

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4585968号
(P4585968)

(45) 発行日 平成22年11月24日(2010.11.24)

(24) 登録日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int. Cl.	F I		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C O 7 K 16/32 (2006.01)	C O 7 K	16/32	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 13 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-506130 (P2005-506130)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月12日(2003.5.12)
 (65) 公表番号 特表2006-507013 (P2006-507013A)
 (43) 公表日 平成18年3月2日(2006.3.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/015046
 (87) 国際公開番号 W02004/014292
 (87) 国際公開日 平成16年2月19日(2004.2.19)
 審査請求日 平成18年5月10日(2006.5.10)
 (31) 優先権主張番号 60/379, 368
 (32) 優先日 平成14年5月10日(2002.5.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/418, 204
 (32) 優先日 平成14年10月14日(2002.10.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 598063203
 パーデュー・リサーチ・ファウンデーション
 PURDUE RESEARCH FOUNDATION
 アメリカ合衆国・インディアナ州 479
 06-4182・ウエスト ラファイエット
 ・ウィン ヘンチュル ブルーヴァード
 1281
 (73) 特許権者 504333972
 メディミュン, エルエルシー
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州,
 ゲイサースバーグ, ワン メディミュン
 ウェイ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 EphA2アゴニストモノクローナル抗体およびその使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

EphA2と特異的に結合し、かつEphA2のリン酸化を誘導する単離抗体であって、受託番号PTA-4380としてATCCに寄託されているハイブリドーマによって産生される、上記抗体。

【請求項2】

EphA2と特異的に結合し、かつEphA2のリン酸化を誘導する単離抗体であって、受託番号PTA-4381としてATCCに寄託されているハイブリドーマによって産生される、上記抗体。

【請求項3】

EphA2と特異的に結合し、かつEphA2のリン酸化を誘導する単離抗体であって、配列番号5のアミノ酸配列を含むVH鎖および配列番号1のアミノ酸配列を含むVL鎖を含む、上記抗体。

10

【請求項4】

EphA2と特異的に結合し、かつEphA2のリン酸化を誘導する単離抗体であって、配列番号2のアミノ酸配列を有するVL CDR1、配列番号3のアミノ酸配列を有するVL CDR2、配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR3、配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR1、配列番号7のアミノ酸配列を有するVH CDR2、および配列番号8のアミノ酸配列を有するVH CDR3を含む、上記抗体。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列を含む、単離核酸。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 7】

前記ヌクレオチド配列の発現を調節するヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 6 に記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 5 に記載の核酸を含むかまたは発現するように遺伝的に操作された宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 6 または 7 に記載のベクターを含むように遺伝的に操作された宿主細胞。

【請求項 10】

受託番号PTA-4380としてATCCに寄託されているハイブリドーマ。

【請求項 11】

受託番号PTA-4381としてATCCに寄託されているハイブリドーマ。

【請求項 12】

前記核酸が発現する条件下で請求項 8 または 9 に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、抗体の製造方法。

【請求項 13】

ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項 4 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年5月10日出願の米国特許仮出願第60/379,368号、2002年10月14日出願の米国特許仮出願第60/418,204号、および2003年4月3日出願の米国特許仮出願第60/460,358号の優先権を主張するものであり、その各々の全体を参照により本明細書に取り入れるものとする。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、癌の治療、管理、または予防のために設計された方法および組成物に関する。本発明の方法は、EphA2アゴニストであり、かつ/または非癌細胞よりも癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上のエピトープと優先的に結合する、EphA2に特異的な1種または複数の抗体、好ましくはモノクローナル抗体の治療有効量の投与を含む。本発明は、1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を単独で、または癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併合して含む医薬組成物も提供する。診断法、ならびに治療上有用な抗-EphA2抗体のスクリーニング法も提供する。

【背景技術】

【0003】

2. 発明の背景

癌

新生物、または腫瘍は、良性もしくは悪性であり得る異常な無制御の細胞増殖の結果として生じる新生物塊である。良性腫瘍は、一般に限局したままである。悪性腫瘍は、総称的に称される癌である。「悪性」という用語は一般に、腫瘍が隣接する身体構造に侵入し破壊し、遠くの部位まで広がって死をもたらし得ることを表す(概説については、Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68-122を参照のこと)。癌は体の多くの部位で生じる可能性があり、その起源に応じて異なる挙動を示す。癌細胞は、それらが発生した体の部分を破壊し、次いで体の他の部分に広がり、そこで新しく増殖し始め、より多くの破壊を行う。

【0004】

毎年120万人以上のアメリカ人が癌を発症している。癌は、アメリカ合衆国では死因の第2位であり、現在の傾向が続いた場合、癌が2010年には死因の第1位になることが予想されている。アメリカ合衆国の男性では、肺および前立腺癌が癌の死因の第1位である。ア

10

20

30

40

50

アメリカ合衆国の女性では、肺および乳癌が癌の死因の第1位である。アメリカ合衆国の2人に1人の男性は、彼の人生のある時点で癌と診断されることになる。アメリカ合衆国の3人に1人の女性は、彼女の人生のある時点で癌と診断されることになる。

【0005】

癌の治療法はいまだに見つかっていない。手術、化学療法および放射線療法など現在の治療の選択肢は、しばしば効果がなく、あるいは深刻な副作用を与える。

【0006】

転移

最も生命にかかわる癌の形態は、腫瘍細胞の集団が体内の遠くのかつ異なる部位でコロニー形成能を獲得した場合にしばしば生じる。これらの転移細胞は、異なる組織中での細胞コロニー形成を通常抑制する制限を覆すことによって生き残る。例えば、通常の乳房上皮細胞は、肺に移植した場合に一般に増殖または生存しないが、肺転移は、乳癌罹患率および死亡率の主な原因である。最近の証拠から、体中への転移細胞の散在が原発腫瘍の臨床症状よりずっと前に起こる可能性があることが示唆されている。これらの微小転移細胞は、原発腫瘍の検出および除去の後、何カ月または何年もの間潜伏したままであり得る。したがって、異なる微小環境における転移細胞の増殖および生存を可能にするメカニズムのより良い理解は、転移癌と戦うために設計した治療学ならびに転移の早期検出および位置確認のための診断学の向上に関して重要である。

【0007】

癌細胞シグナル伝達

癌は、異常シグナル伝達の疾患である。異常な細胞シグナル伝達は、細胞増殖および生存における足場依存性の束縛を覆す(Rhim, et al., *Critical Reviews in Oncogenesis* 8:305, 1997;Patarca, *Critical Reviews in Oncogenesis* 7:343, 1996;Malik, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1287:73, 1996;Cance, et al., *Breast Cancer Res Treat* 35:105, 1995)。チロシン・キナーゼ活性は、ECM足場によって誘発され、事実、チロシン・キナーゼの発現または機能は、悪性細胞中で通常増大する(Rhim, et al., *Critical Reviews in Oncogenesis* 8:305,1997;Cance, et al., *Breast Cancer Res Treat* 35:105, 1995;Hunter, *Cell* 88:333, 1997)。チロシン・キナーゼ活性が悪性細胞増殖に必要であるという証拠に基づき、チロシン・キナーゼは、新しい治療学の標的となっている(Levitzi, et al., *Science* 267:1782, 1995;Kondapaka, et al., *Molecular & Cellular Endocrinology* 117:53, 1996;Fry, et al., *Current Opinion in BioTechnology* 6:662, 1995)。遺憾ながら、腫瘍細胞の特異的な標的化に関連する障壁により、これらの薬物の適用がしばしば制限されている。特に、チロシン・キナーゼ活性は、良性組織の機能および生存に関してしばしば重要である(Levitzi, et al., *Science* 267:1782, 1995)。随伴的な毒性を最小限にするためには、腫瘍細胞中で選択的に過剰発現されているチロシン・キナーゼを同定し、次いで標的とすることが重要である。

【0008】

EphA2

EphA2は、成人の上皮で発現される130kDaの受容体チロシン・キナーゼであり、低レベルで見られ、細胞-細胞接着の部位内に多く含まれる(Zantek, et al., *Cell Growth & Differentiation* 10:629, 1999;Lindberg, et al., *Molecular & Cellular Biology* 10:6316, 1990)。EphA2は、細胞膜に固着したリガンド(エフリン(Ephrin)A1~A5として知られている)と結合するので、この細胞下に局在することは重要である(Eph Nomenclature Committee, 1997, *Cell* 90:403;Gale, et al., 1997, *Cell & Tissue Research* 290:227)。リガンド結合の主要な結果は、EphA2自己リン酸化である(Lindberg, et al., 1990, 上掲)。しかし、他の受容体チロシン・キナーゼとは異なり、EphA2は、リガンド結合またはホスチロシン含有量の不在下においても酵素活性を維持する(Zantek, et al., 1999, 上掲書)。EphA2は、多数の攻撃的な癌細胞に対してアップレギュレートされる。

【0009】

癌治療

抗転移薬の開発への1つの障害は、これらの薬物を設計および評価するのに使用するアッセイシステムである。最も通常の癌治療は、急速に増殖している細胞を標的としている。しかし、癌細胞は、より急速に増殖するとは限らないが、その代わりに、正常細胞には許容されない条件下で生存および増殖する(Lawrence and Steeg, 1996, World J. Urol. 14:124-130)。正常細胞および悪性細胞の挙動のこれらの根本的な差によって、治療的標的化の機会がもたらされる。微小転移性腫瘍が体中に既に散在しているパラダイムにより、異なる三次元微小環境における潜在的な化学療法薬を評価する必要性が強調される。多くの標準的な制癌剤アッセイは、通常の細胞培養条件(すなわち、単層増殖)下での腫瘍細胞増殖または生存を測定する。しかし、二次元アッセイにおける細胞挙動は、しばしば *in vivo*における腫瘍細胞挙動を確実に予測するものではない。

10

【0010】

現在、癌治療は、患者内の新生細胞を根絶するために手術、化学療法、ホルモン療法および/または放射線療法を含むものである(例えば、Stockdale, 1998, "Principles of Cancer Patient Management," in Scientific American:Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., Chapter 12, Section IVを参照のこと)。近年、癌治療は、生物学的療法または免疫療法も含むものである。これらすべての手法は、患者にとって著しい欠点をもたらし得る。例えば手術は、患者の健康によっては禁忌であり、あるいは患者に許容されない可能性がある。さらに、手術によって、新生物組織が完全に取り除かれない可能性がある。放射線療法は、新生物組織が正常組織よりも放射線に対してより高い感受性を示す場合にのみ有効であり、放射線療法はまた、しばしば深刻な副作用を誘発する可能性がある。ホルモン療法は、単剤として投与することはほとんどなく、たとえ有効な可能性があっても、他の治療によって癌細胞の大部分が除去された後に癌の再発を予防または遅延させるのにしばしば使用する。生物学的療法/免疫療法は、数の上では限られており、各療法が極めて特異的なタイプの癌に対して一般に有効である。

20

【0011】

化学療法に関しては、癌の治療に使用可能な様々な化学療法薬がある。極めて大部分の癌化学療法剤は、デオキシリボヌクレオチド三リン酸前駆体の生合成を阻害することにより、直接または間接的にDNA合成を阻害することによって作用して、DNA複製および付随する細胞分裂を防止する(例えば、Gilman et al., Goodman and Gilman's:The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eighth Ed.(Pergamom Press, New York, 1990)を参照のこと)。ニトロソ尿素などのアルキル化剤、メトトレキサートなどの代謝拮抗剤およびヒドロキシ尿素を含むこれらの薬剤、ならびにエトポシド、カンパテシン(camptothecin)、ブレオマイシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシンなどの他の薬剤は、細胞周期特異的とは限らないが、DNA複製に対するそれらの作用のために、S期の中に細胞を死滅させる。他の薬剤、特にコルヒチンならびにピンブラスチンおよびピンクリスチンなどのピンカ・アルカロイドは、微小管アセンブリに干渉し、核分裂停止をもたらす。化学療法プロトコルは一般に、治療の有効性を増大させるために化学療法薬の合剤の投与を含む。

30

【0012】

様々な化学療法薬が利用できるにもかかわらず、化学療法には多くの欠点がある(例えば、Stockdale, 1998, "Principles Of Cancer Patient Management" in Scientific American Medicine, vol. 3, Rubenstein and Federman, eds., ch. 12, sect. 10を参照のこと)。ほぼすべての化学療法薬は有毒であり、化学療法は、重篤な悪心、骨髄抑制、免疫抑制などを含む重大でしばしば危険な副作用を引き起こす。さらに、化学療法薬を組み合わせ投与しても、多くの腫瘍細胞は、化学療法薬に対して耐性があり、あるいは耐性を生じる。事実、治療プロトコルで使用した特定の化学療法薬に耐性がある細胞は、他の薬物、特異的な治療に使用する薬物の作用のメカニズムと異なるメカニズムによって作用する薬物に対してもしばしば耐性があることが分かっており、この現象は、多面的薬剤耐性または多剤耐性と呼ばれている。したがって、薬剤耐性のために、多くの癌は、標準的な化学療法治療プロトコルに対して不応性であることが分かっている。

40

【発明の開示】

50

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

別の癌治療、特に手術、放射線療法、化学療法、およびホルモン療法などの標準的な癌治療に対して不応性であることが分かっている癌の治療に対する著しい必要性がある。さらに、ただ1つの方法によって癌を治療することはまれである。したがって、癌を治療するための新しい治療薬、および癌を治療するための新しいより有効な療法の組合せの開発の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

3. 発明の概要

EphA2は、多くの悪性癌腫で過剰発現され、機能の変更を受ける。EphA2は、腫瘍性タンパク質であり、癌細胞に十分に潜在的転移能力を与える。悪性細胞上に過剰発現されたEphA2は、リガンド結合と関係なくキナーゼ活性を示す。本発明者らは、EphA2レベルが低下すると、細胞の転移挙動が低減することを発見した。特に、本発明者らは、驚くべきことに、EphA2に作用(agonize)する、すなわちEphA2シグナル伝達を誘発する抗体が、実際にはEphA2の発現を低減し、腫瘍細胞の増殖および/または転移を抑制することを発見した。特定の作用機序に拘泥するものでないが、アゴニスト抗体は、EphA2の自己リン酸化を誘発して悪性細胞挙動を抑制し、それによってその後EphA2分解を引き起こして、発現をダウンレギュレートすることができる。したがって、本発明のEphA2抗体は、EphA2シグナル伝達に作用(agonize)し、EphA2のリン酸化を増大させる(「EphA2アゴニスト抗体」)。

【0015】

細胞下局在の差があることから、リガンド結合特性またはタンパク質の組織(例えば、細胞膜中の構造、配向)により、さらに癌細胞上に存在するEphA2を非癌細胞上のEphA2と区別することができる。非癌細胞では、EphA2は、低レベルで発現されており、その膜固着リガンドを結合できる細胞-細胞接触の部位に局在している。しかし、癌細胞は一般に低減した細胞-細胞接触を示し、これによってEphA2リガンド結合が低減し得る。さらに、EphA2の過剰発現により、リガンドに対して過剰のEphA2が引き起こされ、リガンドに結合していないEphA2の量を増大させ得る。その結果、細胞下分布の変化またはEphA2の膜配向により、EphA2をリガンドと隔絶された癌細胞の部位に局在させることができる。さらに、EphA2は、細胞-細胞接合部に局在していてもしていなくてもそのリガンドと安定に相関作用することができないように癌細胞のリガンド結合特性(例えば、改変された立体構造による)を改変した可能性がある。それぞれの場合において、これらの変化により、非癌細胞で露出していないある種のエピトープが癌細胞中のEphA2上に露出し得る。したがって、本発明はまた、特異的にEphA2と結合するが、好ましくは非癌細胞ではなく癌細胞上に露出したEphA2エピトープと結合する抗体を提供する(「露出EphA2エピトープ抗体」)。非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出または増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合するこうしたEphA2抗体に癌細胞を露出すると、標的である癌細胞に治療/予防抗体が送達され、非癌細胞を助命しながら細胞の増殖能力が抑制または低減される。

【0016】

本発明は、EphA2に結合して作用し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上のエピトープに優先的に結合する抗体、好ましくはモノクローナル抗体をスクリーニングし、同定するものである。特に、本発明の抗体は、EphA2の細胞外ドメインに結合し、好ましくはEphA2のシグナル伝達およびEphA2のリン酸化を誘発する。別の特定の実施形態では、本発明の抗体は、EphA2の細胞外ドメインに結合し、好ましくは癌細胞上で露出するが非癌細胞では露出しないEphA2エピトープに結合する。一実施形態では、本発明の抗体は、EA2、EA3、EA4、およびEA5である。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒトまたはヒト化されたものである。

【0017】

一実施形態では、癌細胞上で露出するが非癌細胞では露出しないEphA2エピトープと優先的に結合する抗体を同定するために、リガンドたとえばエフリンA1に結合しておらず、

10

20

30

40

50

細胞-細胞接触部に局在していないEphA2と優先的に結合する能力について、抗体をスクリーニングすることができる。細胞上での抗体の結合/局在化を決定する、当技術分野で周知の任意の方法を使用して、所望の結合特性について、候補抗体をスクリーニングすることができる。特定の実施形態では、免疫蛍光顕微鏡検査またはフロー・サイトメトリーを使用して、抗体の結合特性を決定する。この実施形態では、そのリガンドに結合し、細胞-細胞接触部に局在化しているときにはEphA2への結合が弱く、細胞上の遊離のEphA2にはよく結合する抗体が本発明に含まれる。別の詳細な実施形態では、EphA2結合についてリガンド(たとえば、細胞固着または精製リガンド)と競合する能力について、細胞系アッセイまたはELISAアッセイを用いてEphA2抗体を選択する。

【0018】

一実施形態では、本発明の抗体は、EA2、EA3、EA4、またはEA5である。より好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒトまたはヒト化されたものである。最も好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒト化されたEA2、EA3、EA4、またはEA5である。

【0019】

したがって、本発明は、EphA2に特異的に結合して作用し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上のエピトープと選択的に結合する1種または複数の抗体の投与を含む、対象の癌、特に転移癌を予防、治療、または管理するために設計された医薬組成物、ならびに予防および治療レジメンに関する。一実施形態では、癌は、上皮細胞起源のものである。別の実施形態では、癌は、皮膚、肺、大腸、乳房、前立腺、膀胱、腎臓、または膵臓の癌である。別の実施形態では、予防、治療、または管理しようとする癌の癌細胞は、EphA2を過剰発現している。好ましい実施形態では、EphA2には、細胞-細胞接触の減少、細胞下局在化の変更、またはリガンドに対するEphA2量の増加の結果としてリガンドに結合していないものもある。好ましい実施形態では、本発明の方法を使用して、腫瘍の転移を予防、治療、または管理することができる。本発明の抗体は、1種または複数の他の癌療法との併用で投与することができる。特に、本発明は、被験者において癌を予防、治療、または管理する方法であって、前記被験者に、本発明のEphA2抗体の投与以外の、治療または予防有効量の1種または複数の化学療法、ホルモン療法、生物学的療法/免疫療法、および/または放射線療法の適用と併せて、あるいは手術と組み合わせ、治療または予防有効量の1種または複数の本発明のEphA2抗体を投与することを含む方法を提供する。

【0020】

本発明の方法および組成物は、未治療の患者だけでなく、化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、放射線療法、および/または手術を含むがこれに限らない現在の標準的および実験的癌療法に部分的または完全に不応性である患者にも有用であり、同様にこのような治療の有効性を改善するためにも有用である。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、本発明のEphA2抗体の投与を含むもの以外の療法に不応性または非応答性であることが分かっており、またはそうであるかもしれない癌を治療または予防するための治療および予防法を提供する。特定の実施形態では、非EphA2系治療に不応性または非応答性である患者に本発明の1種または複数のEphA2抗体を投与して、その患者を反応性または応答性にする。次いで、患者が以前は不応性または非応答性であった治療を、治療効果を付して施すことができる。

【0021】

さらに、本発明は、本発明のEphA2抗体についてのスクリーニング法を提供する。詳細には、日常的な免疫学的技術を用いて、EphA2、特にEphA2細胞外ドメイン、との結合について、抗体をスクリーニングすることができる。一実施形態では、アゴニストEphA2抗体を同定するために、EphA2シグナル伝達を誘発する能力、たとえばEphA2リン酸化を増強する能力、かつ/またはEphA2を分解する能力について、EphA2抗体をスクリーニングすることができる。

【0022】

別の実施形態では、非癌細胞ではなく癌細胞上に露出したEphA2エピトープと優先的に

10

20

30

40

50

結合する抗体を同定するために、抗体を、リガンド、例えば、エフリンA1と結合しておらず、また細胞-細胞接触部に局在していないEphA2と優先的に結合する能力についてスクリーニングすることができる。細胞上の抗体結合/局在を決定するための当技術分野で周知の任意の方法を使用して、候補抗体を所望の結合特性についてスクリーニングすることができる。特定の実施形態では、免疫蛍光顕微鏡検査法またはフロー・サイトメトリーを用いて抗体の結合特性を決定している。この実施形態では、そのリガンドと結合して細胞-細胞接触部に局在している場合にEphA2との結合が乏しいが、細胞上の遊離EphA2とよく結合する抗体は、本発明に含まれている。別の特定の実施形態では、EphA2抗体は、細胞系またはELISAアッセイを用いてEphA2との結合についてリガンド(例えば、細胞固着または精製リガンド)と競合するそれらの能力について選択する。

10

【0023】

本発明はさらに、本発明のEphA2抗体を使用して、EphA2系または非EphA2系の癌治療の有効性を評価する診断法を提供する。一般に、EphA2の発現が増大すると、それに伴い癌がますます侵襲性かつ転移性になる。したがって、特定の治療によるEphA2発現の低減は、その治療が、癌の侵襲性および/または潜在的転移能力を低下させていることを示唆する。特定の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化し、その位置を決定する方法と、原発腫瘍部位の遠位の組織および体液、たとえば全血、喀痰、尿、血清、細針吸引液(すなわち、生検)を用いて診断および予測する方法(並びに、原発腫瘍の組織および体液を使用する方法)とを提供する。他の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化し、その位置を決定する方法と、*in vivo*で診断および予測する方法とを提供する。このよ

