

(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2004-522702

(P2004-522702A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/198	A 6 1 K 31/198	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 39/395	N 4 C 2 O 6
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-537340 (P2002-537340)	(71) 出願人	398051143
(86) (22) 出願日	平成13年10月25日 (2001.10.25)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月28日 (2003.4.28)		ティ オブ カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045612		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(87) 国際公開番号	W02002/034289		07-5200, オークランド, 12ティ
(87) 国際公開日	平成14年5月2日 (2002.5.2)		ーエイチ フロア, フランクリン ストリ
(31) 優先権主張番号	09/697,854		ート 1111
(32) 優先日	平成12年10月27日 (2000.10.27)	(74) 代理人	100109726
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 園田 吉隆
		(74) 代理人	100101199
			弁理士 小林 義教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管形成の調節

(57) 【要約】

本発明は血管形成における K u z の関与に関する方法と組成物を提供する。様々な実施態様では、本発明は、病原性血管形成であるとされた脊椎動物において K u z の活性を特異的に調節して、血管形成を調節する方法；脊椎動物において K u z の活性を特異的に調節し、続いて動物において生じた血管形成の調節を検出することによって、血管形成を調節する方法；病原性血管形成であるとされた脊椎動物において K u z の活性を特異的に検出する方法；所定の K u z 活性を持つ脊椎動物において病原性血管形成を特異的に検出する方法；及び (a) 予め定まった量の K u z を含む血管形成アッセイ系を候補薬剤に、候補薬剤が存在しない場合に系が基準血管形成を付与する条件下で、接触させ、 (b) 系の薬剤バイアス血管形成を検出することによって、血管形成の修飾因子を同定する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

病原性血管形成であるとされた脊椎動物において K u z の活性を特異的に調節して、血管形成を調節する工程を含んでなる、血管形成の調節方法。

【請求項 2】

調節工程が、K u z に特異的に結合する薬剤に動物を接触させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

調節工程が、K u z に特異的に結合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤がメタロプロテアーゼインヒビターを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

調節工程が、K u z に特異的に結合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤がメタロプロテアーゼインヒビターを含み、インヒビターが、高親和性の亜鉛結合によって上記 K u z を阻害する、置換ヒドロキサマト、カルボキシラート、チオール、ホスホナート、アミノジアチアゾール、及びカテコールからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

調節工程が、K u z に特異的に結合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤がメタロプロテアーゼインヒビターを含み、インヒビターが、T A C E (T N F - 転換酵素) インヒビターである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

調節工程が、K u z に特異的に結合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤がメタロプロテアーゼインヒビターを含み、インヒビターが、I C - 3 (N - { D , L - [2 - (ヒドロキシアミノカルボニル) メチル] - 4 - メチル - ペンタノイル } - L - アラニン , 2 - アミノエチルアミド)、G M 6 0 0 1 (N H O H C O C H ₂ C H (I - B u) C O - T r p - N H M e) ; G W 9 4 7 1 (M o s s 等 , N a t u r e , 1 9 9 7 , V o l 3 8 5 , 7 3 3 - 7 3 6) 及び B B - 9 4 (b a t i m a s t a t) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

調節工程が、K u z に特異的に結合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤が K u z 特異的抗体を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

調節工程が、基質又はコファクターに対して K u z と特異的に競合する薬剤に動物を接触させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

調節工程が、基質又はコファクターに対して K u z と特異的に競合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤がドミナントネガティブ型 K u z 変異体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

調節工程が、基質又はコファクターに対して K u z と特異的に競合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤が可溶性のドミナントネガティブ型 K u z 変異体を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

調節工程が、基質又はコファクターに対して K u z と特異的に競合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤が免疫グロブリン F c 領域に融合した可溶性のドミナントネガティブ型 K u z 変異体を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

調節工程が、基質又はコファクターに対して K u z と特異的に競合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤が二価カチオンのキレーターを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

50

調節工程が、基質又はコファクターに対してK u zと特異的に競合する薬剤に動物を接触させることを含み、薬剤がE D T A及び1, 10-フェナントロリンからなる群から選択される二価カチオンのキレーターを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

脊椎動物においてK u zの活性を特異的に調節し；動物中に生じた血管形成の調節を検出する工程を含んでなる、血管形成の調節方法。

【請求項15】

病理性血管形成であるとされた脊椎動物においてK u zの活性を特異的に検出する工程を含んでなる、k u z活性の検出方法。

【請求項16】

検出工程が、K U Z特異的プロテアーゼアッセイ又はK U Z特異的免疫結合アッセイを使用することを含み、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

所定のK u z活性を有する脊椎動物において病理性血管形成を特異的に検出する工程を含んでなる、血管形成の検出方法。

【請求項18】

検出工程が腫瘍を検出することを含み、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

血管形成の修飾因子を同定する方法において、

予め定まった量のK u zを含む血管形成アッセイ系を候補薬剤に、候補薬剤が存在しない

場合に系が基準血管形成を付与する条件下で、接触させ、

系の薬剤バイアス血管形成を検出する工程を含み、

薬剤バイアス血管形成と基準血管形成の差異により、薬剤による系の血管形成の調節が示

される、方法。

【請求項20】

系が、インビトロの細胞ベースアッセイ又はインビボのマウスベースアッセイを含む、請求項19に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(緒言)

(発明の分野)

本発明の分野は、K u zとして知られているタンパク質を標的とすることによって血管形成を変調することである。

【0002】

(発明の背景)

A D A Mファミリーの遺伝子はメタロプロテアーゼ及びディスインテグリンドメインの両方を含む膜貫通タンパク質をコードしており(BlackとWhite, 1998 Curr. Opin. Cell Biol. 10, 654-659; Wolfsberg

とWhite, 1996 Dev. Biol. 180, 389-401)、哺乳動物における多様な生物プロセス、例えば受精(Cho等, 1998 Science 281, 1857-1859)、筋芽細胞融合(Yagami-Hiromasa等, 1995 Nature 377, 652-656)及び外部ドメイン分断(Moss等, 1997 Nature 385, 733-736; Black等, 1997 Nature 385, 729-733; Peschon等, 1998 Science 282, 1281-1284)に関与している。ショウジョウバエのクズバニアン(kuzbanian(kuz))遺伝子は無脊椎動物で同定された最初のA D A Mファミリーのメンバーである(Rooke等, 1996 Science 273, 1227-1231)。

過去の遺伝子研究では、kuzはショウジョウバエの神経発生中において側方抑制と軸索成長に必要とされることが示された(Rooke等, 1996; Fambrough等, 1996 PNAS. USA 93, 13233-13238; PanとRubi

等, 1996 PNAS. USA 93, 13233-13238; PanとRubi

等, 1996 PNAS. USA 93, 13233-13238; PanとRubi

等, 1996 PNAS. USA 93, 13233-13238; PanとRubi

等, 1996 PNAS. USA 93, 13233-13238; PanとRubi

等, 1996 PNAS. USA 93, 13233-13238; PanとRubi

10

20

30

40

50

n, 1997 Cell 90, 271-280; Sotillos等, 1997 Development 124, 4769-4779)。特に、側方抑制プロセスの間、kuzはNotchの上流で作用し(PanとRubin, 1997; Sotillos等, 1997)、それがDelta遺伝子によってコードされた側方抑制シグナルのための膜貫通レセプターをコードする。より最近では、Notchの線虫ホモログの活性を同様な形で調節するkuzのホモログが線虫(SUP-17)において同定された(Wen等, 1997 Development 124, 4759-4767)。

【0003】

kuzの脊椎動物ホモログは、アフリカツメガエル、ウシ、マウス、ラット及びヒトにおいて単離されている。KUZのウシホモログ(MADM又はADAM10とも呼ばれる)は最初はウシKUZプロテアーゼに対する生理学的基質ではありそうにない細胞質タンパク質であるミエリン塩基性タンパク質に対するそのインビトロでのタンパク分解活性に基づいて思いがけなく単離された(Howard等, 1996 Biochem. J. 317, 45-50)。最近の研究で、我々は、アフリカツメガエル中でのマウスkuzホモログ(mkuz)のドミナントネガティブ型の発現が余分なニューロン生成を生じ、脊椎動物の神経発生におけるNotchシグナル伝達の調節に対してmkuzの進化的に保存された役割を示唆している(PanとRubin, 1997)。しかし我々は胚性幹(ES)細胞中での遺伝子ターゲティングを利用してmkuz欠損マウスを産生した。我々は、mkuzが胚発生のために必須であり、mkuz変異体マウスはおよそ胎齢(E)9.5日で、神経系、沿軸中胚葉及び卵黄囊脈管構造に重症の欠陥が生じて死亡することを示す。神経系において、mkuz変異体胎仔は、異所性ニューロン分化を示す。沿軸中胚葉において、mkuz変異体胎仔は体節の遅発性でまとまりのない分節化を示す。これらの表現型はNotch-1又はNotch経路の成分、例えばRBP-Jkを欠くマウスのもの(Conlon等, 1995, Development 121, 1533-1545; Oka等, 1995)と同様であり、マウスの発育中のNotchシグナル伝達の調節におけるmkuzの保存された役割を示している。更に、我々は我々のノックアウト動物ではNotchプロセシングに可視できる欠陥は検出していない。神経発生と体節発生の欠陥に加えて、mkuz変異体マウスはまた卵黄囊脈管構造に重大な欠陥を示しており、毛管網が拡大して乱れ、大きな卵黄血管がない。そのような表現型はNotch-1又はRBP-Jkを欠くマウス(Swiaterek等, 1994 Genes Dev 15, 707-719; Conlon等, 1995; Oka等, 1995 Development 121, 3291-3301)では観察されていないので、我々は、この表現型はNotchシグナル伝達の調節におけるその役割とは別のmkuzの新規な機能を明らかにするものであると決定した。まとめると、我々の研究は哺乳動物の神経発生、体節発生及び血管形成におけるADAMファミリーのディスインテグリンメタロプロテアーゼの必須の役割を明らかにする。

【0004】

(発明の概要)

我々は、Kuzが体節発生、神経発生及び血管形成に関与しており、関連した病状における介入のための有用な治療上のターゲットを提供することを開示した。従って、本発明は体節発生、神経発生及び特に血管形成におけるKuzの関与に関する方法と組成物を提供する。一実施態様では、本発明は、病原性血管形成であるとされた脊椎動物においてKuzの活性を特異的に調節する工程を含んでなる、血管形成の調節方法を提供する。Kuzに特異的に結合するか、基質又は必要とされるコファクターについてKuzと競合する薬剤に動物を接触させることを含む、Kuz活性を特異的に調節する非常に様々な方法が開示される。

【0005】

他の実施態様では、本発明は、病原性血管形成であると必ずしもされていない脊椎動物においてKuzの活性を特異的に調節し、むしろ動物において結果として生じた血管形成の調節を続いて検出する工程を含んでなる血管形成の調節方法を提供する。

本発明はまた病原性血管形成であるとされた脊椎動物において、例えばK U Z特異的プロテアーゼアッセイ又はK U Z特異的免疫結合アッセイを使用して、K u zの活性を特異的に検出する方法を提供する。本発明はまた所定のK u z活性を持つ脊椎動物において、例えば病原性血管形成に伴う腫瘍を検出することによって、病原性血管形成を特異的に検出する方法を提供する。

【0006】

本発明はまた血管形成の修飾因子を同定する方法において、(a)予め定まった量のK u zを含む血管形成アッセイ系を候補薬剤に、候補薬剤が存在しない場合に系が基準血管形成を付与する条件下で、接触させ、(b)系の薬剤バイアス血管形成を検出する工程を含み、薬剤バイアス血管形成と基準血管形成の差異により、薬剤による系の血管形成の調節が示される方法を提供する。このような方法は、インピトロの細胞ベースアッセイ又はインピボの動物ベースアッセイで実施されうる。

10

本発明はまた主題の方法に適合化されたキットと試薬を提供する。

【0007】

(発明の特定の実施態様の説明)

