, Kari [FI/FI]; Molecular/Cancer Biology Laboratory Biomedicum Hel. sinki, P.O. Box 63 (Haartmaninkatu 8), FIN-00014 University of Helsinki (FI); MAKINEN, Taina [FI/FI]; Molecular/Cancer Biology Laboratory Biomedicum Hel. sinki, P.O. Box 63 (Haartmaninkatu 8), FIN-00014 University of Helsinki (FI).
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006104 A2

(54) Title: LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS MATERIALS AND METHODS

(57) Abstract: The present invention is directed to methods and compositions for isolating lymphatic endothelial cells from a mixed population of cells. More particularly, the inventors have found that certain antibodies that recognize the extracellular domain of VEGFR-3 can be used to specifically isolated lymphatic endothelial cells substantially free of other contaminating non-lymphatic endothelial cells. Methods and compositions for producing such cells and using such cells are described.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

**LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS MATERIALS AND METHODS****FIELD OF THE INVENTION**

5 The present invention relates generally to materials and methods relating to the isolation of endothelial cells and, cells isolated according to the present invention. More specifically, the present invention is directed to obtaining populations of isolated lymphatic endothelial cells.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

10 The lymphatic system is a complex structure organized in parallel fashion to the circulatory system. In contrast to the circulatory system, which utilizes the heart to pump blood throughout the body, the lymphatic system pumps lymph fluid using the inherent contractility of the lymphatic vessels. The lymphatic vessels are not interconnected in the same  
15 manner as the blood vessels, but rather form a set of coordinated structures including the initial lymphatic sinuses [Jeltsch *et al.*, *Science*, 276:1423-1425 (1997); and Castenholz, A., in Olszewski, W.L. (ed.), *Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. CRC Press: Boca Raton, Florida (1991), pp.15-42] which drain into the lymphatic  
20 capillaries and subsequently to the collecting lymphatics which drain into the lymphatic trunks and the thoracic duct which ultimately drains into the venous circulation. The composition of the channels through which lymph passes is varied [Olszewski, W.L., in Olszewski, W.L. (ed), *Lymph Stasis: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*. CRC Press: Boca Raton, Florida (1991), pp. 235-258; and Kinmonth, J.B., in Kinmonth, J.B. (ed), *The Lymphatics: Diseases, Lymphography and Surgery*. Edward Arnold Publishers: London, England (1972), pp. 82-86], including the single  
25 endothelial layers of the initial lymphatics, the multiple layers of the collecting lymphatics including endothelium, muscular and adventitial layers, and the complex organization of the lymph node. The various organs of the  
30 body such as skin, lung, and GI tract have components of the lymphatics

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 2 -

with various unique features. [See Ohkuma, M., in Olszewski (1991),  
*supra*, at pp. 157-190; Uhley, H. and Leeds, S., in Olszewski (1991),  
*supra*, at pp. 191-210; and Barrowman, J.A., in Olszewski (1991), at pp.  
221-234.)]

5           Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a prime  
regulator of endothelial cell proliferation, angiogenesis, vasculogenesis and  
vascular permeability (Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543, 1999). Besides  
VEGF, the VEGF family of growth factors currently contains five other  
known members, namely placenta growth factor (PlGF), VEGF-B,  
10    VEGF-C, VEGF-D and orf viral VEGF homologs (Eriksson and Alitalo,  
*Curr Top Microbiol Immunol.*, 257:41-57; 1999). Additional novel  
VEGF-like heparin binding proteins were recently isolated from snake  
venom (Gasmi *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 268(1):69-72, 2000;  
Gasmi *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 1481(1):209-12, 2000; Komori *et al.*,  
15    1999). Disruption of the genes encoding either VEGF or any of the three  
receptors of the VEGF family, VEGFR-1/Flt1, VEGFR-2/Flk1/KDR or  
VEGFR-3/Flt4 results in embryonic lethality because of failure of blood  
vessel development (Dumont *et al.*, *Science*, 282:946-949, 1998; Fong *et*  
*al.*, *Nature*, 376:66-70, 1995; Shalaby *et al.*, *Nature*, 376:62-66, 1995).  
20    Detailed descriptions of these receptors and their ligands are presented in  
U.S. Patent No. 5,776,755; U.S. Patent No. 5,607,918; U.S. Patent No.  
5,840,693; U.S. Patent No. 5,928,939; U.S. Patent No. 6,130,071; U.S.  
Patent No. 6,221,839; U.S. Patent No. 6,235,713; U.S. Patent No.  
6,245,530; U.S. Patent Application No. 09/427,657 filed October 26, 1999;  
25    U.S. Patent Application No. 09/534,376 filed March 24, 2000; U.S. Patent  
Application No. 60/262,476 filed January 17, 2001; as well as PCT  
Application No. PCT/US98/01973, filed February 2, 1998. Each of these  
documents is specifically incorporated herein by reference in its entirety.  
Additional disclosure relating to vascular endothelial growth factors and their  
30    receptors may be found in for example, U.S. Patent No. 6,245,512; U.S.  
Patent No. 6,168,778; U.S. Patent No. 6,100,071; U.S. Patent No.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 3 -

6,051,698; U.S. Patent No. 6,040,157; U.S. Patent No. 6,020,473; and U.S. Patent No. 6,011,003, each incorporated herein by reference.

VEGFR-2 is considered to be the main signal transducing VEGF receptor for angiogenesis and for mitogenesis of endothelial cells. VEGF induces endothelial cell proliferation, migration and survival via activation of VEGFR-2 and subsequent signal transduction pathways including the MAP (mitogen-activated protein) kinase/ERK (extracellular signal regulated kinase) and the phosphatidylinositol (PI) 3-kinase pathways (for a review, see Petrova *et al.*, *Exp. Cell. Res.* 253:117-130, 1999; Shibuya *et al.*, In Claesson-Welsh, L (ed.) *Vascular growth factors and angiogenesis*. Springer Verlag, GmbH&Co., KG, Heidelberg, 237:59-83, 1999). Activation of the p42/p44 MAPK (ERK1/ERK2) cascade is linked in many cells to a proliferation response. In addition, this pathway can lead to increased cell survival by stimulating the transcription of pro-survival genes and by posttranslational modification and inactivation of components of the cell death machinery (Bonni *et al.*, *Science*, 286:1358-1362, 1999; Gupta *et al.*, *Exp. Cell. Res.*, 247:495-504, 1999). The PI3-kinase pathway was also initially linked to mitogenesis, but several studies have subsequently shown that this pathway has an important function in regulating cell survival by activation of the serine/threonine kinase Akt (protein kinase B) (Datta *et al.*, *Genes Dev.* 13:2905-2927, 1999). Recent studies have also indicated some crosstalk between the MAPK and PI3-kinase signaling pathways: phosphorylation of Raf by Akt resulted in inhibition of the Raf-MEK (MAP kinase kinase)-ERK pathway (Rommel *et al.*, *Science* 286:1738-1741, 1999; Zimmermann and Moelling, *Science* 286:1741-1744, 1999).

Molecular biology has identified at least a few genes and proteins postulated to have roles mediating the growth and/or embryonic development of the lymphatic system. One such gene/protein is the receptor tyrosine kinase designated Flt4 (fms-like tyrosine kinase 4; also referred to as vascular endothelial cell growth factor receptor 3 or VEGFR-3), cloned from human erythroleukaemia cell and placental cDNA libraries. [See U.S. Patent

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 4 -

No. 5,776,755 and U.S. Patent 6,107,046; Aprelikova *et al.*, *Cancer Res.*, 52: 746-748 (1992); Galland *et al.*, *Genomics*, 13: 475-478 (1992); Galland *et al.*, *Oncogene*, 8: 1233-1240 (1993); and Pajusola *et al.*, *Cancer Res.*, 52:5738-5743 (1992), all incorporated herein by reference.] Studies showed that, in mouse embryos, a targeted disruption of the VEGFR-3 gene leads to a failure of the remodeling of the primary vascular network, and death after embryonic day 9.5 [Dumont *et al.*, *Science*, 282: 946-949 (1998)]. Additional studies have indicated that certain mutations in VEGFR-3 have an apparent causal role in hereditary lymphedema (PCT Publication No. WO 00/58511). However, VEGFR-3 is not exclusive to lymphatic vessels. VEGFR-3 has an essential role in the development of the embryonic blood vasculature, before the emergence of the lymphatic vessels. However, additional studies indicated that, during further development, the expression of VEGFR-3 becomes restricted mainly to lymphatic vessels [Kaipainen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3566-3570 (1995)]. However, VEGFR-3 expression also is observed in neovascular blood vessels of at least some tumors (PCT Publication No. WO 00/21560).

The expression of the VEGFR-3 gene starts during mouse embryonic day 8.5 in developing blood vessels, and VEGFR-3 deficient embryos die at midgestation due to defects in the remodeling of primary vascular networks (Dumont *et al.*, *Science*, 282:946-949, 1998). However, in adult tissues VEGFR-3 expression occurs mainly in the lymphatic endothelia (Kaipainen, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 3566-3570, 1995; Partanen *et al.*, *FASEB J.*, 14:2087-2096, 2000), and VEGFR-3 ligands VEGF-C and VEGF-D can induce growth of the lymphatic vessels (Jeltsch *et al.*, *Science*, 276:1423-1425, 1997; Veikkola *et al.*, *EMBO J.* 20: 1223-1231, 2001). In contrast, blocking of VEGFR-3 signaling by use of a soluble VEGFR-3 protein caused regression of developing lymphatic vessels by inducing endothelial cell apoptosis (Mäkinen *et al.*, *Nature Med.*, 7:199-205, 2001). However, the biochemical signaling pathways activated via VEGFR-3 are less well characterized than those of VEGFR-2, making it

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 5 -

difficult to ascertain the mechanism of action of these important regulators of lymphatic endothelial cells function. In the absence of such information, therapeutic and diagnostic implications of dysfunctions of these interactions remain elusive.

5 Previously, a number of VEGFR-3 antibodies have been described, see for example, U.S. Patent 6,107,046 (incorporated herein by reference). In addition, podoplanin has recently been identified as a specific marker for lymphatic endothelium (Breiteneder-Geleff et al., et al., *Am. J. Path.*, 154(2) 385-394, 1999), and LYVE-1, a homolog of the CD44 glycoprotein is purported to be a lymph-specific receptor for hyaluron (Banerji et al., *J. Biol. Chem.*, 144(4)789-801, 1999). However, despite the availability of these markers, at present, there are no adequate methods of obtaining isolated lymphatic endothelial cells. The study of therapeutic and diagnostic implications of various lymphatic cell disorders would be greatly facilitated if such isolated endothelial cells could be obtained and be made available for molecular studies. Moreover, the availability of such cells would provide useful information about the characteristic features of the lymphatic endothelial cells, thereby facilitating further identification of specific areas for therapeutic intervention.

20 There are a number of disease states such as hereditary lymphedema, cancer metastases and post-surgical edema, which involve aberration in lymphatic endothelial cells and receptors thereon. The ability to isolate, grow and replace lymphatic endothelial cells would be in a useful palliative intervention, treatment or other ameliorative regimen against such disorders. Such interventions would be particularly useful against injury induced lymphedema, for example. Moreover, the availability of such cells would be particularly amenable to cell-specific treatment regimens thereby greatly reducing undesirable side effects as may be seen in e.g., non-cell specific gene therapy or chemotherapy protocols.

30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 6 -

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention, provides improvements in the ability to manipulate endothelial cells and lymphatic and vascular systems that have numerous practical uses in medicine and molecular biology. More particularly, the present invention provides a method for isolating lymphatic endothelial cells from a biological sample of comprising lymphatic endothelial cells, the method comprising contacting said biological sample with an antibody that preferentially recognizes lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions where the antibody binds lymphatic endothelial cells, and isolating lymphatic endothelial cells bound to said antibody. As used herein the term "antibody" is intended to refer to any antibody agent that specifically binds a target antigen (*e.g.*, lymphatic endothelial cells) or any polypeptide that comprises an antigen binding fragment that specifically recognizes the antigen. More particularly, the antibody is one that is immunologically reactive with an epitope on the extracellular domain of VEGFR-3 that is specific for lymphatic endothelial cells. In the context of the present invention, "preferential" or "specific" means that the antibody binds the target antigen *e.g.*, VEGFR-3 on lymphatic endothelial cells) with greater affinity or avidity than it binds similar antigens on other cells (*e.g.*, VEGFR-3 on blood vascular endothelial cells). This differential binding permits the isolation of one cell type from another.

It should be understood that the biological sample may be from any mammalian organism and may be any tissue or fluid sample that could be expected to contain lymphatic endothelial cells. Particularly preferred is a biological sample is from a human patient. In preferred embodiments, the antibody is immobilized on a solid support and said biological sample is contacted with said support to allow the lymphatic endothelial cells to become bound to said antibody and thereby to the support. In other preferred embodiments, the antibody is labeled with a fluorescent label and said lymphatic endothelial cells are isolated using

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 7 -

fluorescence activated cell sorting. In alternative preferred embodiments, the antibody is labeled with a magnetic label and lymphatic endothelial cells are isolated using magnetic activated cell sorting. It is contemplated that the lymphatic endothelial cells in the biological sample may be isolated using immunohistochemistry. Other embodiments contemplate the use of immunochromatography to isolate the lymphatic endothelial cells.

It should be understood that the antibody may be a polyclonal antibody or it may be a monoclonal antibody. In preferred embodiments, the antibody is a binding reagent that comprises an antigen binding fragment of 2E11D11. In other embodiments, the antibody is a derivative of 2E11D11. In still further embodiments, the antibody is a binding reagent that comprises an antigen binding fragment derived from the antigen binding fragment of 2E11D11 which has been mutated or altered to have greater binding specificity for a VEGFR-3 epitope that is specific for lymphatic endothelial cells. In other embodiments, the antibody recognizes the same epitope of VEGFR-3 protein that is recognized by 2E11D11. In particularly preferred embodiments, the antibody is 2E11D11. (deposited as accession 01083129 with European Collection of Cell Cultures, Center for Applied Microbiology and Research, Porton Down Salisbury, U.K.). The production of this antibody is described in U.S. Patent 6,107,046 (incorporated herein by reference). In other preferred embodiments, antibody is an anti-podoplanin. In certain embodiments, antibody is mutant or derivative the anti-podoplanin antibody that has a binding specificity for lymphatic endothelial cells.

Certain aspects of the present invention contemplate, a method of isolating blood vascular endothelial cells from a biological sample comprising microvascular endothelial cells, the method comprising contacting the biological sample with an antibody that preferentially recognizes lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, wherein the antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3, and removing the lymphatic endothelial cells that are bound by the antibody from microvascular cells

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 8 -

that are not bound to the antibody, wherein the microvascular cells not bound to the antibody comprise a population of blood vascular endothelial cells substantially free of lymphatic endothelial cells.

Another aspect of the present invention contemplates a lymphatic endothelial cell population isolated according to a method comprising contacting a biological sample comprising lymphatic endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, wherein the antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3, and isolating lymphatic endothelial cells that are bound by the antibody. In preferred embodiments, the biological sample comprises a heterogeneous population of endothelial cells. In other preferred embodiments, the sample of cells is a microvascular endothelial cell population. In particularly preferred embodiments, the lymphatic endothelial cell population is substantially free of contaminating blood vascular endothelial cells. In preferred aspects the method of isolating cells comprises expanding the lymphatic endothelial cells in culture.

A further aspect of the present invention describes a blood vascular endothelial cell population isolated according to a method comprising: contacting a population of microvascular endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to blood vascular endothelial cells, wherein the antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3, and; removing the lymphatic endothelial cells that are bound by the antibody from microvascular cells that are not bound to the antibody, wherein the microvascular cells not bound to the antibody comprise a population of blood vascular endothelial cells substantially free of lymphatic endothelial cells. In specific embodiments, the blood vascular cell population is produced by a method which further comprises expanding the blood vascular endothelial cell population.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 9 -

A preferred aspect of the present invention particularly contemplates a lymphatic endothelial cell population substantially free of other contaminating endothelial cells. Another preferred aspect of the invention describes a blood vascular endothelial cell population substantially free of other contaminating endothelial cells.

Another preferred embodiment of the invention relates to a method of obtaining a composition substantially enriched in subpopulation of lymphatic endothelial cells comprising obtaining a source of cells comprising microvascular endothelial cells; contacting the cells with a monoclonal antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions to allow the binding of the antibody to lymphatic endothelial cells; separating those cells that are specifically bound by the monoclonal antibody, thereby obtaining a composition substantially enriched in a subpopulation of lymphatic endothelial cells. In preferred aspects antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of an antigen expressed on lymphatic endothelial cells. In further preferred embodiments, the antigen is VEGFR-3. The invention also encompasses, in preferred aspects, a composition comprising a substantially enriched subpopulation of lymphatic endothelial cells obtained by such a method. In preferred embodiments, the antibody is an anti-podoplanin. In other preferred embodiments, the antibody is 2E11D11, which preferentially recognizes VEGFR-3 expressed on lymphatic endothelial cells.

Other embodiments contemplate a method of ameliorating a lymphatic endothelial cell disorder comprising targeting lymphatic endothelial cells with a therapeutic agent, wherein the therapeutic agent is targeted to the cells using an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, wherein the antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3. In specific embodiments, the disorder is selected from the group consisting of

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 10 -

lymphoma, hereditary lymphedema, lymphedemas, lymphangiomas, lymphangiosarcomas, lymphangiomatosis, lymphangiectasis, and cystic hygroma.

5 The present invention further provides a method of ameliorating a lymphatic disorder, wherein the method comprises *ex vivo* therapy comprising obtaining a biological sample from the patient in need of the therapy, wherein the biological sample comprises microvascular endothelial cells; contacting the microvascular endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to  
10 other endothelial cells, wherein the antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3; isolating lymphatic endothelial cells that are bound by the antibody; transfecting the lymphatic endothelial cells with an expression construct comprising a nucleic acid encoding a protein operably linked to a promoter, in an amount effective  
15 to produce the expression of the protein in the cells; and reintroducing the transfected cells to the patient. The encoded protein can be any protein that one might wish to express in lymphatic endothelial cells (*e.g.*, to treat a disease, palliate the symptoms of a disease, or to permit better diagnosis or imaging)

20 The present invention also provides a method of promoting the growth of lymphatic endothelial cells in culture comprising obtaining the lymphatic endothelial cells according to a method of the present invention; and stimulating the cells with a VEGFR-3 ligand; wherein stimulating the growth of the cells with the VEGFR-3 ligand promotes the survival of the cells in  
25 culture as compared to growth in the absence of the stimulation. In particularly preferred embodiments, the VEGFR-3 ligand is VEGF-C, VEGF-C156S or VEGF-D. The method may further comprise stimulating the cells with a VEGFR-2 ligand. In specific embodiments, it is contemplated that the stimulation of the cells protects the cells from apoptosis. In preferred  
30 embodiments, the protection of the cells from apoptosis is mediated through

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 11 -

the activation of Akt or p42/MAPK signaling molecules. In preferred embodiments, the stimulation of the cells allows the cells to maintain differentiated endothelial cell characteristics.

Also encompassed by the present invention is a method of  
5 selectively modulating lymphatic endothelial cells in a mammalian organism comprising isolating lymphatic endothelial cells from the mammalian organism as described by the present invention, contacting the isolated lymphatic endothelial cells with an agent to modulate the lymphatic  
10 endothelial cells; and reintroducing the lymphatic endothelial cells into the organism. In preferred aspects, the contacting step comprises introducing an exogenous polynucleotide into the cells. In other preferred embodiments, the organism has a disorder characterized by a genetic mutation in a gene expressed in lymphatic endothelial cells and the contacting comprises  
15 introducing an exogenous polynucleotide into the cells to overcome the effects of the genetic mutation in the gene. In specific embodiments, the disorder is hereditary lymphedema. For example, the disorder is hereditary lymphedema characterized by a VEGFR-3 mutation and the treatment comprises introducing a wild-type VEGFR-3 allele.

Another aspect of the invention describes a method for imaging  
20 lymphatic endothelial cells in tissue from a vertebrate organism, comprising contacting vertebrate tissue suspected of containing a lymphatic endothelial cells with a composition comprising an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under  
25 conditions that allow the binding of the antibody to lymphatic endothelial cells; detecting the antibody bound to the lymphatic endothelial cells in the tissue; and imaging lymphatic endothelial cells in the tissue by identifying lymphatic endothelial cells bound by the antibody, wherein the binding of the  
30 lymphatic endothelial cells to the antibody indicates the presence and location of lymphatic endothelial cells in the tissue. More particularly, the tissue comprises human tissue. In specific embodiments, the method further comprises the step of washing the tissue, after the contacting step and before

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 12 -

the imaging step, under conditions that remove from the tissue antibody that is not bound to the lymphatic endothelial cells in the tissue. The antibody may be an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3. In other embodiments, the antibody is an anti-podoplanin antibody. In preferred embodiments, the antibody further comprises a detectable label covalently bound thereto.

The method may be further defined as comprising contacting the tissue with a second compound that specifically binds to a lymphatic endothelial marker that is substantially absent in blood vascular endothelia; and detecting the second compound bound to cells in the tissue; wherein the imaging step comprises identifying lymphatic vessels labeled with both the antibody and the second compound, wherein lymphatic vessels labeled with both the antibody and the second compound correlate with the presence and location of lymphatic endothelial cells in the tissue. In preferred embodiments, the antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3, and the second compound is an anti-podoplanin antibody.

Also contemplated herein is a method of screening for a disease characterized by a change in lymphatic endothelial cells, comprising obtaining a tissue sample from a vertebrate organism suspected of being in a diseased state characterized by changes in lymphatic endothelial cells; exposing the tissue sample to a composition comprising an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions that allow the binding of the antibody to lymphatic endothelial cells in the organism; washing the tissue sample; and screening for the disease by detecting the presence, quantity, or distribution of the bound antibody in the tissue sample.

Another embodiment contemplates a method for specifically detecting lymphatic endothelial cells in a mammal, comprising administering to the mammal a composition comprising an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 13 -

conditions that allow the binding of the antibody to lymphatic endothelial cells, and detecting the antibody bound to lymphatic endothelial cells, thereby detecting lymphatic endothelial cells in the organism. The method may further comprise administering to the mammal a second compound that specifically binds to a lymphatic endothelial cell marker; and wherein the detecting step comprises detection of the antibody and the second compound bound to lymphatic endothelial cells. In all the imaging methods of the invention, it is contemplated that the imaging methods may be used in disorders of lymphatic vessels in determining the presence of the disorder, as well as for monitoring the effects of treatment of the disorder. Such methods may be, particularly useful in assessing lymphedema *e.g.*, hereditary lymphedema or injury induced edema and other lymphatic vessel disorders.

Additional features and variations of the invention will be apparent to those skilled in the art from the entirety of this application, and all such features are intended as aspects of the invention. Likewise, features of the invention described herein can be re-combined into additional embodiments that also are intended as aspects of the invention, irrespective of whether the combination of features is specifically mentioned above as an aspect or embodiment of the invention. Also, only such limitations which are described herein as critical to the invention should be viewed as such; variations of the invention lacking limitations which have not been described herein as critical are intended as aspects of the invention.

Aspects of the invention may be summarized by genus, and it should be understood that every individual member of the genus is intended as an individual aspect of the invention.

**BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING(S)**

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of the drawings in combination with the detailed description of the specific embodiments presented herein.

FIG. 1A-FIG. 1C. Analysis of the receptor-specificities of different VEGFs using the Ba/F3 bioassay. Measurement of the viability of Ba/F3 cells expressing the chimeric receptors VEGFR-1/ EpoR (FIG. 1A), VEGFR-2/EpoR (FIG. 1B) or VEGFR-3/EpoR (FIG. 1C) in the presence of different VEGFs at indicated concentrations. Cell viability was determined using the MTT assay. Data represent the mean values from triplicate assays (mean  $\pm$  s.d.). FIG. 1D-FIG. 1G. Biosensor analysis of the interaction of VEGF-C (FIG. 1D, FIG. 1E) and VEGF-C156S (FIG. 1F, FIG. 1G) with VEGFR-3 (FIG. 1D, FIG. 1F) and VEGFR-2 (FIG. 1E, FIG. 1G). Chimeric receptor proteins were immobilized onto a carboxymethylated dextran surface. Growth factors were injected over the surface at a flow rate of 20  $\mu$ l/min at the indicated concentrations. The sensorgrams shown have been subtracted with the corresponding signal obtained when the same sample was passed over a blank control channel. Kinetic data derived from the biosensor analysis is shown in Table I.