20

【0024】

別の実施形態では、本発明の医薬組成物または診断試薬を含むキットを提供する。

【0025】

3.1 定義

3.1 定義

本明細書では、「アゴニスト」という用語は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗体断片、大分子、または小分子(10kD未満)を含む、別の分子の活性、活性化、または機能を増大させる任意の化合物を指す。EphA2アゴニストは、EphA2タンパク質のリン酸化および分解を増大させる。EphA2に作用(agonize)するEphA2抗体は、非癌細胞に比して癌細胞に露出されるEphA2エピトープと優先的に結合してもよいし、しなくてもよい。

30

【0026】

「EphA2に免疫特異的に結合する抗体またはその断片」という用語は、本明細書では、EphA2ポリペプチドまたはEphA2ポリペプチド断片に特異的に結合し、他の非EphA2ポリペプチドには特異的に結合しない抗体またはその断片を指す。EphA2ポリペプチドまたはその断片に免疫特異的に結合する抗体またはその断片は、他の抗体と非特異的に交差反応しないことが好ましい(たとえば、適切なイムノアッセイにおいて、結合が、非EphA2タンパク質たとえばBSAと競合して失せることはない。)。EphA2ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体または断片は、たとえば、イムノアッセイまたは当業者に周知の他の技法によって同定することができる。本発明の抗体には、合成モノクローナル抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、単鎖Fvs(scFv)(二重特異性scFvsを含む)、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、および抗イデオタイプ(抗Id)抗体、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合断片が含まれるがこれに限らない。特に、本発明の抗体には、EphA2抗原に免疫特異的にする免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫活性部分、すなわち抗原結合部位(たとえば、抗EphA2抗体の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR))を含む分子が含まれる。EphA2ポリペプチドまたはその断片に免疫特異的に結合するアゴニスト抗体または断片は、EphA2のみに作用(agonize)し、他の活性には有意に作用しないことが好ましい。

40

50

【0027】

本明細書では、「癌」という用語は、遠位部位に転移する潜在能力を有し、非癌細胞のものとは異なる表現型形質、例えば、軟寒天などの三次元基質中でのコロニー形成またはマトリゲル(登録商標; MATRIGEL)などの三次元基底膜もしくは細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワークもしくは網様マトリックスの形成を示す細胞を伴う疾患を意味する。非癌細胞は、軟寒天中でコロニーを形成せず、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中で異なる球様構造を形成する。癌細胞は、様々なメカニズムを介するにもかかわらず、それらの発生中に機能的な能力の特徴セットを獲得する。こうした能力には、アポトーシスの回避、増殖シグナルの自給自足、抗増殖シグナルへの非感受性、組織浸潤/転移、無限の複製能力、および持続的血管形成がある。「癌細胞」という用語は、前悪性および悪性癌細胞の両方を含むことになっている。

10

【0028】

本明細書では、「誘導体」という用語は、アミノ酸残基置換、欠失または付加(すなわち、変異)の導入によって改変された、EphA2ポリペプチドのアミノ酸配列、EphA2ポリペプチドの断片、EphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体、またはEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体断片を含むポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、抗体誘導体またはその断片は、1種または複数のCDRにおいてアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む。抗体誘導体は、非誘導体抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有するかもしれない。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異された)。本明細書では、「誘導体」という用語はまた、すなわち、ポリペプチドへの任意のタイプの分子の共有結合によって改変されたEphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、EphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体、またはEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体断片を意味する。例えば、限定する目的ではないが、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片は、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合などによって改変することができる。EphA2ポリペプチドの誘導体、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片は、それだけには限らないが、特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む当業者に周知の技法を用いて化学修飾によって改変することができる。さらに、EphA2ポリペプチドの誘導体、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片には、1種または複数の非古典的アミノ酸が含まれていてよい。一実施形態では、ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載のEphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、もしくは抗体断片と類似したまたは同一の機能をもっている。別の実施形態では、EphA2ポリペプチドの誘導体、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片は、未改変ポリペプチドと比較すると、改変された活性を有する。例えば、誘導体抗体またはその断片は、そのエピトープとよりしっかりと結合し、あるいはタンパク質分解に対しより耐性があり得る。

20

30

【0029】

本明細書では、「エピトープ」という用語は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはマウスまたはヒトの抗原または免疫活性(immunogenic activity)を有するEphA2ポリペプチドの一部を意味する。免疫活性を有するエピトープは、動物中で抗体応答を誘発するEphA2ポリペプチドの一部である。抗原活性を有するエピトープは、当技術分野でよく知られている任意の方法、例えば、イムノアッセイによって決定されるように、抗体が免疫特異的に結合するEphA2ポリペプチドの一部である。抗原エピトープは、必ずしも免疫原性である必要がない。

40

【0030】

本明細書に記載の「断片」には、EphA2ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5個の連続アミノ酸残基、少なくとも10個の連続アミノ酸残基、少なくとも15個の連続アミノ酸残基、少なくとも20個の連続アミノ酸残基、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、少なく

50

とも40個の連続アミノ酸残基、少なくとも50個の連続アミノ酸残基、少なくとも60個の連続アミノ酸残基、少なくとも70個の連続アミノ酸残基、少なくとも80個の連続アミノ酸残基、少なくとも90個の連続アミノ酸残基、少なくとも100個の連続アミノ酸残基、少なくとも125個の連続アミノ酸残基、少なくとも150個の連続アミノ酸残基、少なくとも175個の連続アミノ酸残基、少なくとも200個の連続アミノ酸残基、もしくは少なくとも250個の連続アミノ酸残基のアミノ酸配列またはEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体を含むペプチドまたはポリペプチドがある。抗体断片はエピトープ結合断片であることが好ましい。

【0031】

本明細書では、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体である非ヒト(例えば、ネズミ)抗体の形態を意味する。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基を、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)由来の超可変領域残基と置き換えたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基を対応する非ヒト残基と置き換える。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中で見られない残基を含むことができる。これらの改変は、抗体性能をさらに改良するために行う。一般に、ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべての超可変領域が非ヒト免疫グロブリンのものと対応し、すべてまたは実質的にすべてのFRがヒト免疫グロブリン配列のものである、実質的にすべての少なくとも1種、通常2種の可変ドメインを含むはずである。ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン定常領域(Fc)、通常アミノ酸残基置換、欠失または付加(すなわち、変異)の導入によって改変されたEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合するヒト免疫グロブリンのもの的一部分も含むはずである。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は誘導体である。このようなヒト化抗体は、1種もしくは複数の非ヒトCDRにおけるアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有するかもしれない。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異させた)。ヒト化抗体のさらなる詳細については、欧州特許EP 239,400、EP 592,106、およびEP 519,596;国際公開WO 91/09967およびWO 93/17105;米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、第5,565,332号、第5,585,089号、第5,766,886号、および第6,407,213号;ならびにPadlan, 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka et al.,

1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, *PNAS* 91:969-973; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-25; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.* 13:353-60; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272:10678-84; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.* 9:895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55(23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, *Cancer Res.* 55:1717-22; Sandhu, 1994, *Gene* 150:409-10; Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.* 235:959-73; Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Reichmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; および Presta, 1992, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2:593-596を参照のこと。

【0032】

本明細書では、「超可変領域」という用語は、抗原結合に対し反応性の抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメインの31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) および/または「超可変ループ」由来の残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメインの26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3); Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917)を含む。EA2のCDR残基を表1に記載する。「フレームワー

10

20

30

40

50

ク領域」または「FR」残基は、本明細書で定義した超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0033】

本明細書では、「併用」という用語は、2種以上の予防および/または治療薬の使用を意味する。「併用」という用語の使用は、予防および/または治療薬を過剰増殖性細胞障害、特に癌にかかっている被験者に投与する順番を制限するものではない。第1の予防または治療薬は、過剰増殖性細胞障害、特に癌にかかっていた、かかっている、またはかかりやすい被験者に第2の予防または治療薬を投与する前(例えば、1分、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間前)、投与すると同時に、または投与した後(例えば、1分、5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、8週間、または12週間後)に投与することができる。予防または治療薬は、本発明の薬剤が他の薬剤と一緒に作用してその他の方法で投与した場合よりも利益の増大をもたらす得るように、被験者に順番にある時間間隔内で投与する。任意の追加の予防または治療薬を他の追加の予防または治療薬と一緒に任意の順番で投与してもよい。

10

【0034】

本明細書では、「低忍容性」という表現は、患者が治療による副作用に苦しむ状態を意味し、それによって有害な作用および/または副作用による被害が治療の利益をはるかに上回るので患者が療法によって利益を受けない、かつ/または療法を続けない。

20

【0035】

本明細書では、「管理する」、「管理している」および「管理」という用語は、疾患の治癒が得られない、予防または治療薬の投与から被験者に生じた有益な効果を意味する。ある実施形態では、疾患の進行または悪化を防ぐために、被験者に1種または複数の予防または治療薬を投与して疾患を「管理する」。

【0036】

本明細書では、「非応答性/不応性」という表現は、患者が追加の有効な療法を必要とするほどその療法がこれらの患者を治療するのに臨床的に十分ではない、例えば療法の影響を受けないままである、化学療法、放射線療法、手術、ホルモン療法および/または生物学的療法/免疫療法などの1種または複数の現在利用可能な療法(例えば、癌療法)、特に特定の癌に対する標準的な治療レジメンで治療した患者の状態を説明するのに使用する。この表現は、療法に応答するが、さらに副作用に苦しみ、再発し、耐性を生じるなどといった患者についても記載することができる。様々な実施形態では、「非応答性/不応性」は、癌細胞の少なくともある顕著な部分が死滅またはそれらの細胞分裂が停止していないことを表す。このような関係において「不応性」の当技術分野で許容されている意味を用いて、癌細胞が「非応答性/不応性」かどうかの決定は、癌細胞に対する治療の有効性をアッセイするための当技術分野で周知の任意の方法によってin vivoまたはin vitroで行うことができる。様々な実施形態では、癌は「非応答性/不応性」であり、その場合、癌細胞数は、治療中に著しく減少せず、あるいは増加している。

30

【0037】

本明細書では、「増強」という用語は、その通常または承認された用量での治療薬の有効性の改善を意味する。

40

【0038】

本明細書では、「予防する」、「予防している」および「予防」という用語は、予防または治療薬の投与によってもたらされる被験者の疾患の発症、再発、または転移の予防を意味する。

【0039】

本明細書では、「予防薬」という用語は、EphA2過剰発現に関連した障害、特に癌の発症、再発、または転移の予防に使用できる任意の薬剤を指す。ある実施形態では、「予防薬」という用語は、EphA2アゴニスト抗体または露出EphA2エピトープ抗体(たとえば、EA2

50

、EA3、EA4、またはEA5)を指す。他のある実施形態では、「予防薬」という用語は、癌化学療法剤、放射線療法、ホルモン療法、生物学的療法(たとえば、免疫療法)、および/または本発明のEphA2抗体を指す。他の実施形態では、2種以上の予防薬を併用して投与してもよい。

【0040】

本明細書では、「予防有効量」とは、癌の再発または転移を予防するのに十分な予防薬の量を指す。予防有効量は、癌の再発または転移、あるいは癌の素因のある者または以前に発癌物質に曝された者を含むがこれに限らない患者における癌の発生を予防するのに十分な予防薬の量を指すこともある。予防有効量は、癌予防に予防利益をもたらす予防薬の量を指すこともある。さらに、本発明の予防薬についての予防有効量は、単独または他の薬剤と併用された予防薬が、癌予防に予防利益をもたらす量を意味する。本発明のEphA2抗体の量と共に用いると、この用語は、予防を全体として改善し、あるいは別の予防薬の予防有効性またはそれとの相乗効果を高める量を含意することができる。

10

【0041】

本明細書では、「プロトコル」には、投与スケジュールおよび投与レジメンが含まれる。

【0042】

本明細書では、「副作用」という表現は、予防または治療薬の望ましくない有害な作用を含む。有害な作用は、常に望ましくないが、望ましくない作用は必ずしも有害ではない。予防または治療薬による有害な作用は、有害または不快または危険であるかもしれない。化学療法による副作用には、それだけには限らないが初期および後期形成下痢および膨満などの胃腸毒性、悪心、嘔吐、摂食障害、白血球減少、貧血、好中球減少、無力症、腹部痙攣、発熱、疼痛、体重減少、脱水症、脱毛症、呼吸困難、不眠症、眩暈、粘膜炎、口内乾燥、および腎不全、ならびに便秘、神経および筋肉作用、腎臓および膀胱への一時的または永久的な損傷、流感様症状、体液貯留、および一時的または永久的な不妊症があるが、それだけには限定されない。放射線療法による副作用には、疲労、口内乾燥、および食欲減少があるが、それだけには限定されない。生物学的療法/免疫療法による副作用には、投与部位の発疹または腫張、発熱、悪寒および疲労などの流感様症状、消化管問題およびアレルギー反応があるが、それだけには限定されない。ホルモン療法による副作用には、悪心、受精能力問題、うつ病、食欲減少、眼の問題、頭痛、および体重変動があるが、それだけには限定されない。患者が通常経験する別の望ましくない作用は非常に多く、当技術分野で周知である。それらの多くはPhysicians' Desk Reference(56th ed., 2002)に記載されている。

20

30

【0043】

本明細書では、「単鎖Fv」または「scFv」という用語は、単一ポリペプチド鎖中に存在する抗体のVHおよびVLドメインを含む抗体断片を意味する。一般に、Fvポリペプチドは、抗原結合するのに望ましい構造をscFvが形成することを可能にするVHおよびVLドメインの間のポリペプチドリッカーをさらに含む。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer Verlag, New York, pp. 269-315(1994)を参照のこと。特定の実施形態では、scFvは、二重特異性scFvおよびヒト化scFvを含む。

40

【0044】

本明細書では、「被験者」および「患者」という用語は、区別なく用いる。本明細書では、被験者は、好ましくは非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および霊長類(例えば、サルおよびヒト)などの哺乳動物、最も好ましくはヒトである。

【0045】

本明細書では、「治療する」、「治療している」および「治療」という用語は、1種または複数の治療薬の投与によってもたらされる疾患もしくは障害の症状の根絶、軽減または回復、特に原発性、局所性もしくは転移癌組織の根絶、除去、改変、または制御を表す

50

。ある実施形態では、こうした用語は、このような疾患にかかっている被験者への1種もしくは複数の治療薬の投与によってもたらされる癌の転移の最小化または遅延を意味する。

【0046】

本明細書では、「治療薬」という用語は、EphA2の過剰発現に関連した障害、特に癌の予防、治療、または管理に使用できる任意の薬剤を指す。ある実施形態では、「治療薬」という用語は、EphA2アゴニスト抗体および/露出EphA2エピトープ抗体、たとえばEA2、EA3、EA4、またはEA5を指す。他のある実施形態では、「治療薬」という用語は、癌化学療法剤、放射線療法、ホルモン療法、生物学的療法/免疫療法、および/または本発明のEphA2抗体を指す。他の実施形態では、2種以上の薬剤を併用投与してよい。

10

【0047】

本明細書では、「治療有効量」とは、原発性、局所性、または転移性の癌組織を破壊、改変、制御、または除去するのに十分な治療薬の量を指す。治療有効量とは、癌の転移を遅らせ、または最小に抑えるのに十分な治療薬の量を指すこともある。治療有効量は、癌の治療または管理に治療利益をもたらす治療薬の量を指すこともある。さらに、本発明の治療薬についての治療有効量は、単独または他の療法と組み合わせられた治療薬が、癌の治療または管理に治療利益をもたらす量を意味する。本発明のEphA2抗体の量と共に用いると、この用語は、療法を全体として改善し、望ましくない効果を低減または回避し、あるいは別の治療薬の治療有効性またはそれとの相乗効果を高める量を含意することができる。

20

【0048】

4. 図面の簡単な説明

(後記参照のこと。)

【発明を実施するための最良の形態】

【0049】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、一部には、EphA2モノクローナル抗体が癌細胞の表現型を阻害(又は抑制)し得るとする発明者らの発見に基づく。EphA2活性が低下すると、悪性の癌細胞増殖が選択的に抑制される。EphA2活性は、EphA2アゴニスト・モノクローナル抗体を用いて低下させることができる。特定の作用機序に拘泥するものではないが、悪性細胞増殖のこうした阻害は、EphA2のシグナル伝達を刺激し(すなわちそれに作用(agonizing)し)、それによってEphA2のリン酸化を引き起こし、これがその分解をもたらすことによって実現される。悪性細胞増殖は、EphA2レベルが低下するために低減し、したがってリガンド依存的なEphA2シグナル伝達が高減する。

30

【0050】

したがって、本発明は、癌、特に転移癌を治療、予防、および管理するための方法および組成物に関する。本発明の特定の態様は、癌細胞、特にEphA2を過剰発現している癌細胞の増殖および侵襲を抑制する化合物を含む方法および組成物に関する。本発明はさらに、上皮細胞由来の癌、特にヒトの乳房、肺、皮膚、および前立腺の癌の治療、抑制、または転移管理のための方法および組成物に関する。本発明の別の組成物および方法は、本発明のEphA2抗体と組み合わせる他の種類の活性成分を含む。

40

【0051】

本発明はまた、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および生物学的療法など、現在または標準の癌治療に部分的または完全に不応性になっている癌の治療、抑制、および管理のための方法に関する。

【0052】

本発明はさらに、本発明のEphA2抗体、特に露出EphA2エピトープ抗体を使用して、EphA2系または非EphA2系の癌治療の有効性を評価する診断法を提供する。本発明の診断法を使用すると、癌の進行を予測または予想することもできる。特定の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化し、その位置を決定する方法と、原発腫瘍部位の遠位の組織およ

50

び体液を用いて診断および予測する方法(並びに、原発腫瘍の組織および体液を使用する方法)とを提供する。他の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化し、その位置を決定する方法と、in vivoで診断および予測する方法とを提供する。

【0053】

5.1 抗体

上で論じたように、本発明は、抗体(好ましくはモノクローナル抗体)またはその断片であって、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2シグナル伝達に作用するもの(「EphA2アゴニスト抗体」)、および/または非癌細胞でなく癌細胞で選択的に露出または増加するEphA2上エピトープに優先的に結合するもの(「露出EphA2エピトープ抗体」)の投与を含む。一実施形態では、抗体は、EphA2の細胞外ドメインに結合し、好ましくはまたEphA2に作用する、たとえばEphA2のリン酸化を増大させる。別の実施形態では、抗体は、EphA2の細胞外ドメインに結合し、好ましくは、非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上エピトープにも結合する。より好ましい実施形態では、抗体は、EA2、EA3、EA4、またはEA5である。別の実施形態では、抗体は、たとえばELISAによってアッセイされるように、EA2、EA3、EA4、またはEA5によって結合されるエピトープに結合し、かつ/またはEphA2結合についてEA2、EA3、EA4、またはEA5と競合する。他の実施形態では、本発明の抗体は、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2のシグナル伝達に作用(agonize)し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上エピトープに優先的に結合し、結合についてEphA2リガンド、たとえばエフリン(Ephrin)A1と競合してもよいし、しなくてもよい。

【0054】

本発明の抗体EA2(EA2.31株)およびEA5(EA5.12株)を産生するハイブリドーマは、特許手続の目的での微生物寄託についての国際的な承認に関するブタベスト条約の規約のもと、2002年5月22日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108)に寄託され、それぞれ受託番号PTA-4380およびPTA-4381が割り当てられており、参照により本明細書に援用する。EA2抗体のVLおよびVHのアミノ酸配列を図16A~16Bに示す。EA2 CDRの配列を表1に示す。最も好ましい実施形態では、抗体はヒトのものか、またはヒト化されているものである。

【0055】

本発明の方法で使用する抗体には、モノクローナル抗体、合成抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖Fvs(scFv)(二重特異性scFvsを含む)、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、および上記のいずれかのエピトープ結合断片が含まれるがこれだけに限らない。特に、本発明の方法で使用する抗体には、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2のアゴニストであり、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2エピトープと優先的に結合する免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫活性部分、すなわち抗原結合部位を含む分子が含まれる。本発明の免疫グロブリン分子は、どんな種類(たとえばIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、どんなクラス(たとえばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂)、またはどんなサブクラスの免疫グロブリン分子のものでよい。

【0056】

本発明の方法で使用する抗体は、鳥類および哺乳動物(例えば、ヒト、ネズミ、ロバ、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリ)を含む任意の動物起源であってよい。抗体は、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体であることが好ましい。本明細書では、「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体およびヒト免疫グロブリン・ライブラリーまたはマウスもしくはヒト遺伝子由来の抗体を発現する他の動物から単離した抗体が含まれる。

【0057】

本発明の方法に使用する抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性またはより多い多重特異性であってよい。多重特異性抗体は、EphA2ポリペプチドの異なるエピトープと免疫特異的に結合でき、あるいはEphA2ポリペプチドならびに異種ポリペプチドまたは固

る、EphA2と結合する前述のいずれかのものも含む。

【0060】

一実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号6であるVH CDR1と、アミノ酸配列が配列番号2であるVL CDR1とを含む。別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号6であるVH CDR1と、アミノ酸配列が配列番号3であるVL CDR2とを含む。別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号6であるVH CDR1と、アミノ酸配列が配列番号4であるVL CDR3とを含む。

10

【0061】

別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号7であるVH CDR2と、アミノ酸配列が配列番号2であるVL CDR1とを含む。別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号7であるVH CDR2と、アミノ酸配列が配列番号3であるVL CDR2とを含む。別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号7であるVH CDR2と、アミノ酸配列が配列番号4であるVL CDR3とを含む。

20

【0062】

別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号8であるVH CDR3と、アミノ酸配列が配列番号2であるVL CDR1とを含む。別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号8であるVH CDR3と、アミノ酸配列が配列番号3であるVL CDR2とを含む。別の実施形態では、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体は、アミノ酸配列が配列番号8であるVH CDR3と、アミノ酸配列が配列番号4であるVL CDR3とを含む。

30

【0063】

本発明の方法で使用する抗体には、すなわち、任意のタイプの分子の抗体への共有結合によって改変された誘導体が含まれる。例えば、限定する目的ではないが、抗体誘導体には、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合などによって改変された抗体が含まれる。多数の化学修飾のいずれも、それだけには限らないが、特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む周知の技法によって行うことができる。さらに、誘導体には、1種または複数の非古典的アミノ酸が含まれていてよい。