特定の実施態様と実施例の次の説明は例示のために提供されるもので限定のためではない。矛盾せず又はそれ以外の定義が示されない限り、これらの説明及び本明細書全体を通じて、「a」及び「an」という用語は一又は複数を意味し、「又は」という用語は及び/又はを意味する。K u zは広く記載されている当該分野で認められた天然タンパク質ファミリーを意味し、当該分野でまたよく知られているオーソログス(orthologs)及び変異体を包含する。例えば、W O 9 8 / 3 7 0 9 2及びW O 9 7 / 3 1 9 3 1; M a y e r等(米国特許第5922546号;及びR u b i n等(米国特許第5935792号)を含む、ヒトK U Zの幾つかの型が記載されている。しばしば血管形成について検討され実証されるが、開示された方法と試薬は一般に病原性体節発生及び神経発生にも同様に適用可能であるものと理解されなければならない。

20

【0008】

幾つかの開示された用途は脊椎動物におけるK u zの活性を特異的に調節することを含む。K u zに特異的に結合するか、あるいは基質又は必要とされるコファクターに対してK u zと競合する薬剤に動物を接触させることを含む、K u z活性を特異的に調節する非常に様々な方法が開示される。

30

【0009】

k u zに特異的に結合する薬剤には、メタロプロテアーゼインヒビター、例えばヒドロキサマートメタロプロテアーゼインヒビター及びT A C E (T N F - 転換酵素)インヒビター(レビューには、A m o u r A等, A n n N Y A c a d S c i 1 9 9 9 J u n e 3 0 ; 8 7 8 : 7 2 8 - 3 1を参照)が含まれる。例示的なインヒビターには、I C - 3 (N - { D , L - [2 - (ヒドロキシアミノカルボニル)メチル] - 4 - メチル - ペンタノイル} - L - アラニン, 2 - アミノエチルアミド、B l a c k等, N a t u r e , 1 9 9 7 , V o l 3 8 5 , 7 2 9 - 7 3 ; G a l k oとT e s s i e r - L a v i g n e , S c i e n c e , 2 0 0 0 , V o l 2 8 9 , 1 3 6 5 - 1 3 6 7)、G M 6 0 0 1 (N H O H C O C H ₂ C H (I - B u) C O - T r p - N H M e) ; G W 9 4 7 1 (M o s s等, N a t u r e , 1 9 9 7 , V o l 3 8 5 , 7 3 3 - 7 3 6に示されたT A C Eの精製中に使用されたG W 9 4 7 1のピオチン化誘導体であるG W 9 2 7 7の構造を参照);及び合成ヒドロキサマートペプチド模倣マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビターであるB B - 9 4 (b a t i m a s t a t) (H e r n a n d e z - P a n d o R等 I n t J E x p P a t h o l 2 0 0 0 J u n ; 8 1 (3) : 1 9 9 - 2 0 9を参照)が含まれる。有用な天然のM M Pインヒビターには、M M P sの組織インヒビター(T I M P s)、例えばT I M P - 1及びT I M P - 3が含まれる(例えばA m o u r等, F E B S L e t t . 2 0 0 0 M a y 1 9 ; 4 7 3 (3) : 2 7 5 - 9を参照のこと)。

40

【0010】

50

Kuzに特異的に結合するインヒビターの他のクラスは、Kuzに特異的に結合する免疫グロブリン相補性決定領域(CDRs)、特にCDR3領域を含むポリペプチドである。これらは抗体と抗体断片、例えばF(ab)断片を包含する。治療用の抗体及び抗体断片を製造し使用方法はよく知られている。例えば米国特許第5935792号を参照。

【0011】

細胞内抗体、つまりイントラボディは遺伝子療法における用途を持つ中和分子のクラスを表す(vonMehren M, Weiner LM. (1996) *Current Opinion in Oncology*. 8: 493-498, Marasco WA. (1997) *Gene Therapy*. 4: 11-15, Rondon IJ, Marasco WA. (1997) *Annual Review of Microbiology*. 51: 257-283)。抗Kuzイントラボディは重鎖の可変ドメインがペプチドリッカーを介して軽鎖の可変ドメインに結合され、親Kuz抗体の親和性を維持している遺伝子操作された一本鎖抗体である(Rondon等)。抗KuzイントラボディはKuzの酵素活性形態を認識し、結合時にKuzのリン酸転移能を阻害する抗体をコードするポリクロナルか又はモノクロナルの抗Kuz抗体cDNAから設計される。また、抗KuzイントラボディはKuz酵素活性を刺激する抗体をコードするポリクロナルか又はモノクロナル抗体cDNAから産生することができる。抗Kuz一本鎖イントラボディはまた細胞質の安定性を増大させるためにC末端ヒトCドメインで、及び/又は発生期にあるイントラボディを核コンパートメントに向けるためにC末端SV40核移行シグナルで、それぞれ修飾してもよい(Mhashilkar AM等 (1995) *Embo Journal*. 14: 1542-1551)。この点について、安定に発現された一本鎖抗Kuzイントラボディとその修飾形態は、真核生物細胞の細胞質又は核コンパートメントの何れかにKuz分子を効率的にターゲティングするために使用することができる。

【0012】

Kuz特異的イントラボディは標準的なDNAトランスフェクション法(リン酸カルシウム、エレクトロポレーション、リポフェクタミン等々)を含む幾つかの確立された方法の任意のものによって培養された細胞中に導入することができる。抗Kuzイントラボディは、tet抑制の(Gossen M, Bujard H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 5547-5551)又はIPTG誘発性の(Liu HS等, (1998) *Biotechniques*. 24: 624-632, Hannan GN等(1993) *Gene*. 130: 233-239)又はグルココルチコイド誘発性(GREを使用)の誘発性発現ベクター、構成発現ベクター(例えばCMV又はRSVプロモータ駆動ベクター)又は組織特異的発現遺伝子のプロモータ(例えばT細胞レセプタープロモータ)を使用する組織特異的発現ベクターの、種々のものの任意のものに構築される。抗Kuzイントラボディ組織(並びに株化細胞)を発現するための重要な変更点は、標準的なプロトコール(Vile RG等(1995) *British Medical Bulletin*. 51: 12-30, Shoji I等(1997) *J. General Virology*. 78: 2657-2664, Paulus W等(1996) *J. Virology*. 70: 62-67)を使用して適切なウイルス発現ベクターを構築することである。抗Kuzイントラボディ遺伝子はキーとなるウイルス遺伝子に置き換えられ、宿主細胞によってウイルス粒子中に収容される。改変されたウイルスゲノムが標的の組織ゲノム中に組み込まれるが、新しいウイルス粒子の形成を防ぐように崩壊される。そして標的組織の個々の細胞が抗Kuzイントラボディ転写物とタンパク質を生産する。

【0013】

基質又はコファクターに対してKuzと特異的に競合する非常に多種の薬剤を使用することができる。競合的インヒビターには、高親和性の亜鉛結合によってZn-メタロプロテアーゼを阻害することが知られている、置換ヒドロキサマート、カルボキシラート、チオール、ホスホナート、アミノジアチアゾール、及びカテコール、並びにEDTA及び1,

10 - フェナントロリンのような二価カチオンのキレーターを含む、数多くのクラスが包含される。競合的インヒビターにはまたプロテアーゼドメインが欠失又は点変異誘発によって破壊されているドミナントネガティブ型K u z 変異体が含まれる。そのようなK u z 変異体は当該分野で公知であり、新規なドミナントネガティブ型変異体はプロテアーゼドメイン内での残基の標的変異誘発の後に常套的な活性スクリーニングを行うことによって直ぐに作製される。米国特許第5935792号参照。例示的なドミナントネガティブ型ヒトk u z 変異体を表1に示す。

【0014】

表1. ドミナントネガティブ型ヒトk u z 変異体の例

名称	変異	ドミナントネガティブ活性
hKUZDN1	Δ212-455*	+++
hKUZDN2	Δ213-381	+++
hKUZDN3	Δ382-392	+++
hKUZDN4	Δ382-392 及び Δ677-748	+++
hKUZDN5	E384 から A	+++
hKUZDN6	E384 から A 及び Δ675-748	+++
hKUZDN7	S391 から A	+++
hKUZDN8	AHE384-386 から AAA	+++

10

20

* 番号付けは米国特許第5935792号のヒトK u z (配列番号: 4)に記載されたアミノ酸残基を示す。対応する変異は、配列アラインメントによって米国特許第5922546号及びPCT公報WO97/31931に開示されているように、他のヒトK u z タンパク質において同定できる。

【0015】

好適な実施態様では、ドミナントネガティブ型K u z 変異体は可溶性であり、つまり膜貫通ドメインを欠いているが—又は複数の細胞外ドメインを含んでいる。好ましくは、可溶性ドミナントネガティブ型変異体はまたシグナルペプチドとプロドメインを欠き、システムリッチドメイン、ディスインテグリンドメイン及び/又はメタロプロテアーゼドメインを含む。他の好適な実施態様では、可溶性ドミナントネガティブ型変異体は精製、欠失又は可溶化を容易にするか、あるいはある種の他の機能を付与するように選択される非関連ポリペプチドに融合される。融合タンパク質は一般に可溶性K u z 変異体をコードするヌクレオチド配列が、選択された非関連ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に読み枠を一致させて結合したハイブリッド遺伝子を発現することによって産生される。好適な非関連タンパク質は免疫グロブリンの定常(Fc)領域(例えばヒトIgGのFc領域)であり、これは、得られた融合タンパク質を、生物療法に使用する場合により安定でより長い半減期を持つものとできる。

30

【0016】

幾つかの開示された用途は、病原性体節発生、神経発生又は特に血管形成であることがきまった脊椎動物、特にマウス、ラット又はヒトを含む。他の実施態様では、本方法は動物の病原性血管形成、体節発生又は神経発生を特異的に検出することに関する。病原性血管形成は例えば望ましくない過剰又は欠乏した血管形成を全身的又は局部的に呈するあらゆる症状を包含し; 例示的な元となる状態には、癌、糖尿病性網膜症、リウマチ様関節炎、黄斑変性症、乾癬、及び過剰又は不十分又は調節を誤った血管形成が役割を担っているその他の病理状態が含まれる。例えば、我々のK u z 欠損マウスは、M a s h - 1とニューロゲニン(neurogenin)を含む幾つかの神経の特定遺伝子のアップレギュレーションを呈し、神経前駆体が過剰であることを示している。これらのマウスはまた体節におけるD l l 1 発現の喪失と体節の深刻な表現型破壊によって明らかにされる体節発生不

40

50

良を呈している。また、マウスは病原性血管形成を呈しており、胚性卵黄嚢中の卵黄の血管が発生していない。病原性体節発生、神経発生又は血管形成は、組織検査、関連しているマーカー遺伝子の発現等々のような常套的な方法によって直ぐに検出される。また、以下において実証するように、内皮細胞ベースの血管形成アッセイのような数多くのインビトロモデル系が知られている。多くの場合、検出は、病原性血管形成に関連する腫瘍のような状態を検出することにより推論して実施される。血管形成は、特に、インビトロ細胞ベースアッセイ、例えば *h u v e c* アッセイ及びインビトロ指標、例えば血流パラメータ、微小血管密度、血管内皮成長因子レベル（例えば *L e e* 等 *O b s t e t G y n e c o* 2000 Oct; 96(4): 615-21を参照）、成長因子レセプター（例えば *S h i n* 等 2000 *J C a n c e r R e c C l i n O n c o l* 126, 519-28）等々を含む、任意の常套的な手段によって検出される。これらのアッセイは、異種移植系、例えば *R o f s t a d* 等 2000 *C a n c e r R e s* 60, 4932-8のようなモデル系で実施できる。