FIG. 2A-FIG. 2B. VEGFR-2 and VEGFR-3, but not VEGFR-1 activating ligands inhibit apoptosis of serum-deprived HMVE cells. Measurement of the cytoplasmic histone-associated DNA fragments (mono- and oligonucleosomes) in serum-starved HMVE cells consisting of two cell populations of blood vascular and lymphatic endothelial cells (FIG. 2A) or in the isolated cell populations after magnetic cell sorting using VEGFR-3 antibodies (FIG. 2B). The enrichment factor of cytoplasmic oligonucleosomes in the apoptotic cells grown for 24 h in serum-free medium (BSA) was chosen as 100 (%). Data represent mean values from three independent experiments (mean  $\pm$  s.d.). The following concentrations of growth factors were used:

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 15 -

bFGF 10 ng/ml, PlGF 500 ng/ml, VEGF 50 ng/ml, VEGF-C 100 ng/ml, VEGF-C156S 500 ng/ml, VEGF-D 500 ng/ml, ORFV2-VEGF 500 ng/ml and myelin basic protein (MBP) as an irrelevant control protein 500 ng/ml.

5 FIG. 3. Quantitation of the Annexin-V positive cells (% of adherent cells) in the podoplanin positive and negative cell populations after 72 hours of serum starvation. Data represent mean values from five counted areas (x 400) (mean  $\pm$  s.d.).

10 FIG. 4. VEGFR-2 or VEGFR-3 stimulation leads to PI3-kinase dependent Akt phosphorylation. VEGF (grey circles), VEGF-C (black boxes) and VEGF-C156S (open triangles) induced phosphorylation of Akt with different kinetics. The data represent quantitations of optical densities of the signals from phosphorylated versus total Akt protein from three independent experiments (mean  $\pm$  s.d.).

15 FIG. 5. VEGFR-3 mediates endothelial cell migration. The migration of HMVE cells in the presence of different VEGFs in a Boyden chamber assay. VEGF-C156S, but not VEGF stimulated migration was blocked by preincubating VEGF-C156S with ten-molar excess of soluble VEGFR-3 (light grey bars). Data represent mean values from three independent experiments (mean  $\pm$  s.d.). The growth factor concentrations used  
20 are: VEGF 10 ng/ml, VEGF-C 500 ng/ml, VEGF-D 500 ng/ml and VEGF-C156S 3  $\mu$ g/ml.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

25 In the present invention, the inventors have used VEGF-C and its VEGFR-3 specific mutant (VEGFC156S) to study VEGFR-3 signaling in order to provide a more detailed characterization of this signaling. For the first time, it is demonstrated that primary cultures of human dermal endothelial cells consist of distinct lineages of blood vascular and lymphatic endothelial cells and that the latter can be isolated by using antibodies against  
30 VEGFR-3.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 16 -

In particular, it is shown that VEGFR-3 was expressed specifically on the lymphatic endothelial cells and its stimulation protected these cells from serum-deprivation induced apoptosis and increased cell migration. Moreover, the data presented herein shows that VEGFR-3 can induce PKC dependent p42/p44 MAPK activation and wortmannin-sensitive phosphorylation of Akt. These two important signaling cascades have been associated with cell survival (Bonni *et al.*, *Science*, 286:1358-1362, 1999; Datta *et al.*, *Genes Dev.* 13:2905-2927, 1999).

Given the details provided herein, one of skill in the art will not be able to employ molecular markers such as VEGFR-3 for the isolation of lymphatic endothelial cells. Moreover, the present invention teaches that the culture of these cells in the presence of specific growth factors is possible without loss of differentiated properties of these cells. Furthermore, it is demonstrated that specific VEGFR-3 ligands can induce cell migration and protect serum-deprived lymphatic endothelial cells from apoptosis via the activation of two important signaling molecules associated with cell survival, Akt and p42/p44 MAPK. The ability to culture lymphatic endothelial cells should now allow further characterization of the VEGFR-3 signaling pathways as well as the molecular features and gene expression profiles of blood vascular versus lymphatic endothelial cells.

#### A. Methods of Making and Using Endothelial Cell Culture

The inventors have found that microvascular endothelial cells consist of two distinct populations of endothelial cells, namely, lymphatic endothelial cells and blood vascular endothelial cells. The present invention, for the first time provides a method of isolating lymphatic endothelial cells from a mixed population of microvascular endothelial cells. A related implication is the ability to provide isolated blood vascular endothelial cells depleted of lymphatic endothelial cells. The present section provides an overview of the present invention, additional details of various aspects of the invention may be found elsewhere throughout the specification.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 17 -

Given the teachings of the present invention it will now be possible to cultures both types of endothelial cells. Such cultures will not only be useful in providing insights into cell signaling and function of the endothelial cells but also provide for therapeutic intervention of diseases which involve neovascularization, including for example, angiogenesis, lymphangiogenesis, hereditary lymphedema and the like.

There are numerous commercially available sources of microvascular endothelial cells available to those of skill in the art. Such commercially available sources include for example, Promocell (Heidelberg, Germany; Suppliers of HDMEC, proliferating or cryopreserved microvascular endothelial cells); Cell Applications Inc., (San Diego, Ca, USA, Supplier of CADMEC™, microvascular endothelial cells isolated from normal human neonatal foreskin (or adult skin) capillaries). Additional commercially available sources also will be known to those of skill in the art. In addition to the cells, these sources will generally supply exemplary growth culture conditions to be used in order to maintain the cells in a proliferating state. Thus, cell lines and cultures from commercial sources are a particularly useful starting material for the methods of the instant invention. It is contemplated that any cell culture that comprises microvascular endothelial cells may be used in the present invention. Such a cell culture preferably will only contain microvascular endothelial cells, but it should be understood that cell cultures that contain cells other than just lymphatic and blood vascular endothelial cells also will adequately serve as a starting host cell culture for the present invention, so long as some of the cells of the culture are lymphatic endothelial cells.

In addition to commercially available source, one may wish to isolate microvascular endothelial cells from various species, including man. Cells from other species including mice, rats, rabbits, dogs, pigs, horses, and primates also are contemplated. Thus, the invention specifically contemplates the use of primary cell culture and especially, primary human microvascular cell culture. The starting primary cell culture may be one that contains only

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 18 -

endothelial cells, but it is likely that when the primary cell culture is initially isolated from the subject, such a cell culture also will contain additional cells such as fibroblasts, smooth muscle cells pericytes and other cells specific for the tissue from which the endothelial cells are being isolated. Such  
5 contaminating cells can easily be removed using for example, density gradient centrifugation, immunoabsorption chromatography using specific markers for the cells, fluorescence activated cell screening, magnetic activated cell screening and other cell sorting techniques.

Generally, in the event that there is significant organ specificity  
10 of microvascular endothelial cells, the primary microvascular endothelial cell culture should be derived from the tissue involved in the diseases one wishes to study or modulate. Methods for isolating these cells will generally be known to those of skill in the art and will involve, digestion of the given tissue with trypsin and collagenase, aggregation of the microvascular endothelial cells  
15 induced by for example, exposure to human plasma, density centrifugation, e.g. Percoll density centrifugation, and ultimately selection and culture of the cells after local digestion with trypsin/EDTA under light microscopy.

The cells of the invention are grown in a medium suitable for the growth of endothelial cells e.g., Ham's F12 medium-10% fetal calf  
20 serum (FCS). Once such a culture is generated, one of skill in the art will be able to confirm the presence of microvascular endothelial cell by observing characteristics associated with microvascular endothelial cells, such as, e.g., presence of contact inhibition (*i.e.*, grew in monolayer), and expression of classical endothelial markers, including von Willebrand factor (vWF),  
25 platelet endothelial cell adhesion molecule 1(PECAM-1, CD31), and transcripts for the angiotensin converting enzyme (ACE), formation of capillary-like structures, and the like. Elsewhere in the present specification, details for exemplary functional assays for microvascular endothelial cells have been provided.

30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 19 -

As indicated above, those of skill in the art will be generally aware of conditions for growing microvascular endothelial cells. In the present invention, culture medium of the cells can be supplemented with a variety of growth factors and stimulators. In preferred aspects, the cells may be grown in the presence of stimulators of VEGFR-3 and/or stimulators of VEGFR-2, including but not limited to including VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S, VEGF-D and ORFV2-VEGF. These and other related agents are well known to those of skill in the art and are described in further detail elsewhere in the specification.

In preferred uses of the invention, it may be advantageous to grow the isolated endothelial cells in culture for a prolonged period of time. In general, growth of such cells in media is often impeded by apoptosis of the cells. The present invention demonstrates that apoptosis of the cells may be inhibited, slowed, or even prevented, by stimulation of the cells with stimulators of VEGFR-3 and/or VEGFR-2. In particularly preferred embodiments, the survival of lymphatic endothelial cells in the mixed population of microvascular endothelial cells or indeed isolated cultures of lymphatic endothelial cells substantially free of other endothelial cell contaminants is enhanced or increased by supplementing the media with VEGF-C or VEGF-C156S.

Having grown the endothelial cell culture, the method of the invention provides a method of isolating the lymphatic endothelial cells from the mixed cell population microvascular endothelial cells by using an antibody that preferentially recognizes lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells. More particularly, the antibody would be one which is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3. In a particularly preferred aspect of the invention, it is demonstrated that the anti-VEGFR-3 antibody 2E11D11 is specific for lymphatic endothelial cells. Another exemplary antibody that is specific for lymphatic endothelial cells is anti-podoplanin antibody. While many of the examples in this specification employ these antibodies, it should be

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 20 -

understood that given the teachings of the present invention, additional antibodies may be identified that will serve for the isolation purposes of the present invention. For example, as described below, such additional antibodies may be generated through conventional methods for producing monoclonal antibodies, which methods may use the same epitope recognized by these exemplary antibodies. Alternatively, the additional antibodies may be generated and isolated through phage-display techniques well known those of skill in the art. Yet another alternative would be to generate antibodies related to 2E11D11 or anti-podoplanin antibody by site directed mutagenesis at specific sites of the antibody to generate second generation antibodies that are specific for lymphatic endothelial cell. Methods for producing such antibodies are described in greater detail herein below.

By "specific for lymphatic endothelial cells", it is meant that this antibody preferentially recognizes lymphatic endothelial cells in a mixed population of endothelial cells and does not recognize or recognizes to a lesser degree endothelial cells from a blood vascular endothelial cell lineage. This differential binding permits isolation of one cell type from the mixed population.

Given that the instant invention shows that microvascular endothelial cells consist generally of a mixed population of blood vascular endothelial cells and lymphatic endothelial cells and that the invention for the first time provides details of how to isolate lymphatic endothelial cells from microvascular endothelial cell culture, such that the endothelial cells are substantially free of other contaminant endothelial cells, *e.g.*, blood vascular endothelial cells, it is understandable that the instant invention also encompasses methods of isolating blood vascular endothelial cells substantially free of other contaminant endothelial cells *e.g.*, lymphatic endothelial cells.

When referring to a population of cells that is "substantially free" of contaminant cells, the instant invention does not mean that the cell culture is required to be completely free of contaminant cells. Rather, it is

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 21 -

intended that the majority of the cells of the culture are of the given cell type. For example, in a lymphatic endothelial cell culture substantially free of other contaminant endothelial cells it is expected that at least 51 % of the cells are lymphatic endothelial cells. More preferably, at least 60 % of the cells are lymphatic endothelial cells. Yet more preferred would be a cell culture comprising at least 70 % lymphatic endothelial cells, still more preferred would be 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 % lymphatic endothelial cells. A particularly preferred method of the present invention would be one which isolates lymphatic endothelial cells such that the culture comprises above 90 % lymphatic endothelial cells. Obviously, the more purified the culture, the greater the percentage of lymphatic endothelial cells in the culture, most preferred would be cell cultures comprising 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % and of course, 100 % lymphatic endothelial cells. Of course, it should be understood that these figures are not intended to be limited to lymphatic endothelial cells and also apply to a substantially purified population of blood vascular endothelial cells. In order to determine the cell type, one of skill in the art may determine the presence of markers specific for any given cell. For example, lymphatic endothelial cells may be identified by the presence of VEGFR-3, the presence of podoplanin as well as other lymphatic cell markers such as LYVE-1. Other VEGFR-3 specific antibodies that may be useful in combination with the above markers include 9D9F9 and 7B3F9 as well as those antibodies described in U.S. Patent No. 6,107,046. Of course, it should be understood that combinations of markers may be particularly useful. Other assays for determining cell function are described herein and are known to those of skill in the art.

In alternative embodiments, the cell culture produced by the methods of the present invention, be it a substantially purified lymphatic endothelial cell culture or a substantially purified endothelial cell culture may be defined in terms of a minimum amount of contaminating cells. By contaminating cells, it is meant any cell that is not the cell type of which the

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 22 -

culture is predominantly composed of. For example, a contaminating cell in a lymphatic endothelial cell culture is any cell that is not a lymphatic endothelial cell. Likewise a contaminating cell in a blood vascular endothelial cell culture is any cell that is not a blood vascular endothelial cell. Examples of contaminating cells of a culture of lymphatic endothelial cells are blood vascular endothelial cells and vice versa, of course other cell types such as for example fibroblasts also will fall into the category of contaminating cells. It is relatively easy to identify contaminating cells, for example by searching for cells possessing specific markers. Thus, in preferred embodiments, the method of the present invention produce cell cultures that contain less than 49% contaminating cells, more preferably, these cultures contain less than 45%, less than 40%, less than 35%, less than 30%, less than 25%, less than 20% less than 15%, less than 14% contaminating cells, less than 13% contaminating cells, less than 12% contaminating cells, less than 11% contaminating cells or less than 10% contaminating cells. Obviously, the more purified the culture, the less the percentage of contaminating cells that are present in the cells of the culture, most preferred would be cell cultures comprising less than 9% contaminating cells, less than 8% contaminating cells, less than 7% contaminating cells, less than 6% contaminating cells, less than 5% contaminating cells, less than 4% contaminating cells, less than 3% contaminating cells, less than 2% contaminating cells, and of course less than 1% contaminating cells.

In certain aspects of the invention, the present invention contemplates therapeutic and diagnostic methods using the isolated cell populations of the present invention. For example, the methods of the present invention may be used to isolate cells from an individual suspected of having a disorder relating to lymphatic endothelial cells or indeed relating to blood vascular endothelial cells. In diagnostic applications, the cells from the patient individual would be analyzed to determine the presence, absence or alteration of certain cellular or biochemical makers or characteristics of the cells that may be indicative of the diseased state. Similar analyses may

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 23 -

be performed for prognostic purposes, in which the cells are isolated before and after the administration of a particular therapy directed at treating the disorder that relates to the cells and determining whether the therapeutic intervention has had a desired effect. In still further embodiments, the isolated cells of the present invention may be used to facilitate an efficacious treatment of a disorder related to an aberration in the physical, biochemical or molecular characteristics of cells. In exemplary embodiments, the therapy may be facilitated by testing the effects of a potential therapy on the cells of the patient *in vitro* to determine whether the cells of that patient will be responsive to such an intervention. Alternatively, the cells may be used for *ex vivo* gene therapy in which the cells isolated from a patient are transduced with a genetic expression construct *in vitro*, expanded and redelivered to the individual in order to correct a disorder in the patient at a molecular level. In yet another alternative, the isolated, expanded cells of the present invention may be used to deliver therapy to a given area. For example, prior to re-delivery of the cells to the patient, the cells are linked to a cytotoxic agent thereby specifically targeting only for example, the lymphatic endothelial cells of the individual. These and other aspects of the invention are discussed in greater detail herein below.

#### B. Elucidation of Role of VEGFR-3 Signaling Pathways

Given that the present invention for the first time allows the isolation of a lymphatic endothelial cell population that is substantially free of contaminating cells, it is now possible to determine the elusive role of VEGFR-3 signaling in lymphatic endothelial cells, the role of these cells in phenomena such as lymphangiogenesis and in lymphatic disorders.

While stimulation of VEGFR-2 promotes cell viability, VEGF withdrawal results in endothelial cell apoptosis, inhibits angiogenesis and leads to blood vessel regression *in vivo* (Aiello *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.*, 92: 10457-10461, 1995; Ferrara *et al.*, *Nature Med.*, 4:336-340, 1998; Gerber *et al.*, *Development*, 126:1149-1159, 1999). Similarly, the inhibition

of VEGFR-3 signaling causes regression of developing lymphatic vessels (Mäkinen *et al.*, *Nature Med.*, 7:199-205, 2001). In agreement with previously published studies, VEGFR-2 stimulation strongly protected serum-deprived primary endothelial cells against apoptosis. This effect occurred via VEGFR-2 alone (stimulation by ORFV2-VEGF) as well as in combination with VEGFR-1 stimulation (by VEGF) or VEGFR-3 stimulation (by VEGF-C). However, VEGFR-1 (stimulation by PlGF) transmitted only very weak, if any, cell survival signals. Moreover, VEGFR-3 signaling alone was sufficient for inhibition of serum-deprivation induced apoptosis. Interestingly, while VEGF-C was a weaker survival factor than VEGF for blood vascular endothelial cells, it strongly promoted the survival of VEGFR-3 expressing lymphatic endothelial cells.

VEGFR-3 induced the phosphorylation of two important survival signaling molecules, p42/p44 MAPK and Akt. A PKC inhibitor severely reduced VEGFR-3 mediated p42/p44 MAPK phosphorylation, suggesting that this pathway is mainly transmitted via PKC, not via Ras, similarly to what has been previously shown for VEGFR-2 (Doanes *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 545-548, 1999; Takahashi *et al.*, *Oncogene*, 18:2221-2230, 1999; Yoshiji *et al.*, *Cancer Res.*, 59:4413-4418, 1999). Such pathway is unique among receptor tyrosine kinases since classically PKC-dependent MAPK activation is thought to be employed mainly by certain seven-transmembrane, G protein-coupled receptors. PKC regulates many endothelial cell processes involved in angiogenesis, including endothelial cell proliferation and migration (Harrington *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271:499-508, 2000; Harrington *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:7390-7397, 1997; Ilan *et al.*, *J. Cell Sci.*, 111:3621-3631, 1998) and inhibition of PKC was able to block tumor neovascularization (Yoshiji *et al.*, *Cancer Res.*, 59:4413-4418, 1999).

Although p42/p44 MAPK activation occurred with a similar kinetics in HMVE cells stimulated by VEGF or VEGF-C, the latter induced a more sustained response. Differences in the duration of activation and in

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 25 -

the subcellular distribution of p42/p44 MAPK have been reported to lead to divergent cellular responses (Kaiser *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 249:349-358, 1999; Marshall, *Cell* 80: 179-185, 1995; Pang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270: 13585-13588, 1995). The differences may result from the fact that only VEGF-C can signal simultaneously via VEGFR-2 and VEGFR-3. However, although VEGF-induced homo- or heterodimeric complexes between VEGFR-1 and VEGFR-2 have been shown to differentially regulate mitogenesis (Rahimi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 275:16986-16992, 2000), we could not detect heterodimer formation by VEGFR-2 and VEGFR-3 in the VEGF-C stimulated cells.

The VEGFR-3 specific mutant form of VEGF-C, VEGF-C156S, proved to be a valuable tool for studies of VEGFR-3 mediated signaling (Joukov *et al.*, *EMBO J.*, 15:290-298, 1998; Veikkola *et al.*, *EMBO J.*, 20:1223-1231, 2001; U.S. Patent 6,130,071). In the biosensor analysis, the affinity of VEGF-C156S to VEGFR-3 was reduced in comparison to the wild type VEGF-C. Moreover, the VEGF-C156S induced maximal VEGFR-3 phosphorylation or p42/p44 MAPK activation were not as strong as for VEGF-C. The reason for this is unclear, but VEGF-C156S may be more unstable than the wild type VEGF-C because one of the eight conserved cysteine residues forming the cystine knot growth factor domain has been changed into a serine residue. However, in a transgenic model VEGF-C156S was as efficient as wild type VEGF-C in promoting lymphangiogenesis (Veikkola *et al.*, *EMBO J.*, 20:1223-1231, 2001). Furthermore, the concentrations used in assays described herein should saturate VEGFR-3. Therefore, since even the highest VEGF-C156S concentrations were not as effective as VEGF-C in protecting cells from apoptosis, a simultaneous activation of both VEGFR-2 and VEGFR-3 may be required for the VEGF-C induced maximal survival of the lymphatic endothelial cells.

30

### C. Antibodies Specific for Lymphatic Endothelial Cells

In the present invention, it is shown that cultured human primary microvascular endothelial cells can be separated into distinct, stable lineages of blood vascular and lymphatic endothelial cells by using certain antibodies against the extracellular domain of VEGFR-3 and both lineages can be expanded in culture. The present section describes the antibodies used for these separation techniques and further describes methods for generating additional antibodies that may be employed in the present invention.

Particularly preferred antibodies of the present invention include for example 2E11D11 (Jussila *et al.*, *Cancer Res.* 58:1599-1604, 1998; U.S. Patent No. 6,107,046), and anti-human podoplanin (Breiteneder-Geleff *et al.*, *et al.*, *Am. J. Path.*, 154(2) 385-394, 1999). These antibodies are known to those of skill in the art. Production of antibodies specific for VEGFR-3 (also known as Flt4) is detailed in U.S. Patent No. 6,107,046, which is specifically incorporated herein by reference.

Given that the present invention teaches that 2E11D11 and anti-podoplanin specifically recognize lymphatic endothelial cells, one of skill in the art will be able to produce additional antibodies that recognize the specific epitope or epitopes recognized by these antibodies. Thus, using the section of VEGFR-3 recognized by 2E11D11, one of skill in the art will be able to produce additional antibodies that recognize lymphatic endothelial cells. Thus, the antibody is one that is preferably immunoreactive with a portion of the VEGFR-3 molecule recognized by 2E11D11, or any other portion of VEGFR-3 that allows the antibody to specifically recognize lymphatic endothelial cells preferentially over any other cell type. By preferentially over any other cell type, it is meant that the antibody will be more reactive with lymphatic endothelial cells than with any other cells including other endothelial cells such as blood vascular endothelial cells.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 27 -

Moreover, the discovery that the 2E11D11 antibody preferentially recognizes VEGFR-3 expressed on lymphatic endothelial cells over VEGFR-3 expressed on blood vessel endothelial cells demonstrates the feasibility of isolating such antibodies using conventional immunization and screening techniques (see *e.g.*, Harlow and Lane, ANTIBODIES: A

5 LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988). A population of VEGFR-3 antibodies can be screened for binding specificity or cross-reactivity against different cell populations described herein.

10 The antibodies that may be used in the present invention include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab expression library, bifunctional/bispecific antibodies, humanized antibodies, CDR-grafted

15 antibodies, human antibodies and antibodies which include portions of CDR sequences specific for VEGFR-3. Neutralizing antibodies, *i.e.*, those which inhibit VEGFR-3 activity also may be useful. In a preferred embodiment, an antibody is a monoclonal antibody. Means for preparing and characterizing antibodies are well known in the art (see, *e.g.*, Harlow and Lane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor

20 Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988).

Briefly, a polyclonal antibody is prepared by immunizing an animal with an immunogen comprising a polypeptide of the present invention and collecting antisera from that immunized animal. A wide range of animal species can be used for the production of antisera. Typically an animal used

25 for production of anti-antisera is a non-human animal including rabbits, mice, rats, hamsters, goat, sheep, pigs or horses. Because of the relatively large blood volume of rabbits, a rabbit is a preferred choice for production of polyclonal antibodies.

