

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4522047号
(P4522047)

(45) 発行日 平成22年8月11日(2010.8.11)

(24) 登録日 平成22年6月4日(2010.6.4)

(51) Int.Cl.		F I		
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48		N
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		S
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574		D

請求項の数 4 (全 12 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2002-537340 (P2002-537340)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成13年10月25日(2001.10.25)</p> <p>(65) 公表番号 特表2004-522702 (P2004-522702A)</p> <p>(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2001/045612</p> <p>(87) 国際公開番号 W02002/034289</p> <p>(87) 国際公開日 平成14年5月2日(2002.5.2)</p> <p>審査請求日 平成15年5月6日(2003.5.6)</p> <p>(31) 優先権主張番号 09/697,854</p> <p>(32) 優先日 平成12年10月27日(2000.10.27)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>前置審査</p>	<p>(73) 特許権者 592130699 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア The Regents of The University of Calif ornia アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 607 オークランド フランクリン ス トリート 1111 トゥエルフス フロ ア</p> <p>(74) 代理人 100109726 弁理士 園田 吉隆</p> <p>(74) 代理人 100101199 弁理士 小林 義教</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管形成の調節

(57) 【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、インビトロで K u z の活性を特異的に検出する工程を含んでなる、病原性血管形成を確認するための K u z 活性の検出方法。

【請求項 2】

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む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

K u z 活性を有する脊椎動物において、インビトロで K u z の活性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 4】

検出工程が腫瘍を検出することを含む、請求項 3 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Rubin, 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)。しかして我々は胚性幹 (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プロセッ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 (Swiatek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Ku

10

20

30

40

50

z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。K u z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。

【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K u z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で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。

10

【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。

20

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; Mayer等(米国特許第5 9 2 2 5 4 6号; 及びRubin等(米国特許第5 9 3 5 7 9 2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。

30

【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。

【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、Amour A等, Ann N Y Acad Sci 1999 June 30;878:728-31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、Black等, Nature, 1997, Vol 385, 729-73; GalkoとTessier-Lavigne, Science, 2000, Vol 289, 1365-1367)、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 (Moss等, Nature, 1997, Vol 385, 733-736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のビ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 (batimastat) (Hernandez-Pando R等 Int J Exp Pathol 2000 Jun;

40

50

81(3):199-209を参照)が含まれる。有用な天然のMMPインヒビターには、MMPsの組織インヒビター(TIMPs)、例えばTIMP-1及びTIMP-3が含まれる(例えばAmour等, FEBS Lett. 2000 May 19;473(3):275-9を参照のこと)。

【0010】

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Fab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する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ン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ーナルか又はモノクローナルの抗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ーナルか又はモノクローナル抗体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收容される。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

10

20

30

40

50

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 5 9 3 5 7 9 2 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。

【 0 0 1 4 】

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
h KUZDN1	Δ 212-455*	+++
h KUZDN2	Δ 213-381	+++
h KUZDN3	Δ 382-392	+++
h KUZDN4	Δ 382-392 及び Δ 677-748	+++
h KUZDN5	E384 から A	+++
h KUZDN6	E384 から A 及び Δ 675-748	+++
h KUZDN7	S391 から A	+++
h KUZDN8	AHE384-386 から AAA	+++

10

” 番号付けは米国特許第 5 9 3 5 7 9 2 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 5 9 2 2 5 4 6 号及び P C T 公報 W O 9 7 / 3 1 9 3 1 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。

【 0 0 1 5 】

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ー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、システインリッチドメイン、ディスインテグリンドメイン及びノ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 (F c) 領域 (例えばヒト I g G の F c 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する。

20

30

【 0 0 1 6 】

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 1 1 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

40

50

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Lee等 *Obstet Gynecol* 2000 Oct;96(4):615-21を参照）、成長因子レセプター（例えばShin等 2000 *J Cancer Res Clin Oncol* 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Rofstad等 2000 *Cancer Res* 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け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Rofstad等 2000 *Cancer Res* 60, 4932-8のものを適応させた。簡単に述べると、B A L B / c n u / n u マウスに移植したヒトメラノーマ株 (A - 0 7、D - 1 2、R - 1 8 及びU - 2 5) 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