40

【0064】

本発明は、当業者に知られているフレームワーク領域を含む本発明の抗体またはその断片も提供する。本発明の抗体またはその断片は、ヒトのものまたはヒト化されていることが好ましい。特定の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、EA2、EA3、EA4、またはEA5(または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2エピトープと優先的に結合する他の任意のEphA2アゴニスト抗体またはEphA2抗体)のうちのいずれかに由来する1種または複数のCDRを含み、EphA2と結合し、好ましくはEphA2に作用(agonize)し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2エピトープと優先的に結合する。

【0065】

本発明は、ラクダ化単ドメイン抗体を含む単ドメイン抗体を含む(たとえば、Muyld

50

ermans et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann and Muylldermans:1999, J. Immunol. Meth. 231:25; 国際公開WO 94/04678およびWO 94/25591; 米国特許第6,005,079号を参照されたく、これらの全体を参照により本明細書に援用する)。一実施形態では、本発明は、EA2、EA3、EA4、またはEA5(または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2エピトープと優先的に結合する他の任意のEphA2アゴニスト抗体またはEphA2抗体)のVHドメインのうちいずれかのアミノ酸配列を、単ドメイン抗体が生成されるように改変された状態で有する2個のVHドメインを含む単ドメイン抗体を提供する。別の実施形態では、本発明は、EA2、EA3、EA4、またはEA5(または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2エピトープと優先的に結合する他の任意のEphA2アゴニスト抗体またはEphA2抗体)のVH CDRのうち1種または複数を含む2個のVHドメインを含む単ドメイン抗体も提供する。

10

【0066】

本発明の方法はまた、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて15日以上、好ましくは20日以上、25日以上、30日以上、35日以上、40日以上、45日以上、2カ月以上、3カ月以上、4カ月以上、または5カ月以上の半減期(例えば、血清半減期)を有する抗体またはその断片の使用を含む。哺乳動物、好ましくはヒトにおける本発明の抗体またはその断片の半減期が増大すると、哺乳動物において前記抗体または抗体断片の血清価がより高くなり、したがって、前記抗体もしくは抗体断片の投与頻度が減り、かつ/または投与すべき前記抗体もしくは抗体断片の濃度が下がる。in vivo半減期が増大した抗体またはその断片は、当業者に周知の技法によって生成することができる。例えば、in vivo半減期が増大した抗体またはその断片は、FcドメインとFcRn受容体との相互作用に関与するものと認められるアミノ酸残基を改変(例えば、置換、欠失または付加)することによって生成することができる(例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる国際公開WO 97/34631およびWO 02/060919を参照のこと)。in vivo半減期が増大した抗体またはその断片は、前記抗体または抗体断片に高分子量ポリエチレングリコール(PEG)などのポリマー分子を結合することによって生成することができる。PEGは、PEGと前記抗体もしくは抗体断片のNもしくはC末端との部位特異的結合によってまたはリジン残基上に存在するイプシロン-アミノ基を介して、多機能リンカーを用いてまたは用いないで前記抗体もしくは抗体断片と結合させることができる。生物学的活性の最小損失をもたらす直鎖状または分枝状ポリマー誘導体を使用することになる。結合の度合いは、SDS-PAGEおよび質量分析によって密接にモニターして、PEG分子と抗体との正常な結合を確実にする。未反応PEGは、例えば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーによって抗体-PEG結合体から分離することができる。

20

30

【0067】

本発明は、フレームワーク領域または可変領域中に突然変異(たとえば、1個または複数のアミノ酸の置換)を含む、EA2、EA3、EA4、またはEA5の一方または両方の可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体または抗体断片の使用も含む。これら抗体の突然変異は、互いに免疫特異的に結合する特定の抗原に対する抗体の結合力および/または親和性を維持または強化するものであることが好ましい。当業者に知られている標準の技術(たとえばイムノアッセイ)を使用して、特定の抗原に対する抗体の親和性をアッセイすることができる。

40

【0068】

例えば、アミノ酸置換をもたらす部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発を含む当業者に周知の標準的な技法を使用して、抗体、またはその断片をコードするヌクレオチド配列に変異を導入することができる。誘導体は、元の抗体またはその断片に対して15未満のアミノ酸置換、10未満のアミノ酸置換、5未満のアミノ酸置換、4未満のアミノ酸置換、3未満のアミノ酸置換、2未満のアミノ酸置換を含むことが好ましい。好ましい実施形態では、誘導体は、1種または複数の予測した非必須アミノ酸残基で作られる保存的アミノ酸置換を有する。

【0069】

50

本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体または抗体断片であって、EA2、EA3、EA4、またはEA5の可変軽鎖および/または重鎖のアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である可変軽鎖および/または可変重鎖のアミノ酸配列を含む抗体またはその断片も含む。ある実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号1に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である可変軽鎖のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本発明の抗体および抗体断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号5に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である可変重鎖のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号1に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である可変軽鎖と、配列番号5に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である可変重鎖のアミノ酸配列を含む。

【0070】

本発明はさらに、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/癌細胞で露出したEphA2エピトープに優先的に結合する抗体またはその断片であって、EA2、EA3、EA4、またはEA5の1種または複数のCDRのアミノ酸配列に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%である1種または複数のCDRのアミノ酸配列を含む抗体またはその断片を含む。一実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号2、3、または4に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%であるCDRのアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号6、7、または8に対する同一性が少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%であるCDRのアミノ酸配列を含む。

【0071】

2つのアミノ酸配列の同一性パーセントの決定は、BLASTタンパク質検索を含む当業者に周知の任意の方法によって行うことができる。

【0072】

本発明はさらに、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体またはその断片であって、配列番号2、3、4、6、7、または8と対照してアミノ酸残基の置換、欠失、または付加を含む1種または複数のCDRのアミノ酸配列を含む抗体またはその断片を含む。アミノ酸残基の置換、欠失、または付加を含む1種または複数のCDRを含む抗体は、アミノ酸残基の置換、欠失、または付加のない1種または複数のCDRを含む抗体と比べて、結合がほぼ同程度でも、より良好でも、またはより劣っていてもよい。特定の実施形態では、CDRの1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸残基が置換、欠失、または付加を起こしている(すなわち、

突然変異している)。

【0073】

本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上エピトープと優先的に結合する抗体または抗体断片の使用を含み、この場合、前記抗体または抗体断片は、ストリンジент条件下でEA2、EA3、EA4、またはEA5のヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上エピトープと優先的に結合する抗体またはその断片であって、EA2、EA3、EA4、またはEA5の可変軽鎖のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる可変軽鎖を含む抗体またはその断片を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号9のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる可変軽鎖を含む抗体またはその断片を提供する。別の実施形態では、本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で選択的に露出または増加しているEphA2上エピトープと優先的に結合する抗体またはその断片であって、EA2、EA3、EA4、またはEA5の可変重鎖のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる可変重鎖を含む抗体またはその断片を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号13のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる可変重鎖を含む抗体またはその断片を提供する。別の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、また配列番号9のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる可変軽鎖と、配列番号13のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる可変重鎖とを含む。

10

20

【0074】

別の実施形態では、本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2上エピトープと優先的に結合する抗体またはその断片であって、EA2、EA3、EA4、またはEA5の1種または複数のCDRのヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる1種または複数のCDRを含む抗体またはその断片を提供する。好ましい実施形態では、本発明の抗体または断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号10、11、または12のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるCDRを含む。別の好ましい実施形態では、本発明の抗体または断片は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号14、15、または16のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるCDRを含む。

30

【0075】

ストリンジентなハイブリダイゼーション条件には、それだけには限らないが、約45における6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションとそれに続く約50~65における0.2X SSC/0.1% SDS中での1回または複数回の洗浄、約45における6X SSC中でのフィルター結合DNAとのハイブリダイゼーションとそれに続く約60における0.1X SSC/0.2% SDS中での1回または複数回の洗浄などの極めてストリンジентな条件、または当業者に周知の任意の他のストリンジентなハイブリダイゼーション条件がある(例えば、Ausubel, F.M. et al., eds. 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley and Sons, Inc., NYの6.3.1~6.3.6および2.10.3頁を参照のこと)。

40

【0076】

本発明はさらに、EphA2に免疫特異的に結合し、EphA2に作用(agonize)し、かつ/または

50

癌細胞で露出しているEphA2エピトープに優先的に結合する抗体またはその断片であって、配列番号10、11、12、14、15、または16と比較して核酸残基の置換、欠失、または付加を含む1種または複数のCDRのヌクレオチド配列によってコードされる1種または複数のCDRを含む抗体またはその断片を含む。核酸残基の置換、欠失、または付加を含む1種または複数のCDRを含む抗体は、核酸残基の置換、欠失、または付加のない1種または複数のCDRを含む抗体と比べて、結合がほぼ同程度でも、より良好でも、より劣っていてもよい。特定の実施形態では、CDRの1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個の核酸残基が置換、欠失、または付加を起こしている(すなわち、突然変異している)。核酸の置換は、突然変異したCDRのアミノ酸配列を変化させても変化させなくてもよい。

【表1】

抗体	V鎖	CDR	配列番号 (アミノ酸)	配列番号 (核酸)	ATCC 受託番号
EA2					PTA-4380
	VL		1	9	
		VL1	2	10	
		VL2	3	11	
		VL3	4	12	
	VH		5	13	
		VH1	6	14	
		VH2	7	15	
		VH3	8	16	

【0077】

5.1.1 抗体結合体

本発明は、異種ポリペプチド(またはその部分、好ましくは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100アミノ酸のポリペプチド)に組換えによって融合させ、または化学結合(共有結合も非共有結合も含む)によって結合させて、融合タンパク質を生成した抗体またはその断片の使用を含む。融合は、必ずしも直接的でなくともよく、リンカー配列を介して起こしてよい。たとえば、抗体を使用すると、抗体を特定の細胞表面受容体に特異的な抗体と融合または結合させて、in vitroまたはin vivoで異種ポリペプチドを特定の細胞型に標的指向させることができる。異種ポリペプチドに融合または結合させた抗体は、当技術分野で知られている方法を使用するin vitroイムノアッセイおよび精製法で使用することもできる。たとえば、国際公開WO 93/21232;EP 439,095;Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99;米国特許第5,474,981号;Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432;およびFell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452を参照されたく、これらの全体を参照により本明細書に援用する。ある実施形態では、検出、治療、管理、またはモニターすべき障害は、EphA2を過剰発現する悪性の癌である。他の実施形態では、検出、治療、管理、またはモニターすべき障害は、EphA2を過剰発現する細胞を伴う前癌状態である。特定の実施形態では、前癌状態は、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維嚢胞症、または化合物母斑(compound nevi)である。

【0078】

本発明はさらに、抗体断片と融合または結合した異種物質を含む組成物を含む。例えば、異種ポリペプチドは、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)₂断片、もしくはその部分と融合または結合してよい。ポリペプチドを抗体部分と融合または結合させる方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号、および第5,112,946;EP 307,434;EP 367,166;国際公

10

20

30

40

50

開WO 96/04388およびWO 91/06570;Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88:10535 ~ 10539;Zhen g et al., 1995, J. Immunol. 154:5590 ~ 5600;およびVil et al., 1992, PNAS 89:11337 ~ 11341を参照のこと(前記参考文献は、その全体が参照により組み込まれている)。

【 0 0 7 9 】

たとえば、EA2、EA3、EA4、またはEA5抗体(または非癌細胞でなく癌細胞上で露出しているEphA2エピトープに優先的に結合する他の任意のEphA2アゴニスト抗体またはEphA2抗体)のいずれかの別の融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフ・シャフリング、エキソン・シャフリング、および/またはコドン・シャフリング(総称して「DNAシャフリング」と呼ばれる)の技法によって生成することができる。DNAシャフリングを使用すると、本発明の抗体またはその断片(たとえば、親和性が高く、解離率が低い抗体またはその断片)の活性を変更することができる。一般に、米国特許第5,605,793号;同第5,811,238号;同第5,830,721号;同第5,834,252号;および同第5,837,458号、ならびにPatten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33;Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76;Hansson, et al., 1999, J Mol. Biol. 287:265;およびLorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308(これらの特許および刊行物それぞれの全体を参照により本明細書に援用する)を参照されたい。抗体またはその断片、またはコードされた抗体またはその断片は、組換えを行う前に、エラープローンPCR、ランダム・ヌクレオチド挿入、または他の方法によるランダム変異誘発にかけることによって変更することができる。抗体または抗体断片をコードしているポリヌクレオチドの、EphA2に免疫特異的に結合する1箇所または複数の部分を、1種または複数の異種分子の1個または複数の構成成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、断片などと組み換えることができる。

【 0 0 8 0 】

さらに、抗体またはその断片をペプチドなどのマーカー配列と融合させると、精製を容易にすることができる。好ましい実施形態では、マーカーアミノ酸配列は、特にpQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)として提供されているタグなど、その多くが市販されているヘキサヒスチジン・ペプチドである。Gentz et al., 1989, PNAS 86:821に記載されているとおり、たとえば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の精製を好都合にするものである。精製の際に有用な他のペプチド・タグには、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する赤血球凝集素「HA」(Wilson et al., 1984, Cell 37:767)および「フラグ」タグが含まれるがこれに限らない。

【 0 0 8 1 】

他の実施形態では、本発明の抗体またはその断片もしくは変異体は、診断または検出可能な物質と結合させる。こうした抗体は、特定の療法の有効性の決定などの臨床試験手順の一部として、癌の発生または進行をモニターまたは予測するのに有用であり得る。さらに、こうした抗体は、EphA2を過剰発現する細胞に関連する前癌性症状(例えば、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維嚢胞症、または化合物母斑)の発生または進行をモニターまたは予測するのに有用であり得る。一実施形態では、露出EphA2エピトープ抗体は、診断または検出可能な物質と結合している。別の実施形態では、抗体はEA2ではない。

【 0 0 8 2 】

こうした診断および検出は、それだけには限らないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ベータ・ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの様々な酵素;それだけには限らないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンなどの補欠分子族;それだけには限らないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンなどの蛍光物質;それだけには限らないが、ルミノールなどの発光物質;それだけには限らないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどの生物発光物質;それだけには限らないが、ビスマス(^{213}Bi)、炭素(^{14}C)、クロム(^{51}Cr)、コバルト(^{57}Co)、フッ素(^{18}F)、ガドリニウム(15

10

20

30

40

50

^{3}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム(^{68}Ge)、ホルミウム(^{166}Ho)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタン(^{140}La)、ルテチウム(^{177}Lu)、マンガン(^{54}Mn)、モリブデン(^{99}Mo)、パラジウム(^{103}Pd)、リン(^{32}P)、プラセオジウム(^{142}Pr)、プロメチウム(^{149}Pm)、レニウム(^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム(^{105}Rh)、ルテニウム(^{97}Ru)、サマリウム(^{153}Sm)、スカンジウム(^{47}Sc)、セレン(^{75}Se)、ストロンチウム(^{85}Sr)、硫黄(^{35}S)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Ti)、スズ(^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、トリチウム(^3H)、キセノン(^{133}Xe)、イッテルビウム(^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、イットリウム(^{90}Y)、亜鉛(^{65}Zn)などの放射性物質;様々な陽電子射出断層撮影法を用いた陽電子放出金属および非放射性常磁性金属イオンを含むが、それだけには限定されない検出可能な物質と抗体をカップリングすることによって実施することができる。

10

【0083】

本発明はさらに、治療薬に結合させた抗体またはその断片の使用を含む。

【0084】

抗体またはその断片は、毒素などの治療部分、たとえば、細胞増殖抑制剤または細胞破壊剤、治療薬、または放射性金属イオン、たとえば 放射体に結合させてよい。細胞毒または細胞傷害剤には、細胞に有害な任意の物質が含まれる。例には、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロ

カイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルピシン、およびシクロホスファミド、ならびにこれらの類似体または同族体が含まれる。治療薬には、代謝拮抗薬(たとえば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(たとえば、メクロレタミン、チオエパ(thioepa)クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BCNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(たとえば、ダウノルピシン(以前のダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(たとえば、ダクチノマイシン(以前のアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン(AMC))、およ

び有糸分裂阻害剤(たとえば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が含まれるがこれに限らない。

20

30

【0085】

さらに、抗体またはその断片を、所与の生物学的応答を改変する治療薬または薬物部分に結合させてもよい。治療薬または薬物部分は、伝統的な化学治療薬に限定されないものと解釈する。たとえば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドでよい。こうしたタンパク質には、たとえば、アプリン、リシンA、シュードモナス外毒素、コレラ毒、またはジフテリア毒などの毒素;腫瘍壊死因子、インターフェロン、インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲン

アクチベーターなどのタンパク質;アポトーシス剤、たとえばTNF- α 、TNF- β 、AIM I(国際公開WO 97/33899を参照のこと)、AIM II(国際公開WO 97/34911を参照のこと)、Fasリガンド(Takahashi et al., 1994, J. immunol., 6:1567)、およびVEGF(国際公開WO 99/23105を参照のこと)、血栓剤または抗血管形成剤、たとえば、アンギオスタチンまたはエンドスタチン;あるいは、たとえば、リンフォカイン(たとえば、インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、および顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」))、または増殖因子(たとえば、成長ホルモン(「GH」))などの生物学的応答改変剤が含まれる。

40

【0086】

さらに、抗体は、放射性物質や、放射性金属イオンと結合するのに有用な大環状キレート剤などの治療部分と結合させることができる(放射物質の例については上記を参照のこ

50

と)。ある実施形態では、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体に結合することのできる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)である。こうしたリンカー分子は、当技術分野で一般に知られており、参照により全体を本明細書に援用するDenardo et al., 1998, Clin Cancer Res. 4:2483-90; Peterson et al., 1999, Bioconjug. Chem. 10:553; および Zimmerman et al., 1999, Nucl Med. Biol. 26:943-50に記載されている。

【0087】

特定の実施形態では、結合した抗体は、非癌細胞ではなく癌細胞上に露出したEphA2エピトープと好ましくは結合するEphA2抗体である(すなわち、露出EphA2エピトープ抗体)。別の特定の実施形態では、結合した抗体はEA2ではない。

10

【0088】

治療部分を抗体と結合させる技法はよく知られている。この部分は、それだけには限らないが、アルデヒド/シッフ結合、スルフヒドリル結合、酸不安定性結合、cis-アコニチル(aconityl)結合、ヒドラゾン結合、酵素分解性結合を含む当技術分野で周知の任意の方法によって抗体と結合させることができる(一般にGarnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216を参照のこと)。治療部分を抗体と結合させる別の技法はよく知られており、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243~56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(第2版)、Robinsonら(編)、623~53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475~506(1985); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303~16 (Academic Press 1985)、およびThorpeら、1982, Immunol. Rev. 62:119~58を参照のこと。抗体をポリペプチド部分と融合または結合させる方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第5336603号、第5622929号、第5359046号、第5349053号、第5447851号、および第5112946号; EP 307434; EP 367166; 国際公開WO 96/04388およびWO 91/06570; Ashkenaziら、1991, PNAS 88:10535~10539; Zhengら、1995, J. Immunol. 154:5590~5600; およびVilら、1992, PNAS 89:11337~11341を参照のこと。抗体の部分への融合は、必ずしも直接的でなくてもよいが、リンカー配列によって起こり得る。こうしたリンカー分子は、当技術分野で一般に周知であり、その全体が参照によりそれぞれ本明細書に組み込まれる、Denardoら、1998, Clin Cancer Res. 4:2483~90; Petersonら、1999, Bioconjug. Chem. 10:553; Zimmermanら、1999, Nucl. Med. Biol. 26:943~50; Garnett、2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171~216に記載されている。

20

30

【0089】

あるいは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4676980号でSegalによって記載されているように、抗体は、第2抗体と結合して、ヘテロ結合抗体を形成することができる。

40

【0090】

抗体は、標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用な固体支持体と結合させることもできる。こうした固体支持体には、それだけには限らないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンがある。

【0091】

5.1.2 抗体を生成する方法

抗体またはその断片は、抗体の合成についての当技術分野で周知の任意の方法によって、特に、化学合成、または好ましくは組換え発現技法によって生成することができる。

【0092】

50

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え、およびファージ・ディスプレイ技法、またはその組合せの使用を含む当技術分野で周知の多種多様な技法を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で周知のもの、および例えば、Harlowら、Antibodies:A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、第2版1988);Hammerlingら:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563~681(Elsevier、N.Y.、1981)に教示のものを含むハイブリドーマ技法を用いて生成することができる(前記参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれている)。本明細書では、「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術によって生成した抗体だけには限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物、原核生物、またはファージ・クローンを含む単一クローン由来の抗体を意味するものであり、それを生成する方法ではない。

10

【0093】

ハイブリドーマ技術を使用して特定の抗体を生成し、スクリーニングする方法は、常法どおりであり、当技術分野でよく知られている。簡潔に述べれば、マウスをEphA2(全長タンパク質またはその断片、たとえば細胞外ドメインまたはリガンド結合ドメイン)で免疫感作し、免疫応答が検出されたなら、たとえば、マウス血清中にEphA2に特異的な抗体が検出されたなら、マウスの脾臓を摘出し、脾細胞を単離することができる。次いで、周知の技法によって、脾細胞を任意の適切な骨髄腫細胞、たとえばATCCから入手可能なSP20細胞系由来の細胞と融合させる。ハイブリドーマを選択し、限界希釈によってクローン化する。次いで、当技術分野でよく知られている方法によって、本発明のポリペプチドと結合

20

【0094】

したがって、モノクローナル抗体は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養することによって生成することができる。好ましくは、そのハイブリドーマは、EphA2またはその断片で免疫したマウスから単離した脾細胞を骨髄腫細胞と融合することによって生成し、次いで融合で得たハイブリドーマをEphA2と結合できる抗体を分泌するハイブリドーマ・クローンについてスクリーニングする。

【0095】

特異的EphA2エピトープを認識する抗体断片は、当業者に周知の任意の技法によって生成することができる。例えば、本発明のFabおよびF(ab')₂断片は、パパイン(Fab断片を生成するため)またはペプシン(F(ab')₂断片を生成するため)などの酵素を用いた免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断によって生成することができる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖のCH1ドメインを含む。さらに、本発明の抗体は、当技術分野で周知の様々なファージ・ディスプレイ法を用いて生成することもできる。