Depending on the host species, various adjuvants may be used

30 to increase immunological response. Such adjuvants include but are not limited to Freund's, mineral gels such as aluminum hydroxide, and surface

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 28 -

active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants.

5           Antibodies, both polyclonal and monoclonal, specific for isoforms of antigen may be prepared using conventional immunization techniques, as will be generally known to those of skill in the art. As used herein, the term "specific for" is intended to mean that the variable regions of the antibodies recognize and bind an epitope that allows the antibody to  
10 specifically and preferentially recognize lymphatic endothelial cells and are capable of distinguishing such an epitope from other antigens, for example other VEGF receptors or the same receptors expressed on non-lymphatic cells. A composition containing antigenic epitopes such as those recognized by 2E11D11 or anti-podoplanin can be used to immunize one or more  
15 experimental animals, such as a rabbit or mouse, which will then proceed to produce specific antibodies against the compounds of the present invention. Polyclonal antisera may be obtained, after allowing time for antibody generation, simply by bleeding the animal and preparing serum samples from the whole blood.

20           Monoclonal antibodies for use in the invention may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include but are not limited to the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (*Nature* 256: 495-497, 1975), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al.*,  
25 *Immunol Today* 4:72, 1983 ; Cote *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 80: 2026-2030, 1983) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R Liss Inc, New York N.Y., pp 77-96, (1985).

          When the hybridoma technique is employed, myeloma cell lines may be used. Such cell lines suited for use in hybridoma-producing  
30 fusion procedures preferably are non-antibody-producing, have high fusion efficiency, and enzyme deficiencies that render them incapable of growing in

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 29 -

certain selective media which support the growth of only the desired fused cells (hybridomas). For example, where the immunized animal is a mouse, one may use P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 and S194/5XX0 Bul; for rats, one  
5 may use R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F and 4B210; and U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 and UC729-6 are all useful in connection with cell fusions. It should be noted that the hybridomas and cell lines produced by such techniques for producing the monoclonal antibodies are contemplated to be novel compositions of the present invention.

10 In an exemplary method for generating a polyclonal antisera immunoreactive with the chosen VEGFR-3 epitope, 50 µg of VEGFR-3 antigen is emulsified in Freund's Complete Adjuvant for immunization of rabbits. At intervals of, for example, 21 days, 50 µg of epitope are emulsified in Freund's Incomplete Adjuvant for boosts.

15 To generate monoclonal antibodies, a mouse is injected periodically with recombinant VEGFR-3 against which the antibody is to be raised (*e.g.*, 10-20 µg emulsified in Freund's Complete Adjuvant). The mouse is given a final pre-fusion boost of a VEGFR-3 polypeptide containing the epitope that allows specific recognition of lymphatic endothelial cell in PBS,  
20 and four days later the mouse is sacrificed and its spleen removed. The spleen is placed in 10 ml serum-free RPMI 1640, and a single cell suspension is formed by grinding the spleen between the frosted ends of two glass microscope slides submerged in serum-free RPMI 1640, supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 100  
25 µg/ml streptomycin (RPMI) (Gibco, Canada). The cell suspension is filtered through sterile 70-mesh Nitex cell strainer (Becton Dickinson, Parsippany, New Jersey), and is washed twice by centrifuging at 200 g for 5 minutes and resuspending the pellet in 20 ml serum-free RPMI. Splenocytes taken from three naive Balb/c mice are prepared in a similar manner and used as a control.  
30 NS-1 myeloma cells, kept in log phase in RPMI with 11% fetal bovine serum

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 30 -

(FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah) for three days prior to fusion, are centrifuged at 200 g for 5 minutes, and the pellet is washed twice as described in the foregoing paragraph.

5  $1 \times 10^8$  spleen cells are combined with  $2.0 \times 10^7$  NS-1 cells and centrifuged, and the supernatant is aspirated. The cell pellet is dislodged by tapping the tube, and 1 ml of 37°C PEG 1500 (50% in 75mM Hepes, pH 8.0) (Boehringer Mannheim) is added with stirring over the course of 1 minute, followed by the addition of 7 ml of serum-free RPMI over 7 minutes. An additional 8 ml RPMI is added and the cells are centrifuged at 200 g for 10  
10 minutes. After discarding the supernatant, the pellet is resuspended in 200 ml RPMI containing 15% FBS, 100  $\mu$ M sodium hypoxanthine, 0.4  $\mu$ M aminopterin, 16  $\mu$ M thymidine (HAT) (Gibco), 25 units/ml IL-6 (Boehringer Mannheim) and  $1.5 \times 10^6$  splenocytes/ml and plated into 10 Corning flat-bottom 96-well tissue culture plates (Corning, Corning New York).

15 On days 2, 4, and 6, after the fusion, 100  $\mu$ l of medium is removed from the wells of the fusion plates and replaced with fresh medium. On day 8, the fusion is screened by ELISA, testing for the presence of mouse IgG binding to VEGFR-3 as follows. Immulon-4 plates (Dynatech, Cambridge, MA) are coated for 2 hours at 37°C with 100 ng/well of VEGFR-3  
20 diluted in 25mM Tris, pH 7.5. The coating solution is aspirated and 200  $\mu$ l/well of blocking solution (0.5% fish skin gelatin (Sigma) diluted in CMF-PBS) is added and incubated for 30 min. at 37°C. Plates are washed three times with PBS with 0.05% Tween 20 (PBST) and 50  $\mu$ l culture supernatant is added. After incubation at 37°C for 30 minutes, and washing as above, 50  $\mu$ l  
25 of horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG(fc) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania) diluted 1:3500 in PBST is added. Plates are incubated as above, washed four times with PBST, and 100  $\mu$ l substrate, consisting of 1 mg/ml o-phenylene diamine (Sigma) and 0.1  $\mu$ l/ml 30%  $H_2O_2$  in 100 mM Citrate, pH 4.5, are added. The color reaction is  
30 stopped after 5 minutes with the addition of 50  $\mu$ l of 15%  $H_2SO_4$ .  $A_{490}$  is read on a plate reader (Dynatech).

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 31 -

Selected fusion wells are cloned twice by dilution into 96-well plates and visual scoring of the number of colonies/well after 5 days. The monoclonal antibodies produced by hybridomas are isotyped using the Isostrip system (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

5 In addition to the production of monoclonal antibodies, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 81: 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312: 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314: 452-454; 1985). Alternatively, 10 techniques described for the production of single chain antibodies (U.S. Pat. No. 4,946,778) can be adapted to produce VEGFR-3-specific single chain antibodies.

15 From an antibody population that is shown to bind VEGFR-3 or other lymphatic endothelial cell antigens, one can use blood vessel endothelial cells to "subtract" those antibodies that cross-react with VEGFR-3 or other epitopes on such cells. The remaining antibody population is enriched in antibodies preferential for lymphatic endothelial cell epitopes.

20 Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (*Proc Natl Acad Sci* 86: 3833-3837; 1989), and Winter G and Milstein C (*Nature* 349: 293-299, 1991).

25 It is proposed that the antibodies of the present invention, in addition to being used for the isolation methods of the invention will find useful application in standard immunochemical procedures, such as ELISA and Western blot methods and in immunohistochemical procedures such as tissue staining, as well as in other procedures which may utilize antibodies 30 specific to VEGFR-3-related antigen epitopes.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 32 -

In general, both polyclonal and monoclonal antibodies made for the present invention may be used in a variety of other embodiments. In certain aspects, the antibodies may be employed for therapeutic purposes in which the inhibition of VEGFR-3 activity is desired. Antibodies may be used to block VEGF-C action and VEGFR-3 receptor function thereby treating hyperproliferative disorders associated with lymphangiogenesis. Antibodies of the present invention also may prove useful in diagnostic purposes in order, for example, to detect increases or decreases in VEGFR-3 proteins in tissue samples including samples for sites of a suspected diseased state. Additional aspects will employ the antibodies of the present invention in antibody cloning protocols to obtain cDNAs or genes encoding other VEGFR-3 proteins. They may also be used in inhibition studies to analyze the effects of VEGFR-3 related peptides in cells or animals. The antibodies produced for the present invention will also be useful in immunolocalization studies to analyze the distribution of VEGFR-3 during various cellular events, for example, to determine the cellular or tissue-specific distribution of VEGFR-3 polypeptides under different points in the cell cycle. A particularly useful application of such antibodies is in purifying native or recombinant VEGFR-3, for example, using an antibody affinity column. The operation of all such immunological techniques will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure.

In addition to the above "conventional" methods of generating antibodies for use in the invention, also contemplated are phage display methods of screening for antibodies that would be useful herein. It is now known that 2E11D11 and anti-podoplanin antibodies will specifically recognize lymphatic endothelial cells. Cells isolated by use of these two antibodies can be used as a read-out for other related antibodies that are presented using phage display of all possible mutations of the 2E11D11 or anti-podoplanin related molecules. Alternatively, the displayed antibodies may be selected by their binding capacity to a given epitope recognized by 2E11D11 or anti-podoplanin. This method for isolating novel antibodies is

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 33 -

well known to those of skill in the art and detailed in for example, U.S. Patent 5,223,409, incorporated herein by reference, which describes the directed evolution of binding proteins. Related methods also are described in U.S. Patent No. 5,403,484; U.S. Patent No. 5,571,698; U.S. Patent No. 5,837,500; U.S. Patent No. 5,702,892; . The techniques described in U.S. Patent No. 5,780,279; U.S. Patent No. 5,821,047; U.S. Patent No. 5,824,520; U.S. Patent No. 5,855,885; U.S. Patent No. 5,858,657; U.S. Patent No. 5,871,907; U.S. Patent No. 5,969,108; U.S. Patent No. 6,057,098; U.S. Patent No. 6,225,447, also will be useful for generating antibodies for the present invention.

Additionally, another useful technique for generating antibodies for use in the present invention may be one which uses a rational design type approach. The goal of rational design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides or compounds with which they interact (agonists, antagonists, inhibitors, peptidomimetics, binding partners, etc.). In this case, the active polypeptides are 2E11D11 and anti-podoplanin antibodies discussed herein throughout. By creating such analogs, it is possible to fashion additional antibodies which are more immunoreactive than the native or natural 2E11D11 or anti-podoplanin molecules. In one approach, one would generate a three-dimensional structure for the antibodies or an epitope binding fragment thereof. This could be accomplished by x-ray crystallograph, computer modeling or by a combination of both approaches. An alternative approach, "alanine scan," involves the random replacement of residues throughout molecule with alanine, and the resulting affect on function determined.

It also is possible to solve the crystal structure of the specific antibodies . In principle, this approach yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallograph altogether by generating anti-idiotypic antibodies to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of anti-idiotypic would be expected to be an analog of

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 34 -

the original antigen. The anti-idiotypic could then be used to identify and isolate additional antibodies from banks of chemically- or biologically-produced peptides.

5     **D.     Methods for Isolating Cells**

          The present invention provides a method of isolating lymphatic endothelial cells from a mixed cell culture. Essentially, this isolation method employs antibodies that preferentially recognize lymphatic endothelial cells. The generation and examples of such antibodies have been  
10     discussed above. The present section described certain techniques that may be used in conjunction with the antibodies to isolate the cells. These are merely exemplary techniques, those of skill in the art will be aware of other methods for isolating cells that may also be used in combination with the methods described herein.

15           Various techniques may be employed to separate the cells according to the present invention. The antibodies may be attached to a solid support to allow for crude separation. The separation techniques employed should maximize the retention of viability of the fraction to be collected. Various techniques of different efficacy may be employed to obtain "relatively  
20     crude" separations. Such separations are where up to 10%, usually not more than about 5%, preferably not more than about 1%, of the total cells present not having the marker may remain with the cell population to be retained. The particular technique employed will depend upon efficiency of separation, associated cytotoxicity, ease and speed of performance, and necessity for  
25     sophisticated equipment and/or technical skill.

          Procedures for separation may include, but are not limited to, magnetic separation, using antibody-coated magnetic beads, affinity chromatography, cytotoxic agents joined to a monoclonal antibody or used in  
30     conjunction with a monoclonal antibody, including, but not limited to, complement and cytotoxins, and "panning" with antibody attached to a solid matrix, e.g., plate, elutriation or any other convenient technique.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 35 -

The use of separation techniques include, but are not limited to, those based on differences in physical (density gradient centrifugation and counter-flow centrifugal elutriation), cell surface (lectin and antibody affinity), and vital staining properties (mitochondria-binding dye rho123 and DNA-binding dye Hoechst 33342).

Techniques providing accurate separation include, but are not limited to, Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) FACS, which can have varying degrees of sophistication, e.g., a plurality of color channels, low angle and obtuse light scattering detecting channels, impedance channels, etc.

FACS is a cell sorting method with which cells in suspension can be separated based on differences in cell surface markers. In the context of the present invention, FACS may be used to specifically remove lymphatic endothelial cells from a mixed population of cells. FACS physically separates a cell or particle of interest from a heterogeneous population. Using this techniques, cells can be sorted in a sterile environment enabling the recovered cells to be cultured. The lymphatic endothelial cells are sorted according to the presence of an antigen recognized by the antibodies described herein. Additionally, the FACS also may be used to remove contaminant cells from the cell culture by recognition of antigen expression, GFP expression, DNA content or cell function (e.g. calcium flux or apoptosis) of the contaminant cells. The contaminant cells may be removed before, after or both before and after the lymphatic endothelial cells are isolated.

FACS is based on flow cytometry, which is a means of measuring certain physical and chemical characteristics of cells or particles as they travel in suspension one by one past a sensing point. Thus, flow cytometers can be considered to be specialized fluorescence microscopes. The modern flow cytometer consists of a light source, collection optics, electronics and a computer to translate signals to data. In most modern cytometers the light source of choice is a laser which emits coherent light at a specified wavelength. Scattered and emitted fluorescent light is collected by two lenses (one set in front of the light source and one set at right angles) and by a series

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 36 -

of optics, beam splitters and filters, specific bands of fluorescence can be measured. Physical characteristics measurable by flow cytometric techniques include characteristics such as cell size, shape and internal complexity and, of course, any cell component or function that can be detected by a fluorescent compound can be examined.

5  
10  
15  
In general, flow cytometers use a principle involving the electrostatic deflection of charged droplets. Cells are aspirated from a sample and ejected one by one from a nozzle in a stream of sheath fluid which is generally PBS but can be any ionized fluid. As the cell intercepts with the laser beam, scattered light and fluorescence signals are generated and the sort logic boards make a decision as to whether the cell is to be sorted or not (according to user-defined criteria). In this instance, the user defined criteria for sorting lymphatic endothelial cells is whether or not the cells bind or are recognized by a lymphatic endothelial cell specific antibody, such as 2E11D11, anti-podoplanin and the like.

20  
The distance between the laser intercept and the break-off point is called the drop delay. If a cell of interest i.e. one to be sorted, has been detected, the cytometer waits until that cell has traveled from the intercept to the break-off point and then charges the stream. So as the drop containing the cell of interest leaves the solid fluid stream it will carry a charge, either positive or negative. A further distance downstream the charged drop passes through two high voltage deflection plates and will be attracted to towards the plate of opposite polarity. So it is possible to sort two separate populations from the same sample.

25  
30  
In a first separation, typically starting with about  $1 \times 10^{8-9}$  preferably at about  $5 \times 10^{8-9}$  cells, the lymphatic cell specific antibody may be labeled with one fluorochrome, while the antibodies for the various other cells, or anti-gp80 antibodies, may be conjugated to at least one different fluorochrome. While each of the lineages may be separated in a separate step, desirably the lineages are separated at the same time as one is positively selecting for the epitope recognized by 2E11D11 and/or other lymphatic

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 37 -

endothelial markers. The cells may be selected against dead cells, by employing dyes associated with dead cells (including but not limited to, propidium iodide (PI)). Preferably, the cells are collected in a medium appropriate for the growth or storage of the cells. Cells may be selected based on light-scatter properties as well as their expression of various cell surface antigens. Those of skill in the art are well aware of specific protocols that may be used for FACS sorting of the cells for the present invention.

In an exemplary FACS procedure, microvascular endothelial cells are labeled in suspension by incubating with one or more antibody that recognizes the lymphatic endothelial cells at 4°C for 40 minutes. Cells before and after sorting are maintained at 4°C and in an appropriate medium. After completion of the antibody labeling, propidium iodide (for identifying dead cells) at final concentration of 10 µg/ml was added to each of the sample tubes. Fluorescence Activated Cell Sorting is performed with a Becton Dickinson FACSTAR<sup>plus</sup> (San Jose, Calif.) using a 4 W argon laser with 60 mW of power and a 100 µm nozzle. FACS also can be used to measure physical characteristic by determining FSC and SSC scattering of the cells.

In addition to FACS, MACS also is a useful technique for sorting cells. Instead of using immunofluorescence as a method for isolating the cells, the cells are immunomagnetically labeled and separated using magnetic field. Antibody attached to magnetic beads can also be used to separate the lymphatic endothelial cells from a mixed population culture. The magnetic beads presenting the antibody are bound in a column held in a magnetic field. The microvascular cell population is then passed through the column, and the lymphatic endothelial cells become bound by the antibody whereas the remainder of the cells are collected in the column flowthrough.

Conventional immunosorbant affinity chromatography also is contemplated for isolating the lymphatic cells. In such a technique, the antibody is bound to inert column chromatography beads and the beads are packed into a column. When the microvascular cell population is passed

through the column, the lymphatic endothelial cells become bound to the antibody whereas the non-lymphatic endothelial cells pass through in the column flowthrough.

Panning techniques also may be used to isolate the lymphatic endothelial cells of the invention. Panning for cells is a well known technique which employs antibodies to bind cells to a solid support such as a petri dish. Essentially, an antibody specific for the cells to be panned for, e.g., 2E11D11 specific for lymphatic endothelial cells is coated onto an adherent cell culture plate. The mixed population of cells is then added to the plate and the plate is swirled in order to allow the cells to come into full contact with the antibody immobilized on the surface of the plate. The remaining cell culture media containing cells that are not recognized by the antibody is removed from the plate, leaving the lymphatic endothelial cells substantially free of contaminating cells, attached to the antibody. The cells can either be harvested and transferred into fresh culture medium for expansion or alternatively, the fresh culture media may be added to the cells attached to the antibodies. In the case of a microvascular cell population, it should be understood that the cells that remained in suspension and were removed from the adhered lymphatic cells are a population of blood vascular endothelial cells substantially free of contaminating lymphatic endothelial cells.

In an exemplary panning protocol, antibodies, (0.5 mg/dish) diluted in 9 ml of an appropriate buffer are poured onto 100 mm<sup>2</sup> bacteriological polystyrene petri dishes (Falcon, Lincoln Park, N.J.). The dishes are swirled to evenly coat the surface and incubated at room temperature for 40 minutes. The coated dishes are washed with the buffer prior to use, to remove any residual antibody that has not adhered to the surface of the petri dish. A volume e.g., 10 milliliters of a microvascular cell suspension containing up to  $3 \times 10^7$  cells is incubated at 4°C for 10 minutes in the dishes coated with the antibody. The non-adherent cells are removed by aspiration and the plates are washed with a buffer or media suitable for the cells. The non-adherent cells can be precipitated using centrifugation and recultured.

**E. Assays for Determining the Presence of VEGFR-3 Activity**

The many biological activities mediated through the VEGF-C/D binding to VEGFR-3 receptor family (including but not limited to affecting growth and migration of vascular endothelial cells and blood vessels; promoting growth of lymphatic endothelial cells and lymphatic vessels; increasing vascular permeability; and affecting myelopoiesis) support numerous *in vitro* and *in vivo* clinical utilities for the isolated cells of the present invention. For the first time, such activities can specifically be monitored in lymphatic endothelial cell cultures free of any contaminating effects that may have been caused by non-lymphatic endothelial cells. These cells can be monitored for VEGFR-3 binding and activity of VEGF-C/D as well as compounds that modulate the binding. As such, the cells of the invention will be effective in identifying modulators and in preferred embodiments inhibitors of VEGF-C/D mediated biological responses. The present section describes various assays for determining the presence of VEGFR-3 binding and/or activity. The presence of such activity in the cells isolated by the present invention will be used to indicate that such cells are lymphatic endothelial cells.

The presence of lymphatic endothelial cells may be monitored by the ability of the cells to present VEGFR-3 binding activity. Exemplary binding assays have been described in Achen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-53 (1998), incorporated by reference in its entirety. These assays will generally comprise admixing the cells of the present invention which should express the VEGFR-3 receptor and a ligand of the receptor (e.g., VEGF-C) and determining the receptor binding.

The cells may be used for applications where the therapeutic efficacy of an agent in inhibiting VEGFR-3 receptors is desired to be determined prior to administering the agent to the individual. As an indicator of activity, the ability of the therapeutic agent to alter autophosphorylation of VEGFR-3 receptor on the cells can also be

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 40 -

examined. A candidate therapeutic agent is added to cells, the cells are then lysed and immunoprecipitated with anti-VEGF receptor antiserum and analyzed by Western blotting using anti-phosphotyrosine antibodies to determine phosphorylation of the VEGF receptor.

5           The cells in these assays are grown using techniques well known to those of skill in the art. For example, the cells are grown in Ham's F12 medium-10% fetal calf serum (FCS). The cells are starved overnight in DMEM medium or Ham's F12 supplemented with 0.2% bovine serum albumin (BSA), and then incubated for 5 minutes with VEGF-C alone  
10 or the therapeutic agent in combination with VEGF-C.

          After addition of the VEGF-C, the cells are washed twice with ice-cold Tris-Buffered Saline (TBS) containing 100 mM sodium orthovanadate and lysed in RIPA buffer containing 1 mM  
15 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 U/ml aprotinin and 1 mM sodium orthovanadate. The lysates are sonicated, clarified by centrifugation at 16,000 x g for 20 minutes and incubated for 3-6 hours on ice with 3-5  $\mu$ l of antisera specific for VEGFR-3 or VEGFR-2. Immunoprecipitates are bound to protein A-Sepharose, washed three times with RIPA buffer containing 1mM PMSF, 1mM sodium orthovanadate, washed twice with 10  
20 mM Tris-HCl (pH 7.4), and subjected to SDS-PAGE using a 7% gel. Polypeptides are transferred to nitrocellulose by Western blotting and analyzed using PY20 phosphotyrosine-specific monoclonal antibodies (Transduction Laboratories) or receptor-specific antiserum and the ECL detection method (Amersham Corp.).

25           The ability of a candidate therapeutic to affect the autophosphorylation (detected using the anti-phosphotyrosine antibodies) is scored as modulating the receptor. The level of alteration observed for various concentrations of therapeutic agent, relative to known concentrations of VEGF-C, provide an indication of the potency of receptor modulation.  
30 Therapeutics that have been shown to bind the receptor, but are incapable of stimulating receptor phosphorylation, are scored as inhibitors. Inhibitory

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 41 -

activity can be further assayed by mixing a known receptor agonist such as recombinant VEGF-C with either media alone or with concentrated conditioned media, to determine if the concentrated conditioned media inhibits VEGF-C-mediated receptor phosphorylation.

5           The presence of lymphatic endothelial cells can also be monitored using binding assays for natural or recombinant ligands of VEGFR-3. To measure the binding affinities of selected ligands, an ELISA-type approach may be employed. For example, to examine binding affinity for VEGFR-3, serial dilutions of competing VEGFR-3-IgG fusion proteins  
10           and a subsaturating concentration of the candidate ligand tagged with the *myc* epitope is added to microtitre plates coated with VEGFR-3, and incubated until equilibrium is established. The plates are then washed to remove unbound proteins. Ligands that remain bound to the VEGFR-3 coated plates are detected using an anti-*myc* antibody conjugated to a readily detectable  
15           label *e.g.*, horseradish peroxidase. Binding affinities ( $EC_{50}$ ) can be calculated as the concentration of competing VEGFR-IgG fusion protein that results in half-maximal binding.