10

20

30

40

50

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 V E G F、I L - 8、P D - E C G F、b F G F 及び K u z 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

【 0 0 2 1 】

方法：成体（8 - 10 週齢）の雌の B A L B / c n u / n u 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 - 0 7、D - 1 2、R - 1 8 及び U - 2 5、Rofstad, Br. J. Cancer, 70: 804-812, 1994）を、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 R P M I 1 6 4 0（25 mM の H E P E S 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 C O₂ の加湿雰囲気中で 37 °C 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

【 0 0 2 2 】

腫瘍血管形成は内皮血管形成アッセイ（Danielsen, 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 $1 . 0 \times 10^6$ 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 H B S S 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 1 mm 当たりの毛細血管の数として定量する。

30

【 0 0 2 3 】

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 V E G F、I L - 8、P C - E C G F、b F G F 及び K u z 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 V E G F マウスモノクローナル抗体、抗ヒト I L - 8 マウスモノクローナル抗体、抗ヒト P D - E C G F ヤギポリクローナル抗体、抗ヒト b F G F ヤギポリクローナル抗体及び抗ヒト K u z 抗体である。抗体溶液を P B S で希釈し、腹腔内注射によって 0 . 2 5 m l 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（V E G F 及び b F G F）又は 100 μ g（I L - 8 及び P D - E C G F）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

【 0 0 2 4 】

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 7、D - 1 2、R - 1 8 又は U - 2 5 細胞を、5 μ g / m l 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 R P M I 1 6 4 0（25 mM の H E P E S 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。

【 0 0 2 5 】

50

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(10ng/ml)+TNF(2.5ng/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。

10

【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℃で、20mMのHEPES(pH7.3)、10%のヒト血清、10%の新生仔ウシ血清(NBCS)、150µg/mlのECGF、5IU/mlのヘパリン、2mM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0.5g/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。

20

【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。15.8mg/mlで基底膜成分を含む腫瘍抽出物であるマトリゲルを1cm²ウェル(120µl/ウェル)に塗布し、37℃で1時間、固化させる。続いて、各ウェルに50000RAMECsを蒔き、実験の薬物を含む完全DMEMと共に37℃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(2.5x倍率)で測定する。

30

【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2.5Uの第XIII因子、2mgのヒトフィブリノーゲン、2mgのクエン酸ナトリウム、0.8mgのNaCl、及び3µgのプラスミノーゲンの混合物に0.1U/mlのトロンピンを加えることによって調製する。全体で300mlのこの混合物を1cm²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0.5mlのM199を含ませる。内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、20mMのHEPES(pH7.3)、10%ヒト血清、10%NBCS、2mMのL-グルタミン、抗生物質、10ng/mlのbFGF、及び2.5ng/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。

40

【0029】

50

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17mm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、0.5mmのリングに切断する。各大動脈リングを、底部が既に150µl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、3mg/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、10mMのHEPES、1mM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。

10

【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10mm)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1cm離して各CAMに配する。酢酸コルチゾンの滅菌溶液(100µg/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。

20

【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(1mm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。

30

【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

40

50

よって阻害される。

【 0 0 3 3 】

4 . K u z は正常コレステ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 K u z が促進し K u z 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、正常コレステ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、K u z 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 (B g a l) 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-K u z 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-B g a l 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。

10

【 0 0 3 4 】

肢血管再生に対する K u z 及び K u z インヒビターの効果を試験するために、K u z 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 . 1 m g / k g I C - 3) 行う。K u z 処置を受ける動物は、大腿動脈切除後 4 0 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、K u z インヒビター処置を受けた動物は、大腿動脈切除後 4 0 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。

20

【 0 0 3 5 】

同様に、K u z 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。K u z 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 (K u z > 2 5 0 毛細血管 / m m ² ; コントロール < 1 7 0 毛細血管 / m m ² 内転筋 ; P < 0 . 0 1) 。比較のために、幾らかの動物は虚血性肢の大腿中へ V E G F をコードするアデノウイルス (アデノ-V E G F) の筋肉内注射を受ける。K u z 同様、V E G F 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。K u z 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。