【0017】

K u z が病原性体節発生、神経発生又は血管形成に関連する症状に対する有用な治療上のターゲットを提供するという本開示は、当業者に明らかな数多くの応用例 - 病原性体節発生、神経発生又は血管形成に関連する症状の治療ターゲットとして *K u z* の使用を前提とした任意の応用例、を提供する。例えば、一実施態様では、本発明は、病原性血管形成であると必ずしもされていない脊椎動物において *K u z* の活性を特異的に調節し、むしろ動物中に結果として生じた血管形成の調節を続いて検出する工程を含んでなる血管形成の調節方法を提供する。他の実施態様では、本発明はまた病原性血管形成であるとされた脊椎動物において、例えば *K U Z* 特異的プロテアーゼアッセイ又は *K U Z* 特異的免疫結合アッセイを使用して、*K u z* の活性を特異的に検出する方法を提供する。他の実施態様では、本発明は所定の *K u z* 活性を持つ脊椎動物において、例えば病原性血管形成に伴う腫瘍を検出することによって、病原性血管形成を特異的に検出する方法を提供する。

【0018】

本発明はまた *K u z* 活性に関連していることが推測的に知られている血管形成の修飾因子を同定する方法を提供する。例示できるそのような方法は、(a) 予め定まった量の *K u z* を含む血管形成アッセイ系を候補薬剤に、候補薬剤が存在しない場合に系が基準血管形成を付与する条件下で、接触させ、(b) 系の薬剤バイアス血管形成を検出する工程を含み、薬剤バイアス血管形成と基準血管形成の差異により、薬剤による系の血管形成の調節が示される。このようなスクリーニング方法は、以下に記載するように、インビトロの細胞ベースアッセイ又はインビボの動物ベースアッセイで実施されうる。

【0019】

更なる説明を行わなくとも、当業者であれば、これまでの説明と次の例証のための実施例を用いて、本発明の化合物を製造し使用し、本発明の方法を実施することができるであろう。従って、次の実施例は本発明の好適な実施態様を特に指摘するもので、残りの開示を如何なる形であっても限定するものとみなしてはならない。上記の発明は理解を容易にするための実施例と例証によりある程度の詳細さで説明したが、特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱しない限りそれに所定の變形と変更を加えても良いことは本発明の教唆から当業者には明らかであろう。この明細書中に引用した全ての刊行物及び特許出願を、あたかも各個々の刊行物又は特許出願が出典明示によりここに取り込まれる旨が示されているかのように、出典明示によりここに取り込む。

【0020】

(実施例)

1. 血管内皮成長因子、インターロイキン8、血小板由来内皮細胞増殖因子、塩基性線維芽細胞成長因子及び *K u z* はヒトのメラノーマ異種移植片における血管形成と転移を促進する。

この実験は、メラノーマの血管形成と転移が、*K u z* を含む幾つかの既知の血管形成因子のインヒビターによって阻害されることを実証する。実験の詳細は *R o f s t a d* 等 2

10

20

30

40

50

000 Cancer Res 60, 4932-8のものを適応させた。簡単に述べると、BALB/c nu/nuマウスに移植したヒトメラノーマ株(A-07、D-12、R-18及びU-25)からの細胞が腫瘍モデルとして用いられる。血管形成因子の発現はエライザ、ウェスタンブロット法及び免疫組織化学法により検査される。血管形成は皮内血管形成アッセイを使用して評価される。肺のコロニー形成及び突発性肺転移は、腫瘍細胞の静脈内及び皮内注射後にそれぞれ判定される。腫瘍血管形成、肺コロニー形成、及び突発性転移におけるVEGF、IL-8、PD-ECGF、bFGF及びKuzの特異的な役割は、中和抗体又はドミナントネガティブ型変異体で処置したマウスで評価される。メラノーマ株は複数の血管形成因子を発現し、各々の株が独特の発現パターンを示す。複数の血管形成因子は殆どの血管形成メラノーマ株において血管形成を促進する。腫瘍増殖、肺コロニー形成及び突発性転移は血管形成の速度によって制御され、よって血管形成を促進する血管形成因子によって制御される。肺コロニー形成と突発性転移は中和抗体又はドミナントネガティブ型変異体での処置によって阻害される。結果は、主題の血管形成因子のそれぞれがヒトメラノーマ異種移植片において血管形成と転移を促進することができ、それぞれが治療介入のための有効なターゲットであることを実証する。

10

【0021】

方法：成体(8-10週齢)の雌のBALB/c nu/nuマウスを用いて腫瘍血管形成、肺コロニー形成及び突発性転移を評価する。

4種のヒトメラノーマ細胞株(A-07、D-12、R-18及びU-25、Rofstad, Br. J. Cancer, 70: 804-812, 1994)を、13%の仔ウシ血清、250mg/lのペニシリン、50mg/lのストレプトマイシンを補填したRPMI 1640(25mMのHEPES及びL-グルタミン)中で単層培養物として維持する。培養物を空气中5%のCO₂の加湿雰囲気中で37℃にてインキュベーションし、一週間に2回、継代培養する。細胞株にマイコプラズマ汚染がないことが証明された。

20

【0022】

腫瘍血管形成は内皮血管形成アッセイ(Danielson, T等, Int. J. Cancer, 76: 836-841, 1998)を使用して評価される。100- μ lのハミルトンシリンジを用いてマウスの脇腹に10 μ lの細胞懸濁液の一定分量を接種する。接種点は真皮の深層部分のS.C.筋肉組織上である。接種当たりの細胞数は1.0 \times 10⁶である。接種後7日でマウスを殺し、小さい血管が新生した腫瘍がそのときまでに接種部位に発生する。接種部位の回りの皮膚を取り除き、腫瘍を解剖顕微鏡に配する。腫瘍の方を向いた真皮中の毛細血管をカウントし、目盛付きの接眼レンズを使用して腫瘍の直径を測定する。毛細血管の数を、10 μ lのHBSSの注射の後に決定したバックグラウンドに対して補正する。血管形成を、腫瘍当たりの毛細血管の数又は腫瘍の外周1mm当たりの毛細血管の数として定量する。

30

【0023】

インビボでの中和抗体での処置。

腫瘍血管形成、肺コロニー形成、及び突発性転移におけるVEGF、IL-8、PC-ECGF、bFGF及びKuzの特異的な役割は、これらの血管形成因子に対する中和抗体で宿主マウスを処置することによって調べられる。処置に使用される抗体は抗ヒトVEGFマウスモノクローナル抗体、抗ヒトIL-8マウスモノクローナル抗体、抗ヒトPD-ECGFヤギポリクローナル抗体、抗ヒトbFGFヤギポリクローナル抗体及び抗ヒトKuz抗体である。抗体溶液をPBSで希釈し、腹腔内注射によって0.25mlの容量をマウスに投与する。血管形成と肺コロニー形成実験では、処置は、24時間の間隔で与えられる抗体25 μ g(VEGF及びbFGF)又は100 μ g(IL-8及びPD-ECGF)の4回の投与からなる。最初の投与量は腫瘍細胞の接種の1時間前に与えられる。

40

【0024】

インビトロでの中和抗体での処置。

上述の中和抗体の可能な細胞障害性又は抗増殖性効果がインビトロで調べられる。A-0

50

7、D - 12、R - 18又はU - 25細胞を、5 μ g / mlの抗体の存在下又は非存在下で8日間、13%の仔ウシ血清、250 mg / lのペニシリン、50 mg / lのストレプトマイシンを補填したRPMI 1640 (25 mMのHEPES及びL - グルタミン)中で培養する。培養物中の細胞の数を、培養開始から2、4、6又は8日後に、血球計数器で細胞をカウントすることによって決定する。

【0025】

2. Kuzインヒビターによる血管形成の阻害

この実施例では、IC - 3、GM6001、GW9471、BB - 94、TIMP - 1及び2を含むKuzインヒビターが幾つかのモデル系で血管形成を阻害することが示される。Kuzとその活性の存在はエライザとKuz特異的プロテアーゼ活性によって血管形成の測定前又は後にアッセイされる。我々の結果は、Kuzインヒビターがマトリゲル上に蒔いたラット微小血管内皮細胞によって形成される管形成を減少させ、30 - 70%でフィブリン上に蒔いたヒト微小血管内皮細胞によるbFGF (10 ng / ml) + TNF (2.5 ng / ml) 刺激微小血管形成を有意に低減させることを実証している。更に、インヒビター濃度は従属的にラット大動脈 - リングアッセイでの突発的な微小血管形成とニワトリ絨毛尿膜アッセイでの血管発生を阻害した。

【0026】

Manolopoulos VG等 Gen Pharmacol 2000 Feb; 34 (2): 107 - 16の方法を適応させた。ラット副腎髄質からの微小血管内皮細胞 (RAMECs) を単離し、増殖させ、特徴付けた (Manolopoulos等, 1997 Biochim Biophys Acta 1356, 321 - 332; Manolopoulos等, 1997 Am J. Physiol. 273, C214 - C222)。細胞を空气中10%のCO₂を補填したDMEM中で培養し、17 - 19継代で使用する。ヒト包皮微小血管内皮細胞 (HMVECs) を、過去に記載されたようにして (Koolwijk等 1996. J. Cell Biol. 132, 1177 - 1188)、単離し増殖させる。細胞を、5%のCO₂の空气中37^oで、20 mMのHEPES (pH 7.3)、10%のヒト血清、10%の新生仔ウシ血清 (NBCS)、150 μ g / mlのECGF、5 IU / mlのヘパリン、2 mMのL - グルタミン及び抗生物質を補填したM199中でゼラチン被覆皿にて培養し、10又は11継代で使用する。両方の細胞型はCa²⁺ / Mg²⁺を含まない溶液中の0.5 g / lトリプシン - EDTAに簡単に暴露することによって継代される。

【0027】

マトリゲルアッセイはKubota Y等, 1988. J. Cell Biol. 107, 1589 - 1598に従って実施される。15.8 mg / mlで基底膜成分を含む腫瘍抽出物であるマトリゲルを1 cm² ウェル (120 μ l / ウェル) に塗布し、37^oで1時間、固化させる。続いて、各ウェルに50000 RAMECsを蒔き、実験の薬物を含む完全DMEMと共に37^oで8時間インキュベートする。選んだインキュベーション時間 (8時間) は予備実験では我々の実験条件下で最適な管形成のために最低限必要であることが見出されている。各ウェルに形成された管構造の全長を、OPTIMAS画像解析ソフトウェアを備えたコンピュータに接続したビデオカメラが装備された顕微鏡 (東京、日本) を用いて、ウェル表面全体をカバーする6倍の顕微鏡視野 (2.5 x 倍率) で測定する。

【0028】

フィブリンゲルアッセイは上掲のKoolwijk等によって記載されたようにして実施される。簡単に述べると、ヒトフィブリンマトリックスを、指示薬なしのM199培地1ミリリットル当たり2.5 Uの第XIII因子、2 mgのヒトフィブリンノーゲン、2 mgのクエン酸ナトリウム、0.8 mgのNaCl、及び3 μ gのプラスミノーゲンの混合物に0.1 U / mlのトロンピンを加えることによって調製する。全体で300 mlのこの混合物を1 cm² ウェルに加える。室温での凝固後、フィブリンマトリックスに、10%ヒト血清、10% NBCS及び抗生物質を補填した0.5 mlのM199を含ませる。内

10

20

30

40

50

皮細胞を高密度で蒔いてコンフルエントな単層を取得し、20 mMのHEPES (pH 7.3)、10%ヒト血清、10%NBCS、2 mMのL-グルタミン、抗生物質、10 ng/mlのbFGF、及び2.5 ng/mlのTNF を補填した指示薬なしのM199培地で培養する。新鮮培地と試験化合物を2から3日毎に加えて、インキュベーションを10日の間続ける。三次元フィブリンマトリックス中の内皮細胞によって形成された管構造を、位相差顕微鏡によって観察し、各ウェル中のその全長を、OPTIMAS画像解析ソフトウェアを備えたコンピュータに接続したモノクロCCDカメラ(MX5)が装備されたオリンパス顕微鏡を用いて、ウェル表面全体をカバーする6倍の顕微鏡視野で測定する。