          VEGF-C stimulates endothelial cell migration in collagen gel. The cells of the invention may be examined to determine VEGF-C mediated  
20           endothelial cell migration in collagen gel, thus providing another indicia that the isolated cells are indeed lymphatic endothelial cells. Exemplary cell migration assays have been described in International Patent Publication No. WO 98/33917, incorporated herein by reference. Briefly, the lymphatic  
25           endothelial cells isolated in the invention are seeded on top of a collagen layer in tissue culture plates. VEGF-C is placed in wells made in collagen gel approximately 4mm away from the location of the attached lymphatic  
          endothelial cells. The number of endothelial cells that have migrated from the original area of attachment in the collagen gel towards the wells  
30           containing the VEGF-C is then counted to assess VEGF-C induced cell migration.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 42 -

Collagen gels for these assays are prepared by mixing type I collagen stock solution (5 mg/ml in 1 mM HCl) with an equal volume of 2x MEM and 2 volumes of MEM containing 10% newborn calf serum to give a final collagen concentration of 1.25 mg/ml. Tissue culture plates (5 cm diameter) are coated with about 1 mm thick layer of the solution, which is allowed to polymerize at 37°C. The lymphatic endothelial cells of the invention are seeded atop this layer.

For the migration assays, the cells are allowed to attach inside a plastic ring (1 cm diameter) placed on top of the first collagen layer. After 30 minutes, the ring is removed and unattached cells are rinsed away. A second layer of collagen and a layer of growth medium (5% newborn calf serum (NCS)), solidified by 0.75% low melting point agar (FMC BioProducts, Rockland, ME), are added. A well (3 mm diameter) is punched through all the layers on both sides of the cell spot at a distance of 4 mm, and media containing a VEGF-C polypeptide is pipetted daily into the wells. Photomicrographs of the cells migrating out from the spot edge are taken, e.g., after six days, through an Olympus CK 2 inverted microscope equipped with phase-contrast optics. The migrating cells are counted after nuclear staining with the fluorescent dye bisbenzimidazole (1 mg/ml, Hoechst 33258, Sigma).

The number of cells migrating at different distances from the original area of attachment towards wells containing the VEGF-C, are determined 6 days after addition of the media. The number of cells migrating out from the original ring of attachment are counted in five adjacent 0.5 mm x 0.5 mm squares using a microscope ocular lens grid and 10x magnification with a fluorescence microscope. Cells migrating further than 0.5 mm are counted in a similar way by moving the grid in 0.5 mm steps. The ability of the cells of the present invention to undergo VEGF-C mediated migration indicates that the cells isolated are lymphatic endothelial cells that express VEGFR-3.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 43 -

Additionally, the mitogenic activity of VEGF-C can be examined using endothelial cell proliferation assays such as that described in Breier *et al.*, *Dev* 114:521-532 (1992), incorporated herein in its entirety. The cells may be assayed for this effect by adding the VEGF-C to the cells. After three days, the cells are dissociated with trypsin and counted using a cytometer to determine any effects of the peptides on the proliferative activity of the lymphatic endothelial cells.

#### F. Stimulators of VEGFR-3

As indicated in this specification, it is contemplated that the isolated lymphatic endothelial cells may be grown in culture in such a manner that their survival in culture is promoted. In specific embodiments, the cells may be grown in the presence of stimulators of VEGFR-3 and/or stimulators of VEGFR-2, including but not limited to including VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S, VEGF-D and ORFV2-VEGF. Certain of these stimulators and their effects on VEGF receptors is discussed in further detail in the present section. It should be understood that these agents may be prepared in any formulation that makes them amenable to use in conjunction with the cells of the present invention. Additionally, these stimulators may be supplied to the cells of the invention either alone or in a combined application to inhibit, suppress, reduce or otherwise prevent apoptosis of the lymphatic endothelial cells in culture.

The above stimulators belong to the PDGF/VEGF family of growth factors, which includes at least the following members: PDGF-A (see *e.g.*, GenBank Acc. No. X06374), PDGF-B (see *e.g.*, GenBank Acc. No. M12783), VEGF (see *e.g.*, GenBank Acc. No. Q16889 referred to herein for clarity as VEGF-A or by particular isoform), PlGF (see *e.g.*, GenBank Acc. No. X54936 placental growth factor), VEGF-B (see *e.g.*, GenBank Acc. No. U48801; also known as VEGF-related factor (VRF)), VEGF-C (see *e.g.*, GenBank Acc. No. X94216; also known as VEGF related protein (VRP)), VEGF-D (also known as c-fos-induced growth factor (FIGF); see *e.g.*,

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 44 -

Genbank Acc. No. AJ000185), VEGF-E (also known as NZ7 VEGF or OV NZ7; see *e.g.*, GenBank Acc. No. S67522), NZ2 VEGF (also known as OV NZ2; see *e.g.*, GenBank Acc. No. S67520), D1701 VEGF-like protein (see *e.g.*, GenBank Acc. No. AF106020; Meyer *et al.*, *EMBO J* 18:363-374), and  
5 NZ10 VEGF-like protein (described in International Patent Application PCT/US99/25869) [Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)].

VEGF-C, comprises a VHD that is approximately 30%  
10 identical at the amino acid level to VEGF-A. VEGF-C is originally expressed as a larger precursor protein, prepro-VEGF-C, having extensive amino- and carboxy-terminal peptide sequences flanking the VHD, with the C-terminal peptide containing tandemly repeated cysteine residues in a motif typical of  
15 Balbiani ring 3 protein. Prepro-VEGF-C undergoes extensive proteolytic maturation involving the successive cleavage of a signal peptide, the C-terminal pro-peptide, and the N-terminal pro-peptide. Secreted VEGF-C protein consists of a non-covalently-linked homodimer, in which each monomer contains the VHD. The intermediate forms of VEGF-C produced by  
20 partial proteolytic processing show increasing affinity for the VEGFR-3 receptor, and the mature protein is also able to bind to the VEGFR-2 receptor. [Joikov *et al.*, *EMBO J.*, 16:(13):3898-3911 (1997).] It has also been demonstrated that a mutant VEGF-C, in which a single cysteine at position  
25 156 is either substituted by another amino acid or deleted, loses the ability to bind VEGFR-2 but remains capable of binding and activating VEGFR-3 [International Patent Publication No. WO 98/33917]. In mouse embryos, VEGF-C mRNA is expressed primarily in the allantois, jugular area, and the metanephros. [Joukov *et al.*, *J Cell Physiol* 173:211-215 (1997)]. VEGF-C is involved in the regulation of lymphatic angiogenesis: when VEGF-C was overexpressed in the skin of transgenic mice, a hyperplastic lymphatic vessel  
30 network was observed, suggesting that VEGF-C induces lymphatic growth [Jeltsch *et al.*, *Science*, 276:1423-1425 (1997)]. Continued expression of

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 45 -

VEGF-C in the adult also indicates a role in maintenance of differentiated lymphatic endothelium [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. VEGF-C also shows angiogenic properties: it can stimulate migration of bovine capillary endothelial (BCE) cells in collagen and promote growth of human endothelial cells [see, e.g., International Patent Publication No. WO 98/33917, incorporated herein by reference]. VEGF-C<sub>156</sub>S is a VEGF-C cysteine deletion variant that binds to VEGFR-3 but demonstrates reduced binding (relative to VEGF-C) to VEGFR-2. VEGF-C<sub>156</sub>S and related ligands specific for VEGFR-3 that may be used in the present invention are described in U.S. Patent No. 6,130,071, which specifically incorporated by reference in its entirety. VEGF-C materials and methods are described in U.S. Patent Nos 6,245,530 and 6,221,839, incorporated herein by reference.

VEGF-D is structurally and functionally most closely related to VEGF-C [see International Patent Publ. No. WO 98/07832 and U.S. Patent 6,235,713, incorporated herein by reference]. Like VEGF-C, VEGF-D is initially expressed as a prepro-peptide that undergoes N-terminal and C-terminal proteolytic processing, and forms non-covalently linked dimers. VEGF-D stimulates mitogenic responses in endothelial cells *in vitro*. During embryogenesis, VEGF-D is expressed in a complex temporal and spatial pattern, and its expression persists in the heart, lung, and skeletal muscles in adults. Isolation of a biologically active fragment of VEGF-D designated VEGF-DΔNΔC, is described in International Patent Publication No. WO 98/07832, incorporated herein by reference. VEGF-DΔNΔC consists of amino acid residues 93 to 201 of VEGF-D linked to the affinity tag peptide FLAG<sup>®</sup>.

VEGF-A was originally purified from several sources on the basis of its mitogenic activity toward endothelial cells, and also by its ability to induce microvascular permeability, hence it is also called vascular permeability factor (VPF). VEGF-A has subsequently been shown to induce a number of biological processes including the mobilization of intracellular calcium, the induction of plasminogen activator and plasminogen activator

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 46 -

inhibitor-1 synthesis, promotion of monocyte migration *in vitro*, induction of antiapoptotic protein expression in human endothelial cells, induction of fenestrations in endothelial cells, promotion of cell adhesion molecule expression in endothelial cells and induction of nitric oxide mediated vasodilation and hypotension [Ferrara, *J Mol Med* 77: 527-543 (1999); Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13: 9-22 (1999); Zachary, *Int J Biochem Cell Bio* 30: 1169-1174 (1998)].

VEGF-A is a secreted, disulfide-linked homodimeric glycoprotein composed of 23 kD subunits. Five human VEGF-A isoforms of 121, 145, 165, 189 or 206 amino acids in length (VEGF<sub>121-206</sub>), encoded by distinct mRNA splice variants, have been described, all of which are capable of stimulating mitogenesis in endothelial cells. However, each isoform differs in biological activity, receptor specificity, and affinity for cell surface- and extracellular matrix-associated heparan-sulfate proteoglycans, which behave as low affinity receptors for VEGF-A. VEGF<sub>121</sub> does not bind to either heparin or heparan-sulfate; VEGF<sub>145</sub> and VEGF<sub>165</sub> (GenBank Acc. No. M32977) are both capable of binding to heparin; and VEGF<sub>189</sub> and VEGF<sub>206</sub> show the strongest affinity for heparin and heparan-sulfates. VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, and VEGF<sub>165</sub> are secreted in a soluble form, although most of VEGF<sub>165</sub> is confined to cell surface and extracellular matrix proteoglycans, whereas VEGF<sub>189</sub> and VEGF<sub>206</sub> remain associated with extracellular matrix. Both VEGF<sub>189</sub> and VEGF<sub>206</sub> can be released by treatment with heparin or heparinase, indicating that these isoforms are bound to extracellular matrix via proteoglycans. Cell-bound VEGF<sub>189</sub> can also be cleaved by proteases such as plasmin, resulting in release of an active soluble VEGF<sub>110</sub>. Most tissues that express VEGF are observed to express several VEGF isoforms simultaneously, although VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>145</sub> are the predominant forms, whereas VEGF<sub>206</sub> is rarely detected [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. VEGF<sub>145</sub> differs in that it is primarily expressed in cells derived from reproductive organs [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999)].

The pattern of VEGF-A expression suggests its involvement in the development and maintenance of the normal vascular system, and in angiogenesis associated with tumor growth and other pathological conditions such as rheumatoid arthritis. VEGF-A is expressed in embryonic tissues associated with the developing vascular system, and is secreted by numerous tumor cell lines. Analysis of mice in which VEGF-A was knocked out by targeted gene disruption indicate that VEGF-A is critical for survival, and that the development of the cardiovascular system is highly sensitive to VEGF-A concentration gradients. Mice lacking a single copy of VEGF-A die between day 11 and 12 of gestation. These embryos show impaired growth and several developmental abnormalities including defects in the developing cardiovascular system. VEGF-A is also required post-natally for growth, organ development, regulation of growth plate morphogenesis and endochondral bone formation. The requirement for VEGF-A decreases with age, especially after the fourth postnatal week. In mature animals, VEGF-A is required primarily for active angiogenesis in processes such as wound healing and the development of the corpus luteum. [Neufeld *et al.*, *FASEB J* 13:9-22 (1999); Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)]. VEGF-A expression is influenced primarily by hypoxia and a number of hormones and cytokines including epidermal growth factor (EGF), TGF- $\beta$ , and various interleukins. Regulation occurs transcriptionally and also post-transcriptionally such as by increased mRNA stability [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999)].

Four additional members of the VEGF subfamily have been identified in poxviruses, which infect humans, sheep and goats. The orf virus-encoded VEGF-E and NZ2 VEGF are potent mitogens and permeability enhancing factors. Both show approximately 25% amino acid identity to mammalian VEGF-A, and are expressed as disulfide-linked homodimers. Infection by these viruses is characterized by pustular dermatitis which may involve endothelial cell proliferation and vascular permeability induced by these viral VEGF proteins. [Ferrara, *J Mol Med* 77:527-543 (1999); Stacker and Achen, *Growth Factors* 17:1-11 (1999)].

VEGF-like proteins have also been identified from two additional strains of the orf virus, D1701 [GenBank Acc. No. AF106020; described in Meyer *et al.*, *EMBO J* 18:363-374 (1999)] and NZ10 [described in International Patent Application PCT/US99/25869, incorporated herein by reference].

5 These viral VEGF-like proteins have been shown to bind VEGFR-2 present on host endothelium, and this binding is important for development of infection and viral induction of angiogenesis [Meyer *et al.*, *EMBO J* 18:363-374 (1999); International Patent Application PCT/US99/25869].

10 **G. Method of Treating VEGF-C Related Disorders**

The present invention also involves, in another embodiment, the diagnosis and treatment of pathologies characterized by ligand-mediated activity of VEGFR-3. There are numerous disorders that may thus benefit from an intervention including but not limited to cancer, chronic inflammatory diseases, rheumatoid arthritis, psoriasis, diabetic retinopathy, and the like. In particular embodiments, the therapeutic methods of the invention are used in the treatment of lymphatic disorders. The cells of the invention may be isolated from a patient suspected of having such a disorder that is mediated through the binding of VEGFC to VEGFR-3.

20 By "lymphatic disorder" is meant any clinical condition affecting the lymphatic system, including but not limited to lymphedemas, lymphangiomas, lymphangiosarcomas, lymphangiomatosis, lymphangiectasis, and cystic hygroma. Preferred embodiments are methods of screening a human subject for an increased risk of developing a lymphedema disorder, *i.e.*,  
25 any disorder that physicians would diagnose as lymphedema and that is characterized by swelling associated with lymph accumulation, other than lymphedemas for which non-genetic causes (e.g., parasites, surgery) are known. By way of example, lymphedema disorders include Milroy-Nonne (OMIM 153100) syndrome-early onset lymphedema [Milroy, *N.Y. Med. J.*, 56:505-508 (1892); and Dale, *J. Med. Genet.*, 22: 274-278 (1985)] and  
30 lymphedema praecox (Meige syndrome, OMIM 153200)-late onset

lymphedema [Lewis *et al.*, *J. Ped.*, 104:641-648 (1984); Holmes *et al.*,  
*Pediatrics* 61:575-579 (1978); and Wheeler *et al.*, *Plastic Reconstructive*  
*Surg.*, 67:362-364 (1981)] which generally are described as separate entities,  
both characterized by dominant inheritance. However, there is confusion in  
5 the literature about the separation of these disorders. In Milroy's syndrome,  
the presence of edema, which is usually more severe in the lower extremities,  
is seen from birth. Lymphedema praecox presents in a similar fashion but the  
onset of swelling is usually around puberty. Some cases have been reported to  
develop in the post-pubertal period. In the particular analyses described  
10 herein, the lymphedema families showing linkage to 5q34-q35 show an early  
onset for most affected individuals, but individuals in these pedigrees have  
presented during or after puberty.

Particularly contemplated for treatment according to the present  
invention are hereditary lymphedemas with an identifiable genetic cause. For  
15 example, International Patent Publication No. WQ 005/58511 describes  
screening and therapy for lymphedemas involving VEGFR-3 mutations. The  
ability to isolate lymphatic endothelial cells from such patients permit  
improved protein- or gene based therapies by contacting target cells *ex vivo*  
with the therapeutic agent and reintroducing the cells.

20 In addition, the other types of disorders that may be treated,  
according to the present invention, such disorders are limited only by the  
involvement of VEGFC and/or VEGFR-3. Thus, it is contemplated that, for  
example, a wide variety of tumors may be assessed using the cells of the  
present invention including cancers of the brain (glioblastoma, astrocytoma,  
25 oligodendroglioma, ependymomas), lung, liver, spleen, kidney, lymph node,  
pancreas, small intestine, blood cells, colon, stomach, breast, endometrium,  
prostate, testicle, ovary, skin, head and neck, esophagus, bone marrow, blood  
or other tissue. Cells isolated from patients of having these diseases will be  
used to provide therapy to the individual.

30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 50 -

In many contexts, in providing the therapy, it is not necessary that the tumor cell be killed or induced to undergo normal cell death or "apoptosis." Rather, to accomplish a meaningful treatment, all that is required is that the tumor growth be slowed to some degree or localized to a specific area and inhibited from spread to disparate sites. It may be that the tumor growth is completely blocked, however, or that some tumor regression is achieved. Clinical terminology such as "remission" and "reduction of tumor" burden also are contemplated given their normal usage. In the context of the present invention, the therapeutic effect may result from an inhibition of angiogenesis and/or an inhibition of lymphangiogenesis.

#### I. Genetic Based Therapies

The cells isolated by the present invention may be treated using gene based therapy provided in the form of a nucleic acid, and reintroduced into the patient in order to effect *ex vivo* gene therapy. In an *ex vivo* embodiment, cells from the patient are removed and maintained outside the body for at least some period of time. During this period, a therapy is delivered, after which the cells are reintroduced into the patient; hopefully, any tumor cells in the sample have been killed. Specifically, the cells may be contacted with an expression construct capable of providing a therapeutic gene to the lymphatic or blood vascular cells of the tumor in a manner to allow the inhibition of VEGFR-3 in that vasculature.

For these embodiments, an exemplary expression construct comprises a virus or engineered construct derived from a viral genome. The expression construct generally comprises a nucleic acid encoding the therapeutic gene to be expressed and also additional regulatory regions that will effect the expression of the gene in the cell to which it is administered. Such regulatory regions include for example promoters, enhancers, polyadenylation signals and the like.

It is now widely recognized that DNA may be introduced into a cell using a variety of viral vectors. In such embodiments, expression constructs comprising viral vectors containing the genes of interest may be adenoviral (see for example, U.S. Patent No. 5,824,544; U.S. Patent No. 5,707,618; U.S. Patent No. 5,693,509; U.S. Patent No. 5,670,488; U.S. Patent No. 5,585,362; each incorporated herein by reference), retroviral (see for example, U.S. Patent No. 5,888,502; U.S. Patent No. 5,830,725; U.S. Patent No. 5,770,414; U.S. Patent No. 5,686,278; U.S. Patent No. 4,861,719 each incorporated herein by reference), adeno-associated viral (see for example, U.S. Patent No. 5,474,935; U.S. Patent No. 5,139,941; U.S. Patent No. 5,622,856; U.S. Patent No. 5,658,776; U.S. Patent No. 5,773,289; U.S. Patent No. 5,789,390; U.S. Patent No. 5,834,441; U.S. Patent No. 5,863,541; U.S. Patent No. 5,851,521; U.S. Patent No. 5,252,479 each incorporated herein by reference), an adenoviral-adenoassociated viral hybrid (see for example, U.S. Patent No. 5,856,152 incorporated herein by reference) or a vaccinia viral or a herpesviral (see for example, U.S. Patent No. 5,879,934; U.S. Patent No. 5,849,571; U.S. Patent No. 5,830,727; U.S. Patent No. 5,661,033; U.S. Patent No. 5,328,688 each incorporated herein by reference) vector.

In other embodiments, non-viral delivery is contemplated. These include calcium phosphate precipitation (Graham and Van Der Be, *Virology*, 52:456-467, 1973; Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7:2745-2752, 1987; Rippe *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990) DEAE-dextran (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985), electroporation (Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986; Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984), direct microinjection (Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101:1094-1099, 1985.), DNA-loaded liposomes (Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982; Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979; Felgner, *Sci Am.* 276(6):102-6, 1997; Felgner, *Hum Gene Ther.* 7(15):1791-3, 1996), cell sonication (Fechheimer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467,

1987), gene bombardment using high velocity microprojectiles (Yang *et al.*,  
*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 87:9568-9572, 1990), and receptor-mediated  
transfection (Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987; Wu and  
Wu, *Biochemistry*, 27:887-892, 1988; Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery*  
5 *Rev.*, 12:159-167, 1993).

In a particular embodiment of the invention, the expression  
construct (or indeed the peptides discussed above) may be entrapped in a  
liposome. Liposomes are vesicular structures characterized by a  
phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium.  
10 Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous  
medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an  
excess of aqueous solution. The lipid components undergo  
self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water  
and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh and Bachhawat, *In:*  
15 *Liver diseases, targeted diagnosis and therapy using specific receptors and*  
*ligands*, Wu G, Wu C ed., New York: Marcel Dekker, pp. 87-104, 1991).  
The addition of DNA to cationic liposomes causes a topological transition  
from liposomes to optically birefringent liquid-crystalline condensed globules  
(Radler *et al.*, *Science*, 275(5301):810-4, 1997). These DNA-lipid  
20 complexes are potential non-viral vectors for use in gene therapy and  
delivery.

Liposome-mediated nucleic acid delivery and expression of  
foreign DNA *in vitro* has been very successful. Also contemplated in the  
present invention are various commercial approaches involving "lipofection"  
25 technology. In certain embodiments of the invention, the liposome may be  
complexed with a hemagglutinating virus (HVJ). This has been shown to  
facilitate fusion with the cell membrane and promote cell entry of  
liposome-encapsulated DNA (Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989).  
In other embodiments, the liposome may be complexed or employed in  
30 conjunction with nuclear nonhistone chromosomal proteins (HMG-1) (Kato  
*et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991). In yet further embodiments,

the liposome may be complexed or employed in conjunction with both HVJ and HMG-1. In that such expression constructs have been successfully employed in transfer and expression of nucleic acid *in vitro* and *in vivo*, then they are applicable for the present invention.

5 Other vector delivery systems that can be employed to deliver a nucleic acid encoding a therapeutic gene into cells include receptor-mediated delivery vehicles. These take advantage of the selective uptake of macromolecules by receptor-mediated endocytosis in almost all eukaryotic cells. Because of the cell type-specific distribution of various  
10 receptors, the delivery can be highly specific (Wu and Wu, 1993, *supra*).

Receptor-mediated gene targeting vehicles generally consist of two components: a cell receptor-specific ligand and a DNA-binding agent. Several ligands have been used for receptor-mediated gene transfer. The most extensively characterized ligands are asialoorosomucoid (ASOR) (Wu and Wu, 1987, *supra*) and transferrin (Wagner *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*  
15 *USA*, 87(9):3410-3414, 1990). Recently, a synthetic neoglycoprotein, which recognizes the same receptor as ASOR, has been used as a gene delivery vehicle (Ferkol *et al.*, *FASEB J.*, 7:1081-1091, 1993; Perales *et al.*,  
20 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 91:4086-4090, 1994) and epidermal growth factor (EGF) has also been used to deliver genes to squamous carcinoma cells (Myers, EPO 0273085).

In other embodiments, the delivery vehicle may comprise a ligand and a liposome. For example, Nicolau *et al.* (*Methods Enzymol.*,  
25 149:157-176, 1987) employed lactosyl-ceramide, a galactose-terminal asialganglioside, incorporated into liposomes and observed an increase in the uptake of the insulin gene by hepatocytes. Thus, it is feasible that a nucleic acid encoding a therapeutic gene also may be specifically delivered into a particular cell type by any number of receptor-ligand systems with or  
30 without liposomes.

In another embodiment of the invention, the expression construct may simply consist of naked recombinant DNA or plasmids. Transfer of the construct may be performed by any of the methods mentioned above that physically or chemically permeabilize the cell membrane. This is applicable particularly for transfer *in vitro*, however, it may be applied for *in vivo* use as well. Dubensky *et al.* (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7529-7533, 1984) successfully injected polyomavirus DNA in the form of CaPO<sub>4</sub> precipitates into liver and spleen of adult and newborn mice demonstrating active viral replication and acute infection. Benvenisty and Neshif (*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:9551-9555, 1986) also demonstrated that direct intraperitoneal injection of CaPO<sub>4</sub> precipitated plasmids results in expression of the transfected genes.