30

【0096】

ファージ・ディスプレイ法では、機能抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列をもつファージ粒子の表面上にディスプレイされている。特に、VHおよびVLドメインをコードするDNA配列は、動物cDNAライブラリー(例えば、リンパ組織のヒトまたはネズミcDNAライブラリー)から増幅されている。VHおよびVLドメインをコードするDNAをscFvリンカーと一緒にPCRによって組換え、ファージミド・ベクター(例えば、pCANTAB 6またはpComb 3 HSS)中に挿入する。このベクターを大腸菌(E. coli)中で電気穿孔し、大腸菌をヘルパー・ファージに感染させる。これらの方法で使用するファージは、通常fdおよびM13を含む糸状ファージであり、そのVHおよびVLドメインは、ファージ遺伝子IIIと遺伝子VIIのいずれかと通常組換え融合させる。所定のEphA2エピトープと結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原、例えば、標識した抗原または固体表面もしくはビーズに結合したもしくは捕捉された抗原を用いて選択または同定することができる。本発明の抗体を作製するのに使用できるファージ・ディスプレイ法の例には、その全体がそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる、Brinkmanら、1995、J. Immunol. Methods 182:

40

50

41~50;Amesら、1995、J. Immunol. Methods 184:177;Kettleboroughら、1994、Eur. J. Immunol. 24:952~958;Persicら、1997、Gene 187:9;Burtonら、1994、Advances in Immunology 57:191~280;国際出願PCT/GB91/01134;国際公開WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/1 1236、WO 95/15982、WO 95/20401、およびWO97/13844;ならびに米国特許第5698426号、第5223409号、第5403484号、第5580717号、第5427908号、第5750753号、第5821047号、第5571698号、第5427908号、第5516637号、第5780225号、第5658727号、第5733743号および第5969108号に記載されているものがある。

【0097】

ファージは、特にEphA2の細胞外ドメインへのEphA2の結合についてスクリーニングされ得る。EphA2活性への作用(たとえば、EphA2のリン酸化の増大、EphA2レベルの低減)をスクリーニングしてもよい。

10

【0098】

上記の参考文献に記載のように、ファージ選択の後、ファージから抗体コード領域を単離し、ヒト抗体、または任意の他の所望の抗原結合断片を含む全抗体を生成するのに使用し、例えば、下記に記載のように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む任意の所望の宿主中で発現させることができる。Fab、Fab'およびF(ab')₂断片を組換え生成する技法も、国際公開WO 92/22324;Mullinaxら、1992、BioTechniques 12:864;Sawaiら、1995、AJRI 34:26;およびBetterら、1988、Science 240:1041に記載のものなどの当技術分野で周知の方法を用いて行うことができる(前記参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれている)。

20

【0099】

全抗体を生成するためには、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するためのフランキング配列を含むPCRプライマーを使用して、scFvクローンのVHまたはVL配列を増幅させることができる。当業者に周知のクローニング技術を利用することによって、PCRで増幅したVHドメインをVH定常領域、例えば、ヒト 4定常領域を発現するベクター中にクローン化することができ、PCRで増幅したVLドメインをVL定常領域、例えば、ヒト 4定常領域を発現するベクター中にクローン化することができる。VHまたはVLドメインを発現するためのベクターには、EF-1 プロモーター、分泌シグナル、可変ドメインのクローニング部位、定常ドメイン、およびネオマイシンなどの選択メーカーが含まれることが好ましい。VHおよびVLドメインは、必要な定常領域を発現する1つのベクターにクローン化することもできる。次いで、当業者に周知の技術を用いて、重鎖変換ベクターおよび軽鎖変換ベクターを細胞系に同時トランスフェクトして、完全長抗体、例えば、IgGを発現する安定または一時的な細胞系を生成する。

30

【0100】

ヒトにおける抗体のin vivo使用およびin vitro検出アッセイを含むいくつかの使用では、ヒトまたはキメラ抗体を使用すると好ましいかもしれない。ヒト被験者の治療に対してあらゆる点でヒト抗体が特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列由来の抗体ライブラリーを用いて上記のファージ・ディスプレイ法を含む当技術分野で周知の様々な方法によって作製することができる。その全体がそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4444887号および第4716111号;ならびに国際公開WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、およびWO 91/10741も参照のこと。

40

【0101】

ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現することができないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現できる遺伝子導入マウスを用いて生成することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、マウス胚幹細胞中にランダムにまたは相同組換えによって導入することができる。あるいは、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域は、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えてマウス胚性幹細胞に導入することができる。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによって別々にまたはヒト免疫グロブリン座位の導入と同時に非機能的にすることができる。特に、J_H領域のホモ接

50

合性欠失は、内因性抗体生成を防止する。改変した胚性幹細胞を増やし、胚盤胞に微量注入してキメラ・マウスを生成する。次いで、キメラ・マウスを繁殖させて、ヒト抗体を発現するホモ接合性子孫を生成する。遺伝子導入マウスを、選択した抗原、例えば、本発明のポリペプチドのすべてまたは一部分を用いて通常の方法で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫したトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスがヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化中に改変し、続いてクラス・スイッチングおよび体細胞変異を受ける。したがって、このような技術を用いることによって、治療上有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を生成することが可能である。ヒト抗体を生成するためのこの技術の概要については、LonbergおよびHuszar(1995、Int. Rev. Immunol. 13:65~93)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのこの技術およびこうした抗体を生成するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、それらの全体が本明細書によって組み込まれる国際公開WO 98/24893、WO 96/34096、およびWO 96/33735;ならびに米国特許第5413923号、第5625126号、第5633425号、第5569825号、第5661016号、第5545806号、第5814318号、および第5939598を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc.(米国カリフォルニア州Freemont)およびMedarex(米国ニュージャージー州Princeton)などの会社は、上記のものと類似の技術を用いて選択した抗原に対するヒト抗体の提供に携わることができる。

【 0 1 0 2 】

キメラ抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域と、ヒト免疫グロブリン定常領域とを有する抗体など、種々の抗体部分が、異なる免疫グロブリン分子に由来している分子である。キメラ抗体を生成する方法は、当技術分野で周知である。たとえば、Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; 米国特許第6,311,415号、同第5,807,715号、同第4,816,567号、および同第4,816,397号を参照されたく、これらの全体を参照により本明細書に援用する。ヒトでない種に由来する1種または複数のCDRと、ヒト免疫グロブリン分子のフレームワーク領域とを含むキメラ抗体は、たとえば、CDR移植(EP 239,400; 国際公開WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号、および同第5,585,089号)、張り合わせ(venezing)または再表面化(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805; およびRoguska et al., 1994, PNAS 91:969)、および鎖シャフリング(米国特許第5,565,332号)を含む当技術分野で知られている様々な技術を使用して生成することができる。一実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2を免疫特異的に結合し、ヒトフレームワーク領域内に、EA2、EA3、EA4、またはEA5のV_L CDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する1個、2個、または3個のVL CDRを含む。特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2を免疫特異的に結合し、配列番号2、3、または4のアミノ酸配列を有するVL CDRを含む。別の実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合し、ヒトフレームワーク領域内に、EA2、EA3、EA4、またはEA5のVH CDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する1個、2個、または3個のVH CDRを含む。特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2に免疫特異的に結合し、配列番号6、7、または8のアミノ酸配列を有するVH CDRを含む。好ましい実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2に免疫特異的に結合し、ヒトフレームワーク領域内に、EA2、EA3、EA4、またはEA5のVL CDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する1個、2個、または3個のVL CDRを含み、EA2、EA3、EA4、またはEA5のVH CDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する1個、2個、または3個のVH CDRをさらに含む。特定の好ましい実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2を免疫特異的に結合し、配列番号2、3、または4のアミノ酸配列を有するVL CDRを含み、配列番号6、7、または8のアミノ酸配列を有するVH CDRをさらに含む。より好ましい実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2を免疫特異的に結合し、ヒトフレームワーク領域内に、EA2、EA3、EA4、またはEA5のVL CDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する3個のVL CDRと、EA2、EA3、EA4、またはEA5のVH CDRのうちのいずれかのアミノ酸配列を有する3個のVH CDRと

10

20

30

40

50

を含む。さらに好ましい実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2を免疫特異的に結合し、配列番号2、3、または4からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するVL CDRを含み、配列番号6、7、または8からなる群から選択されたアミノ酸配列を有するVH CDRをさらに含む。

【0103】

多くの場合、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体の対応する残基と置換して抗原結合を改変、好ましくは改善することになる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野でよく知られている方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相関関係のモデリングならびに特定部位における異常フレームワーク残基を同定するための配列比較を行うことによって確認する。(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5585089号;およびRiechmannら、1988、Nature 332:323を参照のこと。)

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合可能で、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む抗体またはその変異体またはその断片である。ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべてのCDR領域が非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のものに対応し、すべてまたは実質的にすべてのフレームワーク領域がヒト免疫グロブリン・コンセンサス配列のものである、実質的にすべての少なくとも1種、通常2種の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、通常ヒト免疫グロブリンのものを含むことが好ましい。通常、抗体は、軽鎖ならびに少なくとも重鎖の可変ドメインの両方を含むはずである。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域も含むことができる。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリン、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄を含む任意のアイソタイプから選択することができる。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞障害活性を示すことが望ましい補体結合定常ドメインであり、クラスが通常IgG₁である。こうした細胞障害活性が望ましくない場合、定常ドメインはIgG₂クラスであり得る。ヒト化抗体は、2種以上のクラスまたはアイソタイプの配列を含むことができ、特定の定常ドメインを選択して所望のエフェクター機能を最適化することは、当技術分野の通常の技術の範囲内である。ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は、その部位におけるCDRまたはフレームワーク残基がコンセンサスまたは移入抗体に対応しないように、親配列と正確に対応していません。よく、例えば、ドナーCDRまたはコンセンサス・フレームワークは、少なくとも一残基の置換、挿入または欠失によって変異誘発してよい。しかし、こうした変異は、広範囲にはならない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、より頻繁には90%、最も好ましくは95%より多くが親フレームワーク領域(FR)およびCDR配列のものに対応することになる。ヒト化抗体は、それだけには限らないが、CDR移植(欧州特許EP 239400;国際公開WO 91/09967;および米国特許第5225539号、第5530101号、および第5585089号)、張り合わせまたは再表面化(欧州特許EP 592106およびEP 519596;Padlan、1991、Molecular Immunology 28(4/5):489~498;Studnickaら、1994、Protein Engineering 7(6):805~814;およびRoguskaら、1994、PNAS 91:969~973)、鎖シャフリング(米国特許第5565332号)を含む、当技術分野で周知の様々な技術ならびに例えば、米国特許第6407213号、第5766886号、第5585089号、国際公開WO 9317105、Tanら、2002、J. Immunol. 169:1119~25、Caldasら、2000、Protein Eng. 13:353~60、Moreaら、2000、Methods 20:267~79、Bacaら、1997、J. Biol. Chem. 272:10678~84、Roguskaら、1996、Protein Eng. 9:895~904、Coutoら、1995、Cancer Res. 55(23 Supp):5973~5977、Coutoら、1995、Cancer Res. 55:1717~22、Sandhu、1994、Gene 150:409~10、Pedersenら、1994、J. Mol. Biol. 235:959~73、Jonesら、1986、Nature 321:522~525、Riechmannら、1988、Nature 332:323、およびPresta、1992、Curr. Op. Struct. Biol. 2:593~596に開示されている技術を用いて生成することができる。多くの場合、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体の対応する残基と置換して、抗原結合を改変、好ましくは改善することになる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野でよく知られている方法、例えば、抗原結合に重要

10

20

30

40

50

なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相関関係のモデリングならびに特定部位における異常フレームワーク残基を同定するための配列比較を行うことによって確認する。(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Queenら、米国特許第5585089号;およびRiechmannら、1988、Nature 332:323を参照のこと。)

さらに、本発明の抗体を利用して、当業者によく知られている技術を用いて抗イディオタイプ抗体を生成することができる。(例えば、Greenspan & Bona、1989、FASEB J. 7:437~444;およびNissinoff、1991、J. Immunol. 147:2429~2438を参照のこと)。本発明は、本発明の抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの使用を用いる方法を提供する。

【0104】

5.1.3 抗体をコードするポリヌクレオチド

本発明の方法は、高ストリンジェントな、中または低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、例えば、上掲書で定義したように、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドも含む。

【0105】

このポリヌクレオチドは、当技術分野で周知の任意の方法によって、得ることができ、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を同定することができる。抗体のアミノ酸配列は周知であるので、当技術分野でよく知られている方法を用いてこれらの抗体をコードするヌクレオチド配列を同定することができ、すなわち、特定のアミノ酸をコードすることが知られているヌクレオチド・コドン、本発明の抗体またはその断片をコードする核酸を生成するような方法で構築されている。抗体をコードするこのようなポリヌクレオチドは、化学合成したオリゴヌクレオチドから構築されてもよく(例えば、Kutmeierら、1994、Bio Techniques 17:242に記載のように)、簡単に言えば、それは、抗体をコードする配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、アニーリングおよびそれらのオリゴヌクレオチドの連結、次いで連結したオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を伴う。

【0106】

あるいは、適切な供給源に由来する核酸から、抗体をコードするポリヌクレオチドを生成してもよい。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手できなくとも、抗体分子の配列がわかっている場合(たとえば、図16を参照のこと)、その免疫グロブリンをコードする核酸を化学的に合成してもよく、あるいは、適切な供給源(たとえば、本発明の抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞、たとえばATCCにPTA-4380として寄託されているクローンなど、抗体を発現する任意の組織または細胞から単離した核酸、好ましくはポリA+RNAから作製した抗体cDNAライブラリーまたはcDNAライブラリー)から、配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズすることのできる合成プライマーを使用するPCR増幅法によって、または、たとえば抗体をコードするcDNAライブラリー由来のcDNAクローンを同定するのに特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを使用するクローニングによって得てもよい。PCRによって生成した増幅核酸配列は、次いで、当技術分野でよく知られている任意の方法を使用して、複製可能なクローニング・ベクターにクローン化することができる。

【0107】

抗体のヌクレオチド配列を決定した後、抗体のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列の遺伝子操作のための当技術分野でよく知られている方法、例えば、組換えDNA技術、部位特異的変異誘発、PCRなど(例えば、両方ともその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら、1990、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NYおよびAusubelら、編、1998、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NYに記載の技術)を用いて遺伝子操作して、例えばアミノ酸置換、欠失、および/または挿入をもたらすために、異なるアミノ酸配列を有する抗体を生成することができる。

【0108】

特定の実施形態では、通常の組換えDNA技術を用いて1種または複数のCDRをフレームワ

10

20

30

40

50

ーク領域内に挿入する。フレームワーク領域は、天然のまたはコンセンサス・フレームワーク領域、好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る(例えば、ヒトフレームワーク領域の記載についてはChothiaら、1998、J. Mol. Biol. 278:457~479を参照のこと)。フレームワーク領域とCDRの組合せによって生成したポリヌクレオチドがEphA2と特異的に結合する抗体をコードすることが好ましい。上掲書で論じられているように、1種または複数のアミノ酸置換がフレームワーク領域内で生じ得ることが好ましく、アミノ酸置換が抗体のその抗原への結合を改善させることが好ましい。さらに、こうした方法は、鎖内ジスルフィド結合に関与している1種または複数の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失をもたらすのに使用して、1種または複数の鎖内ジスルフィド結合を欠く抗体分子を生成することができる。ポリヌクレオチドへの他の改変は、本発明に含まれ、当技術分野の技術の範囲内である。

10

【0109】

5.1.4 抗体の組換え発現

本発明の抗体、その誘導體、類似体または断片(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖またはその一部分または本発明の単鎖抗体)の組換え発現には、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が必要である。本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはその部分(好ましくは、ただし必ずではないが、重鎖または軽鎖可変ドメインを含む)をコードするポリヌクレオチドを得た後、当技術分野でよく知られている技術を用いて組換えDNA技術によって抗体分子を生成するためのベクターを生成することができる。したがって、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含むポリヌクレオチドを発現することによってタンパク質を調製する方法を本明細書に記載する。当業者によく知られている方法は、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築するのに使用することができる。これらの方法には、例えば *in vitro* 組換えDNA技術、合成技術、および *in vivo* 遺伝子組換えがある。したがって、本発明は、プロモーターに作動可能に結合した本発明の抗体分子、抗体の重鎖または軽鎖、抗体またはその一部分の重鎖または軽鎖可変ドメイン、重鎖または軽鎖CDRをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。こうしたベクターには、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列があり(例えば、国際公開WO 86/05807およびWO 89/01036;ならびに米国特許第5122464号を参照のこと)、全重鎖、全軽鎖、または全重鎖と軽鎖の両方を発現させるために、抗体の可変ドメインをこのようなベクター中に挿入することができる。

20

30

【0110】

発現ベクターを従来の技術によって宿主細胞に移入し、次いで本発明の抗体を生成する従来の技術によってトランスフェクトした細胞を培養する。したがって、本発明は、異種プロモーターに作動可能に結合した本発明の抗体もしくはその断片、またはその重鎖もしくは軽鎖、またはその部分、または本発明の単鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。二本鎖抗体を発現させるのに好ましい実施形態では、以下に詳述するように、重鎖と軽鎖の両方をコードするベクターは、全免疫グロブリン分子を発現するために宿主細胞中で同時発現させることができる。

【0111】

様々な宿主-発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させることができる(たとえば、米国特許第5,807,715号を参照のこと)。その宿主-発現系とは、それによって目的のコード配列を生成し、続いて精製することのできるベヒクルを表すが、適切なヌクレオチド・コード配列で形質転換またはトランスフェクトしたとき、本発明の抗体分子を *in situ* で発現し得る細胞も表す。これらには、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌(たとえば、大腸菌および枯草菌(*B. subtilis*))や、抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母(たとえば、サッカロミセスおよびピチア(*Saccharomyces, Pichia*))などの微生物;抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(たとえば、パキキュロウイルス)を感染させた昆虫細胞系;組換えウイルス発現ベクター(たとえば、カリフ

40

50

ラワー・モザイクウイルス、CaMV;タバコ・モザイクウイルス、TMV)を感染させ、または抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(たとえば、Tiプラスミド)で形質転換した植物細胞系;あるいは哺乳動物細胞ゲノム由来のプロモーター(たとえば、メタロチオネイン・プロモーター)または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(たとえば、アデノウイルス後期プロモーター;牛痘ウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築体を収容する哺乳動物細胞系(たとえば、COS、CHO、BHK、293、NSO、および3T3細胞)が含まれるが、これらに限定はされない。特に完全な組換え抗体分子の発現では、大腸菌(*Escherichia coli*)などの細菌細胞、より好ましくは真核細胞を使用して、組換え抗体分子を発現させることが好ましい。たとえば、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞は、ヒト・サイトメガロウイルス由来の主要中間初期遺伝子プロモーター・エレメントなどのベクターと共に、抗体の有効な発現系である(Foecking et al., 1986, Gene 45:101;およびCockett et al., 1990, BioTechnology 8:2)。特定の実施形態では、免疫特異的に結合し作用する抗体または

その断片をコードするヌクレオチド配列の発現を、構成プロモーター、誘導プロモーター、または組織特異的プロモーターによって調節する。

【0112】

細菌系では、いくつかの発現ベクターは、発現される抗体分子を対象とした使用に依りて有利に選択することができる。例えば、抗体分子の医薬組成物を生成するために多量のこのようなタンパク質を生成すべき場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を誘導するベクターが望ましいはずである。こうしたベクターには、それだけには限らないが、融合タンパク質が生成されるように抗体コード配列がlac Zコード領域とフレームを合わせてベクター中に個々に連結され得る大腸菌発現ベクター-pUR278(Ruthe rら、1983、EMBO 12:1791);pINベクター(Inouye & Inouye、1985、Nucleic Acids Res. 13:3101~3109;Van Heeke & Schuster、1989、J. Biol. Chem. 24:5503~5509);などがある。pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来タンパク質を発現することもできる。一般に、こうした融合タンパク質は可溶性であり、マトリックス・グルタチオン-アガロース・ビーズへの吸着および結合と、それに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって溶解した細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローン化した標的遺伝子生成物がGST部分から放出されるように、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0113】

昆虫系では、外来遺伝子を発現するためのベクターとしてオウトグラフィア・カリフォルニカ核多角体病ウイルス(AcNPV)を使用する。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda*細胞中で増殖する。抗体コード配列は、ウイルスの非必須領域(例えば多角体遺伝子)に個々にクローン化し、AcNPVプロモーター(例えば多角体プロモーター)の制御下に置くことができる。

【0114】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルス系発現系を利用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、所定の抗体コード配列をアデノウイルス転写/翻訳調節複合体、例えば、後期プロモーターおよびトリパタイトリーダー配列と連結することができる。次いで、このキメラ遺伝子を、in vitroまたはin vivo組換えによってアデノウイルス・ゲノムに挿入することができる。ウイルス・ゲノムの非必須領域(例えば、領域E1またはE3)への挿入によって、感染宿主中で生存および抗体分子を発現可能な組換えウイルスが得られるはずである(例えば、Logan & Shenk、1984、PNAS 81:355~359を参照のこと)。挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳には特定の開始シグナルも必要であるかもしれない。これらのシグナルには、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、全挿入断片を確実に翻訳するために、開始コドンは所望のコード配列の読み枠と一緒にフェーズになければならない。これらの外来性翻訳調節シグナルおよび開始コドンの起源は様々であってよく、天然でも合成でもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーターなどを含めることによって高めることができる

10

20

30

40

50

(例えば、Bittnerら、1987、Methods in Enzymol. 153:516~544を参照のこと)。

【0115】

さらに、挿入配列の発現を調節し、あるいは望ましい特定の方法で遺伝子産物を改変および切断する宿主細胞株を選択することができる。タンパク質生成物のこうした改変(例えば、グリコシル化)およびプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に関して重要であるかもしれない。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセッシングならびにタンパク質および遺伝子産物の改変のための特徴ならびに特異的なメカニズムを有する。適切な細胞系または宿主系を選択して、発現した外来タンパク質の正確な改変およびプロセッシングを保証する。このために、転写一次産物の正しいプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞機構をもつ真核宿主細胞を使用することができる。こうした哺乳動物宿主細胞には、それだけには限らないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、NS1およびT47D、NS0(任意の免疫グロブリン鎖を内因的に生成しないマウス骨髄腫細胞系)、CRL7030およびHsS78Bst細胞がある。