【0029】

血管形成のラット大動脈-リングアッセイは、Liekens等, 1997 Oncol. Res. 9, 173-181によって記載されたようにして実施される。簡単に述べると、滅菌した1.5%のアガロース溶液を培養皿に注ぎゲル化させる。アガロースゲルにそれぞれ10及び17 mmの直径の2つの同心円を打ち抜くことによってアガロースリングが得られる。そのリングを6ウェルのプレートに移し、各ウェルに3つのリングを配する。胸大動脈を、成体の雄ウィスターラットから取得して、脂肪及び結合組織を除去し、0.5 mmのリングに切断する。各大動脈リングを、底部が既に150 µlの凝固フィブリノーゲンで被覆されたアガロースウェルの中心に位置させた後、アガロースウェルに凝固フィブリノーゲンを完全に満たす。使用されるフィブリノーゲン溶液は、3 mg/mlの濃度になるように無血清培地中に部分的に精製したウシフィブリノーゲンを溶解することにより得られる。フィブリンゲルは室温で30秒で形成される。フィブリンのゲル化後に、各ウェルに、20%FCS、10 mMのHEPES、1 mMのグルタミン、及び抗生物質を補填したM199培地を満たし、試験化合物を添加する。培養物を毎日調べて倒立顕微鏡で記録する。微小血管網目構造の三次元の複雑さのため、200を越える微小血管の形成がよくあり；よって形成される微小血管は二人の独立した観察者によって0(血管なし)から10(最大の血管数)までのスケールで記録される。

【0030】

絨毛尿膜血管発生アッセイは上掲のLiekens等によって記載されたようにして実施される。簡単に述べると、新鮮な受精卵が、CAMにさらず開口が卵殻に開けられる前に37 (湿度55-60%)で4日間、インキュベートされる。セロファンテープで開口を塞ぎ、卵をインキュベータに戻す。9日目に、試験化合物が滅菌状態で乾燥させられて上に配されているプラスチック円板(直径10 mm)をCAMの選択領域に適用し、各CAMに一つの円板とされる。また、(PBS又はDMSOを含む)コントロール円板を、試験化合物を含む円板から1 cm離して各CAMに配する。酢酸コルチゾンの滅菌溶液(100 µg/円板)を全ての円板に含めて炎症反応を防止する。その後、開口を覆い、卵を37 で48時間インキュベートする。卵に多量の10%緩衝ホルマリンをかけることによりインキュベーションを終了させ、プラスチック円板を取り除く。

【0031】

卵を少なくとも4時間室温で維持した後、円板の回りの大きな領域を切断し、ガラススライドに配する。円板の下の血管密度指数(血管数として表される)を測定する(Harris-Hooker等, 1983. J. Cell Physiol. 114, 302-310)。簡単に述べると、膜を10%緩衝ホルマリンに固定し、切り取り、ガラススライド上に平坦にして載せる。血管密度を、円板があったスポットをグリッドで覆うことによって決定する。グリッドは対象領域を覆う3つの同心円(1 mm離間)を含む。円に交差する血管をカウントする。この方法により、最近形成された小さい微小血管を考慮に入れながら、微小血管の形成を客観的に評価することが可能になる。円板打ち込みまでの全体のニワトリ胎仔の生存は90%を越える。コントロール円板には化合物を含む円板と同じ容量のDMSOが含まれる。

【0032】

3. Kuzはインビトロでの血管構造の形成を促進する。

Kureishi Y等 Nat Med 2000 Sep; 6(9): 1004-10に記載されたようにして、HUVECによる血管様構造の形成が、基底膜マトリックス調製物である成長因子を低減したマトリゲル(Becton Dickinson, Bedford, MA)で評価される。2ウェルチャンバーのスライドをEBM中4-5x10⁴細胞/ウェルで被覆プレートに蒔き、37℃で60分間、インキュベートする。培地に薬剤(ヒトKuzのメタロプロテアーゼドメイン、Kuzインヒビター、Kuz抗体、VEGF等々)を補填し、37℃で8-12時間、インキュベートする。管形成画像を倒立位相差顕微鏡(Nikon Diaphot)を使用して観察する。像をビデオグラフィックシステム(DEI-750CEデジタルアウトプットカメラ, Optronics, Goleta, CA)にとる。管形成の度合いを、国立保健研究所(NIH)イメージプログラムを使用して各ウェルからランダムな視野で管の長さを測定することにより定量する。VEGF同様、Kuz処置は毛細血管様管の形成を促進し、それはKuzインヒビター及び抗体によって阻害される。

10

【0033】

4. Kuzは正常コレストロール動物の血管形成：肢血管再生を促進する。

ここでは、我々は、虚血性組織の生理的血管再生をKuzが促進しKuzインヒビターが低減することができることを示す。Kureishi Y等 Nat Med 2000 Sep; 6(9): 1004-10のものを適応させたプロトコールにおいて、正常コレストロールのウサギからその大腿動脈とその主な枝を一方向から切除し、後肢血流に顕著な減少を生じさせる(Pu等 J. Surg. Res. 54, 575-583, 1993)。最初は、我々は虚血性後肢の内皮細胞へのアデノウイルス媒介遺伝子導入を使用して、Kuzがこのモデルで血管再生を促進することを初めて証明する。B-ガラクトシダーゼ(Bgal)を発現するアデノウイルスコンストラクトをこれらの肢に注入すると、導入遺伝子の発現が血管内皮に限定されることが明らかになった。このモデルにおけるアデノ-Kuzコンストラクトの注入は側副血管形成を亢進し、腓腹血圧比の増加によって示されるように組織血流を改善する。これに対して、アデノ-Bgalの注入は未処置の虚血性後肢(コントロール)又は生理食塩水を注入した血管に対して、血管形成又は組織血流を促進しなかった。

20

【0034】

肢血管再生に対するKuz及びKuzインヒビターの効果を試験するために、Kuzとインヒビターの投薬を、大腿動脈切除後に毎日(例えば腹腔内注射により0.1mg/kg IC-3)行う。Kuz処置を受ける動物は、大腿動脈切除後40日で未処置のコントロール群よりも、より検出可能な、特徴的な螺旋状の形態を持つ側副血管を示す。これに対して、Kuzインヒビター処置を受けた動物は、大腿動脈切除後40日で未処置のコントロール群ほど、検出しにくい特徴的な螺旋状の形態を持つ側副血管を示す。

30

【0035】

同様に、Kuz処置された動物の肢は虚血性肢の収縮期圧の正常な肢のものに対する比によって決まる減少した血行力学的欠陥を示す。Kuzの投与はまた虚血性肢において毛細血管形成を促進する(Kuz > 250毛細血管/mm²; コントロール < 170毛細血管/mm² 内転筋; P < 0.01)。比較のために、幾らかの動物は虚血性肢の大腿中へVEGFをコードするアデノウイルス(アデノ-VEGF)の筋肉内注射を受ける。Kuz同様、VEGFでの処置は側副血管及び毛細血管の形成を亢進し腓腹血圧を増加させた。Kuzインヒビターの同時投与はこれらの効果を逆にすることが示されている。

40

【0036】

方法：3.0-3.5kgの体重で正常な食餌が与えられた雄のニュージーランドホワイトラビットを用いて、血管成長のKuz及びKuzインヒビター媒介調節の効果を調べる。注入モデルに対しては、左大腿動脈と主要な側枝をその基点から伏在及び膝窩動脈への二股分岐部の2cm以内のところまで切除する。10日後に、術後の回復を可能にするために、末梢の大腿動脈を再暴露し、大腿静脈を一時的にクランプした後、50mlの生理食塩水、Ad-Bgalの3.5x10¹⁰ウイルス粒子を有する生理食塩水、又はAd

50

- Kuz (ヒトKuzのメタロプロテアーゼドメインを発現)の 3.5×10^{10} ウイルス粒子を有する生理食塩水を末梢の大腿動脈に注入し、15分インキュベートする。クランプの除去後、末梢の大腿動脈を連結する。Ad-Bgalを注入した2匹の動物を、手術の3日後に殺し、腓腹筋中でのB-ガラクトシダーゼの発現を判定する。残りの動物(n=6)について大腿動脈切除後31日目に肢血管再生を分析する。Ad-VEGFの筋肉内注射又はKuzインヒビターの腹腔内注射には、左大腿動脈と側枝をその基部から二股分岐が生じる遠くの点まで完全に切除する。10日後に、術後の回復を可能にするために、2.5mlの生理食塩水中全体で 3.5×10^{10} のAd-VEGFのウイルス粒子を、内転筋(2部位)、内側大(2部位)及び半膜性(1部位)筋(注射部位当たり500ul)に3から5mmの深さで27ゲージ針によって注射する。あるいは、インヒビター(IC-3、0.1mg/kg/日)又は生理食塩水を手術の後の日から犠牲にする1日前まで腹腔内投与(1ml)する。これらの群(n=6)の動物について手術から40日後に肢血管再生を分析する。如何なる処置計画の場合にも、死亡、浮腫又は血管腫の形成を含む如何なる有害事象もなかった。腓腹血圧をドップラー流量計(モデル1059, Parks Medical Electronics, Aloha, OR)によって両方の肢について測定する。腓腹血圧は右腓腹収縮期圧に対する左腓腹の比として定義される。側副動脈は内腸骨血管造影によって評価される。3-F注入カテーテル(Tracker-18, Target Therapeutic, San Jose, CA)を総頸動脈内に導入し、蛍光透視鏡の下で0.014インチのワイヤーを使用して虚血性肢の内腸骨動脈まで進める。ノニオン性の対照培地(Isovue-370, Squibb Diagnostics, New Brunswick, NJ)を1ml/秒の速度で注入し、虚血性肢の連続的画像を1フィルム/秒の速度で10秒間記録する。側副血管の定量血管造影分析は、4コマ血管造影図上に配した5mm離れて列に配置された2.5mm直径の円からなるグリッドオーバーレイを用いて結果を知らない研究者によって実施される。血管造影スコアは、可視できる動脈が交差する円の数を内側大腿における円の全数によって割ったものとして算定される。毛細血管密度は安楽死の時点で虚血性肢の内転筋から取り出された切片について光学顕微鏡を用いて結果を知らない研究者によって評価される。筋肉試料はOCT化合物(Miles, Elkhart, IN)に包埋され、液体窒素でスナップ凍結される。横断した形で配向した筋繊維を持つ凍結された切片(5um厚)を、インドキシル-テトラゾリウムを使用してアルカリホスファターゼに対して染色した後、0.5%エオシンで対比染色する。毛細血管密度は10のランダムに選択された視野から平均された毛細血管/mm²として算定される。

【0037】

5. Kuzはニワトリ絨毛尿膜アッセイにおいて血管形成を促進する。Bellahcene A等Circ Res 2000 Apr 28; 86(8): 885-91のものを適応させたプロトコールで、受精したローマン選択白色レグホーン卵を加湿インキュベータにて37でインキュベートする。発生の3日目に、矩形の開口を卵殻に開けた。8日目に、3.5mmの内径(高さ500mm、重さ7mg)の2つのシラスティックリングを、ニワトリ胎仔絨毛尿膜(CAM)表面に配する。Kuz(ヒト、メタロプロテアーゼドメイン、15mM)を滅菌PBSに溶解し5mlの一定分量でリング内に適用する。ビヒクル単独(PBS)及び血管形成の刺激剤である塩基性FGF(bFGF、0.5mM)をそれぞれ負のコントロール及び正のコントロールとして使用する。他の実験では、抗avb3抗体LM609(15mg)をリングに加えてKuzの存在下での血管発生に対するその効果を評価する。CAMを10日目まで毎日調べ、ライカDMLM顕微鏡(Van Hopplynus, Brussels, Belgium)でin vivoで写真にとった。各条件に対して最少8個の卵を処置し、実験を少なくとも2回行った。血管指数を、記載されたようにして(Barnhill等J Invest Dermatol. 1983; 81: 485-488)リングを横断する全ての識別可能な血管をカウントすることにより決定し、コントロールPBSリングと比較した場合の異なった実験条件での血管数の相対的増加として表す。我々の結果は、Kuzがニワトリ