Another embodiment of the invention for transferring a naked DNA expression construct into cells may involve particle bombardment. This method depends on the ability to accelerate DNA coated microprojectiles to a high velocity allowing them to pierce cell membranes and enter cells without killing them (Klein *et al.*, *Nature*, 327:70-73, 1987). Several devices for accelerating small particles have been developed. One such device relies on a high voltage discharge to generate an electrical current, which in turn provides the motive force (Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 87:9568-9572, 1990). The microprojectiles used have consisted of biologically inert substances such as tungsten or gold beads.

Those of skill in the art are well aware of how to apply gene delivery to *in vivo* and *ex vivo* situations. For viral vectors, one generally will prepare a viral vector stock. Depending on the kind of virus and the titer attainable, one will deliver  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  or  $1 \times 10^{12}$  infectious particles to the patient. Similar figures may be extrapolated for liposomal or other non-viral formulations by comparing relative uptake efficiencies. Formulation as a pharmaceutically acceptable composition is discussed below.

Various routes are contemplated for various tumor types. The section below on routes contains an extensive list of possible routes. For practically any tumor, systemic delivery is contemplated. This will prove especially important for attacking microscopic or metastatic cancer. Where discrete tumor mass may be identified, a variety of direct, local and regional approaches may be taken. For example, the tumor may be directly injected with the expression vector or protein. A tumor bed may be treated prior to, during or after resection. Following resection, one generally will deliver the vector by a catheter left in place following surgery.

## II. Immunotherapies

Immunotherapeutics, generally, rely on the use of immune effector cells and molecules to target and destroy cancer cells. The immune effector may be, for example, an antibody specific for some marker on the surface of a tumor cell. The antibody alone may serve as an effector of therapy or it may recruit other cells to actually effect cell killing. The antibody also may be conjugated to a drug or toxin (chemotherapeutic, radionuclide, ricin A chain, cholera toxin, pertussis toxin, *etc.*) and serve merely as a targeting agent. Alternatively, the effector may be a lymphocyte carrying a surface molecule that interacts, either directly or indirectly, with a tumor cell target. Various effector cells include cytotoxic T cells and NK cells.

In the context of the present invention, it is possible that the antibody, antibodies, antibody conjugates or immune effector cells target the selected tumor for therapy and the peptides of the present invention that are combined with the immunotherapy target the vasculature of the tumor thereby having a combined therapeutic effect.

The general approach for combined therapy is discussed below. In the context of the present invention, seeing as it has been determined that 2E11D11 and anti-podoplanin antibodies are capable of specifically recognizing lymphatic endothelial cells, it will be possible to

target these cells with cytotoxic agents. As such, lymphangiogenesis associated with various cancers may be inhibited using the methods described herein.

5 In some embodiments, the antibodies may be used to target therapeutic proteins to the lymphatic endothelial cells. These therapies will be particularly useful as anti-lymphangiogenesis and/or anti-angiogenic treatments, however it is contemplated that the instant invention is not limited to these beneficial effects. Administration of the compositions can be systemic or local and may comprise a single site injection of a therapeutically effective amount of the protein. Any route known to those of skill in the art 10 for the administration of a therapeutic composition of the invention is contemplated including for example, intravenous, intramuscular, subcutaneous or a catheter for long term administration. Alternatively, it is contemplated that the therapeutic composition may be delivered to the patient at multiple sites. The multiple administrations may be rendered 15 simultaneously or may be administered over a period of several hours. In certain cases it may be beneficial to provide a continuous flow of the therapeutic composition. Additional therapy may be administered on a period basis, for example, daily, weekly or monthly. In addition, 20 chemotherapeutic agents may also be target to the lymphatic endothelial cells. Such agents that will be useful in the therapeutic applications of the present invention are discussed in further detail below.

### 25 III. Combined Therapy with Immunotherapy, Traditional Chemo- or Radiotherapy

Tumor cell resistance to DNA damaging agents represents a major problem in clinical oncology. One goal of current cancer research is to find ways to improve the efficacy of chemo- and radiotherapy. One way is by combining such traditional therapies with gene therapy. For example, 30 the herpes simplex-thymidine kinase (*HS-tk*) gene, when delivered to brain tumors by a retroviral vector system, successfully induced susceptibility to

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 57 -

the antiviral agent ganciclovir (Culver *et al.*, 1992). One embodiment of the present invention, it is contemplated that the peptides of the present invention may be administered in conjunction with chemo- or radiotherapeutic intervention, immunotherapy, or with other anti-angiogenic/anti-lymphangiogenic therapy.

To kill cells, inhibit cell growth, inhibit metastasis, inhibit angiogenesis or otherwise reverse or reduce the malignant phenotype of tumor cells, using the methods and compositions of the present invention, one would generally contact a "target" cell, a tumor or its vasculature with the at least two different therapeutic compositions. These compositions would be provided in a combined amount effective to kill or inhibit proliferation of the cancer by killing and/or inhibiting the proliferation of the cancer cells and/or the endothelia of blood and lymphatic vessels supplying and serving the cancer cells. This process may involve contacting the cells with the peptide or expression construct and the agent(s) or factor(s) at the same time. This may be achieved by contacting the cell with a single composition or pharmacological formulation that includes both agents, or by contacting the cell with two distinct compositions or formulations, at the same time.

Alternatively, the two different treatments may be separated by intervals ranging from minutes to weeks. In embodiments where the two therapies are administered separately, one would generally ensure that a significant period of time did not expire between the time of each delivery, such that the first and second therapy would still be able to exert an advantageously combined effect. In such instances, it is contemplated that one would administer both modalities within about 12-24 hours of each other and, more preferably, within about 6-12 hours of each other, with a delay time of only about 12 hours being most preferred. In some situations, it may be desirable to extend the time period for treatment significantly, however, where several days (2, 3, 4, 5, 6 or 7) to several weeks (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) lapse between the respective administrations. Repeated treatments with

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 58 -

one or both therapies is specifically contemplated. In specific embodiments, an anti-cancer therapy may be delivered which directly attacks the cancer cells in a manner to kill, inhibit or necrotize the cancer cell, in addition a therapeutic composition based an antiangiogenic and/or anti-lymphangiogenic effect also is administered. The antilymphangiogenic compositions may be administered following the other anti-cancer agent, before the other anti-cancer agent or indeed at the same time as the other anti-cancer agent.

Agents or factors suitable for use in a combined therapy are any chemical compound or treatment method that induces DNA damage when applied to a cell. Such agents and factors include radiation and waves that induce DNA damage such as,  $\gamma$ -irradiation, X-rays, UV-irradiation, microwaves, electronic emissions, and the like. A variety of chemical compounds, also described as "chemotherapeutic agents," function to induce DNA damage, all of which are intended to be of use in the combined treatment methods disclosed herein. Chemotherapeutic agents contemplated to be of use, include, *e.g.*, adriamycin, 5-fluorouracil (5FU), etoposide (VP-16), camptothecin, actinomycin-D, mitomycin C, cisplatin (CDDP) and even hydrogen peroxide. The invention also encompasses the use of a combination of one or more DNA damaging agents, whether radiation-based or actual compounds, such as the use of X-rays with cisplatin or the use of cisplatin with etoposide.

In treating cancer according to the invention, one would contact the tumor cells and/or the endothelia of the tumor vessels with an agent in addition to the antilymphangiogenic therapeutic agent. This may be achieved by irradiating the localized tumor site with radiation such as X-rays, UV-light,  $\gamma$ -rays or even microwaves. Alternatively, the tumor cells may be contacted with the agent by administering to the subject a therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition comprising a compound such as, adriamycin, 5-fluorouracil, etoposide, camptothecin, actinomycin-D, mitomycin C, or cisplatin. Kinase inhibitors also contemplated to be useful in combination

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 59 -

therapies with the peptides of the present invention. The agent may be prepared and used as a combined therapeutic composition, or kit, by combining it with a VEGF-C/D inhibitor peptide such as those described in U.S. Patent Application No. 60/262,476, filed January 17, 2001, incorporated herein by reference.

5 Agents that directly cross-link nucleic acids, specifically DNA, are envisaged to facilitate DNA damage leading to a synergistic, antineoplastic combination with antilymphangiogenic agents. Agents such as cisplatin, and other DNA alkylating agents may be used. Cisplatin has been widely used to treat cancer, with efficacious doses used in clinical applications of 20 mg/m<sup>2</sup> for 10 5 days every three weeks for a total of three courses. Cisplatin is not absorbed orally and must therefore be delivered via injection intravenously, subcutaneously, intratumorally or intraperitoneally.

Agents that damage DNA also include compounds that interfere with DNA replication, mitosis and chromosomal segregation. Such 15 chemotherapeutic compounds include adriamycin, also known as doxorubicin, etoposide, verapamil, podophyllotoxin, and the like. Widely used in a clinical setting for the treatment of neoplasms, these compounds are administered through bolus injections intravenously at doses ranging from 25-75 mg/m<sup>2</sup> at 21 day intervals for adriamycin, to 35-50 mg/m<sup>2</sup> for etoposide intravenously or 20 double the intravenous dose orally.

Agents that disrupt the synthesis and fidelity of nucleic acid precursors and subunits also lead to DNA damage. As such a number of nucleic acid precursors have been developed. Particularly useful are agents that have undergone extensive testing and are readily available. As such, agents such as 25 5-fluorouracil (5-FU), are preferentially used by neoplastic tissue, making this agent particularly useful for targeting to neoplastic cells. Although quite toxic, 5-FU, is applicable in a wide range of carriers, including topical, however intravenous administration with doses ranging from 3 to 15 mg/kg/day being commonly used.

30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 60 -

By way of example the following is a list of chemotherapeutic agents and the cancers which have been shown to be managed by administration of such agents. Combinations of these chemotherapeutics with the peptides of the present invention may prove to be useful in amelioration of various neoplastic disorders. Examples of these compounds include adriamycin (also known as doxorubicin), VP-16 (also known as etoposide), and the like, daunorubicin (intercalates into DNA, blocks DNA-directed RNA polymerase and inhibits DNA synthesis); mitomycin (also known as mutamycin and/or mitomycin-C) is an antibiotic isolated from the broth of *Streptomyces caespitosus* which has been shown to have antitumor activity; Actinomycin D also may be a useful drug to employ in combination with the peptides of the present invention because tumors which fail to respond to systemic treatment sometimes respond to local perfusion with dactinomycin which also is known to potentiate radiotherapy. It also is used in combination with primary surgery, radiotherapy, and other drugs, particularly vincristine and cyclophosphamide and has been found to be effective against Ewing's tumor, Kaposi's sarcoma, and soft-tissue sarcomas, choriocarcinoma, metastatic testicular carcinomas, Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphomas.

Bleomycin is a mixture of cytotoxic glycopeptide antibiotics isolated from a strain of *Streptomyces verticillius*, is effective in the management of the following neoplasms either as a single agent or in proven combinations with other approved chemotherapeutic agents in squamous cell carcinoma such as head and neck (including mouth, tongue, tonsil, nasopharynx, oropharynx, sinus, palate, lip, buccal mucosa, gingiva, epiglottis, larynx), skin, penis, cervix, and vulva. It has also been used in the treatment of lymphomas and testicular carcinoma.

Cisplatin has been widely used to treat cancers such as metastatic testicular or ovarian carcinoma, advanced bladder cancer, head or neck cancer, cervical cancer, lung cancer or other tumors and may be a useful combination with the peptides of the present invention. VP16 (etoposide) and is used primarily for treatment of testicular tumors, in combination with bleomycin and

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 61 -

cisplatin, and in combination with cisplatin for small-cell carcinoma of the lung. It is also active against non-Hodgkin's lymphomas, acute nonlymphocytic leukemia, carcinoma of the breast, and Kaposi's sarcoma associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Tumor Necrosis Factor [TNF; Cachectin] glycoprotein that kills some kinds of cancer cells, activates cytokine production, activates macrophages and endothelial cells, promotes the production of collagen and collagenases, is an inflammatory mediator and also a mediator of septic shock, and promotes catabolism, fever and sleep. TNF can be quite toxic when used alone in effective doses, so that the optimal regimens probably will use it in lower doses in combination with other drugs. Its immunosuppressive actions are potentiated by  $\gamma$ -interferon, so that the combination potentially is dangerous. A hybrid of TNF and interferon- $\alpha$  also has been found to possess anti-cancer activity.

Taxol an antimitotic agent original isolated from the bark of the ash tree, *Taxus brevifolia*, and its derivative paclitaxol have proven useful against breast cancer and may be used in the combination therapies of the present invention. Beneficial responses to vincristine have been reported in patients with a variety of other neoplasms, particularly Wilms' tumor, neuroblastoma, brain tumors, rhabdomyosarcoma, and carcinomas of the breast, bladder, and the male and female reproductive systems. Vinblastine also is indicated as a useful therapeutic in the same cancers as vincristine. The most frequent clinical use of vinblastine is with bleomycin and cisplatin in the curative therapy of metastatic testicular tumors. It is also active in Kaposi's sarcoma, neuroblastoma, and Letterer-Siwe disease (histiocytosis X), as well as in carcinoma of the breast and choriocarcinoma in women.

Melphalan also known as alkeran, L-phenylalanine mustard, phenylalanine mustard, L-PAM, or L-sarcosylsin, is a phenylalanine derivative of nitrogen mustard. Melphalan is a bifunctional alkylating agent which is active against selective human neoplastic diseases. Melphalan is the active L-isomer of the D-isomer, known as medphalan, which is less active against certain animal tumors, and the dose needed to produce effects on chromosomes is larger than

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 62 -

that required with the L-isomer. Melphalan is available in form suitable for oral administration and has been used to treat multiple myeloma. Available evidence suggests that about one third to one half of the patients with multiple myeloma show a favorable response to oral administration of the drug. Melphalan has  
5 been used in the treatment of epithelial ovarian carcinoma.

Cyclophosphamide is stable in the gastrointestinal tract, tolerated well and effective by the oral and parental routes and does not cause local vesication, necrosis, phlebitis or even pain. Chlorambucil, a bifunctional alkylating agent of the nitrogen mustard type that has been found active against  
10 selected human neoplastic diseases. Chlorambucil is indicated in the treatment of chronic lymphatic (lymphocytic) leukemia, malignant lymphomas including lymphosarcoma, giant follicular lymphoma and Hodgkin's disease. It is not curative in any of these disorders but may produce clinically useful palliation.

Other factors that cause DNA damage and have been used extensively include what are commonly known as  $\gamma$ -rays, X-rays, and/or the  
15 directed delivery of radioisotopes to tumor cells. Other forms of DNA damaging factors are also contemplated such as microwaves and UV-irradiation. It is most likely that all of these factors effect a broad range of damage DNA, on the precursors of DNA, the replication and repair of DNA, and the assembly and maintenance of chromosomes. Dosage ranges for X-rays range from daily  
20 doses of 50 to 200 roentgens for prolonged periods of time (3 to 4 weeks), to single doses of 2000 to 6000 roentgens. Dosage ranges for radioisotopes vary widely, and depend on the half-life of the isotope, the strength and type of radiation emitted, and the uptake by the neoplastic cells.

The skilled artisan is directed to "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, chapter 33, in particular pages 624-652. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being  
25 treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human  
30 administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 63 -

The inventors propose that the regional delivery of the therapy to patients with VEGFR-3-linked cancers will be a very efficient method for delivering a therapeutically effective gene to counteract the clinical disease. Similarly, the chemo- or radiotherapy may be directed to a particular, affected region of the subjects body. Alternatively, systemic delivery of expression construct and/or the agent may be appropriate in certain circumstances, for example, where extensive metastasis has occurred.

In addition to the anticancer therapeutics discussed above, it is contemplated that the peptides of the invention may be combined with other angiogenesis inhibitors. The peptides of the present invention are expected to have both anti-lymphangiogenic and anti-angiogenic properties. Many anti-angiogenic drugs also may have anti-lymphangiogenic properties. <http://cancertrials.nci.nih.gov/news/angio> is a website maintained by the National Institutes of Health which provides current information on the trials presently being conducted with anti-angiogenic agents. These agents include, for example, Marimastat (British Biotech, Annapolis MD; indicated for non-small cell lung, small cell lung and breast cancers); AG3340 (Agouron, LaJolla, CA; for glioblastoma multiforme); COL-3 (Collagenex, Newtown PA; for brain tumors); Neovastat (Aeterna, Quebec, Canada; for kidney and non-small cell lung cancer) BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb, Wallingford CT; for metastatic non-small cell lung cancer); Thalidomide (Celgen, for melanoma, head and neck cancer, ovarian, metastatic prostate, and Kaposi's sarcoma; recurrent or metastatic colorectal cancer (with adjuvants); gynecologic sarcomas, liver cancer; multiple myeloma; CLL, recurrent or progressive brain cancer, multiple myeloma, non-small cell lung, nonmetastatic prostate, refractory multiple myeloma, and renal cancer); Squalamine (Magainin Pharmaceuticals Plymouth Meeting, PA; non-small cell cancer and ovarian cancer); Endostatin (EntreMED, Rockville, MD; for solid tumors); SU5416 (Sugen, San Francisco, CA; recurrent head and neck, advanced solid tumors, stage IIIB or IV breast cancer; recurrent or progressive brain (pediatric); Ovarian, AML; glioma, advanced malignancies, advanced colorectal, von-Hippel Lindau disease,

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 64 -

advanced soft tissue; prostate cancer, colorectal cancer, metastatic melanoma, multiple myeloma, malignant mesothelioma: metastatic renal, advanced or recurrent head and neck, metastatic colorectal cancer); SU6668 (Sugen San Francisco, CA; advanced tumors); interferon- $\alpha$ ; Anti-VEGF antibody (National Cancer Institute, Bethesda MD; Genentech San Francisco, CA; refractory solid tumors; metastatic renal cell cancer, in untreated advanced colorectal); EMD121974 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; HIV related Kaposi's Sarcoma, progressive or recurrent Anaplastic Glioma ); Interleukin 12 (Genetics Institute, Cambridge, MA; Kaposi' s sarcoma) and IM862 (Cytran, Kirkland, WA; ovarian cancer, untreated metastatic cancers of colon and rectal origin and Kaposi' s sarcoma). The parenthetical information following the agents indicates the cancers against which the agents are being used in these trials. It is contemplated that any of these disorders may be treated with the peptides of the present invention either alone or in combination with the agents listed.

It is that the effects of any of these therapies on lymphatic endothelial cells may now be tested using the lymphatic endothelial cells isolated by the present invention. The availability of methods of isolating these cells will allow the development of more effective treatment protocols for the management of disorders of lymphatic endothelial cells.

#### F. Assay Formats for Identifying Additional Therapeutic Agents

The present invention also contemplates the use of the lymphatic endothelial cells of the present invention in the screening of compounds that modulate (increase or decrease) characteristics of these cells such as VEGFR-3 receptor activity, cell growth, lymphangiogenic potential and the like of these cells. These assays may make use of a variety of different formats and may depend on the kind of "activity" for which the screen is being conducted. Contemplated functional "read-outs" include VEGFR-3 binding to a substrate; ligand binding to a receptor, migration assays, or any other functional assay

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 65 -

normally employed to monitor endothelial cell activity. Such functional assays for endothelial cells are well known to those of skill in the art and some exemplary assays have been described elsewhere in this document.

5                   a.     **Assay Formats.**

The present invention provides methods of screening for inhibitors of VEGFR-3 activity by monitoring such activity in the presence and absence of the candidate substance and comparing such results. It is contemplated that this screening technique will prove useful in the general identification of a compound that will serve the purpose of inhibiting, decreasing or preventing the VEGFR-3 activity. Such compounds will be useful in the treatment of various disorders, such as for example, lymphomas, lymphedema, solid cancers characterized by neovascularization and other disorders such as those discussed in PCT/US99/06133, specifically incorporated herein by reference as providing examples of disorders involving VEGFR-3 receptor and, specifically, disorders including but not limited to hereditary lymphedema, lymphedemas, lymphangiomas, lymphangiosarcomas, lymphangiomatosis, lymphangiectasis, and cystic hygroma.

In these embodiments, the present invention is directed to a method for determining the ability of a candidate substance to inhibit the VEGFR-3 activity of the lymphatic endothelial cells of the present invention. The method includes generally the steps of:

- (i) providing an isolated lymphatic endothelial cell culture of the present invention;
- (ii) contacting said culture with a candidate substance; and
- (iii) comparing the activity or characteristics of the cell culture of step (iii) with the activity or characteristics of the cell culture observed in the absence of the candidate substance,

wherein an alteration in the activity or characteristics of the cell culture indicates that said candidate substance is a modulator of said cells.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 66 -

To identify a candidate substance as being capable of modulating the activity or altering the characteristics of the cells of the present invention in the assay above, one would measure or determine the activity or characteristics in the absence of the added candidate substance. One would then add the candidate substance to the cell culture and determine the activity or characteristics in the presence of the candidate substance. A candidate substance which alters the activity relative to that observed in its absence is indicative of a candidate substance with modulatory capability.

While the above method generally describes activity or characteristics of the cells in a culture of the present invention. It should be understood that candidate substance may be an agent that alters the production of VEGFR-3, thereby increasing or decreasing the amount of VEGFR-3 present as opposed to the per unit activity of the VEGFR-3. Similarly, the candidate may be one which increases or decreases the growth of cells in number and/or size. Moreover, while the above discussion is directed to using isolated lymphatic endothelial cell cultures, it should be understood that similar assays also may be set up to identify therapeutic agents that act on blood vascular endothelial cells or modulate receptors and components thereof.

**b. Candidate substances.**

As used herein the term "candidate substance" refers to any molecule that is capable of modulating an activity or characteristic of lymphatic endothelial cells. In specific embodiments, the molecule is one which modulates VEGFR-3 binding activity with its ligand. Alternatively, the candidate substance may modulate a downstream effect of VEGFR-3 receptor/ligand interaction, *e.g.*, receptor autophosphorylation. The candidate substance may be a protein or fragment thereof, a small molecule inhibitor, or even a nucleic acid molecule. It may prove to be the case that the most useful pharmacological compounds for identification through application of the screening assay will be compounds that are structurally related to other known modulators of VEGFR-3 activity. The active compounds may include fragments or parts of naturally-occurring

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 67 -

compounds or may be only found as active combinations of known compounds which are otherwise inactive. However, prior to testing of such compounds in humans or animal models, it will be necessary to test a variety of candidates to determine which have potential as therapeutic agents.

5 Accordingly, the active compounds may include fragments or parts of naturally-occurring compounds or may be found as active combinations of known compounds which are otherwise inactive. Accordingly, the present invention provides screening assays to identify agents which modulate cellular VEGF receptors. It is proposed that compounds isolated from natural sources,  
10 such as animals, bacteria, fungi, plant sources, including leaves and bark, and marine samples may be assayed as candidates for the presence of potentially useful pharmaceutical agents.

It will be understood that the pharmaceutical agents to be screened could also be derived or synthesized from chemical compositions or man-made  
15 compounds. Thus, it is understood that the candidate substance identified by the present invention may be polypeptide, polynucleotide, small molecule inhibitors or any other inorganic or organic chemical compounds that may be designed through rational drug design starting from known modulators of VEGF receptors.

The candidate screening assays are simple to set up and perform.  
20 Thus, in assaying for a candidate substance, after obtaining an isolated lymphatic endothelial cell population of the present invention, one will admix a candidate substance with the cells of the population, under conditions which would allow a lymphatic endothelial cells specific measurable activity to occur or specific characteristic to be observed. In this fashion, one can measure the ability of the  
25 candidate substance to modulate the activity or characteristic of the cell in the absence of the candidate substance.

"Effective amounts" in certain circumstances are those amounts effective to reproducibly alter a given event, activity or phenotype from the cell in  
30 comparison to their normal levels. Compounds that achieve significant appropriate changes in activity will be used.