10

【0116】

組換えタンパク質の長期高収率産生には、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞系を操作することができる。ウイルス起源の複製を含む発現ベクターを用いるよりも、宿主細胞は、適切な発現調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)、および選択マーカーによって制御したDNAを用いて形質転換することができる。外来DNAの導入に続いて、操作した細胞を富化培地中で1~2日間増殖させ、次いで選択培地に切り換えることができる。組換えプラスミドの選択マーカーは、選択への耐性を与え、細胞のそれらの染色体中へのプラスミドの安定した組み込み、ならびに細胞系にクローン化および増殖できる細胞株を形成するための生長を可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞系を操作するのに使用すると有利であり得る。こうした操作した細胞系は、抗体分子と直接または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評価に特に有用であり得る。

20

【0117】

それだけには限らないが、単純疱疹ウイルス・チミジン・キナーゼ(Wiglerら、1977、Cell 11:223)、グルタミン合成酵素、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybaska & Szybalski, 1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)を含むいくつかの選択系を使用でき、アデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、1980、Cell 22:8-17)遺伝子をそれぞれtk-、gs-、hgprt-またはaprt-細胞に使用することができる。さらに、代謝拮抗剤耐性を、以下の遺伝子:メトトレキセートへの耐性を与えるdhfr(Wiglerら、1980、PNAS 77:357;O'Hareら、1981、PNAS 78:1527);マイコフェノール酸への耐性を与えるgpt(Mulligan & Berg, 1981、PNAS 78:2072);アミノグリコシドG-418への耐性を与えるneo(WuおよびWu, 1991、Biotherapy 3:87;Tolstoshev, 1993、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573;Mulligan, 1993、Science 260:926;ならびにMorganおよびAnderson, 1993、Ann. Rev. Biochem. 62:191;May, 1993、TIB TECH 11:155~);およびハイグロマイシンへの耐性を与えるhygro(Santerreら、1984、Gene 30:147)の選択のベースとして使用することができる。組換えDNA技術の当技術分野で一般に周知の方法は、所望の組換えクローンを選択するのに通常適用でき、こうした方法は、例えば、それらの全体が本明細書に参照により組み込まれる、Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY(1993);Kriegler、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY(1990);ならびに第12および13章、Dracopolisら、(編)、Current Protocols in Human Genetics、John Wiley & Sons、NY(1994);Colberre-Garapinら、1981、J. Mol. Biol. 150:1に記載されている。

30

40

【0118】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大させることができる(概説については、BebbingtonおよびHentschel、The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning、第3巻(Academic Press、New York、1987)を参照のこと)。抗体を発現するベクター系のマーカーが増

50

幅可能な場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害物質のレベルの増大により、マーカー遺伝子のコピー数が増大することになる。増幅領域は抗体遺伝子と関連しているため、抗体の産生も増大することになる(Crouseら、1983、Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0119】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、重鎖由来ポリペプチドをコードする第1のベクターおよび軽鎖由来ポリペプチドをコードする第2のベクターで同時トランスフェクトすることができる。この2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同等発現を可能にする同一の選択マーカーを含んでいてよい。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、発現できる単一ベクターを使用してもよい。こうした状況では、軽鎖を重鎖の手前に置いて毒性のない重鎖過剰を防止すべきである(Proudfoot、1986、Nature 322:52;およびKohler、1980、PNAS 77:2197)。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含むことができる。

10

【0120】

本発明の抗体分子を組換え発現によって生成した後、免疫グロブリン分子の精製に関する当技術分野で周知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインA後の特異的抗原に対する親和性によるもの、およびサイジング・カラム・クロマトグラフィー)、遠心分離、溶解性の差、またはタンパク質の精製に関する任意の他の標準的な技法によって精製することができる。さらに、本発明の抗体またはその断片は、本明細書に記載されているまたはその他の方法で当技術分野で周知の異種ポリペプチド配列と融合して精製を容易にすることができる。

20

【0121】

5.2 予防/治療方法

本発明は、1つまたは複数のEphA2アゴニスト抗体および/または露出したEphA2エピトープ抗体、好ましくは1つまたは複数のモノクローナル(または単一抗体種である他供給源からの抗体)EphA2アゴニスト抗体および/または露出したEphA2エピトープ抗体の投与を含む、被験者における、EphA2過剰発現に伴う疾患、好ましくは癌の治療、予防または管理の方法を包含する。ある具体的な実施形態では、治療、予防または管理される疾患は悪性癌である。別の具体的な実施形態では、治療、予防または管理する疾患は、EphA2を過剰発現する細胞に伴う前癌状態である。より具体的な実施形態では、この前癌状態は高悪性度前立腺上皮内新生(PIN)、乳腺線維腺腫、線維嚢胞症または複合母斑である。

30

【0122】

ある実施形態では、本発明の抗体を、癌の治療、予防または管理に有益な他の治療薬と組み合わせて投与してもよい。ある実施形態では、本発明の1つまたは複数のEphA2抗体を、癌の治療、予防または管理に有益な1つまたは複数の他の治療薬と同時に、好ましくはヒトである哺乳類に投与する。「同時に」という用語は、予防薬または治療薬を正確に同時刻に投与することに限らず、むしろ本発明のEphA2抗体および他の薬を、それ以外の方法で投与するより本発明の抗体が他の薬と共に作用してよりよい結果をもたらすような順序と時間間隔で、対象に投与することを意味する。例えば、各予防薬または治療薬は、同時にでも、あるいは異なった時間にどんな順序で順番に投与するのでもよい。しかし、同時に投与しない場合は、期待する治療または予防効果をもたらすだけ時間的に十分接近して投与しなければならない。各治療薬は適切ないかなる形式で適切ないかなる経路で別々に投与してもよい。別の実施形態では、本発明のEphA2抗体を手術前、手術中または手術後に投与する。手術が局在する腫瘍を完全に除去するか大型腫瘍を縮小することが好ましい。手術を予防措置または痛みを軽減するために行ってもよい。

40

【0123】

好ましい実施形態では、本発明の1つまたは複数のEphA2抗体は、EA2、EA3、EA4またはEA5からなる。より好ましい実施形態では、抗体はヒト化されたEA2、EA3、EA4またはEA5からなる。別の実施形態では、例えば1つまたは複数のアミノ酸置換を特に可変領域に伴うなどして、EA2、EA3、EA4またはEA5と比較してより高い活性や結合能力などを備えたEA2、EA3、EA4またはEA5変異体を提供する。

50

【 0 1 2 4 】

種々の実施形態において、予防薬または治療薬を、1時間以内間隔、約1時間間隔、約1時間から約2時間間隔、約2時間から約3時間間隔、約3時間から約4時間間隔、約4時間から約5時間間隔、約5時間から約6時間間隔、約6時間から約7時間間隔、約7時間から約8時間間隔、約8時間から約9時間間隔、約9時間から約10時間間隔、約10時間から約11時間間隔、約11時間から約12時間間隔、24時間以下の間隔または48時間以下の間隔で投与する。好ましい実施形態では、複数の構成成分を患者の同じ来診時に投与する。

【 0 1 2 5 】

本明細書でもたらされる投与の投与量および頻度は、治療有効および予防有効という用語に含まれる。投与量および頻度は、投与した特定の治療または予防薬、癌の重症度およびタイプ、投与の経路、ならびに年齢、体重、応答、および患者の過去の病歴に応じた各患者に特異的な要因によって、通常さらに異なることになる。適当なレジメンは、こうした要因を考慮し、例えば、文献に報告され、またPhysician's Desk Reference(第56版、2002)で推奨された投与量に従うことによって、当業者によって選択され得る。

【 0 1 2 6 】

5.2.1 患者集団

本発明は、治療上または予防上有効量の本発明の1つまたは複数のEphA2抗体を被験者に投与することにより、癌を治療、予防または管理する方法を提供する。別の実施形態では、本発明の抗体を、1つまたは複数の他の治療薬と併用して投与してもよい。被験者は好ましくは哺乳類であり、例えば非霊長類(ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および霊長類(カニクイザルなどのサルおよびヒト)である。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【 0 1 2 7 】

本発明に包含される方法により治療される癌の具体例は、EphA2を過剰発現する癌を含むが、それだけに限定はされない。別の実施形態では、癌は上皮起源である。このような癌の実施例は、肺、大腸、前立腺、乳房、および皮膚の癌である。他の癌は実施例により例示され、次の5.2.1.1節により限定されない。特定の実施形態では、原発腫瘍からの転移の治療および/または予防に本発明の方法を使用してもよい。

【 0 1 2 8 】

本発明の方法および組成物は、癌を患っている被験者/患者、または、例えば特定型の癌の遺伝的素因を有するか、発癌物質にさらされたことがあるか、特定の癌の寛解期にあるかなど、癌を患うと予想される被験者/患者への本発明の1つまたは複数のEphA2抗体の投与を含む。ここで「癌」とは原発腫瘍または転移性腫瘍を指す。このような患者は過去に癌で治療されたことがあってもなくてもよい。本発明の方法および組成物を、癌の第1治療としても、または第2治療として用いてもよい。本発明は他の癌治療を受けている患者の治療も含み、これらの他の癌治療の副作用や不耐性が現れない限り本発明の方法と組成物を使用してもよい。本発明は、難治性患者の症状を治療または改善するため、本発明の1つまたは複数のEphA2抗体を投与する方法も包含する。ある実施形態で癌が治療に対し難治性であるとは、少なくとも癌細胞のかなりの部分が殺されない、または癌細胞の細胞分裂が停止させられない、ということの意味する。癌細胞が難治性かどうかは、このような場合に当技術分野で受け入れられている「難治性又は不応性(refractory)」の意味を使用し、in vivoまたはin vitroのどちらにおいても癌細胞処置の有効性をアッセイする当技術分野で知られているどの方法を用いて判定してもよい。種々の実施形態では、癌細胞の数が減少せずまたは増加した場合、癌は難治性である。本発明は、癌を患う素因のある患者における癌の発症または再発を防ぐために、1つまたは複数のEphA2アゴニスト抗体を投与する方法も包含する。モノクローナル抗体はEA2、EA3、EA4またはEA5が好ましい。

【 0 1 2 9 】

特定の実施形態では、本発明のEphA2抗体またはEphA2の発現を減少させる他の治療薬を、ホルモン薬、放射線および化学療法薬に対する癌細胞の抵抗性すなわち減少した感受性を逆転させるために投与し、それにより癌細胞に対する1つまたは複数のこれらの薬物の

10

20

30

40

50

感受性を再び高める。その後これらの薬物を、転移を予防するためなど、癌を治療または管理するために投与してもよい(または投与し続けてもよい)。

【0130】

別の実施形態では、本発明の1つまたは複数のEphA2抗体を他の任意の治療法と組み合わせて投与し患者の癌を治療する方法、または他の治療法では難治性であると立証され、その治療法をもはや受けていない患者への投与により患者の癌を治療する方法を、本発明は提供する。EphA2抗体はEA2、EA3、EA4またはEA5が好ましい。ある実施形態では、本発明の方法で治療される患者は、すでに化学療法、放射線療法、ホルモン療法または生物学的または免疫療法により治療されている。これらの患者の中には、難治性の患者および既存の癌療法を用いた治療にもかかわらず癌を患う患者がいる。他の実施形態では、患者は治療されてお

10

【0131】

好ましい実施形態では、既存の治療は化学療法である。特定の実施形態では、既存の治療には、それだけには限らないが、メトトレキサート、タキソール、メルカプトプリン、チオグアニン、ヒドロキシ尿素、シタラビン、シクロホスファミド、イホスファミド、ニトロソ尿素、シスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン、ダカルバジン、プロカルビジン、エトポシド、カンパテシン (campathecin)、プレオマイシン、ドキシソルピシン、イダルビシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、プリカマイシン、ミトキサントロン、アスパラギナーゼ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ピノレルピン、パクリタキセル、ドセタキセルなどを含む化学療法の適用がある。これらのうち、患者は放射線療法、ホルモン療法および/または生物学的療法/免疫療法で治療した患者である。また、これらのうち、患者は癌の治療のために手術を受けたものである。

20

【0132】

あるいは、本発明は、放射線療法を受けているまたは受けた患者を治療する方法も含む。これらのうち、化学療法、ホルモン療法および/または生物学的療法/免疫療法で治療しているまたは既に治療した患者である。また、これらのうち、患者は癌の治療のために手術を受けたものである。

【0133】

他の実施形態では、本発明は、ホルモン療法および/または生物学的療法/免疫療法を受けているまたは受けた患者を治療する方法を含む。これらのうち、化学療法および/または放射線療法で治療しているまたは治療した患者である。また、これらのうち、患者は癌の治療のために手術を受けたものである。

30

【0134】

さらに、本発明はまた、その療法の毒性が強すぎるということが証明されたまたは証明できる、すなわち、治療している被験者に許容できないまたは耐えられない副作用をもたらす場合、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および/または生物学的療法/免疫療法に代わる方法として癌の治療方法を提供する。本発明の方法で治療している被験者は、場合によっては、どの治療が許容できないまたは耐えられないか判明したことに応じて手術、化学療法、放射線療法、ホルモン療法または生物学的療法など他の癌治療で治療することができる。

40

【0135】

他の実施形態では、本発明は、癌の治療のための任意の他の癌療法をもたない、こうした治療に不応性であることが証明された被験者に、1種または複数の本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体の投与をもたらす。特定の実施形態では、他の癌療法に不応性の患者には、癌療法の不在下で1種または複数のアゴニスト・モノクローナル抗体を投与する。

【0136】

他の実施形態では、EphA2を過剰発現する細胞に関連する前癌性症状にかかっている患者には、本発明の抗体を投与して、障害を治療し、それが悪性癌に進行する可能性を減ら

50

すことができる。特定の実施形態では、前癌性症状は、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維嚢胞症、または化合物母斑である。

【 0 1 3 7 】

5.2.1.1 癌

本発明の方法および組成物により治療または予防することができる癌および関連する疾患は、上皮細胞起源の癌を含むが、それだけに限定されない。このような癌の例としては以下のものが挙げられる:これらだけに限定するものではないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病などの急性骨髄性白血病、ならびに骨髄異形成症候群などの白血病;これらだけに限定するものではないが、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ性白血病、毛様細胞白血病などの慢性白血病;真性赤血球増加症;これらだけに限定するものではないが、ホジキン病、非ホジキン病などのリンパ腫;これらだけに限定するものではないが、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌型骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞白血病、孤立性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫などの多発性骨髄腫;ヴァルデンスト্রেームマクログロブリン血症;意味未確定モノクローナル高ガンマグロブリン血症;良性モノクローナル高ガンマグロブリン血症;H鎖病;これらだけに限定するものではないが、骨肉腫(bone sarcoma、osteosarcoma)、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫瘍、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜性骨肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫(angiosarcoma、hemangiosarcoma)、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫などの骨および結合組織肉腫;これらだけに限定するものではないが、神経膠腫、星状膠細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠腫、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体腫、松果体芽腫、原発性脳リンパ腫などの脳腫瘍;これらだけに限定するものではないが、腺癌、小葉(小細胞)癌、腺管内癌、乳腺髓様癌、乳腺粘液癌、乳腺管状癌、乳頭癌、パジェット病および炎症性乳癌などの乳癌;これらだけに限定するものではないが、クロム親和性細胞腫および副腎皮質癌などの副腎癌;これらだけに限定するものではないが、乳頭状または濾胞性甲状腺癌、髄様甲状腺癌および未分化型甲状腺癌などの甲状腺癌;これらだけに限定するものではないが、睪島細胞腺腫、ガストリン産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、ピローマ、ソマトスタチン産生腫瘍およびカルチノイドまたは睪島細胞腫などの睪癌;これらだけに限定するものではないが、クッシング病、プロラクチン産生腫瘍、末端肥大症および尿崩症などの下垂体癌;これらだけに限定するものではないが、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫などの眼球黒色腫および網膜芽細胞腫などの眼癌;扁平上皮癌、腺癌および黒色腫などの腔癌;扁平上皮癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫およびパジェット病などの外陰癌;これらだけに限定するものではないが、扁平上皮癌および腺癌などの子宮頸癌;これらだけに限定するものではないが、子宮内膜癌および子宮肉腫などの子宮癌;これらだけに限定するものではないが、卵巣上皮癌、境界性腫瘍、胚細胞腫瘍および間質腫瘍などの卵巣癌;これらだけに限定するものではないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、疣贅癌および燕麦細胞(小細胞)癌などの食道癌;これらだけに限定するものではないが、腺癌、腫瘤形成型(ポリープ状)、潰瘍形成型、表在拡大型、びまん性拡大型、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、癌肉腫などの胃癌;大腸癌;直腸癌;これらだけに限定するものではないが、肝細胞癌および肝芽腫などの肝臓癌;腺癌のなどの胆嚢癌;これらだけに限定するものではないが、乳頭状、結節型およびびまん性などの胆管癌;非小細胞肺癌、扁平上皮癌(類表皮癌)、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌などの肺癌;これらだけに限定するものではないが、胚腫瘍、精上皮腫、未分化型、古典的(典型的)、精母細胞性、非精上皮腫、胎児性癌、奇形腫癌、絨毛癌(卵黄嚢腫瘍)などの精巣癌;これらだけに限定するものではないが、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫などの前立腺癌;陰茎癌;これらだけに限定するものではないが、扁平上皮癌などの口腔癌;基底癌;これらだけに限定するものではないが、腺癌、粘表皮癌および腺様嚢胞癌などの唾液腺癌;これらだけに限定するものではないが、扁平上皮癌および疣贅癌などの咽頭癌;これらだけに限定するものではないが、基底細胞癌、扁平上皮癌および黒色腫、表在拡大型黒色腫、結節型黒色腫、黒子悪性黒色腫、末端黒子型黒色腫

10

20

30

40

50

などの皮膚癌;これらだけに限定するものではないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌(腎盤および/または尿管)などの腎癌;ウィルムス腫瘍;これらだけに限定するものではないが、移行上皮癌、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫などの膀胱癌。また、混合肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原性癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌も癌に含まれる。(この疾患の総説は、Fishmanら、1985、Medicine、第2版、J.B.Lippincott社、PhiladelphiaおよびMurphyら、1997、Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery、Viking Penguin社、Penguin Books U.S.A.社、United States of Americaを参照のこと)。

【0138】

したがって、本発明の方法および組成物はさらに、膀胱、乳房、大腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、胃、頸部、甲状腺および皮膚のものを含む癌;扁平上皮癌を含む;白血病、急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫を含むリンパ様系統の造血腫瘍;急性および慢性骨髄性白血病ならびに前骨髄性血病を含む骨髄様系統の造血腫瘍;線維肉腫および横紋筋肉腫を含む間葉起源の腫瘍;黒色腫、精上皮腫、テトラコカルシノーマ(tetratocarcinoma)、神経芽細胞腫および神経膠腫を含む他の腫瘍;星状細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、および神経鞘腫を含む中枢および末梢神経系の腫瘍;線維肉腫、横紋筋肉腫、および骨肉腫を含む間葉起源の腫瘍;ならびに黒色腫、色素性乾皮症、角化棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞状癌および奇形癌を含む他の腫瘍を含む(がそれだけには限定されない)様々な癌または他の異常増殖性疾患の治療または予防に有用である。アポトーシスの異常によって引き起こされた癌も本発明の方法および組成物によって治療されることも意図している。こうした癌には、それだけには限らないが、濾胞状リンパ腫、p53変異をもつ癌、乳房、前立腺および卵巣のホルモン依存腫瘍、ならびに家族性腺腫性ポリポージスなどの前癌性病変、ならびに骨髄異形成症候群があり得る。特定の実施形態では、悪性または異常増殖性変化(化生および異形成など)、あるいは過剰増殖性障害は、皮膚、肺、大腸、乳房、前立腺、膀胱、腎臓、膵臓、卵巣、または子宮で治療または予防する。他の特定の実施形態では、肉腫、黒色腫、または白血病を治療または予防する。

【0139】

いくつかの実施形態では、癌は悪性であり、EphA2を過剰発現する。他の実施形態では、治療すべき障害は、EphA2を過剰発現する細胞に関連する前癌性症状である。特定の実施形態では、前癌性症状は、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維嚢胞症、または化合物母斑である。

【0140】

好ましい実施形態では、本発明の方法および組成物は、乳房、大腸、卵巣、肺、および前立腺癌および黒色腫の治療および/または予防に使用し、限定するものではなく、例として下記に示す。

【0141】

5.2.1.2. 乳癌の治療

特定の実施形態では、乳癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、ドキソルピシン、エピルピシン、ドキソルピシンとシクロホスファミドの合剤(AC)、シクロホスファミド、ドキソルピシンおよび5-フルオロウラシルの合剤(CAF)、シクロホスファミド、エピルピシンと5-フルオロウラシルの合剤(CEF)、ハーセプチン、タモキシフェン、タモキシフェンと細胞毒化学療法との組合せ、タキサン(ドセタキセルおよびパクリタキセルなど)を含む有効量の乳癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。他の実施形態では、本発明の抗体は、ノード(node)陽性の局在性乳癌のアジュバント治療のためにタキサンと標準的なドキソルピシンおよびシクロホスファミドと一緒に投与することができる。

【0142】

ある具体的な実施形態では、前癌性の線維腺腫または線維嚢胞症の患者に、疾患を治療し、疾患が悪性乳癌に進行する可能性を減少させるために、本発明の1つのEphA2抗体を投与する。

【0143】

5.2.1.3. 大腸癌の治療

特定の実施形態では、大腸癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、5-FUとロイコポリンの合剤、5-FUとレバミゾールの合剤、イリノテカン(CPT-11)またはイリノテカン、5-FUおよびロイコポリンの合剤(IFL)を含む有効量の¹⁰大腸癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。

【0144】

5.2.1.4. 前立腺癌の治療

特定の実施形態では、前立腺癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、外部ビーム放射線療法、放射性同位元素(すなわち、¹²⁵I、パラジウム、イリジウム)の組織内移植、ロイプロイドまたは他のLHRHアゴニスト、非ステロイド性抗アンドロゲン(フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド)、ステロイド性抗アンドロゲン(酢酸シプロテロン)、ロイプロイドとフルタミドの合剤、DES、クロロトリアニセン、エチニルエストラジオール、結合型エストロゲンU.S.P.、DESニリン酸などのエストロゲン、ストロンチウム-89などの放射性同位元素、外部ビーム放射線療法とストロンチウム-89の組合せ、²⁰アミノグルテチミド、ヒドロコルチゾン、フルタミド退薬、プロゲステロン、およびケトコナゾールなどのセカンドライン・ホルモン療法、低用量プレドニゾン、またはドセタキセル、パクリタキセル、エストラムスチン/ドセタキセル、エストラムスチン/エトボシド、エストラムスチン/ビンブラスチン、およびエストラムスチン/パクリタキセルを含む症状の自覚的な改善およびPSAレベルの低減をもたらすことが報告されている他の化学療法レジメンを含む有効量の²⁰前立腺癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。