絨毛尿膜アッセイで進行中の血管形成を刺激することを証明する。K u z の血管形成活性はK u z インヒビター、ドミナントネガティブ型変異体及びK u z 特異的抗体によって阻害された。

【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
2 May 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/34289 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/00, 39/395, 49/00, C12Q 1/00, G01N 33/53, 33/48
- (21) International Application Number: PCT/US01/45612
- (22) International Filing Date: 25 October 2001 (25.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/697,854 27 October 2000 (27.10.2000) US
- (71) Applicant: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]; 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA 94607-5200 (US).
- (72) Inventors: PAN, Duojia; U.T. Southwestern Medical Center 5323 Harry Hines Boulevard, Dallas, TX 75390-9040 (US); RUBIN, Gerald, M.; Dept. Molecular and Cell Biology, 539 LSA, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720-5200 (US); ZHANG, Hongbing; 814 Lexington Avenue, #2, El Cerrito, CA 94530 (US).
- (74) Agent: OSMAN, Richard, Aron; Science & Technology Law Group, 75 Denise Drive, Hillsborough, CA 94010 (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, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- 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 02/34289 A1

(54) Title: MODULATING ANGIOGENESIS

(57) Abstract: The invention provides methods and compositions relating to Kuz involvement in angiogenesis. In various embodiments, the invention provides methods for modulating angiogenesis by specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic angiogenesis; methods for modulating angiogenesis by specially modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal and subsequently detecting a resultant angiogenic modulation in the animal; methods for specifically detecting Kuz activity in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic angiogenesis; methods for specifically detecting a pathogenic angiogenesis in a vertebrate animal having a predetermined Kuz activity; and method for identifying a modulator of angiogenesis by (a) contacting an angiogenic assay system comprising a predetermined amount of Kuz with a candidate agent, under conditions whereby but for the presence of the agent, the system provides a reference angiogenesis; and (b) detecting an agent-biased angiogenesis of the system.

WO 02/34289

PCT/US01/45612

Modulating Angiogenesis

Inventors: Duojia Pan, Gerald M. Rubin and Hongbing Zhang

Assignee: The Regents of the University of California

INTRODUCTION

Field of the Invention

The field of the invention is modulating angiogenesis by targeting a protein known as Kuz.

Background of the Invention

Genes of the ADAM family encode transmembrane proteins containing both metalloprotease and disintegrin domains (reviewed in Black and White, 1998 *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 654-659; Wolfsberg and White, 1996 *Dev. Biol.* 180, 389-401), and are involved in diverse biological processes in mammals such as fertilization (Cho et al., 1998 *Science* 281, 1857-1859), myoblast fusion (Yagami-Hiromasa et al., 1995 *Nature* 377, 652-656) and ectodomain shedding (Moss et al., 1997 *Nature* 385, 733-736; Black et al., 1997 *Nature* 385, 729-733; Peschon et al., 1998 *Science* 282, 1281-1284). The *Drosophila kuzbanian (kuz)* gene represents the first ADAM family member identified in invertebrates (Rooke et al., 1996 *Science* 273, 1227-1231). Previous genetic studies showed that *kuz* is required for lateral inhibition and axonal outgrowth during *Drosophila* neural development (Rooke et al., 1996; Fambrough et al., 1996 *PNAS. USA* 93, 13233-13238; Pan and Rubin, 1997 *Cell* 90, 271-280; Sotillos et al., 1997 *Development* 124, 4769-4779). Specifically, during the lateral inhibition process, *kuz* acts upstream of *Notch* (Pan and Rubin, 1997; Sotillos et al., 1997), which encodes the transmembrane receptor for the lateral inhibition signal encoded by the *Delta* gene. More recently, a homolog of *kuz* was identified in *C. elegans (SUP-17)* that modulates the activity of a *C. elegans* homolog of Notch in a similar manner (Wen et al., 1997 *Development* 124, 4759-4767).

Vertebrate homologs of *kuz* have been isolated in *Xenopus*, bovine, mouse, rat and human. The bovine homolog of KUZ (also called MADM or ADAM 10) was initially isolated serendipitously based on its in vitro proteolytic activity on myelin basic protein, a

WO 02/34289

PCT/US01/45612

cytoplasmic protein that is unlikely the physiological substrate for the bovine KUZ protease (Howard et al., 1996 Biochem.J. 317, 45-50). In a recent study, we showed that expression of a dominant negative form of the murine *kuz* homolog (*mkuz*) in *Xenopus* leads to the generation of extra neurons, suggesting an evolutionarily conserved role for *mkuz* in regulating Notch signaling in vertebrate neurogenesis (Pan and Rubin, 1997). We have now generated *mkuz*-deficient mice using gene targeting in embryonic stem (ES) cells. We show that *mkuz* is essential for embryonic development. *mkuz* mutant mice die around embryonic day (E) 9.5, with severe defects in the nervous system, the paraxial mesoderm and the yolk sac vasculature. In the nervous system, *mkuz* mutant embryos show ectopic neuronal differentiation. In the paraxial mesoderm, *mkuz* mutant embryos show delayed and uncoordinated segmentation of the somites. These phenotypes are similar to those of mice lacking *Notch-1* or components of the Notch pathway such as *RBP-Jk* (Conlon et al, 1995, Development 121, 1533-1545; Oka et al., 1995), indicating a conserved role for *mkuz* in modulating Notch signaling in mouse development. Furthermore, we detect no visible defect in Notch processing in our knockout animals. Besides the neurogenesis and somitogenesis defect, *mkuz* mutant mice also show severe defects in the yolk sac vasculature, with an enlarged and disordered capillary plexus and the absence of large vitelline vessels. Since such phenotype has not been observed in mice lacking *Notch-1* or *RBP-Jk* (Swiatek et al., 1994 Genes Dev 15, 707-719; Conlon et al, 1995; Oka et al., 1995 Development 121, 3291-3301), we determine that this phenotype reveals a novel function of *mkuz* that is distinct from its role in modulating Notch signaling. Taken together, our studies reveal the essential role for an ADAM family disintegrin metalloprotease in mammalian neurogenesis, somitogenesis and angiogenesis.

SUMMARY OF THE INVENTION

We disclosed that Kuz is involved in somitogenesis, neurogenesis and angiogenesis and provides a useful therapeutic target for intervention in associated pathologies. Accordingly, the invention provides methods and compositions relating to Kuz involvement in somitogenesis, neurogenesis, and particularly, angiogenesis. In one embodiment, the invention provides methods for modulating angiogenesis comprising the step of specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic

WO 02/34289

PCT/US01/45612

angiogenesis. A wide variety of methods for specifically modulating Kuz activity are disclosed, including contacting the animal with an agent which specifically binds the Kuz or competes with the Kuz for substrate or a required cofactor.

In another embodiment, the invention provides methods for modulating angiogenesis comprising the steps of specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal not necessarily predetermined to have a pathogenic angiogenesis, but rather subsequently detecting a resultant angiogenic modulation in the animal.

The invention also provides methods for specifically detecting Kuz activity in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic angiogenesis; for example, using a KUZ specific protease assay or a KUZ specific immunobinding assay. The invention also provides methods for specifically detecting a pathogenic angiogenesis in a vertebrate animal having a predetermined Kuz activity; for example, by detecting a tumor associated with pathogenic angiogenesis.

The invention also provides methods for identifying a modulator of angiogenesis, comprising the steps of (a) contacting an angiogenic assay system comprising a predetermined amount of Kuz with a candidate agent, under conditions whereby but for the presence of the agent, the system provides a reference angiogenesis; and (b) detecting an agent-biased angiogenesis of the system; wherein a difference between the agent-biased angiogenesis and the reference angiogenesis indicates that the agent modulates angiogenesis in the system. Such methods may be embodied in an in vitro, cell based assay or an in vivo, animal-based assay.

The invention also provides kits and reagents adapted to the subject methods.

DESCRIPTION OF SPECIFIC EMBODIMENTS OF THE INVENTION

The following descriptions of particular embodiments and examples are offered by way of illustration and not by way of limitation. Unless contraindicated or noted otherwise, in these descriptions and throughout this specification, the terms "a" and "an" mean one or more, the term "or" means and/or. Kuz refers to an art-recognized family of natural proteins which have been extensively described, encompassing natural orthologs and variants also well known in the art. For example, several forms of human KUZ have been described including WO98/37092 and WO97/31931; Mayer et al. (US Pat No.5,922,546); and Rubin et

WO 02/34289

PCT/US01/45612

al. (US Pat No.5,935,792). Though often discussed and exemplified in terms of angiogenesis, the disclosed methods and reagents are to be understood to be generally applicable to pathogenic somitogenesis and neurogenesis as well.

Several disclosed applications involve specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal. A wide variety of methods for specifically modulating Kuz activity are disclosed, including contacting the animal with an agent which specifically binds the Kuz or competes with the Kuz for substrate or a required cofactor.

Agents which specifically bind kuz include metalloprotease inhibitors, such as hydroxamate metalloprotease inhibitors and TACE (TNF-alpha converting enzyme) inhibitors (for review, see Amour A, et al. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Jun 30;878:728-31). Exemplary inhibitors include IC-3 (N-{D,L-[2-(hydroxyaminocaronyl)methyl]-4-methylpentanoyl}-L-alanine, 2-aminoethyl amide, Black et al., *Nature*, 1997, Vol 385, 729-73; Galko and Tessier-Lavigne, *Science*, 2000, Vol 289, 1365-1367), GM6001 (NHOHCOCH₂CH(I-Bu)CO-Trp-NHMe); GW9471 (see structure of GW9277, a biotinylated derivative of GW9471 used during the purification of TACE as shown in Moss et al, *Nature*, 1997, Vol 385, 733-736); and BB-94 (batimastat), a synthetic hydroxamate peptidomimetic matrix metalloproteinase inhibitor, see Hernandez-Pando R, et al. *Int J Exp Pathol* 2000 Jun;81(3):199-209. Useful natural MMP inhibitors include the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), such as TIMP-1 and TIMP-3 (see, e.g. Amour et al., *FEBS Lett.* 2000 May 19;473(3):275-9).

Another class of inhibitors which specifically bind Kuz are polypeptides comprising immunoglobulin complementary determining regions (CDRs), particularly CDR3 regions which specifically bind Kuz. These encompass antibodies and antibody fragments such as F(ab) fragments. Methods for making and using therapeutic antibodies and antibody fragments are well known, e.g. US Pat. No. 5,935,792.

Intracellular antibodies, or intrabodies, represent a class of neutralizing molecules with applications in gene therapy (vonMehren M, Weiner LM. (1996) *Current Opinion in Oncology*. 8: 493-498, Marasco WA. (1997) *Gene Therapy*. 4: 11-15, Rondon J, Marasco WA. (1997) *Annual Review of Microbiology*. 51: 257-283). Anti-Kuz intrabodies are engineered single-chain antibodies in which the variable domain of the heavy chain is joined to the variable domain of the light chain through a peptide linker, preserving the affinity of

WO 02/34289

PCT/US01/45612

the parent Kuz antibody (Rondon et al.). The anti-Kuz intrabodies are designed from either the polyclonal or monoclonal anti-Kuz antibody cDNA that encode antibodies that recognize the enzymatically active form of Kuz and which, upon binding, inhibit Kuz's ability to transphosphorylate. Also, anti-Kuz intrabodies can be made from either polyclonal or monoclonal antibody cDNA that encodes an antibody that stimulates Kuz enzymatic activity. The anti-Kuz single chain intrabodies may be additionally modified with a C-terminal human C kappa domain to increase cytoplasmic stability and/or the C-terminal SV40 nuclear localization signal to direct the nascent intrabody to the nuclear compartment, respectively (Mhashilkar AM, et al. (1995) *Embo Journal*. 14: 1542-1551). In this regard, stably expressed single chain anti-Kuz intrabodies, and their modified forms, can be used to effectively target Kuz molecules either in the cytoplasm or nuclear compartments of eukaryotic cells.