Significant changes in activity or functional characteristic, *e.g.*, as measured using migration assays, cell proliferation assays, receptor binding, autophosphorylation and the like are represented by an increase/decrease in activity of at least about 30%-40%, and most preferably, by changes of at least about 50%, with higher values of course being possible. The active compounds of the present invention also may be used for the generation of antibodies which may then be used in analytical and preparatory techniques for detecting and quantifying further such modulators.

The isolated cell cultures of the invention are amendable to numerous high throughput screening (HTS) assays known in the art. For a review see Jayawickreme and Kost, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 629-634 (1997). Automated and miniaturized HTS assays are also contemplated as described for example in Houston and Banks *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 734-740 (1997)

There are a number of different libraries used for the identification of small molecule modulators including chemical libraries, natural product libraries and combinatorial libraries comprised of random or designed peptides, oligonucleotides or organic molecules. Chemical libraries consist of structural analogs of known compounds or compounds that are identified as hits or leads via natural product screening or from screening against a potential therapeutic target. Natural product libraries are collections of products from microorganisms, animals, plants, insects or marine organisms which are used to create mixtures of screening by, *e.g.*, fermentation and extractions of broths from soil, plant or marine organisms. Natural product libraries include polypeptides, non-ribosomal peptides and non-naturally occurring variants thereof. For a review see *Science* 282:63-68 (1998). Combinatorial libraries are composed of large numbers of peptides oligonucleotides or organic compounds as a mixture. They are relatively simple to prepare by traditional automated synthesis methods, PCR cloning or other synthetic methods. Of particular interest will be libraries that include peptide, protein, peptidomimetic, multiparallel synthetic collection, recombinatorial and polypeptide libraries. A review of combinatorial libraries and libraries created therefrom, see Myers *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 701-707 (1997).

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 69 -

A candidate modulator identified by the use of various libraries described may then be optimized to modulate activity of the cells through, for example, rational drug design.

5 It will, of course, be understood that all the screening methods of the present invention are useful in themselves notwithstanding the fact that effective candidates may not be found. The invention provides methods for screening for such candidates, not solely methods of finding them.

c. *In vitro* assays.

10 In one particular embodiment, the invention encompasses various binding assays. These can include screening for inhibitors of ligand-receptor complexes or for molecules capable of binding to VEGFR-3, as a substitute of the receptor function and thereby altering the binding of the natural ligand to this receptor and affecting its activity. In such assays, the cells may be either free in solution, or fixed to a support. Either the ligand or the receptor on the cell may be  
15 labeled, thereby permitting determination of binding.

Such assays are highly amenable to automation and high throughput. High throughput screening of compounds is described in WO  
20 84/03564. Large numbers of small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with the cells and washed. Bound polypeptide is detected by various methods. Combinatorial methods for generating suitable peptide test compounds are specifically contemplated.

Of particular interest in this format will be the screening of a  
25 variety of different mutants of the natural ligand for the VEGFR-3 receptor on these cells. These mutants, including deletion, truncation, insertion and substitution mutants, will help identify which domains are involved with the ligand/receptor interaction. Once this region has been determined, it will be possible to identify which of these mutants, which have altered structure but retain  
30 some or all of the functions of this interaction.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 70 -

Purified ligand can be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. However, non-neutralizing antibodies to the polypeptide can be used to immobilize the polypeptide to a solid phase. Also, fusion proteins containing a reactive region (preferably a terminal region) may be used to link the ligand active region to a solid phase.

Other forms of *in vitro* assays include those in which functional readouts are taken. In such assays, the substance would be formulated appropriately, given its biochemical nature, and contacted with the cell. Depending on the assay, culture may be required. The cell may then be examined by virtue of a number of different physiologic assays, as discussed above. Alternatively, molecular analysis may be performed in which the cells characteristics are examined. This may involve assays such as those for protein expression, enzyme function, substrate utilization, mRNA expression (including differential display of whole cell or polyA RNA) and others.

#### G. Use of Cells in Diagnostic Assays

In certain embodiments, the methods of the present invention may be used for the diagnosis of conditions or diseases with which the aberrations in the function or activity of components of the cells, e.g., VEGFR-3/ligand interaction. For example, the cells from a patient suspected of having a disorder associated with lymphatic endothelial cell may be isolated using the methods of the present invention. Polynucleotide sequences from the cells may be used in hybridization or PCR assays to detect the presence of disease related expression. Such methods may be qualitative or quantitative in nature and may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin, chip and ELISA technologies. All of these techniques are well known in the art and are the basis of many commercially available diagnostic kits.

In addition such assays may be useful in evaluating the efficacy of a particular therapeutic treatment regime in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 71 -

the diagnosis of disease, a normal or standard profile for e.g., VEGFR-3 receptor expression needs to be established. This generally involves obtaining lymphatic endothelial cells from normal subjects, and performing suitable hybridization or amplification of disease markers therefrom. Standard hybridization may be  
5 quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of the marker. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from cells samples from subjects being diagnosed for a given disorder. Deviation between standard and subject values establishes the presence of disease.

10 Once disease is established, a therapeutic agent is administered, and a treatment profile is generated. Such assays may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values in the profile progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

15 PCR as described in U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,965,188. Oligomers for use in such assays are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source as described herein above. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation and one with antisense, employed under optimized  
20 conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantitation of closely related DNA or RNA sequences.

25 Additionally, methods to quantitate the expression of a particular molecule include radiolabeling (Melby *et al.*, *J Immunol Methods* 159: 235-44, 1993) or biotinylating (Duplaa *et al.*, *Anal Biochem* 229-36, 1993) nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantitation of multiple samples may be  
30 speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantitation.. A definitive diagnosis of this type may allow

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 72 -

health professionals to begin aggressive treatment and prevent further worsening of the condition. Similarly, further assays can be used to monitor the progress of a patient during treatment.

5 **H. Kits**

The present invention concerns kits for isolating lymphatic endothelial cells using the methods described above. Such kits may include kits, standard VEGF receptor ligands, buffers and the like. As the present invention identifies specific antibodies that may be employed to specifically detect lymphatic  
10 endothelial cells, either or both of such components may be provided in the kit. The kits may thus comprise, in suitable container means, a lymphatic or blood vascular endothelial cell component to act as a standard, a first antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells, and an immunodetection reagent.

15 Still other compositions of the present invention that can be supplied in a kit format are the lymphatic endothelial cells substantially free of other contaminating cells that are non-lymphatic in lineage and the blood vascular endothelial cells substantially free of other contaminating cells that are non-vascular in lineage. The cells may be supplied as a proliferating culture in a  
20 culture flask or may be provided as cryopreserved cells. The cell-based kits also may comprise suitable media, growth supplements and instructions for growth conditions to be used for growing the cells.

In certain embodiments, the first antibody that binds to the lymphatic endothelial cells may be bound to a solid support, such as a column  
25 matrix or well of a microtiter plate.

The immunodetection reagents of the kit may take any one of a variety of forms, including those detectable labels that are associated with or linked to the given antibody or antigen, and detectable labels that are associated with or attached to a secondary binding ligand. Exemplary secondary ligands are  
30 those secondary antibodies that have binding affinity for the first antibody or antigen, and secondary antibodies that have binding affinity for a human antibody.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 73 -

Further suitable immunodetection reagents for use in the present kits include the two-component reagent that comprises a secondary antibody that has binding affinity for the first antibody or antigen, along with a third antibody that has binding affinity for the second antibody, the third antibody being linked to a detectable label.

The kits may further comprise a suitably aliquoted amounts of proliferating or cryopreserved cells, whether labeled or unlabeled, as may be used to prepare a standard curve for a detection assay.

The kits may contain antibody-label conjugates either in fully conjugated form, in the form of intermediates, or as separate moieties to be conjugated by the user of the kit. The components of the kits may be packaged either in aqueous media or in lyophilized form.

The container means of the kits will generally include at least one vial, test tube, flask, bottle, syringe or other container means, into which the antibody or antigen may be placed, and preferably, suitably aliquoted. Where a second or third binding ligand or additional component is provided, the kit will also generally contain a second, third or other additional container into which this ligand or component may be placed. The kits of the present invention will also typically include a means for containing the antibody, antigen, and any other reagent containers in close confinement for commercial sale. Such containers may include injection or blow-molded plastic containers into which the desired vials are retained.

#### **I. Imaging Lymphatic Endothelial Cells**

An additional use for methods of the present invention is in tissue imaging to determine the presence of lymphatic endothelial cells in particular tissue. The use of such diagnostic imaging is particularly suitable in obtaining an image of, for example, a tissue from a patient suffering from a lymphatic disorder. Additionally, lymphatic vessels in or near a tumor mass also may be imaged by the present invention. Previously, those of skill in the art have employed VEGFR-3 antibodies for imaging purposes as described for example

in U.S. Patent 6,107,046 (incorporated herein by reference). It is contemplated that the 2E11D11 and related antibodies described in the present invention may be employed for imaging in a manner analogous to the antibody-based methods disclosed in U.S. Patent No. 6,107,046.

5           The imaging agents of the present invention (*i.e.*, the antibodies or antibody derivatives described herein throughout) may be coupled either covalently or noncovalently to a suitable supramagnetic, paramagnetic, electron-dense, echogenic or radioactive agent to produce a targeted imaging agent. In such embodiments, the imaging agent will localize to the lymphatic endothelial cells and the area of localization be imaged using the above  
10           referenced techniques.

          Many appropriate imaging agents are known in the art, as are methods of attaching the labeling agents to the peptides of the invention (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,965,392, U.S. Patent No. 4,472,509, U.S. Patent No. 5,021,236 and U.S. Patent No. 5,037,630, incorporated herein by reference).  
15           The imaging agents are administered to a subject in a pharmaceutically acceptable carrier, and allowed to accumulate at a target site having the lymphatic endothelial cells. This imaging agent then serves as a contrast reagent for X-ray, magnetic resonance, sonographic or scintigraphic imaging of the target site. The antibodies of the present invention are a convenient and  
20           important addition to the available arsenal of medical imaging tools for the diagnostic investigation of cancer, lymphedema and other lymphatic endothelial cell disorders. Of course, it should be understood that the imaging may be performed *in vitro* where tissue from the subject is obtained through a biopsy, and the presence of lymphatic endothelial cells is determined with the aid of the  
25           imaging agents described herein in combination with histochemical techniques for preparing and fixing tissues.

          Paramagnetic ions useful in the imaging agents of the present invention include for example chromium (III), manganese (II), iron (III), iron  
30           (II), cobalt (II), nickel (II) copper (II), neodymium (III), samarium (III), ytterbium(III), gadolinium (III), vanadium (II), terbium (III), dysprosium (III),

holmium (III) and erbium (III). Ions useful for X-ray imaging include but are not limited to lanthanum (III), gold(III), lead (II) and particularly bismuth (III).

Radioisotopes for diagnostic applications include for example, <sup>211</sup>astatine, <sup>14</sup>carbon, <sup>51</sup>chromium, <sup>36</sup>chlorine, <sup>57</sup>cobalt, <sup>67</sup>copper, <sup>152</sup>Eu, <sup>67</sup>gallium, <sup>3</sup>hydrogen, <sup>123</sup>iodine, <sup>125</sup>iodine, <sup>111</sup>indium, <sup>59</sup>iron, <sup>32</sup>phosphorus, <sup>186</sup>rhenium, <sup>75</sup>selenium, <sup>35</sup>sulphur, <sup>99m</sup>technetium and <sup>90</sup>yttrium.

The antibodies of the present invention may be labeled according to techniques well known to those of skill in the art. For example, the peptides can be iodinated by contacting the peptide with sodium or potassium iodide and a chemical oxidizing agent such as sodium hypochlorite or an enzymatic oxidant such as lactoperoxidase. Antibodies may be labeled with technetium-99m by ligand exchange, for example, by reducing pertechnetate with stannous solution, chelating the reduced technetium onto a Sephadex column and applying the antibody to the column. These and other techniques for labeling proteins and peptides are well known to those of skill in the art.

#### J. Pharmaceutical Compositions

In many aspects, the cells or other compositions discussed in the present invention will be used for clinical purposes. As such, it will be necessary to prepare these formulations as pharmaceutical compositions, *i.e.*, in a form appropriate for *in vivo* applications. Generally, this will entail preparing compositions that are essentially free of pyrogens, as well as other impurities that could be harmful to humans or animals.

One will generally desire to employ appropriate salts and buffers to render delivery vectors stable and allow for uptake by target cells. Buffers also will be employed when recombinant cells are introduced into a patient. Aqueous compositions of the present invention comprise an effective amount of the peptide or an expression vector to cells, dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or aqueous medium. Such compositions also are referred to as inocula. The phrase "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 76 -

adverse, allergic, or other untoward reactions when administered to an animal or a human. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except  
5 insofar as any conventional media or agent is incompatible with the vectors or cells of the present invention, its use in therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

10 The active compositions of the present invention include classic pharmaceutical preparations. Administration of these compositions according to the present invention will be via any common route so long as the target tissue is available via that route. The pharmaceutical compositions may be introduced into the subject by any conventional method, *e.g.*, by intravenous, intradermal,  
15 intramuscular, intramammary, intraperitoneal, intrathecal, retrobulbar, intrapulmonary (*e.g.*, term release); by oral, sublingual, nasal, anal, vaginal, or transdermal delivery, or by surgical implantation at a particular site. The treatment may consist of a single dose or a plurality of doses over a period of time.

20 The active compounds may be prepared for administration as solutions of free base or pharmacologically acceptable salts in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions also can be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a  
25 preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy  
30 syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 77 -

microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle that contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques that yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 78 -

For oral administration the compositions may be incorporated with excipients and used in the form of non-ingestible mouthwashes and dentifrices. A mouthwash may be prepared incorporating the active ingredient in the required amount in an appropriate solvent, such as a sodium borate solution (Dobell's Solution). Alternatively, the active ingredient may be incorporated into an antiseptic wash containing sodium borate, glycerin and potassium bicarbonate. The active ingredient may also be dispersed in dentifrices, including: gels, pastes, powders and slurries. The active ingredient may be added in a therapeutically effective amount to a paste dentifrice that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants.

The compositions of the present invention may be formulated in a neutral or salt form. Pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups also can be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

The compositions of the present invention may be formulated in a neutral or salt form. Pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups also can be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

30

Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions, drug release capsules and the like. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration.

"Unit dose" is defined as a discrete amount of a therapeutic composition dispersed in a suitable carrier. For example, where polypeptides are being administered parenterally, the polypeptide compositions are generally injected in doses ranging from  $1\mu\text{g}/\text{kg}$  to  $100\text{mg}/\text{kg}$  body weight/day, preferably at doses ranging from  $0.1\text{mg}/\text{kg}$  to about  $50\text{mg}/\text{kg}$  body weight/day.

Parenteral administration may be carried out with an initial bolus followed by continuous infusion to maintain therapeutic circulating levels of drug product. Those of ordinary skill in the art will readily optimize effective dosages and administration regimens as determined by good medical practice and the clinical condition of the individual patient.

The frequency of dosing will depend on the pharmacokinetic parameters of the agents and the routes of administration. The optimal pharmaceutical formulation will be determined by one of skill in the art depending on the route of administration and the desired dosage. See for example Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publ. Co, Easton PA 18042) pp 1435-1712, incorporated herein by reference. Such formulations may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release and rate of *in vivo* clearance of the administered agents. Depending on the route of administration, a suitable dose may be calculated according to body weight, body surface areas or organ size. Further refinement of the calculations necessary to determine the appropriate treatment dose is routinely made by those

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 80 -

of ordinary skill in the art without undue experimentation, especially in light of the dosage information and assays disclosed herein as well as the pharmacokinetic data observed in animals or human clinical trials.

5       Appropriate dosages may be ascertained through the use of established assays for determining blood clotting levels in conjunction with relevant dose-response data. The final dosage regimen will be determined by the attending physician, considering factors that modify the action of drugs, *e.g.*, the drug's specific activity, severity of the damage and the responsiveness of the patient, the age, condition, body weight, sex and diet of the patient, the  
10       severity of any infection, time of administration and other clinical factors. As studies are conducted, further information will emerge regarding appropriate dosage levels and duration of treatment for specific diseases and conditions.

      In gene therapy embodiments employing viral delivery, the unit dose may be calculated in terms of the dose of viral particles being administered.  
15       Viral doses include a particular number of virus particles or plaque forming units (pfu). For embodiments involving adenovirus, particular unit doses include  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  or  $10^{14}$  pfu. Particle doses may be somewhat higher (10 to 100-fold) due to the presence of infection defective particles.

20       It will be appreciated that the pharmaceutical compositions and treatment methods of the invention may be useful in fields of human medicine and veterinary medicine. Thus the subject to be treated may be a mammal, preferably human or other animal. For veterinary purposes, subjects include for example, farm animals including cows, sheep, pigs, horses and goats,  
25       companion animals such as dogs and cats, exotic and/or zoo animals, laboratory animals including mice rats, rabbits, guinea pigs and hamsters; and poultry such as chickens, turkey ducks and geese.

**K. Examples**

The following example presents preferred embodiments and techniques, but is not intended to be limiting. Those of skill in the art will, in light of the present disclosure, appreciate that many changes can be made in the specific materials and methods which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

**EXAMPLE 1****Materials and Methods**

10

The present example provides details of materials and methods employed throughout the application and in the Examples presented herein below.

*Antibodies and growth factors.* The primary antibodies used in immunofluorescence were mouse mAbs against human CD31 (Dako), vWF (Dako) or VEGFR-3 (clones 9D9F9, 2E11D11 and 7B3F9; Jussila *et al.*, *Cancer Res.* 58:1599-1604, 1998), rabbit antiserum against human LYVE-1 (Banerji *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 144(4)789-801, 1999), affinity purified rabbit anti-human podoplanin (Breiteneder-Geleff *et al.*, *et al.*, *Am. J. Path.*, 154(2) 385-394, 1999) or rabbit anti-human VEGF-C (882; Joukov *et al.*, *EMBO J.*, 15:290-298, 1996). Monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen (clone PC10) was from Santa Cruz Biotechnology. FITC- or TRITC-conjugated goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG and donkey anti-mouse IgG were obtained from Jackson Immunoresearch. The rabbit antiserum against human VEGFR-2 was a kind gift from Lena Claesson-Welsh (Uppsala, Sweden) and affinity purified goat anti-human VEGFR-1 was from R&D Systems. Rabbit polyclonal antibodies against Akt, MAPK or CREB were from New England Biolabs. Basic FGF, recombinant human VEGF165 and recombinant mature human VEGF-D (consisting of residues Phe93 to Ser201) were from R&D. Recombinant human PlGF-1 was a kind gift from Graziella Persico (Naples, Italy). The recombinant human VEGF-C (Thr103 to Leu215),

20  
25  
30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 82 -

VEGF-C156S (Thr103 to Ile225), ORFV2-VEGF and human VEGFR-3-Ig were produced and purified as described earlier (Joukov *et al.*, *EMBO J.*, 16:3898-3911, 1997; Mäkinen *et al.*, *Nature Med.*, 7:199-205, 2001; Wise *et al.*, *Proc. Nat' l Acad Sci.*, 96:3071-3076, 1999). Wortmannin, LY294002, PD98059 and Bisindolylmaleimide I (GF109203X) were from Calbiochem and U0126 from Promega (Madison, WI).

**Cell culture.** HMVE and HUVE cells were obtained from PromoCell (Heidelberg, Germany), cultured in endothelial cell medium provided by the supplier and used at passages 3 to 7. The murine Ba/F3 pre-B lymphocytes were cultured in DMEM supplemented with 10 % fetal calf serum, glutamine and 2 ng/ml IL-3 (Calbiochem).

**Immunofluorescence staining.** Cells on glass coverslips were fixed in 4 % paraformaldehyde (PFA) or methanol:acetone (1:1) for 10 min. If required, the cells were permeabilised with 0.1 % TritonX-100 in PBS for 5 min. After blocking in 5 % goat serum, the cells were stained with the primary antibodies for 30 min at room temperature, followed by incubation with FITC- or TRITC-conjugated secondary antibodies (15 µg/ml) for 30 min. Hoechst 33258 fluorochrome (Sigma, 0.5 µg/ml in PBS) was used for the staining of the nuclei. If cells were stained alive, the procedure was carried out on ice, followed by fixation in PFA.

**Isolation of lymphatic and blood vascular endothelial cells.** Monoclonal VEGFR-3 antibodies (clone 2E11D11) or polyclonal podoplanin antibodies, MACS colloidal super-paramagnetic MicroBeads conjugated to rat anti-mouse IgG1 or to goat anti-rabbit IgG antibodies (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), MACS MS separation columns and MiniMACS separator (Miltenyi Biotech) were used for cell sorting according to the instructions of the manufacturer.

**Bioassay for VEGFR stimulation.** Viability assays using Ba/F3 pre-B cells expressing VEGFR-2/EpoR (Achen *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-53 1998; Stacker *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:34884-34892, 1999) or VEGFR-3/EpoR (Achen *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 267: 2505-2515, 2000) were

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 83 -

carried out as described earlier (Mäkinen *et al.*, *Nature Med.*, 7:199-205, 2001). For the generation of Ba/F3 VEGFR-1/EpoR cells, the chimeric receptor was constructed by introducing a BglII site into the human VEGFR-1 cDNA prior to the sequence encoding the transmembrane domain followed by ligation of BglII-NotI fragment consisting of the transmembrane and intracellular domains of mouse erythropoietin receptor (Achen *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 267: 2505-2515, 2000). The VEGFR-1/EpoR cDNA was subcloned into the pEF-BOS expression vector (Mizushima and Nagata, *Nucleic Acid Res.*, 18:5322, 1990) and co-transfected into Ba/F3 cells with pCDNA3.1(+)-Zeo vector (Invitrogen). Stable cell pools were generated by selection with 250 mg/ml zeocin.

**Biosensor Analysis.** All protein preparations were analysed for homogeneity and buffer exchanged by micropreparative size exclusion HPLC using a Superose 12 (3.2/30) column installed in a SMART<sup>™</sup> system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) immediately prior to use (Nice and Catimel, *Bioessays*, 21:339-352, 1999). The concentrations of VEGF-C and VEGF-D were determined by absorbance at 280 nm using E280 1% 1 cm of 0-65. Receptor domains were coupled to the carboxymethylated dextran layer of a CM5 sensor chip using standard amine coupling chemistry (Nice and Catimel, *Bioessays*, 21:339-352, 1999) for analysis of ligand binding using a BIAcore 2000 optical biosensor (BIAcore, Uppsala, Sweden). The levels immobilized were 3,000 RU and 7,000 RU for VEGFR-2 and VEGFR-3, respectively. Following immobilization, residual activated ester groups were blocked by treatment with 1 M ethanolamine hydrochloride pH 8.5 followed by washing with 10 mM diethylamine to remove non-covalently bound material. 10 mM diethylamine or 10 mM HCl was used to regenerate the sensor surface between analyses for VEGF-D or VEGF-C binding, respectively. Samples were diluted in running buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% Tween 20). The apparent binding affinities of VEGF-C and VEGF-C156S to receptor domains were determined by analysis of the initial dissociation phase to obtain the  $k_d$ , which was then used to constrain a global analysis of the association region of the curves, assuming a 1:1 Langmuirian

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 84 -

model. Data were analysed using BLAevaluation 3.0 (BLAcore, Uppsala, Sweden) as described previously (Catimel *et al.*, *J. Chromatogr.*, 776:15-30, 1997).

5                    **Analysis of endothelial cell apoptosis.** For the apoptosis assay, 70,000 cells per well were seeded into 24-well plates. Treatments were done in duplicates and apoptosis was detected by measuring cytoplasmic histone-associated DNA fragments using the death detection ELISA PLUS kit (Roche, Indianapolis, IN). The following ranges of growth factor concentrations were tested: bFGF 10-20 ng/ml, PlGF-1 50-1000 ng/ml, VEGF 10-50 ng/ml, 10                    VEGF-C 50-1000 ng/ml, VEGF-D 50-1000 ng/ml, VEGF-C156S 50-1000 ng/ml and VEGF-E 50-1000 ng/ml. Annexin-V-FLUOS (Roche, Indianapolis, IN) was used to detect phosphatidylserine on the apoptotic cells by fluorescence microscopy according to the instructions of the manufacturer. The simultaneous staining with propidium iodide (1 µg/ml) was used for discriminating possible 15                    necrotic cells.