【0145】

特別な実施形態では、前癌性高度前立腺上皮内新生(PIN)にかかっている患者には、本発明のEphA2抗体を投与して、障害を治療し、それが悪性前立腺癌に進行する可能性を減³⁰らす。

【0146】

5.2.1.5. 黒色腫の治療

特定の実施形態では、黒色腫にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、ダカルバジン(DTIC)、カルムスチン(BCNU)およびロムスチン(CCNU)などのニトロソ尿素、ピンカ・アルカロイド、白金化合物、およびタキサンを含む適度の単一薬剤活性をもつ薬剤、ダートマス・レジメン(シスプラチン、BCNU、およびDTIC)、インターフェロン(IFN-A)、ならびにインターロイキン-2(IL-2)を含む有効量の黒色腫治療に有用な⁴⁰1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。特定の実施形態では、有効量の1種または複数の本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体を、メルファラン(L-PAM)を伴い、腫瘍壊死因子(TNF-)を伴うまたは伴わない局所高温四肢灌流(ILP)と併せて多発性脳転移、骨転移、および脊髄圧迫にかかっている患者に投与して、症状軽減および放射線療法による腫瘍の若干の収縮を果たすことができる。

【0147】

特定の実施形態では、前癌性化合物母斑にかかっている患者には、本発明のEphA2抗体を投与して、障害を治療し、それが悪性黒色腫に進行する可能性を減らす。

【0148】

5.2.1.6. 卵巣癌の治療

特定の実施形態では、卵巣癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明の⁵⁰

モノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、 P^{32} 療法などの腹膜内放射線療法、全腹部および骨盤放射線療法、シスプラチン、パクリタキセル(タキソール)またはドセタキセル(タキソテール)およびシスプラチンまたはカルボプラチンの合剤、シクロホスファミドとシスプラチンの合剤、シクロホスファミドとカルボプラチンの合剤、5-FUとロイコボリンの合剤、エトポシド、リポソーマル・ドキシソルピシン、ゲムシタピンまたはトポテカンを含む有効量の卵巣癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。白金不応性疾患にかかっている患者のために有効量の1種または複数の本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体をタキソール投与と併せて投与することも意図している。含まれているのは、白金不応性の疾患にかかっている患者におけるイホスファミド、シスプラチン系併用レジメンの失敗後のサルベージ化学療法としてのヘキサメチルメラミン(HIMM)、ならびに腫瘍上の細胞質エストロゲン受容体が検出可能レベルである患者におけるタモキシフェンの投与を含む、不応性卵巣癌にかかっている患者の治療である。

10

【0149】

5.2.1.7. 肺癌の治療

特定の実施形態では、小細胞肺癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、胸部放射線療法、シスプラチン、ビンクリスチン、ドキシソルピシン、およびエトポシド単独または組合せ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ビンクリスチン/エトポシド、およびシスプラチンの合剤(CAV/EP)、気管支内レーザー療法による局所緩和、気管支内ステント、および/または近接照射療法を含む有効量の肺癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。

20

【0150】

他の特定の実施形態では、非小肺細胞癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を、それだけには限らないが、対症放射線療法、シスプラチン、ビンブラスチンおよびマイトマイシンの合剤、シスプラチンとピノレルピンの合剤、パクリタキセル、ドセタキセルまたはゲムシタピン、カルボプラチンとパクリタキセルの合剤、気管支内病変の組織内放射線療法または定位放射線外科手術を含む有効量の肺癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与する。

【0151】

5.2.2 他の予防/治療薬

いくつかの実施形態では、1種または複数のモノクローナル抗体の投与による治療を、それだけには限らないが、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および/または生物学的療法/免疫療法と併用する。予防/治療薬には、それだけには限らないが、ペプチド、ポリペプチド、翻訳後修飾タンパク質を含むタンパク質、抗体などを含むタンパク質分子; 小分子(1,000ダルトン未満)、無機または有機化合物; それだけには限らないが、二本鎖または一本鎖DNA、あるいは二本鎖または一本鎖RNA、および三重らせん核酸分子を含む核酸分子が含まれるが、それだけには限らない。予防/治療薬は、周知のすべての生物(それだけには限らないが、動物、植物、微生物、真菌、および原生生物、またはウイルスを含む)、または合成分子ライブラリーに由来するものでもよい。

30

40

【0152】

具体的な一実施形態では、本発明の方法は、本発明の抗体の投与を、それだけには限らないが、ABL、ACK、AFK、AKT(例えばAKT-1、AKT-2、およびAKT-3)、ALK、AMP-PK、ATM、Aurora1、Aurora2、bARK1、bArk2、BLK、BMX、BTK、CAK、CaMKキナーゼ、CDC2、CDK、CK、COT、CTD、DNA-PK、EGF-R、ErbB-1、ErbB-2、ErbB-3、ErbB-4、ERK(例えばERK1、ERK2、ERK3、ERK4、ERK5、ERK6、ERK7)、ERT-PK、FAK、FGR(例えばFGF1R、FGF2R)、FLT(例えばFLT-1、FLT-2、FLT-3、FLT-4)、FRK、FYN、GSK(例えばGSK1、GSK2、GSK3-、GSK3-、GSK4、GSK5)、G-タンパク質結合受容体キナーゼ(GRK)、HCK、HER2、HK11、JAK(例えばJAM、JAK2、JAK3、JAK4)、JNK(例えばJNK1、JNK2、JNK3)、KDR、KIT、IGF-1受容体、IKK-1、IKK-2、INSR(インシュリン受容体)、IRAK1、IRAK2、IRK、ITK、LCK、LOY、LYN、MAPK、MAPKAP

50

K-1、MAPKAPK-2、MEK、MET、MFPK、MHCK、MLCK、MLK3、NEU、NIK、PDGF受容体、PDGF受容体、PHK、PI-3キナーゼ、PKA、PKB、PKC、PKG、PRKI、PYK2、p38キナーゼ、p135tyk2、p34cdc2、p42cdc2、p42mapk、p44mpk、RAF、RET、RIP、RIP-2、RK、RON、RSキナーゼ、SRC、SYK、S6K、TAK1、TEC、TIM、TIE2、TRKA、TXK、TYK2、UL13、VEGFRI、VEGFR2、YES、YRK、ZAP-70、およびこれらのキナーゼのすべてのサブタイプ(例えばHardie and Hanks (1995)The Protein Kinase Facts Book, I and II, Academic Press, San Diego, Califを参照のこと)などのキナーゼの阻害剤である、1種または複数の予防/治療薬の投与と併用することを含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体の投与を、Eph受容体キナーゼ(例えばEphA2、EphA4)の阻害剤である1種または複数の予防/治療薬の投与と併用する。最も好ましい実施形態では、本発明の抗体の投与を、EphA2の阻害剤である1種または複数の予防/治療薬の投与と併用する。

10

【0153】

別の具体的な実施形態では、本発明の方法は、本発明の抗体の投与を、それだけには限らないが、アンギオスタチン(プラスミノゲン断片);抗血管新生アンチトロンピンIII;アンギオザイム(Angiozyme);ABT-627;Bay 12-9566;ベネフィン;ペバシズマブ;BMS-275291;軟骨由来阻害剤(CDI);CAI;CD59補体断片;CEP-7055;Col 3;コンプレタスタチンA-4;エンドスタチン(コラーゲンXVIII断片);フィブロネクチン断片;Gro-;ハロフジノン;ヘパリンナーゼ;ヘパリン六糖類断片;HMV833;ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG);IM-862;インターフェロン / / ;インターフェロンで誘発されるタンパク質(IP-10);インターロイキン12;クリングル5(プラスミノゲン断片);マリマスタット;メタロプロテイナーゼ阻害剤(TIMP);2-メトキシエストラジオール;MMI 270(CGS 27023A);MoAb IMC-1C11;ネオバスタット;NM-3;パンゼム;PI-88;胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤;プラスミノゲン活性化剤阻害剤;血小板因子-4(PF4);プリノマスタット;プロラクチン16kD断片;プロリフェリン(Proliferin)系タンパク質(PRP);PTK 787/ZK 222594;レチノイド;ソリマスタット(Solimastat);スクアラミン;SS 3304;SU 5416;SU 6668;SU 11248;テトラヒドロコルチゾール-S;テトラチオモリブデン酸塩;サリドマイド;トロンボスポンジン-1(TSP-1);TNP-470;形質転換成長因子-(TGF-);バスクロスタチン(Vasculostatin);バソスタチン(Vasostat in)(カルレチクリン断片);ZD6126;ZD6474;ファミシル(famesyl)トランスフェラーゼ阻害剤(FTI);およびピスフォスフォネートなどの血管新生阻害剤である、1種または複数の予防/治療薬の投与と併用することを含む。

20

30

【0154】

別の具体的な実施形態では、本発明の方法は、本発明の抗体の投与を、それだけには限らないが、アシビシン(acivicin)、アクラルピシン、塩酸アコダゾール(acodazole)、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アムボマイシン(ambomycin)、酢酸アメタントロン(ametantrone)、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アンスラマイシン、アスパラギナーゼ、アスペルリン(asperlin)、アザシチジン(azacitidine)、アゼテパ(azetepa)、アゾトマイシン(azotomycin)、パチマスタット、ベンゾデパ(benzodepa)、ピカルタミド、塩酸ピサントレン、ジメシル酸ビスナフィド(bisnafide)、ビゼレシン、硫酸ブレオマイシン、ブレキナール・ナトリウム、プロピリミン、プスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド(caracemide)、カーベタイマー、カルボプラチン、カルムスチン、塩酸カルピシン(carubicin)、カルゼレシン(carzelesin)、セデフィンゴル(cedefingol)、クロラムブシル、シロレマイシン(cirolemycin)、シスプラチン、クラドリピン、メシル酸クリスタノール(crisnatol)、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルピシン、デカルバジン(decarbazine)、デシタピン(decitabine)、デキソマプラチン(dexormaplatin)、デザグアニン(dezaguanine)、メシル酸デザグアニン(dezaguanine)、ジアジコン、ドセタキセル、ドキシルピシン、塩酸ドキシルピシン、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオン酸ドロモスタノロン、デュアゾマイシン(duazomycin)、エダトレキセート(edatrexate)、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン(elsamitrucin)、エンロプラチン(enloplatin)、エンプロメート(enpromate)、エピプロピジン(epipropidine)、塩酸エ

40

50

ピルピシン、エルブゾロール(erbulozole)、塩酸エソルピシン(esorubicin)、エストラム
 スチン、リン酸エストラムスチン・ナトリウム、エタニダゾール、エトボシド、リン酸エ
 トボシド、エトプリン(etoprine)、塩酸ファドロゾール、ファザラビン(fazarabine)、フ
 エンレチニド(fenretinide)、フロクスウリジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシ
 ル、フルロシタピン(flurocitabine)、ホスキドン(fosquidone)、ホストリエシン・ナト
 リウム、ゲムシタピン、塩酸ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、塩酸イダルピシン、イホス
 ファミド、イルモホシン(ilmofosine)、インターロイキン2(組換えインターロイキン2、
 またはrIL2を含む)、インターフェロン -2a、インターフェロン -2b、インターフェロ
 ン -n1、インターフェロン -n3、インターフェロン -I a、インターフェロン -I b、
 イプロプラチン、塩酸イリノテカン、酢酸ランレオチド、レトロゾール、酢酸ロイプロリ
 ド、塩酸リアロゾール、ロメトレキソール(lometrexol)・ナトリウム、ロムスチン、塩酸
 ロソキサントロン(losoxantrone)、マソプロコール(masoprocol)、メイタンシン、塩酸メ
 クロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリ
 ル、メルカプトプリン、メトトレキサート、メトトレキサート・ナトリウム、メトプリ
 ン、メツレデパ(meturedepa)、ミチンドミド(mitindomide)、マイトカルシン(mitocarcin
)、マイトクロミン(mitocromin)、マイトギリン(mitogillin)、マイトマルシン(mitomalc
 in)、マイトマイシン、マイトスパー(mitosper)、マイトテイン(mitotane)、塩酸ミトキ
 サントロン、ミコフェノール酸、ニトロソ尿素、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルマ
 プラチン(ormaplatin)、オキシスラン(oxisuran)、パクリタクセル、ペガスパルガーゼ(p
 egaspargase)、ペリオマイシン(peliomycin)、ペンタムスチン(pentamustine)、硫酸ペブ
 ロマイシン、ペルホスファミド(perfosfamide)、ピボプロマン、ピボスルファン(piposul
 fan)、塩酸ピロキサントロン(piroxantrone)、プリカマイシン、プロメスタン(plomestan
 e)、ポルフィマー・ナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン(prednimustine
)、塩酸プロカルバジン、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、ピラゾフリン(pyra
 zofurin)、リボプリン(riboptine)、ログレチミド(rogletimide)、サフィンゴル(safingol)
)、塩酸サフィンゴル(safingol)、セムスチン、シムトラゼン(simtrazene)、スパルフォ
 セート・ナトリウム、スパルソマイシン、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン(spi
 romustine)、スピロプラチン(spiroplatin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、
 スロフェヌール(sulofenur)、タリソマイシン、テコガラン・ナトリウム、テガフル、塩
 酸テロキサントロン(teloxantrone)、テモポルフィン、テニボシド、テロキシロン(terox
 irone)、テストラクトン、チアミプリン(thiamiprine)、チオグアニン、チオテパ、チア
 ゴフリン(tiazofurin)、チラパザミン、クエン酸トレミフェン、酢酸トレストロン(trest
 olone)、リン酸トリシリピン(triciribine)、トリメトレキセート、グルクロン酸トリメ
 トレキセート、トリプトレリン、塩酸チュブゾール(tubulozole)、ウラシル・マスター
 ド、ウレデパ(uredepa)、バプレオチド(vapreotide)、ベルテポルフィン、硫酸ビンブラ
 スチン、硫酸ピンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ビネピジン(vinepidin
 e)、硫酸ピングリシネート(vinglycinate)、硫酸ビンロイロシン(vinleurosine)、酒石酸
 ビノレルピン、硫酸ビンロシジン(vinrosidine)、硫酸ビンゾリジン(vinzolidine)、ボロ
 ゴール(vorozole)、ゼニプラチン(zeniplatin)、ジノスタチン、塩酸ゾルピシンなどの抗
 癌剤である、1種または複数の予防/治療薬の投与と併用することを含む。他の抗癌剤には
 、それだけには限らないが、20-エピ-1,25ジヒドロキシビタミンD3、5-エチニルウラシル
 、アビラテロン(abiraterone)、アクラルピシン、アシルフルベン、アデシペノール(adec
 ypenol)、アドゼレシン、アルデスロイキン、ALL-TKアンタゴニスト、アルトレタミン、
 アンバムスチン(ambamustine)、アミドクス(amidox)、アミフォスチン、アミノレブリン
 酸、アムルピシン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホラ
 イド、血管新生阻害剤、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリクス(antarelix
)、抗背側化形態形成タンパク質1、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、抗新生物薬、グリ
 シン酸アフジコリン、アポトーシス遺伝子調節剤、アポトーシス調節剤、アプリン酸、
 ara-CDP-DL-PTBA、アルギニン・デアミナーゼ、アスラクリン(asulacrine)、アタメスタ
 ン、アトリムスチン、アキシナスタチン(axinastatin)1、アキシナスタチン(axinastatin

10

20

30

40

50

)2、アキシナスタチン(axinastatin)3、アザセトロン、アザトキシン(azatoxin)、アザチロシン、バッカチンIII誘導体、バラノール(balanol)、パチマスタット、BCR/ABLアンタゴニスト、ベンゾクロリン、ベンゾイルスタウロスポリン、
 -ラクタム誘導体、
 -アレチン(alethine)、
 -クラミシンB、ベツリン酸、bFGF阻害剤、ピカルタミド、ピサントレン、ビスアジリジニルスベルミン、ビスナフィド(bisnafide)、ビストラテン(bistratene)A、ビゼレシン、ブレフレート(breflate)、プロピリミン、ブドチタン(budotitane)、ブチオニン・スルホキシイミン、カルシポトリオール、カルフォスチンC、カンプトセシン誘導体、カナリア痘IL-2、カペシタビン、カルボキサミド-アミノ-トリアゾール、カルボキシアミドトリアゾール、CaRest M3、CARN 700、軟骨由来阻害剤、カルゼレシン(carzel
 esin)、カゼイン・キナーゼ阻害剤(ICOS)、カスタノスベルミン、セクロピンB、セトロレ
 リクス、クロロキノキサリン・スルホンアミド、シカプロスト、cis-ポルフィリン、クラ
 ドリピン、クロミフェン類似体、クロトリマゾール、コリスマイシン(collismycin)A、コ
 リスマイシン(collismycin)B、コンプレタスタチンA4、コンプレタスタチン類似体、コナ
 ゲニン、クラムベスシジン(crambescidin)816、クリスタノール(crisnatol)、クリプロフ
 ァイシン(cryptophycin)8、クリプロファイシン(cryptophycin)A誘導体、クラシン(curac
 in)A、シクロペンタンスラキノン、シクロプラタム、サイペマイシン(cypemycin)、シタ
 ラビンオクホスファート、細胞溶解因子、サイトスタチン(cytostatin)、ダクリキシマブ
 (dacliximab)、デシタビン(decitabine)、デヒドロジデムニンB、デスロレリン、デキサ
 メタゾン、デキシホスファミド、デクスラゾキサソール、デクスベラパミル、ジアジコン、ジ
 デムニンB、ジドクス(didox)、ジエチルノルスベルミン、ジヒドロ-5-アザシチジン、ジ
 ヒドロタキソール、ジオキサマイシン(dioxamycin)、ジフェニル・スピロムスチン(spiro
 mustine)、ドセタキセル、ドコサノール、ドラセトロン、ドキシフルリジン、ドロロキシ
 フェン、ドロナビノール、デュオカルマイシンSA、エブセレン、エコムスチン(ecomustin
 e)、エデルホシン(edelfosine)、エドレコロマブ、エフロルニチン、エレメン、エミテフ
 ール、エピルピシン、エプリステリド、エストラムスチン類似体、エストロゲン・アゴニ
 スト、エストロゲン・アンタゴニスト、エタニダゾール、リン酸エトボシド、エキセメス
 タン、ファドロゾール、ファザラビン(fazarabine)、フェンレチナイド、フィルグラスチ
 ム、フィナステライド、フラボピリドール、フレゼラスチン(flezelastine)、フルアステ
 ロン、フルダラビン、塩酸フルオロダウノルニシン(fluorodaunorubicin)、フォルフェニ
 メクス(forfenimex)、フォルメスタン、フォストリエシン、フォテムスチン、ガドリニウ
 ム・テキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタビン、ガニレリックス、ゲラチナーゼ阻害
 剤、ゲムシタビン、グルタチオン阻害剤、ヘプルスファム(hepsulfam)、ヘレグリン、ヘ
 キサメチレンビスアセトアミド、ヘペリシン、イバンドロン酸、イダルピシン、イドキシ
 フェン、イドラマントン(idramantone)、イルモホシン(ilmofofosine)、イロマスタット(il
 omastat)、イミダゾアクリドン、イミキモド、免疫刺激ペプチド、インシュリン様成長因
 子-1受容体阻害剤、インターフェロン・アゴニスト、インターフェロン、インターロイキ
 ン、イオベングアン(iobenguane)、ヨードドキシソルピシン(iododoxorubicin)、イポメア
 ノール(ipomeanol)、イロプラクト(iroplact)、イルソグラジン、イソベンガゾール(isob
 engazole)、イソホモハリコンドリリン(isohomohalicondrin)B、イタセトロン、ジャスプラ
 キノライド、カハラリド(kahalalide)F、三塩酸ラメラリン-N、ランレオチド、レイナマ
 イシン、レノグラスチム、硫酸レンチナン、レプトルスタチン(leptolstatin)、レトロゾ
 ール、白血病阻害因子、白血球
 インターフェロン、ロイプロリド+エストロゲン+プロゲ
 ステロン、ロイプロレリン、レバミゾール、リアロゾール、直鎖ポリアミン類似体、親油
 性二糖類ペプチド、親油性白金化合物、リソクリナミド(lissoclinamide)7、ロバプラ
 チン(lobaplatin)、ロンブリシン、ロメトレキソール(lometrexol)、ロニダミン、ロソキ
 サントロン(losoxantrone)、ロバスタチン、ロキシリピン(loxoribine)、ルルトテカン(l
 urtotecan)、ルテチウム・テキサフィリン、リソフィリン(lysofylline)、溶解ペプチド
 、メイタンシン、マンノスタチンA、マリマスタット、マソプロコール(masoprocol)、マ
 スピン(maspin)、マトリリシン阻害剤、マトリックス・メタロプロテイナーゼ阻害剤、メ
 ノガリル、メルパロン(merbarone)、メテレリン(meterelin)、メチオニナーゼ(methionin
 10
 20
 30
 40
 50

ase)、メトクロプラミド、MIF阻害剤、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミスマッチ二重鎖RNA、ミトグアゾン、ミトラクトール(mitolactol)、マイトマイシン類似体、ミトナフィド(mitonafide)、マイトトキシン(mitotoxin)線維芽細胞成長因子-サポリン、ミトキサントロン、モファロテン、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロフィン、モノホスホリル脂質A+ミオバクテリウム細胞壁sk、モピダモール(mopidamol)、多剤耐性遺伝子阻害剤、多発腫瘍抑制剤1系治療薬、マスタード抗癌薬、マイカペルオキシド(mycaperoxide)B、ミコバクテリウム細胞壁抽出物、ミリアポロン(myriaporone)、N-アセチルジナリン、N-置換ベンズアミド、ナファレリン、ナグレスチップ(nagrestip)、ナロキソン+ペンタゾシン、ナパビン(napavin)、ナフテルピン、ナルト