The Kuz-specific intrabodies can be introduced into cultured cells by any one of several established methods that include the standard DNA transfection methods (Calcium phosphate, electroporation, lipofectamine, etc.). The anti-Kuz intrabodies are first constructed into any one of a variety of inducible expression vectors tet repressible (Gossen M, Bujard H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 5547-5551) or IPTG inducible (Liu HS, et al. (1998) *Biotechniques*. 24: 624-632, Hannan GN, et al. (1993) *Gene*. 130: 233-239) or glucocorticoid inducible (using a GRE), constitutive expression vectors (such as CMV or RSV promoter driven vectors) or tissue specific expression vectors using promoters of tissue specific expressed genes (such as the T cell receptor promoter). A key variation to express the anti-Kuz intrabodies tissues (as well as cell lines) is to construct appropriate viral expression vectors using standard protocols (Vile RG, et al. (1995) *British Medical Bulletin*. 51: 12-30, Shoji I, et al. (1997) *J. General Virology*. 78: 2657-2664, Paulus W, et al. (1996) *J. Virology*. 70: 62-67). The anti-Kuz intrabody genes are substituted for the key viral genes and packaged into a viral particle by a host cell. The altered viral genome is integrated into the target tissue genome but is disrupted in a way that prevents the formation of new viral particles. Individual cells of the target tissues then produce the anti-Kuz intrabody transcripts and proteins.

A wide variety of agents may be used to specifically compete with Kuz for substrate or cofactors. Competitive inhibitors encompass numerous classes, including substituted

WO 02/34289

PCT/US01/45612

hydroxamates, carboxylates, thiols, phosphonates, aminodithiazols, and catechols which are known to inhibit Zn-metalloproteases through high-affinity zinc binding, and chelators of divalent cations, such as EDTA and 1,10-phenanthroline. Competitive inhibitors also include dominant negative Kuz mutants, wherein the protease domain is disrupted by deletion or point mutagenesis. Such Kuz mutants are known in the art and novel dominant negative mutants are readily made by targeted mutagenesis of residues within the protease domain followed by routine activity screening, see US Pat No. 5,935,792. Exemplary dominant negative human kuz mutants are shown in Table 1.

Table 1. Exemplary dominant negative human kuz mutants

Name	mutation	Dominant Negative Activity
hKUZDN1	Δ 212-455*	+++
hKUZDN2	Δ 213-381	+++
hKUZDN3	Δ 382-392	+++
hKUZDN4	Δ 382-392 & Δ 677-748	+++
hKUZDN5	E384 to A	+++
hKUZDN6	E384 to A & Δ 675-748	+++
hKUZDN7	S391 to A	+++
hKUZDN8	AHE384-386 to AAA	+++

*Numbering refers to the amino acid residues as set forth in the human Kuz (SEQ ID NO:4) of US patent no. 5,935,792. Corresponding mutations can be identified in other human Kuz proteins, such as disclosed in US pat. no. 5,922,546 and PCT publication WO 97/31931, by sequence alignment.

In a preferred embodiment, the dominant negative Kuz mutant is soluble, i.e. lacking the transmembrane domain but comprising one or more of the extracellular domains. Preferably, the soluble dominant negative mutant also lacks the signal peptide and prodomain, and comprises the cysteine-rich domain, the disintegrin domain and/or the metalloprotease domain. In another preferred embodiment, the soluble dominant negative mutant is fused to an unrelated polypeptide selected to facilitate purification, detection, or solubilization, or to provide some other function. Fusion proteins are generally produced by expressing a hybrid gene in which a nucleotide sequence encoding the soluble Kuz mutant

WO 02/34289

PCT/US01/45612

joined in-frame to a nucleotide sequence encoding the selected unrelated polypeptide. A preferred unrelated protein is the constant (Fc) region of an immunoglobulin (e.g. a human IgG Fc region), which can render the resulting fusion protein more stable and with a longer half-life when used as a biotherapeutic.

Several disclosed applications involve a vertebrate animal, particularly a mouse, rat or human, which has been predetermined to have pathogenic somitogenesis, neurogenesis or particularly, angiogenesis. In other embodiments, the methods involve specifically detecting the pathogenic angiogenesis, somitogenesis or neurogenesis in the animal. Pathogenic angiogenesis for example, encompasses any condition presenting undesirably excessive or deficient angiogenesis, systemically or regionally; exemplary underlying conditions include cancer, diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis, macular degeneration, psoriasis and other pathologies in which excessive, insufficient or misregulated angiogenesis plays a role. For example, our Kuz-deficient mice present upregulation of several neural specific genes, including Mash-1 and neurogenin, indicating an excess of neural precursors. These mice also present defective somitogenesis as revealed by loss of Dll1 expression in somites and severe phenotypic disruption of the somites. In addition, the mice present pathogenic angiogenesis, wherein vitelline vessels in the embryonic yolk sack fail to develop. The pathogenic somitogenesis, neurogenesis or angiogenesis are readily detected by routine methods, such as histological exam, expression of correlating marker genes, etc. In addition, numerous in vitro model systems are known, such as endothelial cell based angiogenesis assays, as exemplified below. In many cases, detection is effected inferentially by detecting a condition, such as a tumor, which is associated with a pathogenic angiogenesis. Angiogenesis in particular is detected by any convenient means, including in vitro, cell-based assays such as huvec assays and in vivo measures such as blood flow parameters, microvessel density, vascular endothelial growth factor levels (see, e.g. Lee et al. *Obstet Gynecol* 2000 Oct;96(4):615-21), growth factor receptors (e.g. Shin et al. 2000 *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 519-28. etc., These assays may be practiced in model systems, such as heterologous transplant systems, e.g. Rofstad et al. 2000 *Cancer Res* 60, 4932-8.

The present disclosure that Kuz provides a useful therapeutic target for conditions associated with pathogenic somitogenesis, neurogenesis or angiogenesis provides numerous applications that will be apparent to those skilled in the art - any application premised on the

WO 02/34289

PCT/US01/45612

used of Kuz as a therapeutic target for conditions associated with pathogenic somitogenesis, neurogenesis or angiogenesis. For example, in one embodiment, the invention provides methods for modulating angiogenesis comprising the steps of specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal not necessarily predetermined to have a pathogenic angiogenesis, but rather subsequently detecting a resultant angiogenic modulation in the animal. In another embodiment, the invention also provides methods for specifically detecting Kuz activity in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic angiogenesis; for example, using a KUZ specific protease assay or a KUZ specific immunobinding assay. In another embodiment, the invention provides methods for specifically detecting a pathogenic angiogenesis in a vertebrate animal having a predetermined Kuz activity; for example, by detecting a tumor associated with pathogenic angiogenesis.

The invention also provides methods for identifying a modulator of angiogenesis which is a priori known to be associated with Kuz activity. An exemplary such method comprises the steps of (a) contacting an angiogenic assay system comprising a predetermined amount of Kuz with a candidate agent, under conditions whereby but for the presence of the agent, the system provides a reference angiogenesis; and (b) detecting an agent-biased angiogenesis of the system; wherein a difference between the agent-biased angiogenesis and the reference angiogenesis indicates that the agent modulates angiogenesis in the system. Such screening methods may be embodied in an in vitro, cell based assay or an in vivo, animal-based assays, such as described below.

Without further description, one of ordinary skill in the art can, using the preceding description and the following illustrative examples, make and utilize the compounds of the present invention and practice the claimed methods. The following working examples therefore, specifically point out preferred embodiments of the present invention, and are not to be construed as limiting in any way the remainder of the disclosure. Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be readily apparent to those of ordinary skill in the art in light of the teachings of this invention that certain changes and modifications may be made thereto without departing from the spirit or scope of the appended claims. All publications and patent applications cited in this specification are herein incorporated by

WO 02/34289

PCT/US01/45612

reference as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

EXAMPLES

1. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, basic fibroblast growth factor and Kuz promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts.

This study demonstrates that angiogenesis and metastasis of melanoma are inhibited by inhibitors of several known angiogenic factors, including Kuz. Experimental details are adapted from Rofstad, et al. 2000 Cancer Res 60, 4932-8. Briefly, cells from human melanoma lines (A-07, D-12, R-18, and U-25) transplanted to BALB/c nu/nu mice are used as tumor models. Expression of angiogenic factors is studied by ELISA, Western blotting, and immunohistochemistry. Angiogenesis is assessed by using an intradermal angiogenesis assay. Lung colonization and spontaneous lung metastasis are determined after i.v. and intradermal inoculation of tumor cells, respectively. The specific role of VEGF, IL-8, PD-ECGF, bFGF and Kuz in tumor angiogenesis, lung colonization, and spontaneous metastasis are assessed in mice treated with neutralizing antibody or dominant negative mutants. The melanoma lines express multiple angiogenic factors and each line shows a unique expression pattern. Multiple angiogenic factors promote angiogenesis in the most angiogenic melanoma lines. Tumor growth, lung colonization, and spontaneous metastasis are controlled by the rate of angiogenesis and hence by the angiogenic factors promoting the angiogenesis. Lung colonization and spontaneous metastasis are inhibited by treatment with neutralizing antibody or dominant negative mutants. Results demonstrate that each of the subject angiogenic factors can promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts and each provides a validated target for therapeutic intervention.

Methods: Adult (8-10 weeks of age) female BALB/c nu/nu mice are used to assess tumor angiogenesis, lung colonization, and spontaneous metastasis.

Four human melanoma cell lines (A-07, D-12, R-18, and U-25, Rofstad, Br. J. Cancer, 70: 804-812, 1994) are maintained in monolayer culture in RPMI 1640 (25 mM HEPES and L-glutamine) supplemented with 13% bovine calf serum, 250 mg/l penicillin, and 50 mg/l streptomycin. The cultures are incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in

WO 02/34289

PCT/US01/45612

air and subcultured twice a week. The cell lines are verified to be free from *Mycoplasma* contamination.

Tumor angiogenesis is assessed by using an intradermal angiogenesis assay (Danielsen, T. et al., *Int. J. Cancer*, 76: 836-841, 1998). A 100- μ l Hamilton syringe is used to inoculate aliquots of 10 μ l of cell suspension into the flanks of mice. The inoculation point lies above the S.C. muscle tissue in the deeper part of the dermis. The number of cells per inoculum is 1.0×10^6 . The mice are killed on day 7 after the inoculation - small vascularized tumors develop in the inoculation sites by that time. The skin around the inoculation sites is removed, and the tumors located with a dissecting microscope. The capillaries in the dermis oriented toward the tumors are counted, and the diameters of the tumors measured, using an ocular with a scale. The number of capillaries is corrected for the background, determined after the injection of 10 μ l of HBSS. Angiogenesis is quantified as a number of capillaries per tumor or number of capillaries per mm of tumor circumference.

Treatment with Neutralizing Antibody *in Vivo*. The specific roles of VEGF, IL-8, PC-ECGF, bFGF and Kuz in tumor angiogenesis, lung colonization, and spontaneous metastasis are investigated by treating host mice with neutralizing antibody against these angiogenic factors. The antibodies used for treatment are antihuman VEGF mouse monoclonal antibody, antihuman IL-8 mouse monoclonal antibody, antihuman PD-ECGF goat polyclonal antibody, antihuman bFGF goat polyclonal antibody and antihuman Kuz antibody. The antibody solutions are diluted in PBS and administered to the mice in volumes of 0.25 ml by i.p. injection. In the angiogenesis and lung colonization experiments, the treatments consist of four doses of 25 μ g (VEGF and bFGF) or 100 μ g (IL-8 and PD-ECGF) of antibody given in intervals of 24 h. The first dose is given 1h before the tumor cell inoculation.

Treatment with Neutralizing Antibody *in Vitro*. Possible cytotoxic or antiproliferative effect of the neutralizing antibodies described above are investigated *in vitro*. A-07, D-12, R-18 or U-25 cells are cultured in RPMI 1640 (25 mM HEPES and L-glutamine) supplemented with 13% bovine calf serum, 250 mg/l penicillin, and 50 mg/l streptomycin in the absence or presence of 5 μ g/ml of antibody for up to 8 days. The number of cells in the cultures is determined 2, 4, 6, or 8 days after the cultures are initiated by counting cells in a hemocytometer.