**Western blot analysis.** Endothelial cells were cultured on 35 mm dishes to near confluence, starved for 24 h in serum free medium and stimulated as indicated. Wortmannin (30 nM), LY294002 (10-20 µM), PD98059 (10-25 µM) or GF109203X (2.5-5 µM) were added 1-3 h before 20                    stimulation, where indicated. DMSO, into which the inhibitors were dissolved, was used as a control. After the stimulation, the cells were lysed in lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaF, 1 % TritonX-100 supplemented with 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.5 mM PMSF, 100 U/ml aprotonin and 10 µg/ml leupeptin). Clarified lysates were separated by 25                    SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted using the phosphospecific antibodies for Akt-Ser473, Akt-Thr308, p42/44 MAPK-Thr202/Tyr204 or CREB-Ser133. The bound antibodies were detected using horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence detection system. The blots were stripped and reprobed with 30                    antibodies against Akt, MAPK or CREB for quantification by reading the optical densities of the signals with Multi-Analyst 2.0.1 program (Bio-Rad).

*Cell migration assay.* Migration assays were performed in a 48-well chemotaxis Boyden chamber (Neuroprobe Inc.). Eight micron Nucleopore polycarbonate filters (Corning) were coated with 100 µg/ml of collagen type I (Upstate Biotechnology) overnight at +4°C and air dried. The filters were placed over the lower chamber wells containing the growth factors in serum-free growth medium supplemented with 0.2 % BSA. For blocking experiments, VEGF and VEGF-C156S were preincubated with a ten-fold molar excess of soluble human VEGFR-3 for 30 min. HMVE cells were suspended in the growth medium and 10,000 cells in 50 µl were added to each well in the upper chamber. The cells were allowed to migrate for 6 h at 37°C after which the filter was fixed with cold methanol and stained with hematoxylin (Meyer). Non-migrated cells on the upper surface of the filter were removed by scraping with a cotton swab and the number of migrated cells was counted. The assays were run in quadruplicate and repeated with three different batches of HMVECs.

#### EXAMPLE 2

##### **Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Consist of Distinct Populations of Blood Vascular and Lymphatic Endothelial Cells**

The functions of different VEGF receptors have been extensively studied in transfected cell lines, but the lack of an appropriate cellular background can compromise results obtained from such studies. Therefore, the inventors set out to separate microvascular endothelial cells into specific constituent populations of endothelial cells of one type which were substantially free of other types of endothelial cells. More particularly, the inventors generated populations of lymphatic endothelial cells that were substantially free of blood vascular endothelial cells and *vice versa*. In order to pursue this endeavor and to elucidate VEGFR-3 signaling pathways promoting endothelial cell survival, the inventors used primary endothelial cells, human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). It was

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 86 -

determined that all three VEGF tyrosine kinase receptors and the neuropilin-1 co-receptor were expressed in cultures of both HMVE and HUVE cells. These observation are explained in further detail in the present Example.

5 To examine expression of VEGFR mRNAs in primary human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and in the porcine aortic endothelial (PAE) cell line, a Northern blot containing 8  $\mu$ g of the mRNAs was probed with radiolabeled cDNA fragments of human VEGF receptors and with b-actin for the control of equal loading. Numbers to the right denote the sizes of the transcripts (kb). VEGFR-3  
10 mRNA expression was stronger in microvascular endothelial cells and therefore these cells were used for the study of VEGFR-3 signaling in subsequent experiments.

Using immunofluorescence, the inventors demonstrated that HMVE cells consist of two distinct populations of blood vascular and lymphatic  
15 endothelial cells. Briefly, the immunofluorescence double-staining was performed using antibodies against VEGFR-3 and LYVE-1 with counterstaining of the nuclei by Hoechst fluorochrome. The immunofluorescence staining showed that LYVE-1 expression is not detected in all VEGFR-3 positive cells while some VEGFR-3 negative cells are also weakly stained with LYVE-1 antibodies. Immunolabeling  
20 with antibodies against podoplanin, vWF and CD31 also was performed and the nuclei were again stained with the Hoechst fluorochrome. This set of double staining studies revealed that vWF expression occurs primarily in the podoplanin negative cells but weak expression is also detected on podoplanin positive cells. The staining for VEGFR-3, LYVE-1, the counterstaining of the nuclei by  
25 Hoechst fluorochrome and the staining for podoplanin were performed using live cells on ice whereas the stains for vWF and CD31 were performed after PFA fixation.

Thus, the immunofluorescence microscopy showed that only a subset of the HMVE cells was positive for VEGFR-3. Antigen-blocking  
30 experiments and use of three different monoclonal antibodies indicated that the VEGFR-3 staining was specific. The VEGFR-3 expressing cells grew in distinct

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 87 -

islands surrounded by VEGFR-3 negative cells. Based on the previous immunostaining results from human tissues (Jussila *et al.*, *Cancer Res.* 58:1599-1604, 1998; Lymboussaki *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 153: 395-403, 1998), it was assumed that the former represented lymphatic and the latter blood vascular endothelial cells. Most, but not all of these cells and a few of the VEGFR-3 negative cells were stained for the lymphatic endothelial cell marker LYVE-1 (Banerji *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 144(4)789-801, 1999). The VEGFR-3 positive cells were also specifically stained for podoplanin, another recently identified lymphatic endothelial marker (Breiteneder-Geleff *et al.*, *et al.*, *Am. J. Path.*, 154(2) 385-394, 1999). Similar results were obtained also in FACS analysis. The vWF antigen was more prominently expressed in the blood vascular endothelial cells which were negative for podoplanin. The pan-endothelial cell marker CD31 was detected in all cells, confirming the absence of contaminating non-endothelial cells. Also, according to a Western blot analysis, VEGFR-1 and VEGFR-2 were detected in both endothelial cell populations. Among the freshly isolated HMVE cells, the proportion of VEGFR-3 positive cells was in general over 50%, decreasing upon repeated subculture.

### EXAMPLE 3

#### 20 Analysis of VEGFR Specific Ligands Used for the Cell Survival Experiments

VEGF is an endothelial cell mitogen which has been also shown to protect endothelial cells from starvation and TNF- $\alpha$  induced apoptosis via activation of VEGFR-2 (Gerber *et al.*, *J. Biol Chem.*, 273:30336-30343, 1998; Spyridopoulos *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 29:1321-1330, 1997). The abilities of the different VEGFRs to promote endothelial cell survival were compared by using VEGFR specific VEGFs. The specificities of the growth factors used were determined using a cell survival bioassay. For the bioassay, Ba/F3 pre-B cells were stably transfected with a chimeric receptor containing the extracellular domain of human VEGFR-1, VEGFR-2 or VEGFR-3 fused with the transmembrane and cytoplasmic domains of the mouse erythropoietin receptor.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 88 -

As expected, only VEGF and PlGF were able to induce the survival of VEGFR-1/EpoR cells (FIG. 1A). VEGF, VEGF-C, VEGF-D and orf viral NZ2 (ORFV2-VEGF) were able to support the survival of the VEGFR-2/EpoR expressing cells whereas the mutant VEGF-C156S that binds to and activates only VEGFR-3 (Joukov *et al.*, *EMBO J.*, 15:290-298, 1998) did not affect the survival of these cells (FIG. 1B). Instead, VEGFR-3/EpoR expressing cells survived in the presence of VEGF-C, VEGF-C156S and VEGF-D (FIG. 1C). On the basis of these experiments, VEGF-C concentration of 100 ng/ml and VEGF-C156S concentration of 500 ng/ml, which gave maximal viability in VEGFR-3/EpoR cell survival assays, were chosen for the subsequent apoptosis and signaling experiments.

Biosensor analysis was used to further investigate the interactions of VEGF-C and VEGF-C156S with VEGFR-2 and VEGFR-3. Analysis of the biosensor binding curves confirmed that VEGF-C156S binds only to the extracellular domain of VEGFR-3, whereas wild type VEGF-C bound to both VEGFR-2 and VEGFR-3 receptors (FIG. 1D-FIG. 1G). The analysis of the kinetics of the VEGF-C/ VEGFR interactions (Table I) revealed lower KD values than reported previously using radioactive ligand binding analysis in cultured receptor expressing cells (Joukov *et al.*, *EMBO J.*, 16:3898-3911, 1997). However, in both assays the affinity of VEGF-C was higher towards VEGFR-3 than towards VEGFR-2. When compared to VEGF-C, the affinity of VEGF-C156S to VEGFR-3 was significantly lower, but of similar magnitude as reported for the interaction of mouse VEGF-D with mouse VEGFR-3 (Baldwin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:19166-19171, 2001).

Table I

Kinetic data derived from the biosensor analysis of the interaction of VEGF-C and VEGF-C156S with VEGFR-2 and VEGFR-3. The data were extracted by global fitting using BLAevaluation 3.0 assuming a 1:1 Langmuirian model with mass transfer.

Ligand	Receptor	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
hVEGF-C	hVEGFR-2	$5.5 \times 10^4$	$12.3 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-8}$
hVEGF-C	hVEGFR-3	$13.6 \times 10^4$	$6.05 \times 10^{-4}$	$0.44 \times 10^{-8}$
hVEGF-C <sub>156S</sub>	hVEGFR-2	no binding	no binding	no binding
hVEGF-C <sub>156S</sub>	hVEGFR-3	$0.35 \times 10^4$	$4.0 \times 10^{-4}$	$11.5 \times 10^{-8}$
hVEGF-D*	hVEGFR-2	$1.3 \times 10^4$	$6.3 \times 10^{-4}$	$4.8 \times 10^{-8}$
hVEGF-D*	hVEGFR-3	$1.8 \times 10^4$	$12 \times 10^{-4}$	$6.5 \times 10^{-8}$
mVEGF-D*	mVEGFR-2	no binding	no binding	no binding
mVEGF-D*	mVEGFR-3	$0.8 \times 10^4$	$7.0 \times 10^{-4}$	$8.9 \times 10^{-8}$

\*=reference: Baldwin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:19166-19171, 2001

Abbreviations: h=human; m=mouse

The ligands used in the study by Baldwin *et al.*, are the mature forms of VEGF-D, as are VEGF-C and VEGF-C156S used in this study. All other receptors used were bivalent immunoglobulin fusion proteins except mVEGFR-2 which was monovalent.

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 90 -

**EXAMPLE 4****VEGFR-3 Signaling Protects Endothelial Cells from  
Serum Starvation-induced Apoptosis**

5 All VEGFs capable of stimulating VEGFR-2 or VEGFR-3, or  
both, including VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S, VEGF-D and ORFV2-VEGF,  
were able to protect microvascular endothelial cells from starvation induced  
DNA degradation, which was measured as the amount of cytoplasmic  
histone-associated DNA fragments (FIG. 2A). In contrast, PlGF, which binds  
10 only to VEGFR-1, did not give significant protection. The lack of VEGFR-1  
mediated survival signals was also suggested by the fact that the VEGFR-2  
specific ligand, ORFV2-VEGF, gave nearly comparable protection to that  
obtained with VEGF. VEGF-C and VEGF-C156S inhibited dose-dependently  
the accumulation of oligo- and mononucleosomes into the serum-deprived  
15 lymphatic endothelial cells. The maximum effect of VEGF-C was achieved at  
100 ng/ml and that of VEGF-C156S at 500 ng/ml.

**EXAMPLE 5****Isolation of the VEGFR-3 expressing lymphatic endothelial cells**

20 In order to compare the effects of the VEGFs on the survival of  
lymphatic versus blood vascular endothelial cells, specific antibodies and  
magnetic microbeads were used to isolate and to culture the VEGFR-3 positive  
and negative cells. Briefly, in this protocol, three separate sets of VEGFR-3  
expressing lymphatic endothelial cells were cultured: a first set was cultured in  
25 complete medium containing 5 % serum, the second set was cultured in  
complete medium containing 5% serum and supplemented with VEGF (10  
ng/ml,) and the third set was cultured in complete medium containing 5% serum  
supplemented with VEGF-C (100 ng/ml). The VEGFR-3 positive cells were  
grown for five days after sorting in serum or supplemented with VEGF-C and  
30 then stained for podoplanin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The  
nuclei were stained with the Hoechst fluorochrome. If supplemented with

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 91 -

VEGF-C or VEGF, the cells were stained for PCNA. Immunofluorescence double-staining of non-sorted cells or VEGFR-3 negative and VEGFR-3 positive cell populations with antibodies against podoplanin or VEGFR-3 also was performed.

5           The lymphatic endothelial cell cultures were over 95 % pure according to immunofluorescence staining. The isolated VEGFR-3 positive cells did not adhere well on culture dishes and only few cells proliferated in the complete culture medium containing serum. However, if supplemented with either VEGF or VEGF-C, most of the podoplanin positive cells proliferated readily. In contrast, the blood vascular endothelial cells grew well without the addition of these factors.

10           The morphology of the isolated lymphatic endothelial cells was more elongated and the cells displayed several protrusions especially when cultured in the presence of VEGF-C. Immunofluorescence for podoplanin and VEGFR-3 colocalized to the same cells in non-sorted, VEGFR-3 negative and VEGFR-3 positive cell populations. In VEGF-C supplemented cultures, only cytoplasmic staining for VEGFR-3 was observed, consistent with internalization of the ligand-receptor complexes. In contrast, in the presence of serum or VEGF, VEGFR-3 was distributed on the cell surface.

20

#### EXAMPLE 6

##### VEGF-C Promotes Survival of Mainly the VEGFR-3 Expressing Lymphatic Endothelial Cells

25           The accumulation of cytoplasmic mono- and oligonucleosomes was measured as a sign of apoptosis in the two endothelial cell populations during serum starvation. In the VEGFR-3 expressing cells, both VEGF-C and VEGF promoted cell survival (FIG. 2B). However, for the VEGFR-3 negative cells VEGF-C was a less efficient survival factor, requiring five to tenfold higher concentrations for an equal effect as detected in VEGFR-3 positive cells. As expected, VEGF-C156S induced the survival of only the VEGFR-3 positive cells (FIG. 2B). These results confirmed that VEGFR-3 alone can transduce

30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 92 -

endothelial cell survival signals and that VEGF and VEGF-C target differentially blood vascular and lymphatic endothelial cells. The ability to selectively promote the growth of lymphatic endothelial cell population permits further enrichment of the cell culture for these types of cells.

5 Serum-deprivation induced apoptosis was also monitored by analyzing the exposure of phosphatidylserine at the cell surface using the fluorescence conjugated phospholipid-binding protein, Annexin-V. Annexin-V stained cells were detected after 24 hours of serum-starvation and by 72 hours of starvation, approximately 40 % of the adherent cells were apoptotic, although  
10 the cells were more resistant to apoptosis in early passage and at confluence.

Addition of VEGF to the starvation medium strongly decreased the number of cells displaying Annexin-V positivity as well as cell detachment. Annexin-V staining of the HMVE cells was performed after 72 hours of culture in serum-free medium alone (BSA) or with stimulation of VEGF or VEGF-C.  
15 Simultaneous staining using antibodies against podoplanin was used to distinguish lymphatic and blood vascular endothelial cells. Using this staining protocol, it was possible to detect apoptotic, Annexin-V positive lymphatic endothelial cells and apoptotic blood vascular endothelial cells. Again, the nuclei were counterstained with Hoechst fluorochrome. The Annexin-V positive cells  
20 were not stained with propidium iodide and thus they represented apoptotic, not necrotic cells. On the other hand, staining of the nuclei by the Hoechst fluorochrome revealed pyknotic nuclei typical for cells undergoing apoptosis. These pyknotic nuclei were also positive for TUNEL staining. Interestingly, stimulation with VEGF-C and especially with VEGF-C156S increased the  
25 survival of mainly the lymphatic endothelial cells (FIG. 3). The number of Annexin-V positive cells was higher among the podoplanin negative cells also in the BSA and VEGF treated cultures (FIG. 3). This may be partly an indirect effect, since blood vascular, but not lymphatic endothelial cells produce VEGF-C and therefore they can probably promote the survival of the lymphatic  
30 endothelial cells.

## EXAMPLE 7

**VEGFR-3 Phosphorylation Leads to PI-3-kinase Dependent Akt Activation**

As discussed in the background, a major signal transduction pathway by which growth factor receptors can promote cell survival employs the PI-3-kinase and its downstream target, the serine-threonine kinase Akt. The effect of the different VEGFs on Akt was analyzed by assessing Akt phosphorylation in serine 473 and threonine 308 using phosphospecific antibodies. Akt was found to be phosphorylated at Ser473 in HMVE cells stimulated by VEGF, ORFV2-VEGF, VEGF-C, VEGF-C156S or VEGF-D, but not in PIGF stimulated HMVE cells. This indicated that Akt is activated by growth factor signals transduced via VEGFR-2 or VEGFR-3, but not via VEGFR-1. A similar increase in Akt Thr308 phosphorylation was also detected. The PI3-kinase inhibitors wortmannin (30 nM) and LY294002 (20  $\mu$ M) abolished the Akt phosphorylation in response to all the VEGFs studied, demonstrating that the VEGFR-3 mediated Akt activation is transduced via the PI3-kinase as has been previously shown for VEGFR-2 (Gerber *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:30336-30343, 1998; Thakker *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:10002-10007, 1999).

Akt was found to be maximally phosphorylated at 20-30 min after the exposure of HMVEC to VEGF, while the VEGF-C induced Akt phosphorylation peaked at 10 min (FIG. 4). In a striking contrast, VEGF-C156S stimulation resulted in slower Akt phosphorylation, peaking at 30-40 min. The differences in the activation of downstream targets suggested that Akt phosphorylation via VEGFR-2 or VEGFR-3 may be transduced via different routes. VEGFR-2 can probably transduce signals for Akt phosphorylation via the classical pathway as it constitutively associates with the regulatory p85 subunit of the PI3-kinase (Thakker *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:10002-10007, 1999). In contrast, the inventors and others have not been able to detect association of p85 with VEGFR-3 or stimulation of PI3-kinase activity after VEGFR-3 autophosphorylation (Borg *et al.*, *Oncogene*, 10:973-984, 1995; Pajusola *et al.*, *Oncogene*, 9:3545-3555, 1994).

**EXAMPLE 8****Simultaneous VEGFR-2 and VEGFR-3 stimulation by VEGF-C induces a sustained p42/p44 MAPK activation**

The inventors demonstrated that simultaneous signaling via VEGFR-2 and VEGFR-3 upon VEGF-C stimulation leads to sustained p42/p44 MAPK activation in the HMVE cells. The p42/p44 MAPK activation was detected by Western blotting using phospho-Thr202/Tyr204-MAPK specific antibodies and CREB phosphorylation using phospho-Ser133 specific antibodies. The growth factor concentrations used were: VEGF 10 ng/ml, VEGF-C 100 ng/ml and VEGF-C156S 500 ng/ml. Additionally, the present studies showed that VEGFR-3 induced p42/p44 MAPK activation is mediated via protein kinase C in HMVE cells. Effects of inhibition of protein kinase C by GF109203X, MEK1 by PD98059 and PI-3 kinase by LY294002 on p42/p44 MAPK Thr202/Tyr204 phosphorylation, CREB Ser133 phosphorylation and Akt Ser473 phosphorylation in HMVE cells. The growth factor concentrations used were: VEGF 1 ng/ml, VEGF-C 10 ng/ml and VEGF-C156S 500 ng/ml

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway is another mechanism implicated in growth factor-dependent cell survival. The inventors demonstrated that simultaneous signaling via VEGFR-2 and VEGFR-3 upon VEGF-C stimulation leads to sustained p42/p44 MAPK activation in the HMVE cells. The p42/p44 MAPK activation was detected by Western blotting using phospho-Thr202/Tyr204-MAPK specific antibodies and CREB phosphorylation using phospho-Ser133 specific antibodies.

The inventors showed that MAPK activation in HMVE cells was detected after VEGFR-3 stimulation by VEGF-C156S. However, MAPK phosphorylation induced by the VEGFR-2 ligands VEGF and VEGF-C was significantly stronger in these cells. Although MAPK activation after both VEGF-C and VEGF stimulation peaked at 10-20 min, the VEGF induced activation was more transient than that induced by VEGF-C, which persisted for at least 6 h.

Downstream of the MAP kinases, the MAPK activated kinases, Rsk's, have been shown to phosphorylate the transcription factor CREB (cAMP response element-binding protein) at Ser133, which promotes cell survival by increasing transcription of pro-survival genes (Bonni *et al.*, *Science*, 286:1358-1362, 1999). CREB phosphorylation, which correlated with p42/p44 activation, was detected after stimulation of the HMVECs by VEGF or VEGF-C, but not by VEGF-C156S. Although also Akt has been shown to phosphorylate CREB (Du and Montminy, *J. Biol. Chem.*, 273:32377-32379 1998), inhibition of Akt with LY294002 did not affect CREB phosphorylation. In contrast, inhibition of MEK1 (MAP kinase kinase) with PD98059 or U0126 inhibited VEGF-C, but not VEGF induced CREB phosphorylation.

In addition, the inventors discovered that the VEGFR-3 induced MAPK activation is mediated via PKC. VEGF induced activation of the MAPK cascade has been shown to be mediated by protein kinase C (PKC) instead of the classical Ras pathway (Doanes *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255: 545-548, 1999; Takahashi *et al.*, *Oncogene*, 18:2221-2230, 1999; Yoshiji *et al.*, *Cancer Res.*, 59:4413-4418, 1999). In order to study the effect of PKC inhibition on VEGF-C and VEGF-C156S induced MAPK activation, the minimum concentrations of VEGF, VEGF-C and VEGF-C156S were titrated which gave maximal p42/p44 MAPK activation as measured by Western blotting using phosphospecific antibodies. In these conditions, inhibition of PKC by GF109203X completely blocked p42/44 MAPK phosphorylation induced by VEGF, VEGF-C or VEGF-C156S and CREB phosphorylation induced by VEGF or VEGF-C. Moreover, inhibition of MEK1 by PD98059 resulted in decreased phosphorylation of CREB upon VEGF-C stimulation. Surprisingly, this treatment did not inhibit VEGF induced CREB phosphorylation. In agreement, in a recent study, VEGF induced CREB phosphorylation was shown to be mediated via PKC and p38 MAPK, not via p42/p44 MAPK.

30

WO 03/006104

PCT/US02/22164

- 96 -

## EXAMPLE 9

**VEGFR-3 Induces Endothelial Cell Migration**

Migration of endothelial cells plays a critical role in angiogenesis and at least some of the VEGF induced migration signals are transduced via PI3-kinase (Gille *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:3222-3230, 2001; Gille *et al.*, *EMBO J.*, 19:4064-4073, 2000; Qi and Claesson-Welsh, *Exp. Cell Res.*, 263: 173-182, 2001). Since the VEGFR-3 deficient embryos die due to a failure of vascular remodeling (Dumont *et al.*, *Science*, 282:946-949, 1998), the question of whether VEGFR-3 signaling is also involved in the migration of endothelial cells merited further investigation. The HMVE cells were incubated in the presence of different VEGFs in a Boyden chamber assay. VEGF induced a ten-fold stimulation of cell migration, and the effect of VEGF-C or VEGF-D was nearly comparable to that of VEGF (FIG. 5). Furthermore, VEGF-C156S also induced the migration of HMVE cells, and this was specifically blocked by a ten-fold molar excess of soluble VEGFR-3 (FIG. 5, light grey bar). These results indicated that signaling via VEGFR-3 is sufficient for the induction of endothelial cell migration.

While the compositions and methods of this invention have been described in terms of preferred embodiments, it will be apparent to those of skill in the art that variations may be applied to the processes described herein without departing from the concept, spirit and scope of the invention. All such similar substitutes and modifications apparent to those skilled in the art are deemed to be within the spirit, scope and concept of the invention. Techniques used for the production expression libraries and for the production and isolation of recombinant peptides are well known to those of skill in the art and may be used in conjunction with the present invention.