30

【 0 0 3 6 】

方法：3 . 0 - 3 . 5 k g 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 K u z 及び K u z 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 2 c m 以内のところまで切除する。1 0 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、5 0 m l の生理食塩水、A d - B g a l の 3 . 5 x 1 0 ^{1 0} ウイルス粒子を有する生理食塩水、又は A d - K u z (ヒト K u z のメタロプロテアーゼドメインを発現) の 3 . 5 x 1 0 ^{1 0} 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、1 5 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。A d - B g a l 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 3 1 日目に肢血管再生を分析する。A d - V E G F の筋肉内注射又は K u z 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。1 0 日後に、術後の回復を可能にするために、2 . 5 m l の生理食塩水中全体で 3 . 5 x 1 0 ^{1 0} の A d - V E G F 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 5 0 0 u l) に 3 から 5 m m の深さで 2 7 ゲージ針によって注射する。あるいは、インヒビター (I C - 3 、 0 . 1 m g / k g / 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 (1 m l) する。これらの群 (n = 6) の動物について手術から 4 0 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

40

50

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 1 ml / 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 5 mm 離れて列に配置された 2.5 mm 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（5 μm 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。

10

【 0 0 3 7 】

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、3.5 mm の内径（高さ 500 mm、重さ 7 mg）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、15 mM）を滅菌 PBS に溶解し 5 ml 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、0.5 mM）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（15 mg）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 Hoppelynus, Brussels, Belgium）で in ovo 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增加として表す。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。Kuz の血管形成活性は Kuz インヒビター、ドミナントネガティブ型変異体及び Kuz 特異的抗体によって阻害された。

20

30

フロントページの続き

- (72)発明者 パン, ドゥオジア
アメリカ合衆国 テキサス 75390-9040, ダラス, ハリー ハイન્ズ ブールバード
5323, ユー. ティー. サウスウエスタン 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 94720-3200, 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, 539エルエスエー, デパートメント モレキュラー アンド セ
ル バイオロジー
- (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 94530, エル セリト, レキシントン アヴェニュー 8
14, 2号室

審査官 菊池 美香

- (56)参考文献 国際公開第98/008933(WO, A1)
国際公開第00/048617(WO, A1)
国際公開第00/054806(WO, A1)
国際公開第99/047535(WO, A1)
特表平07-503007(JP, A)
The Journal of Biological Chemistry, 1996年, Vol.271 No.51, 32499-32502
Nature, 1997年, Vol.385 No.20, 729-733
Nature, 1997年, Vol.385 No.20, 733-736

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48
G01N 33/53
G01N 33/574
A61K 45/00
A61P 35/00
A61P 43/00
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	调节血管生成		
公开(公告)号	JP4522047B2	公开(公告)日	2010-08-11
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		
当前申请(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 G01N33/53 G01N33/574 A61K31/198 A61K31/381 A61K31/405 A61K38/48 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/18 C12Q1/37 G01N33/573		
CPC分类号	A61K31/198 A61K31/381 A61K31/405 A61K38/4886 A61K2039/505 A61P35/00 A61P43/00 C07K16 /18 C12Q1/37 G01N33/573 G01N2333/96486 G01N2500/04 G01N2500/10		
FI分类号	G01N33/48.N G01N33/53.S G01N33/574.D		
审查员(译)	菊地美香		
优先权	09/697854 2000-10-27 US		
其他公开文献	JP2004522702A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了涉及Kuz参与血管生成的方法和组合物。在各种实施方案中，本发明特异性地调节被认为是致病性血管生成的脊椎动物中Kuz的活性，并且特异性地调节脊椎动物中Kuz的活性。通过调节和随后检测动物中产生的血管生成的调节来调节血管生成的方法；特异性检测被称为致病性血管生成的脊椎动物中Kuz活性的方法；一种特异性检测具有Kuz活性的脊椎动物中致病性血管生成的方法；和（a）包含预定量Kuz作为候选试剂的血管生成试验系统，其中该系统不存在候选试剂。提供了一种通过在赋予基线血管生成和检测（b）系统中药物偏向血管生成的条件下接触来鉴定血管生成调节剂的方法。

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	+++