10

グラスチム、ネダプラチン、ネモル
 ビシン(nemorubicin)、ネリドロロン酸(neridronic acid)、中性エンドペプチターゼ、ニルタミド、ナイサマイシン(nisamycin)、一酸化窒素調整剤、ニトロキシド抗酸化剤、ニトルリン(nitruillyn)、06-ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン(okicenone)、オリゴヌクレオチド、オナプリストン、オンダンセトロン、オラシン、経口サイトカイン誘発剤、オルマプラチン(ormaplatin)、オサテロン、オキサリプラチン、オキサウノマイシン、パクリタキセル、パクリタキセル類似体、パクリタキセル誘導體、パラウアミン(palauamine)、パルミトイルリゾキシシン、パミドロロン酸、パナキシトリオール、パノミフェン、パラバクチン(parabactin)、パゼリプチン(pazelliptine)、ペガスパルガーゼ(pegaspargase)、ペルデシン、ポリ硫酸ペントサンナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール(pentozole)、パーフルブロン、パーホスファミド、ペリリルアルコール、フェナジノ
 マイシン、酢酸フェニル、ホスファターゼ阻害剤、ピシバニル、塩酸ピロカルピン、ピラルピシン、ピリトレキシム(piritrexim)、プラセチン(placetin)A、プラセチン(placetin)B、プラスミノゲン活性化剤阻害剤、白金錯体、白金化合物、白金トリアミン錯体、ポルフィマー・ナトリウム、ポルフィロマイシン、ブレドニゾン、プロピルbis-アクリドン、プロスタグランジンJ2、プロテアソーム阻害剤、タンパク質A系免疫調節剤、タンパク質キナーゼC阻害剤、微細藻、タンパク質チロシン・ホスファターゼ阻害剤、プリン・ヌクレオチド・ホスホリラーゼ阻害剤、プルプリン、ピラゾロアクリジン、ピリドキシル化ヘモグロビン・ポリオキシエチレン接合体、rafアンタゴニスト、ラルチトレキセド、ラモセトロン、rasファルネシル・タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、ras阻害剤、ras-GAP阻害剤、脱メチル化レテリプチン(retelliptine)、エチドロロン酸レニウムRe 186、リゾ
 キシン、リボザイム、RIIレチンアミド、ログレチミド(rogletimide)、ロヒツカイン(rohitukine)、ロムルチド、ロキニメクス(roquinimex)、ルビギノン(rubiginone)B1、ルボキシ
 シル(ruboxyl)、サフィンゴル(safingol)、サイントピン(saintopin)、SarCNU、サルコフィトールA、サルグラモスチム、Sdi 1ミメティクス、セムスチン、老化由来阻害剤1、センス・オリゴヌクレオチド、シグナル伝達阻害剤、シグナル伝達調整剤、一本鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン、ソブゾキサソ、ナトリウム・ボロカプテート、フェニル酢酸ナトリウム、ソルベロール(solverol)、ソマトメジン結合タンパク質、ソネルミン、スパ
 ルホシン酸(sparfosic acid)、スピカマイシンD、スピロムスチン(spiromustine)、スプレノペンチン、スポンジスタチン1、スクアラミン、幹細胞阻害剤、幹細胞分裂阻害剤、
 スチピアミド(stipiamide)、ストロメリシン阻害剤、スルフィノシン(sulfinosine)、超
 40 活性血管作用性腸ペプチド・アンタゴニスト、スラジスタ(suradista)、スラミン、スワンソニン、合成グリコサミノグリカン、タリムスチン(tallimustine)、タモキシフェン・メチオジド、タウロムスチン(tauromustine)、タキソール、タザロテン、テコガラン・ナトリウム、テガフル、テルラピリリウム(tellurapyrylium)、テロメラゼ阻害剤、テモポルフィン、テモゾロマイド、テニボシド、テトラクロロデカオキシド、テトラゾミン(tetrazomine)、タリプラスチン(thaliblastine)、サリドマイド、チオコラリン(thiocoraline)、チオグアニン、トロンボポエチン、トロンボポエチン・ミメティク、チマルファシン(thymalfasin)、チモポエチン受容体アゴニスト、チモトリナン(thymotrinan)、甲状腺刺激ホルモン、スズ・エチル・エチオプルプリン、チラパザミン、二塩化チタノセン、トブセンチン(topsentin)、トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳阻害剤、トレチノイ

20

30

40

50

ン、トリアセチルウリジン、トリシリピン(triciribine)、トリメトレキセート、トリブトレリン、トロピセトロン、ツロステライド(turosteride)、チロシン・キナーゼ阻害剤、チルホスチン、UBC阻害剤、ウベニメクス、尿生殖洞由来成長阻害因子、ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト、バプレオチド(vapreotide)、バリオリン(variolin)B、ベクター系、赤血球遺伝子治療薬、ベラレゾール(velaresol)、ベラミン(veramine)、ベルジンス(verdins)、ベルテポルフィン、ビノレルピン、ビンキサリチン(vinxaltine)、バイタクシン、ボロゾール、ザノテロン(zanoterone)、ゼニプラチン(zeniplatin)、ジラスコルブ(zilasorb)、およびジノスタチン・スチマラマーが含まれる。好ましい追加の抗癌剤は、5-フルオロウラシルおよびロイコボリンである。

【 0 1 5 5 】

より特定の実施形態では、本発明はまた、本発明の1種または複数のモノクローナル抗体を、それだけには限らないが、表2に開示されている抗癌剤、好ましくは前述の乳癌、卵巣癌、黒色腫、前立腺癌、大腸癌、および肺癌の治療用の抗癌剤などの1種または複数の治療薬の投与と併用することも含む。

【表2】

治療薬	投与	投与量	投与間隔
塩酸ドキソルビシン (アドリアマイシン RDF(登録商標)および アドリアマイシン PFS(登録商標))	静脈内	1日目に60~75mg/m ²	21日間隔
塩酸エピルビシン (Ellence(商標))	静脈内	各サイクルの1日目に100~ 120mg/m ² または均等に分割 してサイクルの1~8日目に 投与	3~4週間サイク ル
フルオロウラシル	静脈内	供給形態: 5mlおよび10mlバイアル(そ れぞれフルオロウラシル 250および500mgを含有)	
ドセタキセル(タキ ソテール(登録商標))	静脈内	1時間にわたって60~ 100mg/m ²	3週間毎に1回
パクリタキセル(タ キソール(登録商標))	静脈内	3時間にわたって175mg/m ²	3週間毎に4コー ス(ドキソルビ シン含有併用化 学療法に連続し て投与する)
クエン酸タモキシフ ェン(ノルバデック ス(登録商標))	経口 (錠剤)	20~40mg 投与量が20mgより多い場合 は分割(朝および夜)で投与 すべきである	毎日
注射用ロイコボリン カルシウム	静脈内または 筋肉内注射	供給形態: 350mgバイアル	投与量はテキス トPDR3610から はわからない
酢酸luprolide(リユー プロン(登録商標))	単回皮下注射	1mg(0.2mlまたは20ユニッ ト・マーク)	1日1回
フルタミド (Eulexin(登録商標))	経口 (カプセル 剤)	250mg(各カプセルはフルタ ミド125mgを含む)	8時間間隔で1日 3回(合計1日投 与量750mg)
ニルタミド (Nilandron(登録商 標))	経口 (錠剤)	300mgまたは150mg(各錠剤 はニルタミド50または 150mgを含む)	30日間1日1回 300mg、その後 1日1回150mg
ビカルタミド(カソ デックス(登録商標))	経口 (錠剤)	50mg(各錠剤はビカルタミ ド50mgを含む)	1日1回
プロゲステロン	注射	USPゴマ油中50mg/ml	
ケトコナゾール(ニ ゾラル(登録商標))	クリーム剤	症状に応じて2%クリーム剤 を毎日1回または2回塗布す る	
プレドニゾン	経口 (錠剤)	治療している特定の疾患実 体に応じて初期投与量は1 日当たり5mg~60mgであって よい。	

10

20

30

40

リン酸エストラムスチンナトリウム (Emcyt(登録商標))	経口 (カプセル剤)	14mg/kg体重(すなわち体重10kgまたは22lbにつき140mgカプセル剤1個)	3または4分割で毎日投与	
エトボシドまたはVP-16	静脈内	20mg/ml溶液5ml(100mg)		
ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))	静脈内	2~4.5mg/kg	10日間1日1回。4週間間隔で繰り返してもよい	
カルムスチン・インプラントを含む polifeprosan 20(BCNU)(ニトロソ尿素)(Gliadel(登録商標))	カシエ剤を切除腔に置く	切除腔のサイズおよび形状によって可能な場合、それぞれカルムスチン7.7mgを含み、合計で61.6mgになる8個のカシエ剤		10
シスプラチン	注射	供給形態: 50mLおよび100mLの多用量型バイアル中1mg/ml溶液		
マイトマイシン	注射	5mgおよび20mgバイアル(マイトマイシン5mgおよび20mgを含む)で供給		20
塩酸ゲムシタビン (ジェムザール(登録商標))	静脈内	NSCLC用に2つのスケジュールを検討したが、最適スケジュールは決定されなかった 4週スケジュール-30分間にわたって1000mg/m ² で静脈内に投与 3週スケジュール-30分間にわたって1250mg/m ² で静脈内にジェムザールを投与	4週スケジュール-各28日サイクルの1、8および15日目。1日目にジェムザールの注入後にシスプラチンを静脈内に100mg/m ² 。 3週スケジュール-各21日サイクルの1および8日目。1日目にジェムザールの注入後に100mg/m ² の投与量でシスプラチンを静脈内に投与する。	30
カルボプラチン(パラプラチン(登録商標))	静脈内	単剤療法: 1日目に360mg/m ² I.V.(注入は15分またはそれより長く続く) 他の投与量計算: シクロホスファミドを用いた併用療法、用量調整推奨基準、処方投薬など。	4週間毎	40

ifosamide(Ifex(登録商標))	静脈内	毎日1.2g/m ²	5日間連続 3週間毎または 血液毒性から回復後に繰り返す
塩酸トポテカン(ハイカムチン(登録商標))	静脈内	毎日30分間にわたって静脈内注入によって1.5g/m ²	5日間連続、21日コースの1日目に開始する

10

【0156】

本発明はまた、本発明のEphA2抗体の投与を、X線、 γ 線、および他の放射線源の使用を含む放射線療法と組み合わせて、癌細胞を破壊することを含む。好ましい実施形態では、この放射線療法は、放射線が遠隔治療線源から向けられる外照射または遠隔照射療法として行われる。他の好ましい実施形態では、この放射線療法は、放射線源を体内の癌細胞または腫瘍に近い位置に配置する、内科療法または近接照射療法として行われる。

【0157】

癌治療薬、ならびにその用量、投与経路、および推奨される使用法は当技術分野で周知であり、Physician's Desk Reference(56th ed., 2002)などの文献に記載されている。

【0158】

20

5.3 本発明の抗体の同定

5.3.1 アゴニスト抗体

本発明の抗体は、好ましくはEphA2受容体に作用し(すなわち、EphA2をリン酸化させ)、このEphA2受容体に免疫特異的に結合することができる。抗体が作用すると、EphA2がリン酸化し、その後で分解する。EphA2のリン酸化、活性、または発現のレベルをアッセイするための当技術分野で周知の方法ならどんな方法でも、候補EphA2抗体をアッセイしてそのアゴニスト活性を測定するために用いることができる(例えば、下記の6.2.1節を参照のこと)。

【0159】

したがって本発明は、EphA2に特異的に結合する抗体、特にEphA2細胞外ドメインと結合する抗体を、EphA2を発現する細胞、特に(同じタイプの非癌細胞と比較して)EphA2を過剰発現する好ましくは転移癌細胞である癌細胞と共にインキュベートすることにより、本発明のEphA2抗体をアッセイしスクリーニングする方法、そしてEphA2のリン酸化および/または分解の増加をアッセイする方法、それにより本発明のEphA2抗体を同定する方法を提供する。

30

【0160】

5.3.2 癌細胞上に露出したEphA2エピトープに優先的に結合する抗体

本発明の抗体は、好ましくは、癌細胞(例えば、EphA2を過剰発現する細胞、および/またはリガンドに結合しない実質的なEphA2を有する細胞)上に露出するが、EphA2がリガンドに結合している1つまたは複数の非癌細胞上には露出しないEphA2エピトープに結合することができる。この実施形態では、本発明の抗体は、非癌細胞上には露出せず、癌細胞上に露出したEphA2エピトープに向けられる(例えば、下記の6.6節を参照のこと)。非癌細胞と癌細胞のEphA2膜分布の違いにより、非癌細胞上には露出しないあるエピトープが癌細胞上に露出する。例えば、通常EphA2はそのリガンド、EphrinA1に結合し、細胞同士が接触する領域に局在する。しかし、癌細胞は一般に、細胞-細胞接触を減少させ、またEphA2をそのリガンドよりも過剰に発現する。したがって、癌細胞では、細胞-細胞接触に局在しない非結合EphA2の量が増大する。一実施形態では、非結合で非局在のEphA2に優先的に結合する抗体自体が、本発明の抗体となる。

40

【0161】

候補EphA2抗体の細胞上の結合/局在を測定するための当技術分野で周知の方法ならどん

50

な方法でも所望の結合特性を有する候補抗体をスクリーニングするために用いることができる。一実施形態では、抗体の結合特性を測定するには免疫蛍光顕微鏡検査法を使用する。in vitroで成長する細胞に結合する抗体の結合を比較するには、標準的な技法を使用することができる。具体的な一実施形態では、癌細胞に結合する抗体と、非癌細胞に結合する抗体を比較する。露出EphA2エピトープ抗体は、非癌細胞にはあまり結合しないが、癌細胞にはよく結合する。別の具体的な一実施形態では、解離した(例えば、EGTAなどのカルシウム・キレート剤で処理した)非癌細胞に結合する抗体と、解離していない非癌細胞に結合する抗体を比較する。露出したEphA2エピトープ抗体は、解離していない非癌細胞にはあまり結合しないが、解離した非癌細胞にはよく結合する。

【0162】

別の一実施形態では、抗体の結合特性を測定するには、フロー・サイトメトリーを使用する。この実施形態では、EphA2はそのリガンド、Ephrin A1と架橋していてもしていなくてもよい。露出EphA2エピトープ抗体は、架橋EphA2にはあまり結合しないが、非架橋EphA2にはよく結合する。

【0163】

別の一実施形態では、抗体の結合特性を測定するには、細胞に基づくイムノアッセイを使用する。この実施形態では、EphA2との結合についてEphA2リガンド(例えば、Ephrin A1)と競合し得る抗体が、EphA2からEphrin A1を追い出す。このアッセイで用いられるEphA2リガンドは、(例えば、組換え的に発現された)可溶性タンパク質であってもよく、細胞上に発現されてその細胞に固定されたものでもよい。

【0164】

5.4 治療有用性または予防有用性の特徴付けおよび実証

本発明の予防および/または治療プロトコルの毒性および有効性は、例えばLD₅₀(個体群の50%致死量)およびED₅₀(個体群の50%治療有効量)を測定するための、細胞培養物または実験動物中での標準の薬剤による手順により測定することができる。毒性効果を示す用量と治療効果を示す用量の比を治療係数とし、LD₅₀/ED₅₀比として表す。治療係数が大きい予防および/または治療薬が好ましい。毒性の副作用を示す予防および/または治療薬も使用できるが、そのような薬剤が患部組織の部位を標的とする送達系を設計するにあたっては、非感染細胞に対する潜在的ダメージを最小限に抑え、それにより副作用を低減させるよう注意を払うべきである。

【0165】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られるデータは、ヒトで使用される予防および/または治療薬のある範囲の用量を処方するのに用いることができる。このような薬剤の用量は、ED₅₀を含む、毒性をほとんどまたはまったく持たないある範囲の循環濃度であることが好ましい。この用量は、使用される剤形および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変わり得る。本発明の方法で用いられる任意の薬剤の治療有効量は、最初に細胞培養アッセイから推定することができる。ある用量を動物モデルで処方して、細胞培養物中で測定したIC₅₀を含む循環血漿濃度範囲(すなわち、症状の最大半減阻害を実現する試験化合物の濃度)を実現することができる。このような情報を用いてより正確にヒトに有用な用量を決定することができる。血漿濃度は、例えば高速液体クロマトグラフィーで測定することができる。

【0166】

本発明に従って用いられる治療薬の抗癌活性は、マウスEphA2をヒトEphA2で置き換えたSCIDマウス・モデルまたは遺伝子組換えマウス、ヒト異種移植片を有するヌード・マウス、下記6章に記載の動物モデル、または当技術分野で周知の任意の動物モデル、およびその全体が参照により本明細書に組み込まれるRelevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development(1999, eds. Fiebig and Burger); Contributions to Oncology(1999, Karger); The Nude Mouse in Oncology Research(1991, eds. Boven and Winograd); Anticancer Drug Development Guide(1997 ed. Teicher)に記載の任意の動物モデルなどの、癌研究用の様々な実験動物モデルにより測定することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 7 】

5.4.1 治療有効性の検証

本発明の手順および組成物は、ヒトに使用する前に、期待する治療上および予防上の活性について、in vitroでそしてin vivoで検査するのが好ましい。例えば、ある特定の治療プロトコルを付与するか否かの判定に使用できるin vitroアッセイとしてin vitro細胞培養アッセイがあり、そのアッセイでは患者の組織サンプルを培養にて増殖させ、またそのサンプルをプロトコルにかけるか、あるいはそのサンプルにプロトコルを付与し、例えばEphA2リン酸化/分解の増加など、このプロトコルの組織サンプルへの効果を観察する。接触した細胞の増殖またはその生存が低レベルであることは、その治療薬は患者の状態を治療するのに有効であることを示している。別の方法として、患者の細胞を培養せず、腫瘍または悪性細胞株の細胞を用いて治療薬および治療方法をスクリーニングしてもよい。当技術分野で標準とされているアッセイ方法の多くを、この生存および/または増殖の評価に使用することができる。例えば細胞増殖は、³H-チミジン取り込み測定、細胞の直接計数、または癌原遺伝子(fos、mycなど)や細胞周期マーカーなど既知遺伝子の転写活性の変化の検知により、評価することができる。細胞生存度はトリパンブルー染色により評価でき、分化度は形態やEphA2リン酸化/分解の増加などにより視覚化して評価することができる。

10

【 0 1 6 8 】

治療に使用される化合物は、ヒトで試験する前に、それだけには限らないが、ラット、マウス、ニワトリ、雌ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなどを含む適切な動物モデル系、例えば上述の動物モデルで試験することができる。これらの化合物を次に、適切な臨床試験で使用する。

20

【 0 1 6 9 】

さらに、当業者に周知のアッセイならどんな方法でも、癌の治療または予防のための本明細書で開示された併用療法の予防および/または治療有用性を評価するために使用することができる。

【 0 1 7 0 】

5.5 医薬組成物

本発明の組成物には、医薬組成物の製造に有用なバルク薬剤組成物(不純または未滅菌組成物)および、単位剤型を調製するのに使用可能な医薬組成物(すなわち、被験者または患者に投与するのに適している組成物)が含まれる。このような組成物には、予防または治療有効量の本明細書に開示する予防薬および/または治療薬、またはそれらの薬剤と製薬上許容される担体の組合せが含まれる。本発明の組成物には、予防または治療有効量の本発明の1つまたは複数のEphA2抗体と、製薬上許容される担体との組合せが含まれるのが好ましい。別の実施形態では、本発明の組成物には、さらに別の抗癌剤が含まれる。

30

【 0 1 7 1 】

具体的な一実施形態では、「製薬上許容される」という用語は、連邦または州政府の規制当局による承認を受けたか、米国薬局方、または動物、より具体的にはヒトにおける使用のための他の一般に認知された薬局方に掲載されていることを意味する。「担体」という用語は、それと一緒に治療薬が投与される希釈剤、アジュバント(例えば、フロイントのアジュバント(完全または不完全)または、より好ましくは、Chiron(エメリービル、カリフォルニア州)から入手可能であるMF59C.1)、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬剤用担体は、水、およびピーナツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの石油、動物油、植物油、合成油を含む油などの滅菌液体であり得る。この医薬組成物を静脈内に投与する場合には、水が好ましい担体である。食塩水、ならびにデキストロースおよびグリセリンの水溶液を、特に注射液用の液体担体として使用することもできる。適切な薬剤用賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセリン、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセリン、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。この組成物は、所望に応じて、微量の湿潤剤、乳化剤、または

40

50

pH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は、溶液剤、懸濁液剤、乳剤、錠剤、丸剤、粉末剤、持続放出性製剤などの形をとることができる。

【0172】

一般に、本発明の組成物の成分は、それぞれ別々に供給されるか、あるいは剤形単位中で混合されて、例えば有効薬剤の量を示すアンプルやサシェット(sachette)などの気密性密封容器中の凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。この組成物を輸液により投与する場合、薬剤グレードの滅菌水または生理食塩水を含む輸液ボトルを使って分配することができる。この組成物を注射により投与する場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルを提供することができ、したがって各成分を投与前に混合することができる。

10

【0173】

本発明の組成物は、中性形態または塩の形態として調製することができる。製薬上許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導されるアニオンなどのアニオンで形成される塩、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されるカチオンなどのカチオンで形成される塩が含まれる。

【0174】

様々な送達系、例えばリポソーム、微粒子、マイクロカプセル中への封入によるもの、抗体または抗体断片を発現することが可能な組換え細胞によるもの、受容体を介したエンドサイトーシスによるもの(例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照のこと)、レトロウイルス・ベクターや他のベクターの一部としての核酸の構築によるものなどが知られており、本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体、あるいは本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体と癌の予防または治療に有用な予防薬または治療薬の組合せを投与するために使用することができる。本発明の予防または治療薬の投与方法には、それだけには限らないが、非経口投与(例えば、皮内投与、筋肉内投与、腹腔内投与、静脈内投与、皮下投与)、硬膜外投与、粘膜投与(例えば、鼻腔内投与、吸入投与、経口投与)が含まれる。具体的な一実施形態では、本発明の予防または治療薬を筋肉内、静脈内、または皮下投与する。この予防または治療薬は、任意の好都合な経路、例えば輸液、大量瞬時投与、上皮内層または皮膚粘膜内層(例えば、口腔粘膜、直腸粘膜など)を介した吸収により投与することができ、他の生物学的に有効な薬剤とともに投与することができる。この投与は全身投与でも局部投与でもよい。