WO 03/006104

97

PCT/US02/22164

**What is Claimed Is:**

1. A method for isolating lymphatic endothelial cells from a biological sample comprising lymphatic endothelial cells, the method comprising:
  - a) contacting said sample with an antibody that preferentially
- 5 recognizes lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions where the antibody binds lymphatic endothelial cells, and
  - b) isolating lymphatic endothelial cells bound to said antibody.
2. The method of claim 1, wherein said antibody is an antibody
- 10 that is immunologically reactive with an epitope on the extracellular domain of VEGFR-3 that is specific for lymphatic endothelial cells.
3. The method of claim 1 wherein said biological sample is from a human patient.
- 15 4. The method of claim 1, wherein said antibody is immobilized on a solid support and said biological sample is contacted with said support to allow the lymphatic endothelial cells to become bound to said antibody.
- 20 5. The method of claim 1, wherein said antibody is labeled with a fluorescent label and said lymphatic endothelial cells are isolated using fluorescence activated cell sorting.
- 25 6. The method of claim 1, wherein said antibody is labeled with a magnetic label and lymphatic endothelial cells are isolated using magnetic activated cell sorting.
7. The method of claim 1, wherein said lymphatic endothelial cells are isolated using immunohistochemistry.

30

WO 03/006104

98

PCT/US02/22164

8. The method of claim 1, wherein said lymphatic endothelial cells are isolated using immunochromatography.
9. The method of claim 1, wherein the antibody is a polyclonal antibody.
10. The method of claim 1, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
11. The method of claim 1, wherein the antibody is a binding reagent that comprises an antigen binding fragment of 2E11D11.
12. The method of claim 11, wherein the antibody recognizes the same epitope of VEGFR-3 protein that is recognized by 2E11D11.
13. The method of claim 1, wherein said antibody is 2E11D11.
14. The method of claim 1, wherein said antibody is an anti-podoplanin.
15. A method of isolating blood vascular endothelial cells from a sample of microvascular endothelial cells, the method comprising:
- a) contacting said cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions where the antibody binds lymphatic endothelial cells, and
  - b) removing said lymphatic endothelial cells that are bound by said antibody from microvascular cells that are not bound to said antibody, wherein said microvascular cells not bound to said antibody comprise a population of blood vascular endothelial cells substantially free of lymphatic endothelial cells.

30

WO 03/006104

99

PCT/US02/22164

16. The method of claim 15, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3.
17. A lymphatic endothelial cell population isolated according to a method comprising:
- a) contacting a biological sample comprising lymphatic endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions where the antibody binds lymphatic endothelial cells, and
  - b) isolating lymphatic endothelial cells that are bound by said antibody.
18. The lymphatic endothelial cell population of claim 17, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3.
19. The lymphatic endothelial cell population of claim 17, wherein said biological sample of cells comprises a heterogeneous population of endothelial cells.
20. The lymphatic endothelial cell population of claim 17, wherein said biological sample of cells is a microvascular endothelial cell population.
21. The lymphatic endothelial cell population of claim 17, wherein said lymphatic endothelial cell population is substantially free of contaminating blood vascular endothelial cells.
22. The method of claim 17, comprising expanding said lymphatic endothelial cells.

WO 03/006104

100

PCT/US02/22164

23. A blood vascular endothelial cell population isolated according to a method comprising:
- a) contacting a population of microvascular endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to blood vascular endothelial cells, under conditions where the antibody binds to lymphatic endothelial cells, and
  - b) removing said lymphatic endothelial cells that are bound by said antibody from microvascular cells that are not bound to said antibody, wherein said microvascular cells not bound to said antibody comprise a population of blood vascular endothelial cells substantially free of lymphatic endothelial cells.
24. The blood vascular cell population of claim 23, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3.
25. The blood vascular cell population of claim 23, wherein the method further comprises expanding said blood vascular endothelial cell population.
26. A lymphatic endothelial cell population substantially free of other contaminating endothelial cells.
27. A blood vascular endothelial cell population substantially free of other contaminating endothelial cells.
28. A method of obtaining a composition substantially enriched in a subpopulation of lymphatic endothelial cells comprising:
- (a) obtaining, a source of cells comprising microvascular endothelial cells;
  - (b) contacting the cells with a monoclonal antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions to allow an antibody to bind lymphatic endothelial cells;

WO 03/006104

101

PCT/US02/22164

(c) separating those cells that are specifically bound by the monoclonal antibody, thereby obtaining a composition substantially enriched in a subpopulation of lymphatic endothelial cells.

- 5           29.   The method of claim 28, wherein said antibody is an anti-podoplanin antibody.
30.   The method of claim 28, wherein said antibody is 2E11D11.
- 10           31.   A composition comprising a substantially enriched subpopulation of lymphatic endothelial cells obtained by the method according to claim 28, 29 or 30.
32.   A method of ameliorating a lymphatic endothelial cell disorder  
15 comprising targeting lymphatic endothelial cells with a therapeutic agent, wherein said therapeutic agent is targeted to said cells using an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3.
- 20           33.   The method of claim 30, wherein said disorder is selected from the group consisting of lymphoma, hereditary lymphedema, lymphedemas, lymphangiomas, lymphangiosarcomas, lymphangiomatosis, lymphangiectasis, and cystic hygroma.
- 25           34.   A method of ameliorating a lymphatic disorder, wherein said method comprises *ex vivo* therapy comprising:
- a)   obtaining microvascular endothelial cells of a patient in need of said therapy;
- 30           b)   contacting the microvascular endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other

WO 03/006104

102

PCT/US02/22164

endothelial cells, under conditions that allow the binding of said antibody to lymphatic endothelial cells;

- c) isolating lymphatic endothelial cells that are bound by said antibody
- 5 d) transfecting said lymphatic endothelial cells with an expression construct comprising a nucleic acid encoding a therapeutic protein operably linked to a promoter, in an amount effective to produce the expression of said protein in said cells and
- e) reintroducing said transfected cells to said patient.

10

35. The method of claim 34, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3.

36. A method of promoting the growth of lymphatic endothelial cells in culture comprising:

- a) obtaining the lymphatic endothelial cells according to claim 1;
  - b) stimulating said cells with a VEGFR-3 ligand;
- wherein stimulating the growth of said cells with said VEGFR-3 ligand promotes the survival of said cells in culture as compared to growth in the absence of said stimulation.

20

37. The method of claim 36, wherein said VEGFR-3 ligand is VEGF-C, VEGF-C156S or VEGF-D.

25

38. The method of claim 36, further comprising stimulating said cells with a VEGFR-2 ligand.

39. The method of claim 36, wherein said stimulation of said cells protects the cells from apoptosis.

30

WO 03/006104

103

PCT/US02/22164

40. The method of claim 36, wherein said protection of said cells is mediated through the activation of Akt or p42/MAPK signaling molecules.
41. The method of claim 36, wherein said stimulation allows said cells to maintain differentiated endothelial cell characteristics.
42. A method of selectively modulating lymphatic endothelial cells in a mammalian organism comprising:
- a) isolating lymphatic endothelial cells from said mammalian organism by the method of claim 1,
  - b) contacting said isolated lymphatic endothelial cells with an agent to modulate the lymphatic endothelial cells; and
  - c) reintroducing the lymphatic endothelial cells into said organism.
43. The method of claim 42, wherein the contacting step comprises introducing an exogenous polynucleotide into said cells.
44. The method of claim 42, wherein the organism has a disorder characterized by a genetic mutation in a gene expressed in lymphatic endothelial cells and the contacting comprises introducing an exogenous polynucleotide into the cells to overcome the effects of the genetic mutation in said gene.
45. The method of claim 44, wherein said disorder is hereditary lymphedema.
46. A method for imaging lymphatic endothelial cells in tissue from a vertebrate organism, comprising the steps of:
- (a) contacting vertebrate tissue suspected of containing a lymphatic endothelial cells with a composition comprising an antibody that preferentially binds

WO 03/006104

104

PCT/US02/22164

to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions that allow the binding of said antibody to lymphatic endothelial cells;

(b) detecting said antibody bound to said lymphatic endothelial cells in said tissue; and

5 (c) imaging lymphatic endothelial cells in the tissue by identifying lymphatic endothelial cells bound by said antibody, wherein said binding of the lymphatic endothelial cells to said antibody indicates the presence and location of lymphatic endothelial cells in the tissue.

10 47. The method of claim 46, wherein said tissue comprises human tissue.

48. The method of claim 46, further comprising the step of washing said tissue, after said contacting step and before said imaging step, under conditions  
15 that remove from said tissue antibody that is not bound to the lymphatic endothelial cells in said tissue.

49. The method of claim 46, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3.

20

50. The method of claim 46, wherein said antibody is an anti-podoplanin antibody.

51. The method of claim 46, wherein said antibody further  
25 comprises a detectable label covalently bound thereto.

52. The method according to claim 46, further comprising steps of:  
contacting the tissue with a second compound that specifically binds to  
a lymphatic endothelial marker that is substantially absent in blood vascular  
30 endothelia; and

detecting said second compound bound to cells in said tissue;

WO 03/006104

PCT/US02/22164

105

wherein said imaging step comprises identifying lymphatic vessels labeled with both the antibody and the second compound, wherein lymphatic vessels labeled with both the antibody and the second compound correlate with the presence and location of lymphatic endothelial cells in the tissue.

5

53. The method of claim 52, wherein said antibody is an antibody that is immunologically reactive with the extracellular domain of VEGFR-3, and said second compound is an anti-podoplanin antibody.

10

54. A method of screening for a disease characterized by a change in lymphatic endothelial cells, comprising the steps of:

(a) obtaining a tissue sample from a vertebrate organism suspected of being in a diseased state characterized by changes in lymphatic endothelial cells;

(b) exposing said tissue sample to a composition comprising an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions that allow the binding of said antibody to lymphatic endothelial cells in said organism;

(c) washing said tissue sample; and

(d) screening for said disease by detecting the presence, quantity, or distribution of said bound antibody in said tissue sample.

20

55. A method for specifically detecting lymphatic endothelial cells in a mammal, comprising the steps of:

(a) administering to said mammal a composition comprising an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other endothelial cells, under conditions that allow the binding of said antibody to lymphatic endothelial cells, and

(b) detecting said antibody bound to lymphatic endothelial cells, thereby detecting lymphatic endothelial cells in said organism.

30

WO 03/006104

106

PCT/US02/22164

56. The method of claim 55, further comprising administering to said mammal a second compound that specifically binds to a lymphatic endothelial cell marker; and wherein said detecting step comprises detection of said antibody and said second compound bound to lymphatic endothelial cells.
- 5
57. A method modifying lymphatic endothelial cells comprising:
- a) obtaining a microvascular endothelial cells;
  - b) contacting the microvascular endothelial cells with an antibody that preferentially binds to lymphatic endothelial cells as compared to other
- 10 endothelial cells, under conditions that allow the binding of said antibody to lymphatic endothelial cells;
- c) isolating lymphatic endothelial cells that are bound by said antibody; and
  - d) transfecting said lymphatic endothelial cells with an expression
- 15 construct comprising a nucleic acid encoding a therapeutic protein operably linked to a promoter, in an amount effective to produce the expression of said protein in said cells, wherein said transfecting produces modified lymphatic endothelial cells.
58. A lymphatic endothelial cell produced according to the method
- 20 of claim 57.

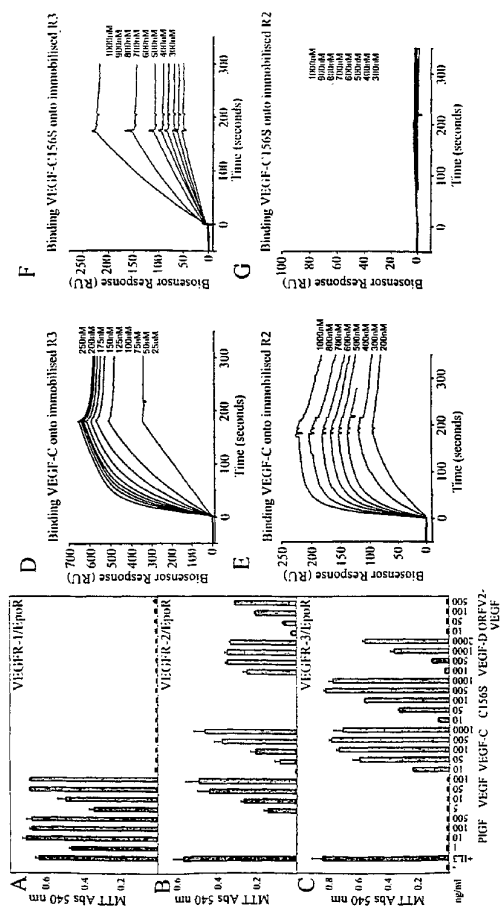


FIGURE 1A - FIGURE 1G

FIGURE 2A

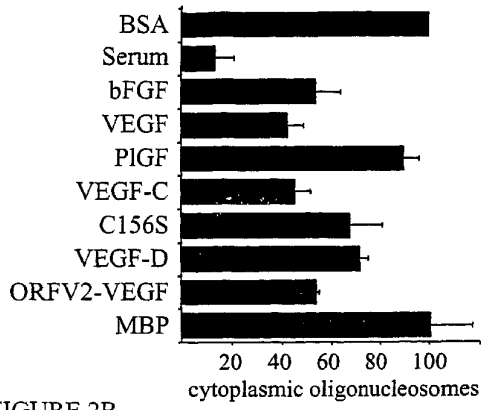
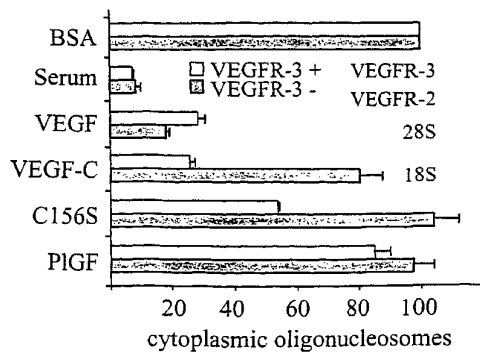


FIGURE 2B



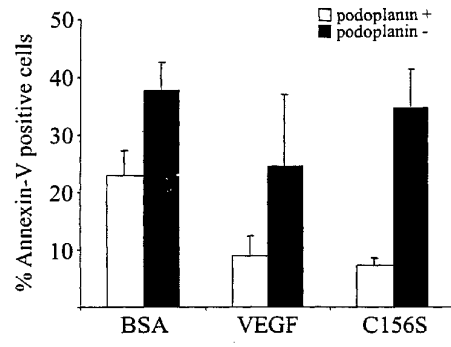


FIGURE 3

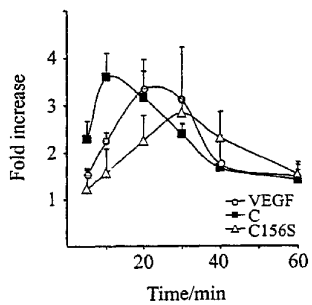


FIGURE 4

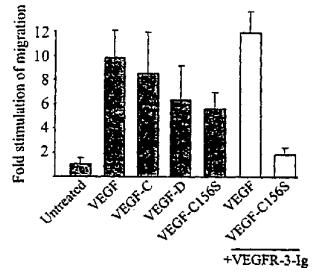


FIGURE 5

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/006104 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/53, A61K 39/00, A61N 43/04 (74) Agent: MCMILLIAN, Nabeela, R.; Marshall, Gerstein & Borun, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/22164 (81) Designated States (national): AI, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/304,889 12 July 2001 (12.07.2001) US; 60/317,610 6 September 2001 (06.09.2001) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US]; 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US); LICENTIA, LTD [FI/FI]; Erotajankatu 19 B, 6th Floor, FIN-001300 Helsinki (FI).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): ALITALO, Kari [FI/FI]; Molecular/Cancer Biology Laboratory Biomedicum Hel, sinki, P.O. Box 63 (Haartmaninkatu 8), FIN-00014 University of Helsinki (FI); MAKINEN, Taina [FI/FI]; Molecular/Cancer Biology Laboratory Biomedicum Hel, sinki, P.O. Box 63 (Haartmaninkatu 8), FIN-00014 University of Helsinki (FI).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 3 April 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/006104 A3

(54) Title: LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS MATERIALS AND METHODS

(57) Abstract: The present invention is directed to methods and compositions for isolating lymphatic endothelial cells from a mixed population of cells. More particularly, the inventors have found that certain antibodies that recognize the extracellular domain of VEGFR-3 can be used to specifically isolate lymphatic endothelial cells substantially free of other contaminating non-lymphatic endothelial cells. Methods and compositions for producing such cells and using such cells are described.

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
23 January 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2003/006104 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/53**,  
A61K 39/00, A61N 43/04
- (21) International Application Number: PCT/US2002/022164
- (22) International Filing Date: 12 July 2002 (12.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/304,889 12 July 2001 (12.07.2001) US  
60/317,610 6 September 2001 (06.09.2001) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US]; 605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US), LICENTIA, LTD [FI/FI]; Erottajankatu 19 B, 6th Floor, FIN-001300 Helsinki (FI).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): ALITALO, Kari [FI/FI]; Molecular/Cancer Biology Laboratory Biomedicum Hel, sinki, P.O. Box 63 (Haartmaninkatu 8), FIN-00014 University of Helsinki (FI), MAKINEN, Taina [FI/FI]; Molecular/Cancer Biology Laboratory Biomedicum Hel, sinki, P.O. Box 63 (Haartmaninkatu 8), FIN-00014 University of Helsinki (FI).
- (74) Agent: MCMILLIAN, Nabeela, R., Marshall, Gerstein & Bonn, 6300 Sears Tower, 233 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report
- (88) Date of publication of the International search report: 3 April 2003
- (48) Date of publication of this corrected version: 3 June 2004
- (15) Information about Correction:  
see PCT Gazette No. 23/2004 of 3 June 2004, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2003/006104 A3

(54) Title: LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS MATERIALS AND METHODS

(57) Abstract: The present invention is directed to methods and compositions for isolating lymphatic endothelial cells from a mixed population of cells. More particularly, the inventors have found that certain antibodies that recognize the extracellular domain of VEGFR-3 can be used to specifically isolate lymphatic endothelial cells substantially free of other contaminating non-lymphatic endothelial cells. Methods and compositions for producing such cells and using such cells are described.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/22164
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : G01N 33/53, A61K 39/00; A61N 43/04 US CL : 435/7.1; 424/ 184.1, 9.34; 514/44 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1; 424/ 184.1, 9.34; 514/44  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS on STN		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,107,046 A (ALITALO et al) 22 August 2000 (22.08.2000), column 39, line 40 bridging column 40, lines 1-39, Table 3, column 14, lines 44-67, column 18, line 64 bridging column 19, lines 1-9, in particular.	1-28, 30-31, 46-51, and 54-55
Y	US 6,235,713 B1 (AGHEN et al) 22 May, 2001 (22.05.2001), column 6, lines 50-65 bridging column 8, in particular.	32-45 and 55-58
X	JOUKOV, V. A Novel Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF-C, Is a Ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) Receptor Tyrosine Kinases EMBO J. 1996, Vol 15. No. 2, pages 290-298, especially pages 291292.	36-38
X	JOUKOV, V. Proteolytic Processing Regulates Receptor Specificity and Activity of VEGF-C EMBO J. 1997, Vol 16. No. 13, pages 3898-11, especially page 3902.	36-38
X	GERBER, H.P. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival Through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway J. Biol. Chem. November 1998, Vol 273. No. 46, pages 30356-43, especially pages 30337 and 30340.	1, and 36-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*Y* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*B* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*Z* document member of the same patent family
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 04 December 2002 (04.12.2002)	Date of mailing of the international search report 02 JAN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Phuong Huynh Telephone No. (703) 308-0196	<i>Christina Chan</i>

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/22164

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y ✓	BREITENEDER-GELEFF, S. Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries Podoplanin as a Specific Marker for Lymphatic Endothelium <i>Anat. J. Path.</i> February 1999, Vol 154, No. 2, pages 385-394, especially page 387.	28-29, 46, 50, 52-53 and 56
X ✓	JUSSILA, L. Lymphatic Endothelium and Kaposi's Sarcoma Spindle Cells Detected by Antibodies Against the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 <i>Cancer Res.</i> April 1998, Vol 58, pages 1599-1604, especially pages 1599-1600.	1-3, 7 and 10
X ✓	US 6,130,071 A (ALITALO et al) 10 October, 2000 (10.10.2000), column 119, especially claims 4-5.	37

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
C 1 2 N 5/10	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/543	5 2 1
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/543	5 4 1 A
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74) 代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74) 代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(72) 発明者 カリ、アリタロ

フィンランド国ユニバーシティー、オブ、ヘルシンキ、ピー・オー・ボックス63(ハールトマニ  
ンカトゥ、8)、モレキュラー/キャンサー、バイオロジー、ラボラトリー、バイオメディカム、  
ヘルシンキ

(72) 発明者 タイア、マキネン

フィンランド国ユニバーシティー、オブ、ヘルシンキ、ピー・オー・ボックス63(ハールトマニ  
ンカトゥ、8)、モレキュラー/キャンサー、バイオロジー、ラボラトリー、バイオメディカム、  
ヘルシンキ

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA36 FB03

4B024 AA01 BA80 DA02 GA11 GA27 HA04 HA17

4B065 AA94X AC12 BA25 BA30 BC41 BD39 CA44 CA46

4C084 AA02 AA03 AA13 NA14 ZA332 ZA892 ZB112 ZB152 ZB262

4C085 AA13 AA14 DD62

专利名称(译)	淋巴管内皮细胞材料和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005500045A</a>	公开(公告)日	2005-01-06
申请号	JP2003511907	申请日	2002-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所 黑麦Sentia有限公司		
申请(专利权)人(译)	路德维格研究所，四，癌症，研究 赖Sentia有限公司		
[标]发明人	カリアリタ口 タイアマキネン		
发明人	カリ、アリタ口 タイア、マキネン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P35/00 C12N5/071 C12N5/10 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/569 C12N5/06		
CPC分类号	A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 C12N5/069 C12N2501/165 G01N33/56966 G01N2333/71		
FI分类号	C12N5/00.E A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P17/06 A61P27/02 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P35/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/543.521 G01N33/543.541.A G01N33/566 C12N5/00.B A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/GA27 4B024/HA04 4B024/HA17 4B065/AA94X 4B065/AC12 4B065/BA25 4B065/BA30 4B065/BC41 4B065/BD39 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA892 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/304889 2001-07-12 US 60/317610 2001-09-06 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及从混合细胞群中分离淋巴管内皮细胞的方法和组合物。更特别地，发明人已经发现，识别VEGFR-3的胞外域的某些抗体可以用于特异性地分离基本上不含其他污染性非淋巴内皮细胞的淋巴内皮细胞。描述了产生此类细胞和使用此类细胞的方法和组合物。

リガンド	受容体	$K_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
hVEGF-C	hVEGFR-2	$5.5 \times 10^4$	$12.3 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-8}$
hVEGF-C	hVEGFR-3	$13.6 \times 10^4$	$6.05 \times 10^{-4}$	$0.44 \times 10^{-8}$
hVEGF-C <sub>iss</sub> S	hVEGFR-2	結合せず	結合せず	結合せず
hVEGF-C <sub>iss</sub> S	hVEGFR-3	$0.35 \times 10^4$	$4.0 \times 10^{-4}$	$11.5 \times 10^{-8}$
hVEGF-D*	hVEGFR-2	$1.3 \times 10^4$	$6.3 \times 10^{-4}$	$4.8 \times 10^{-8}$
hVEGF-D*	hVEGFR-3	$1.8 \times 10^4$	$12 \times 10^{-4}$	$6.5 \times 10^{-8}$
mVEGF-D*	mVEGFR-2	結合せず	結合せず	結合せず
mVEGF-D*	mVEGFR-3	$0.8 \times 10^4$	$7.0 \times 10^{-4}$	$8.9 \times 10^{-8}$