2. Inhibition of angiogenesis by Kuz inhibitors.

WO 02/34289

PCT/US01/45612

In this example, Kuz inhibitors including IC-3, GM6001, GW9471, BB-94, TIMP-1 and 2 are shown to inhibit angiogenesis in several model systems. The presence of Kuz and its activity is assayed by ELISA and Kuz-specific protease activity prior to or subsequent to the measure of angiogenesis. Our results demonstrate that the Kuz inhibitors reduce tube formation by rat microvascular endothelial cells plated on matrigel and significantly reduce bFGF (10 ng/ml) + TNFalpha (2.5 ng/ml)-stimulated microvessel formation by human microvascular endothelial cells plated on fibrin by 30-70%. Furthermore, inhibitor concentration dependently inhibited spontaneous microvessel formation in the rat aorta-ring assay and vessel development in the chick chorioallantoic membrane assay.

The methods were adapted from Manolopoulos VG, et al. Gen Pharmacol 2000 Feb;34(2):107-16. Microvascular endothelial cells from the rat adrenal medulla (RAMECs) are isolated, grown, and characterized (Manolopoulos, et al., 1997 Biochim Biophys Acta 1356, 321-332; Manolopoulos, et al., 1997 Am J. Physiol. 273, C214-C222.) The cells are cultured in DMEM supplemented with 10% CO₂ in air, and used at passages 17-19. Human foreskin microvascular endothelial cells (HMVECs) are isolated and grown as previously described (Koolwijk, et al. 1996. J. Cell Biol. 132, 1177-1188.). The cells are cultured in gelatin-coated dishes in M199 supplemented with 20 mM HEPES (pH 7.3), 10% human serum, 10% newborn calf serum (NBCS), 150 µg/ml ECGF, 5 IU/ml heparin, 2mM L-glutamine, and antibiotics, at 37°C, 5% CO₂ in air, and used at passage 10 or 11. Both cell types are passaged by brief exposure to 0.5 g/l trypsin-EDTA in a Ca²⁺/Mg²⁺-free solution.

The matrigel assay is performed according to Kubota Y. et al., 1988. J. Cell Biol. 107, 1589-1598. Matrigel, a tumor extract containing basement-membrane components at 15.8 mg/ml, is applied to 1-cm² wells (120 µl/well) and allowed to solidify at 37°C for 1 h. Subsequently, 50,000 RAMECs are seeded in each well and incubated with complete DMEM containing the drugs under study at 37°C for 8 h. The incubation period chosen (8 h) is found in preliminary studies to be the minimal necessary for optimal tube formation under our experimental conditions. The total length of the tubular structures formed in each well is measured in six microscopic fields (at 2.5x magnification) covering the entire well surface by using a microscope equipped with a video camera connected to a computer with OPTIMAS image analysis software (Tokyo, Japan).

The fibrin gel assay is performed as described by Koolwijk, et al. *supra*. Briefly,

WO 02/34289

PCT/US01/45612

human fibrin matrices are prepared by the addition of 0.1 U/ml thrombin to a mixture of 2.5 U factor XIII, 2mg human fibrinogen, 2 mg Na citrate, 0.8 mg NaCl, and 3 µg plasminogen per milliliter of M199 medium without indicator. A total of 300 ml of this mixture is added to 1-cm² wells. After clotting at room temperature, fibrin matrices are soaked with 0.5 ml M199 supplemented with 10% human serum, 10% NBCS, and antibiotics. Endothelial cells are seeded at high density to obtain confluent monolayers and are cultured in M199 medium without indicator supplemented with 20 mM HEPES (pH 7.3), 10% human serum, 10% NBCS, 2 mM L-glutamine, antibiotics, 10 ng/ml bFGF, and 2.5 ng/ml TNF α . Incubations are allowed to proceed for 10 days, with fresh medium and test compounds being added every 2 to 3 days. The tubular structures formed by endothelial cells in the three-dimensional fibrin matrix are observed by phase-contrast microscopy, and their total length in each well is measured in six microscopic fields covering the entire well surface by using an Olympus microscope equipped with a monochrome CCD camera (MX5) connected to a computer with OPTIMAS image analysis software.

The rat aorta-ring assay of angiogenesis is performed as described by Liekens, et al., 1997 *Oncol. Res.* 9, 173-181. Briefly, a sterile 1.5% solution of agarose is poured into culture dishes and allowed to gel. Agarose rings are obtained by punching two concentric circles, with diameters of 10 and 17 mm, respectively, in the agarose gel. The rings are transferred to six-well plates, three rings in each well. Thoracic aortas are obtained from adult male Wistar rats, cleaned from fat and connective tissue, and sectioned in 0.5-mm rings. Each aortic ring is positioned at the center of an agarose well, the bottom of which has already been coated with 150 µl of clotting fibrinogen, and then the agarose well is completely filled with clotting fibrinogen. The fibrinogen solution used is obtained by dissolving partly purified bovine fibrinogen in serum-free medium to obtain a concentration of 3 mg/ml. The fibrin gel forms within 30 s at room temperature. After fibrin gelation, each well is filled with M199 medium supplemented with 20% FCS, 10 mM HEPES, 1 mM glutamine, and antibiotics, and the test compounds are added. Cultures are examined daily and scored under an inverted microscope. Formation of more than 200 microvessels is common, owing to the three-dimensional complexity of the microvascular network; therefore, the formed microvessels are scored on a scale from 0 (no vessels) to 10 (maximum vessel number) by two independent observers.

WO 02/34289

PCT/US01/45612

The chorioallantoic membrane vessel development assay is performed as described by Liekens et al, *supra*. Briefly, fresh fertilized eggs are incubated at 37°C (humidity 55-60%) for 4 days before a window is opened on the eggshell, exposing the CAM. The window is covered with cellophane tape, and the eggs are returned to the incubator. On day 9, plastic discs (10-mm diameter), on which the test compounds have been allowed to dry under sterile conditions, are applied to selected areas of the CAM, one disc in each CAM. In addition, a control disc (containing PBS or DMSO) is placed on each CAM, 1 cm away from the disc containing the test compounds. A sterile solution of cortisone acetate (100 µg/disc) is incorporated in all discs to prevent an inflammatory response. Thereafter, the windows are covered, and the eggs are incubated at 37°C for 48 h. Incubation is terminated by flooding of the eggs with 10% buffered formalin, and the plastic discs are removed.

The eggs are kept at room temperature for at least 4 h, and then a large area around the discs is cut off and placed on a glass slide. The vascular density index under the discs (expressed as number of blood vessels) is measured (Harris-Hooker et al., 1983. J. Cell Physiol. 114, 302-310). Briefly, membranes are fixed in 10% buffered formalin, excised, and laid flat on a glass slide. The vessel density is determined by covering with a grid the spot where the disc has been. The grid contains three concentric circles (1 mm apart) that covers the area of interest. The vessels intersecting the circles are counted. This method allows for an objective evaluation of microvessel formation, taking into account the small, recently formed microvessels. Overall chick embryo survival until disc implantation is over 90%. Control discs receive the same volume of DMSO as the discs containing the compounds.

3. Kuz promotes formation of vascular structures in vitro.

The formation of vascular-like structures by HUVEC is assessed on the basement membrane matrix preparation, growth factor-reduced Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA), as described in Kureishi Y, et al. Nat Med 2000 Sep;6(9):1004-10. Two-well chamber slides are coated with Matrigel (10 mg/ml) according to the manufacturer's instructions. HUVEC are seeded on coated plates at 4—5 x 10⁴ cells/well in EBM and incubated at 37 °C for 60 minutes. The media are supplemented with the agents (metalloprotease domain of human Kuz, Kuz inhibitors, Kuz antibodies, VEGF, etc.) and incubated at 37 °C for 8—12 h. Tube formation image is observed using an inverted phase contrast microscope (Nikon Diaphot). Images are captured with a video graphic system (DEI-750 CE Digital Output

WO 02/34289

PCT/US01/45612

Camera, Optronics, Goleta, CA). The degree of tube formation is quantified by measuring the length of tubes in random fields from each well using the National Institutes of Health (NIH) Image Program. Like VEGF, Kuz treatment promotes the formation of capillary-like tubes, which is inhibited by Kuz inhibitors and antibodies.

4. Kuz promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals: limb revascularization.

Here we show that Kuz promotes and Kuz inhibitors can reduce physiological revascularization of ischemic tissue. In a protocol adapted from Kureishi Y, et al. *Nat Med* 2000 Sep;6(9):1004-10, normocholesterolemic rabbits are subject to unilateral resection of their femoral arteries and their main branches, resulting in a marked decrease in hindlimb perfusion (Pu, et al. *J. Surg. Res.* 54, 575-583, 1993). Initially, we use adenovirus-mediated gene transfer to endothelial cells of the ischemic hindlimb to first demonstrate that Kuz promotes angiogenesis in this model. Infusion of these limbs with an adenovirus construct expressing B-galactosidase (Bgal) revealed that transgene expression was restricted to the vascular endothelium. Infusion of a adeno-Kuz constructs in this model enhances collateral vessel formation, and improves tissue perfusion as indicated by an increase in calf blood pressure ratio. In contrast, infusion with adeno-Bgal did not promote vessel formation or tissue perfusion relative to untreated ischemic hindlimbs (control) or vessels infused with saline.

To test the effects of Kuz and Kuz inhibitors on limb revascularization, Kuz and inhibitor dosages are administered daily (e.g. 0.1 mg/kg IC-3 by intraperitoneal injection) after femoral artery resection. Animals receiving Kuz treatment display more detectable collateral vessels with characteristic corkscrew morphology than the untreated control group at 40 days following femoral artery resection. In contrast, animals receiving Kuz inhibitor treatment display less detectable collateral vessels with characteristic corkscrew morphology than the untreated control group at 40 days following femoral artery resection.

Correspondingly, the limbs of the Kuz-treated animals display reduced hemodynamic deficit determined by ratio of the systolic pressure of the ischemic limb to that of the normal limb. Kuz administration also promotes capillary formation in the ischemic limb (Kuz > 250 capillaries/mm²; control < 170 capillaries/mm² in adductor muscle; $P < 0.01$). For comparison, some animals receive an intramuscular injection of an adenovirus encoding VEGF (adeno-VEGF) into the thigh of the ischemic limb. Like Kuz, VEGF treatment

WO 02/34289

PCT/US01/45612

enhanced collateral and capillary vessel formation and increased calf blood pressure.

Coadministration of Kuz inhibitors are shown to reverse these effects.

Methods: Male New Zealand white rabbits, weighing 3.0-3.5 kg and fed a normal diet, are used to examine the effects of Kuz and Kuz inhibitor-mediated modulation of vessel growth. For the infusion model, the left femoral artery and main side branches are excised from their proximal origin to within 2 cm of the bifurcation into the saphenous and popliteal arteries. After 10 days, to permit post-operative recovery, the distal femoral artery is re-exposed and, after temporary clamping of the femoral vein, 50 ml of saline, saline with 3.5×10^{10} viral particles of Ad-Bgal, or saline with 3.5×10^{10} viral particles of Ad-Kuz (expressing metalloprotease domain of human Kuz) is infused through the distal femoral artery and incubated for 15 min. After clamp removal, the distal femoral artery is ligated. Two animals infused with Ad-Bgal are killed 3 days after surgery to determine B-galactosidase expression in the gastrocnemial muscle. The remainder of the animals ($n = 6$) are analyzed for limb revascularization at 31 days after femoral artery resection. For the intramuscular injection of Ad-VEGF or the intraperitoneal injection of Kuz inhibitor, the left femoral artery and side branches are completely excised from their proximal origin to the point distally where bifurcation occurs. After 10 days, to permit post-operative recovery, a total of 3.5×10^{10} viral particles of Ad-VEGF in 2.5 ml of saline is injected through a 27-gauge needle at a depth of 3 to 5 mm in the adductor (2 sites), medial large (2 sites) and semimembranous (1 site) muscle (500 μ l per injection site). Alternatively, inhibitor (IC-3, 0.1 mg/kg/day) or saline is given intraperitoneally (1 ml) from the day after surgery until one day before sacrifice. Animals in these groups ($n = 6$) are analyzed for limb revascularization 40 days after surgery. No adverse events, including death, edema or angioma formation, are noted with any treatment regimen. Calf blood pressure is measured in both limbs by Doppler flow meter (model 1059, Parks Medical Electronics, Aloha, OR). The calf blood pressure is defined as the ratio of the left calf to right calf systolic pressure. Collateral arteries are evaluated by internal iliac angiography. A 3-F infusion catheter (Tracker-18, Target Therapeutic, San Jose, CA) is introduced into the common carotid artery and advanced to the internal iliac artery of the ischemic limb using a 0.014-inch guide wire under fluoroscopic guidance. Non-ionic contrast media (Isovue-370, Squibb Diagnostics, New Brunswick, NJ) is injected at a rate of 1 ml/sec and serial images of the ischemic hindlimb are recorded at a rate of 1 film/sec for 10 sec.

WO 02/34289

PCT/US01/45612

Quantitative angiographic analysis of collateral vessels are performed by an investigator blinded to the outcome using a grid overlay composed of 2.5-mm diameter circles arranged in rows spaced 5 mm apart placed over the 4-sec angiogram. An angiographic score is calculated as the number of circles crossed by visible arteries divided by the total number of circles in the medial thigh. Capillary density is evaluated by investigator blinded to the outcome using light microscopic sections taken from the adductor muscle of the ischemic limb at the time of euthanasia. Muscle samples are embedded in OCT compound (Miles, Elkhart, IN) and snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen sections (5 μ m in thickness) with muscle fibers oriented in a transverse fashion are stained for alkaline phosphatase using indoxyl-tetrazolium, and then counterstained with 0.5% eosin. The capillary density is calculated as capillaries/ mm^2 averaged from 10 randomly selected fields.

5. Kuz promotes angiogenesis in chicken chorioallantoic membrane assay.

In a protocol adapted from Bellahcene A, et al. *Circ Res* 2000 Apr 28;86(8):885-91, fertilized Lohman-selected White Leghorn eggs are incubated at 37°C in a humidified incubator. On the third day of development, a rectangular window was opened in the egg shell. On day 8, two Silastic rings with an inner diameter of 3.5 mm (height 500 μ m, weight 7 mg) are placed on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) surface. Kuz (human, metalloprotease domain, 15 μ M is dissolved in sterile PBS and applied in 5 μ l aliquots inside the rings. Vehicle alone (PBS) and a stimulator of blood vessel formation, basic FGF (bFGF, 0.5 μ M), are used as negative control and positive controls, respectively. In other experiments, the anti-avb3 antibody LM609 (15 μ g) is added to the ring to evaluate its effect on vascular development in presence of Kuz. CAMs were examined daily until day 10 and photographed *in ovo* under a Leica DMLM microscope (Van Hopplinyus, Brussels, Belgium). A minimum of 8 eggs for each condition is treated and the experiments are reproduced at least two times. A vascular index is determined by counting all discernible vessels traversing the ring as described (Barnhill et al. *J Invest Dermatol.* 1983;81:485-488) and is expressed as the relative increase of the number of vessels in the different experimental conditions compared to the control PBS ring. Our results demonstrate that Kuz stimulates ongoing angiogenesis on the chorioallantoic chick membrane assay. Kuz angiogenic activity was inhibited by Kuz inhibitors, dominant negative mutants and Kuz-specific antibody.

WO 02/34289

PCT/US01/45612

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for modulating angiogenesis comprising the step of:
specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic angiogenesis, whereby the angiogenesis is modulated.
5
2. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically binds the Kuz.
3. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the
animal with an agent which specifically binds the Kuz, wherein the agent comprises a metalloprotease inhibitor.
)
4. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically binds the Kuz, wherein the agent comprises a metalloprotease inhibitor, wherein the inhibitor is selected from the group consisting of substituted hydroxamates, carboxylates, thiols, phosphonates, aminodithiazols, and catechols which inhibit said Kuz through high-affinity zinc binding.
5
5. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically binds the Kuz, wherein the agent comprises a metalloprotease inhibitor, wherein the inhibitor is a TACE (TNF-alpha converting enzyme) inhibitor.
)
6. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically binds the Kuz, wherein the agent comprises a metalloprotease inhibitor, wherein the inhibitor is selected from the group consisting of IC-3 (N-{D,L-[2-(hydroxycarbonyl)methyl]-4-methyl-pentanoyl}-L-alanine, 2-aminoethyl amide), GM6001 (NHOHCOCH₂CH(I-Bu)CO-Trp-NHMe); GW9471 (Moss et al, Nature, 1997, Vol 385, 733-736) and BB-94 (bafimastat).
5
7. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the
)

WO 02/34289

PCT/US01/45612

animal with an agent which specifically binds the Kuz, wherein the agent comprises a Kuz-specific antibody.

8. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically competes with Kuz for a substrate or cofactor.
9. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically competes with Kuz for a substrate or cofactor, wherein the agent comprises a dominant negative Kuz mutant.
10. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically competes with Kuz for a substrate or cofactor, wherein the agent comprises a soluble dominant negative Kuz mutant.
11. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically competes with Kuz for a substrate or cofactor, wherein the agent comprises a soluble dominant negative Kuz mutant fused to an immunoglobulin Fc region.
12. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically competes with Kuz for a substrate or cofactor, wherein the agent comprises a chelator of divalent cations.
13. A method according to claim 1, wherein the modulating step comprises contacting the animal with an agent which specifically competes with Kuz for a substrate or cofactor, wherein the agent comprises a chelator of divalent cations selected from the group consisting of EDTA and 1,10-phenanthroline.
14. A method for modulating angiogenesis comprising the steps of:
specifically modulating the activity of Kuz in a vertebrate animal; and
detecting a resultant angiogenic modulation in the animal.

WO 02/34289

PCT/US01/45612

15. A method for detecting kuz activity, comprising the step of:
specifically detecting Kuz activity in a vertebrate animal predetermined to have a pathogenic angiogenesis.
16. A method according to claim 15, wherein the detecting step comprises use of a KUZ specific protease assay or a KUZ specific immunobinding assay.
17. A method for detecting angiogenesis, comprising the step of:
specifically detecting a pathogenic angiogenesis in a vertebrate animal having a predetermined Kuz activity.
18. A method according to claim 17, wherein the detecting step comprises detecting a tumor.
19. A method for identifying a modulator of angiogenesis, comprising the steps of:
contacting an angiogenic assay system comprising a predetermined amount of Kuz with a candidate agent, under conditions whereby but for the presence of the agent, the system provides a reference angiogenesis; and
detecting an agent-biased angiogenesis of the system;
wherein a difference between the agent-biased angiogenesis and the reference angiogenesis indicates that the agent modulates angiogenesis in the system.
20. A method according to claim 19, wherein the system comprises an in vitro, cell based assay or an in vivo, mouse-based assay.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 0/145612												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER														
IPC(7) : A61K 39/00, 39/395, 49/00; C12Q 1/00; G01N 33/53, 33/48 US CL : 424/ 184.1, 130.1, 9.1; 435/ 4, 7.72; 436/ 64														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/ 184.1, 130.1, 9.1; 435/ 4, 7.72; 436/ 64														
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) STN, WEST, MEDLINE														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	Fambrough et al. The cell surface metalloprotease/disintegrin Kuzbanian is required for axonal extension in <i>Drosophila</i> . Proc.Natl.Acad.Sci., November 1996, Vol. 93, pp. 13233-13238, entire article.	1-20												
A	Pan et al. Kuzbanian Controls Proteolytic Processing of Notch and Mediates Lateral Inhibition during <i>Drosophila</i> and Vertebrate Neurogenesis. Cell, July 1997, Vol. 90, pages 271-280, entire article.	1-20												
A	Wen et al. SUP-17, a <i>Caenorhabditis elegans</i> ADAM protein related to <i>Drosophila</i> KUZBANIAN, and its role in LIN-12/NOTCH signalling. Development, 1997, Vol. 124, pages 4759-4767, entire article.	1-20												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*A* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*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	*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	*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family	*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	
* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
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													
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													
L document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family													
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	Date of mailing of the international search report													
11 February 2002 (11.02.2002)	11 MAR 2002													
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 Gary B. Nickol Ph.D. Telephone No. 703-308-0196													

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/48	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/48	N
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/53	S
	G 0 1 N 33/574	D

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 パン, ドゥオジア

アメリカ合衆国 テキサス 7 5 3 9 0 - 9 0 4 0, ダラス, ハリー ハイーンズ ブールバード
5 3 2 3, ユー. ティー. サウスウェスタン メディカル センター

(72) 発明者 ルビン, ジェラルド, エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 2 0 - 3 2 0 0, パークレー, ユニバーシティ オブ
カリフォルニア, パークレー, 5 3 9 エルエスエー, デPARTMENT モレキュラー アンド セ
ル バイオロジ

(72) 発明者 チャン, ホンビン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 3 0, エル セリト, レキシントン アヴェニュー 8
1 4, 2 号室

F ターム(参考) 2G045 AA29 BB20 BB50 CB01 CB02 FA16
4C084 AA17 ZB26
4C085 AA13 CC03 CC04 CC22 DD23 EE03
4C206 FA53 MA04 ZB26 ZC78

专利名称(译)	调节血管生成		
公开(公告)号	JP2004522702A	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2002537340	申请日	2001-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	パンドウオジア ルビンジェラルドエム チャンホンビン		
发明人	パン,ドウオジア ルビン,ジェラルド,エム. チャン,ホンビン		
IPC分类号	G01N33/48 A61K31/198 A61K31/381 A61K31/405 A61K38/48 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/18 C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/573 G01N33/574		
CPC分类号	A61K31/405 A61K31/198 A61K31/381 A61K38/4886 A61K2039/505 C07K16/18 C12Q1/37 G01N33 /573 G01N2333/96486 G01N2500/04 G01N2500/10		
FI分类号	A61K45/00 A61K31/198 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61P43/00.111 G01N33/48.N G01N33/53.S G01N33/574.D		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/FA16 4C084/AA17 4C084 /ZB26 4C085/AA13 4C085/CC03 4C085/CC04 4C085/CC22 4C085/DD23 4C085/EE03 4C206/FA53 4C206/MA04 4C206/ZB26 4C206/ZC78		
优先权	09/697854 2000-10-27 US		
其他公开文献	JP4522047B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了Kuz参与血管生成的方法和组合物。在各种实施方案中，本发明的目的是特异性调节在要被致病血管生成，用于调制血管生成的方法脊椎动物Kuz的活性;活动Kuz在脊椎动物特定调整，发生接着检测血管生成的调制在动物中，用于调节血管发生的方法;方法特异性检测在要被致病血管生成脊椎动物Kuz的活性;预定一种用于在具有活性Kuz脊椎动物特异性检测致病性血管发生的方法;血管生成测定系统，其包括与(a)中的Kuz预规定量的候选试剂是一个系统，如果所述候选试剂是不存在在赋予参考血管生成的条件下，和(b)检测系统的药物偏向血管生成，以鉴定血管生成的调节剂。

表1. ドミナントネガティブ型ヒトkuz変異体の例

名称	変異	ドミナントネガティブ活性
hKUZDN1	Δ212-455*	+++
hKUZDN2	Δ213-381	+++
hKUZDN3	Δ382-392	+++
hKUZDN4	Δ382-392及びΔ677-748	+++
hKUZDN5	E384からA	+++
hKUZDN6	E384からA及びΔ675-748	+++
hKUZDN7	S391からA	+++
hKUZDN8	AHE384-386からAAA	+++