20

30

【0175】

具体的な一実施形態では、望ましくは本発明の予防または治療薬を治療が必要な領域に局所投与することができる。これは例えば、それだけには限らないが、注射による局所輸液、またはインプラントにより実現することができる。このインプラントは、サイラステイック膜などの膜や繊維を含む多孔質材料、非多孔質材料、またはゼラチン材料からなる。

【0176】

別の一実施形態では、この予防または治療薬は、制御放出系または持続放出系で送達することができる。一実施形態では、ポンプを用いて制御または持続放出を実現することができる(Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照のこと)。別の一実施形態では、ポリマー材料を用いて本発明の抗体またはその断片の制御または持続放出を実現することができる(例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neuro I. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); 米国特許第5,679,377号; 米国特許第5,916,597号; 米国特許第5,912,015号; 米国特許第5,989,463号; 米国特許第5,128,32

40

50

6号;国際公開W099/15154号およびW099/20253号を参照のこと)。持続放出性製剤中で用いられるポリマーの例は、それだけには限らないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコール酸(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコール酸)(PLGA)、ポリオルトエステルが含まれる。好ましい一実施形態では、持続放出性製剤に用いられるポリマーは不活性であり、浸出性不純物を含まず、貯蔵安定性であり、滅菌されており、生分解性である。別の一実施形態では、制御放出系または持続放出系を予防または治療標的の近くに位置させることができ、したがって全身向け用量の一部しか必要としない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138(1984)を参照のこと)。

10

【0177】

制御放出系についてはLangerの総説で論じられている(1990, Science 249:1527-1533)。当業者に周知の方法ならどんな方法でも、本発明の1種または複数の持続放出性製剤の製造に使用することができる。例えば、米国特許第4,526,938号;国際公開W091/05548号およびWO 96/20698号;Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189;Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397;Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854;and Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参照のこと。これらはすべてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0178】

5.5.1 製剤

本発明に従って使用される医薬組成物は、1種または複数の生理的に許容される担体を用いて、通常の方法で調製することができる。

【0179】

したがって本発明のEphA2抗体およびその生理的に許容される塩および溶媒和物を、吸入法または吹送法(口か鼻のどちらかを通じて)による投与、または経口・非経口あるいは粘膜(頬、膣、直腸、舌下など)投与用に製剤化してもよい。好ましい実施形態では、局所的または全身的な非経口投与が使用される。

30

【0180】

経口投与では、これらの医薬組成物は例えば、結合剤(例えば、アルファ化トウモロコシデンブ、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース);充填剤(例えば、ラクトース、微結晶セルロース、リン酸水素カルシウム);滑剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ);崩壊剤(例えば、ジャガイモデンブ、デンブングリコール酸ナトリウム);または湿潤剤(例えばラウリル硫酸ナトリウム)などの製薬上許容される賦形剤を使った通常の方法で調製される錠剤またはカプセル剤の形をとることができる。これらの錠剤は当技術分野で周知の方法によりコーティングすることができる。経口投与用の液体製剤は、例えば溶液剤、シロップ剤、または懸濁液剤の形をとることができる。これらは使用前に水や他の適切なビヒクルを使って構成すべき乾燥品として提供することができる。このような液体製剤は、懸濁化剤(例えば、ソルビトール・シロップ、セルロース誘導体、水添食用脂);乳化剤(例えば、レシチン、アカシア);非液体ビヒクル(例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコール、分画植物油);および防腐剤(例えば、メチルp-ヒドロキシベンゾエート、プロピルp-ヒドロキシベンゾエート、ソルビン酸)などの製薬上許容される添加剤を使った通常の方法で調製することができる。これらの製剤はまた、緩衝塩、着色剤、および甘味剤を必要に応じて含むことができる。

40

【0181】

経口投与用製剤を適切に調製して、有効化合物を制御放出させることができる。

【0182】

頬側投与では、これらの組成物は、通常の方法で調製される錠剤またはトローチ剤の形

50

をとることができる。

【0183】

吸入による投与では、本発明に従って用いられる予防または治療薬は、適切な噴霧剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガスを使用した、加圧包装または噴霧器から提供されるエアロゾル・スプレーの形をとることができる。加圧エアゾールの場合、バルブを設けることで単位用量を決定して、計量された量を送達することができる。例えば吸入器または注入器中で用いられるゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、この化合物とラクトースやデンプンなどの適切な粉末基剤の粉末混合物を含むものとして調製することができる。

10

【0184】

この予防または治療薬は、注射、例えば大量瞬時投与または連続輸液による非経口投与に調製することができる。輸液用製剤は、防腐剤を加えた単位剤形、例えば、アンプルやマルチドーズ容器で提供することができる。これらの組成物は、油性または水性ビヒクル中での懸濁液剤、溶液剤、乳剤などの形をとることができ、また懸濁液剤、安定化剤、および/または分散剤などの調製剤を含むこともできる。あるいは、有効成分を粉末の形にして、使用前に適切なビヒクル、例えば発熱物質を含まない滅菌水を使って構築できるようにすることもできる。

【0185】

これらの予防または治療薬は、例えばココアバターや他のグリセリドなどの通常の坐薬基剤を含む坐薬や保留浣腸などの直腸用組成物として調製することもできる。

20

【0186】

前述の組成物に加えて、これらの予防または治療薬はデポー製剤として調製することもできる。そのような持続性製剤は、(例えば皮下もしくは筋肉内)移植または筋肉内注射により投与することができる。したがって、例えば、これらの予防または治療薬は、適切なポリマー材料もしくは疎水性材料(例えば、許容可能な油中乳剤として)またはイオン交換樹脂を用いて、あるいは難溶性の誘導体、例えば難溶性の塩として調製することができる。

【0187】

本発明はまた、その量を示すアンプルやサシェット(sachette)などの気密性密封容器に封入された予防または治療薬を提供する。一実施形態では、この予防または治療薬は、気密性密封容器中の滅菌凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給され、例えば水や生理食塩水で適切な濃度に再構築して被験者に投与することができる。

30

【0188】

本発明の好ましい一実施形態では、様々な化学療法薬、生物学的療法薬/免疫療法薬、およびホルモン療法薬は当技術分野で周知であり、しばしばPhysician's Desk Reference, 56版(2002)に記載されている。例えば、本発明のある具体的な実施形態では、本発明の治療薬は表2に示すように調製、供給することができる。

【0189】

本発明の他の実施形態では、放射性同位体などの放射線治療薬は、カプセル中の液体または飲料として経口投与することができる。放射性同位体はまた、静脈注射用に調製することもできる。熟練した腫瘍遺伝子学者であれば、好ましい製剤および投与経路を決定することができる。

40

【0190】

ある実施形態では、本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体を、静脈注射の場合は1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、25mg/ml、反復皮下投与および筋肉内注射の場合は5mg/ml、10mg/ml、80mg/mlに調製する。

【0191】

これらの化合物は、所望であれば、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得る包装またはディスペンサ装置に入れて提供することができる。この包装、例えばブリス

50

ター包装は、金属やプラスチック箔を含んでいてもよい。この包装またはディスペンサ装置には投与用の説明書を添付してもよい。

【0192】

5.5.2 用量

癌の治療、予防、または管理に有効であろう本発明の組成物の量は、標準的な調査技法により決定することができる。例えば、癌の治療、予防、または管理に有効であろうこの組成物の用量は、例えば本明細書で開示されているか、当業者に周知である動物モデルなどの動物モデルにこの組成物を投与することで決定することができる。さらに、*in vitro* アッセイを任意選択で使用して最適な用量の範囲を特定するのに役立つともよい。

【0193】

好ましい有効用量の選択は、(例えば、臨床実験により)当業者が、当業者に周知のいくつかの因子の検討に基づいて行うことができる。このような因子には、治療または予防の被験者の疾患、関連する症状、患者の体重、患者の免疫状態、および投与される医薬組成物の正確さを反映する当業者に周知の他の要因が含まれる。

【0194】

製剤中に使用すべき正確な用量はまた、投与経路および癌の重篤度に依存するであろうし、担当医の判断および各患者の状況に応じて決めるべきである。有効用量は、*in vitro* または動物の試験系に由来する用量-反応曲線から推定することができる。

【0195】

抗体については、患者に投与される用量は通常、患者の体重1kg当たり0.1~100mgである。患者に投与される用量は、好ましくは患者の体重1kg当たり0.1~20mg、より好ましくは患者の体重1kg当たり1~10mgである。一般に、人体内での半減期は、ヒト抗体およびヒト化抗体の方が、外来ポリペプチドに対する免疫反応のために、他種の抗体より長い。したがって、ヒト抗体の用量を少なくし、投与頻度を少なくすることがしばしば可能である。

【0196】

患者に投与される他の癌治療薬について、当技術分野で周知の様々な治療薬の典型的な用量を表2に示す。本発明のある好ましい実施形態は、単独の薬剤の投与で推奨される用量と比べて少ない用量を併用治療レジメンで投与することを含むであろう。

【0197】

本発明は、これまで癌の予防、治療、管理、または改善に有効であると思われてきた周知の予防または治療薬をより少ない用量で投与する任意の方法を提供する。より少ない用量の周知の抗癌薬と、より少ない用量の本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体を併用して投与することが好ましい。

【0198】

5.6 キット

本発明は本発明のEphA2抗体を充填した1つまたは複数の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。また、癌治療に有用な1つまたは複数の他の予防薬または治療薬も、この医薬パックまたはキットに含めてもよい。本発明は本発明の組成物の1つまたは複数の成分を充填した1つまたは複数の容器を含む医薬パックまたはキットも提供する。場合により、医薬品または生物学的製剤の製造・使用および販売を管理する政府機関が規定する形式で、ヒトへの投与のための製造・使用および販売を当該機関が承認したことを示す注意書を、この容器に添付してもよい。

【0199】

本発明は上記の方法に使用可能なキットを提供する。ある実施形態では、本発明の1つまたは複数のEphA2抗体がキットに含まれる。別の実施形態では、1つまたは複数の容器に入った癌治療に有用な1つまたは複数の予防薬または治療薬がキットにさらに含まれる。EphA2抗体はEA2、EA3、EA4またはEA5が好ましい。ある実施形態では、他の予防薬または治療薬は化学療法薬である。別の実施形態では、他の予防薬または治療薬は生物学的治療薬またはホルモン薬である。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0200】

6. 実施例

6.1 モノクローナル抗体の調製

抗原の調製

Rasで形質転換されたMCF-10A細胞をRIPAバッファーで抽出した。チロシンリン酸化タンパク質を、固定化したPY20抗体を使い部分的に精製した(Kannerら、1989、J. Immunol. Meth. 120、115~124頁)。結合したタンパク質を25mMのフェニルリン酸を用い競合的に溶出させた。PY-20反応性タンパク質を含む画分を、リン酸化チロシン特異的抗体を用いたウェスタン・ブロット解析により確認した。

10

【0201】

抗体スクリーニング

EphA2免疫反応性の予備スクリーニングとして、バルク培養ハイブリドーマからの上清が、EphA2に対する免疫反応性についてスクリーニングされた。生存可能腫瘍細胞上の細胞外EphA2エピトープを同定するよう免疫戦略を計画した。したがって、生細胞に対する抗体反応性について選択する蛍光系ELISAプロトコル(FluorELISA)を利用した。このスクリーニング法は、コンフォメーションによって制限されたエピトープを認識する抗体に不利に働いたかもしれないウェスタン・ブロット解析よりも好ましかった。

【0202】

抗EphA2抗体の細胞表面EphA2受容体への結合を既報(Kilpatrickら、1998、Hybridoma 17、576頁)のアッセイ方法の改良を用いてモニターした。組織培養で処理した96ウェル平底プレート(Costar社、Cambridge、MA)を0.1Mのリン酸ナトリウム(pH8.0)で10 µg/mlに希釈した100 µlのポリ-L-リジン臭化水素酸塩(シグマ社、St. Louis、MO)で1時間処理した。ポリ-L-リジンをウェルから除去した後、100 µlのMDA-MB-23細胞懸濁液(EphA2に対し陽性)またはBT474細胞(陰性対照)を1ウェルにつき 3×10^4 細胞の濃度で加えた。5%のCO₂、37で一晩インキュベートした後、培地を穏やかに除去し、100 µlのハイブリドーマ上清を細胞上で室温で1時間インキュベートした。このサンプルを1xダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水(pH7.1)(GIBCO社、Grand Island、NY)で3回洗浄した。PBSで2 µg/mlに希釈したヤギ抗マウスAlexa Fluor 488抗体(100 µl、Molecular Probes社、Eugene、OR)を室温で1時間加えた。細胞をPBSで洗浄後、2%のFCSを含む50 µlのPBSを各ウェルに加え、その後倒立

20

30

【0203】

FluorELISAによりEphA2過剰発現腫瘍細胞(MDA-MB-231)を染色したが、EphA2欠損細胞(BT474)を染色しなかった44個のバルクハイブリドーマ集団が同定された(データ示さず)。免疫反応性は蛍光顕微鏡を使って確認され、拡散した膜染色のパターンを明らかに示したが、これはEphA2の細胞下局在に関する我々の以前の実験結果(Zelinskiら、2001、Cancer Res. 61:2301頁、およびZantekら、1999、Cell Growth Diff. 10:629頁)と一致した。ハイブリドーマのバルク培養物を、標的欠損細胞ではなく標的陽性細胞の強い免疫染色に基づいたフロー・サイトメトリーによるサブクローニングのために、最初に選択した。次いでバルク培養のハイブリドーマ集団をフロー・サイトメトリーによりサブクローニングし、FluorELISAを、サブクローニングしたハイブリドーマからの上清について繰り返した。

40

【0204】

6.2 EphA2モノクローナル抗体は腫瘍細胞の転移性を減少させる

6.2.1 EphA2のリン酸化と分解

EphA2抗体は、MDA-MB-231細胞内のEphA2のチロシンリン酸化および分解を促進した(図1A~1C)。EA2(図1A~1B、レーン2~3)、EA5(図1A~1B、レーン4~5)または対照(図1A~1B、レーン1)の存在下で、細胞単層を37で8分間インキュベートした。次にEphA2特異的抗体(D7、Upstate Biologicals社、Lake Placid、NYより購入;アメリカン・タイプ・ティッシュ・コレクション(American Type Tissue Collection)に2000年12月8日寄託し、ATCC番号PTA2755が割り付けられた。)を用いて細胞溶解液を免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離

50

し、リン酸化チロシン特異的抗体(4G10、Upstate Biologicals社、Lake Placid、NY、より購入)を用いてウェスタン・プロット解析に掛けた(図1A)。ローディング対照として、メンブレンを剥がし、免疫沈降法で使用したEphA2特異的抗体(D7)で再精査した。

【0205】

ウェスタン・プロット分析および免疫沈降法は既報(Zantekら、1999、Cell Growth Dif f. 10:629~638頁)に従い行った。簡単に説明すると、界面活性剤処理した細胞単層を1%のTriton X-100 (Sigma社、St.Louis、MO)を含むTris緩衝生理食塩水に抽出した。タンパク質濃度を測定(BioRad社、Hercules、CA)した後、1.5mgの細胞溶解液を免疫沈降し、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース(Protran、Schleicher and Schuell社、Keene、NH)に転写した。増強された化学発光法(Pierce社、Rockford、IL)および放射線撮影法(X-OM AT、Kodak社、Rochester、NY)により抗体の結合を検出した。

【0206】

EphA2アゴニスト抗体であるEA2およびEA5とのインキュベーションにより、EphA2リン酸化レベルが増加することがわかった(図1B)。30 µg/mlのEA2(図1C、レーン2~3)、EA5(図1C、レーン4~5)または対照(図1C、レーン1)の存在下で、MDA-MB-231単層細胞を37 °Cで24時間インキュベートした。次に細胞溶解液をSDS-PAGEにより分離し、EphA2特異的抗体(D7)を用いてウェスタン・プロット解析を行った。EphA2タンパク質レベルは抗体とのインキュベーションにより減少した。

【0207】

同様の実験をA549細胞を用いて行った。EA2、EA5または対照(PBS)の存在下で、A549細胞単層を37 °Cで10分間(図2A~2B)または5時間(図2C~2D)インキュベートした。次にEphA2特異的抗体(D7)を用いて細胞溶解液を免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、リン酸化チロシン特異的抗体(4G10、Upstate Biologicals社、Lake Placid、NY、より購入)を用いてウェスタン・プロット解析を行った(図2A、2C)。ローディング対照として、メンブレンを剥がし、免疫沈降法で使用したEphA2特異的抗体(D7)で再精査した(図2B、2D)。10分で、抗体インキュベーションがリン酸化の増加を引き起こした(図2A)。インキュベーションを5時間継続させると、これらの抗体はEphA2タンパク質の分解を引き起こした(図2D)。

【0208】

6.2.2 軟寒天内での増殖

腫瘍細胞を軟寒天内に懸濁させた。Zelinskiらの既報(2001、Cancer Res.61:2301~2306頁)に従い、軟寒天内のコロニー形成をアッセイした。抗体または対照液(PBS)を底部と上部の寒天溶液に加えた。精製した抗体または対照液(PBS)の存在下で、細胞を軟寒天内に37 °Cで7日間懸濁させた。Olympus社製40x対物レンズ装着倒立型位相差顕微鏡CK-3を使い、コロニー形成を顕微鏡下でスコアした。少なくとも3個の細胞を含むクラスターを陽性とスコアした。高倍率視野当たりの平均コロニー数を示す。各実験において別々の10箇所の高倍率顕微鏡視野を平均した。またここに示す結果は少なくとも3回の別々の実験を代表するものである。

【0209】

A549悪性肺癌細胞を10 µg/mlまたは2.5 µg/mlのEA2またはEA5モノクローナル抗体または対照(PBS)とインキュベートした。使用したどの量の抗体も軟寒天内での細胞増殖を阻害した(図3A)。EphA2過剰発現は良性MCF-7乳房上皮腫瘍細胞を悪性細胞(MCF-7^{EphA2})に変換した。これら両方の腫瘍細胞型を、EA2モノクローナル抗体または対照(PBS)とインキュベートした。EA2はMCF-7^{EphA2}細胞が軟寒天内で増殖する能力を阻害する。良性MCF-7細胞は、抗体とのインキュベーションの有無に拘わらず、軟寒天内でコロニーを形成しなかった(図3B)。結果を高倍率視野(HPF)当たりのコロニー数として報告する。対照実験により、アイソタイプの一一致した(IgG₁)対照(例えば、抗パキシリン)およびEphA2上の細胞内エピトープに対する抗体(D7など)のどちらも軟寒天内でのコロニー形成を減少させなかったことを確認した(データ示さず)。

【0210】

6.2.3 MATRIGEL(商標)内での管状ネットワークの形成

MATRIGEL(商標)などの微小三次元環境における腫瘍細胞の挙動から、乳房上皮細胞の分化状態と攻撃性を信頼性をもって予測することができる。単層で培養した良性(MCF-10A)もしくは悪性(MDA-MB-231)の乳房上皮細胞を、EphA2抗体(10 μ g/ml)もしくは対照液(PBS)の存在下、MATRIGEL(商標)上でインキュベートする。MATRIGEL(商標)上での細胞の挙動を、Zelinskiら(2001、Cancer Res.61:2301~2306頁)に従い分析する。簡単に説明すると、組織培養皿をMATRIGEL(商標)(Collaborative Biomedical Products社、Bedford、MA)を用い37 $^{\circ}$ Cでコーティングし、あらかじめEphA2抗体もしくは対照液(PBS)と共に氷上で1時間インキュベートしておいた 1×10^5 個のMDA-MB-231細胞もしくはMCF-10A細胞を加える。MATRIGEL(商標)上で細胞を37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートし、オリンパス社製倒立型光学顕微鏡IX-70を用い評価する。画像はすべて35mmフィルム(T-Max-400:Kodak社、Rochester、NY)上に記録する。

【0211】

24時間以内に、非形質転換MCF-10A上皮細胞はMATRIGEL(商標)上で腺房様球に組織化し、一方MDA-MB-231細胞は急速に管状ネットワークを組み立てる。これらの管状ネットワークは、次第にMATRIGEL(商標)全体にくまなく侵入する。EphA2アゴニスト抗体を加えることにより、この管状ネットワークの形成は阻止される。

【0212】

6.2.4 In vivoでの増殖

EA2はin vivoでの腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。 5×10^6 個のMDA-MB-231乳癌細胞を正位(orthotopically)または皮下に、 5×10^6 個のA549肺癌細胞を、胸腺欠損マウスの皮下に移植した。この腫瘍が平均体積 100mm^3 に増殖した後、マウスに6mg/kgのEA2または陰性対照(PBSまたは1A7抗体)を3週間にわたり週2回腹腔内投与した。実験動物は通例最後の処置から少なくとも2週間後または腫瘍が 2000mm^3 を超えた時点で屠殺した。腫瘍増殖を評価し、腫瘍体積を初期腫瘍体積(100mm^3)で割った比として、または総体積として示した。EA2は、正位(図4A)または皮下(図4B、D)に移植されたMDA-MB-231細胞の増殖を阻害した。EA2はまた皮下移植されたA549細胞の増殖も阻害した(図4C)。

【0213】

6.3 乳癌細胞におけるエストロゲン依存性

エストロゲン感受性乳癌細胞MCF-7をトランスフェクトし、ヒトEphA2(MCF-7^{EphA2})を安定に過剰発現させた(pNeoMSV-EphA2はScripps InstituteのT.Hunter博士より頂いた)。対応する対照と比較して、トランスフェクトした細胞でのEphA2の異所過剰発現を、ウエスタン・ブロット分析により確認した(データ示さず)。

【0214】

EphA2過剰発現は悪性増殖を増加させた(図5A~5B)。増殖は次のようにアッセイした。MCF-7^{neo}(対照細胞)もしくはMCF-7^{EphA2}細胞を96ウェルプレートに播種した。アラマーブルー(Alamar blue)(Biosource International社、Camarillo、CA)を製造者の指示に従い用以て細胞増殖を測定した。既報(Zelinskiら、2001、Cancer Res.61:2301~2306頁)に従い軟寒天内でコロニーを形成し、少なくとも3個の細胞を含む細胞群を陽性と定義し顕微鏡下でスコアした。このデータはそれぞれの試料について別々の10箇所の高倍率顕微鏡視野の平均を表し、また少なくとも3回の別々の実験を代表するものである。誤差棒は少なくとも3回の異なった実験の平均の標準誤差を表し、Microsoft Excelソフトウェアを用いて求めた。

【0215】

MCF-7対照細胞は軟寒天にコロニーを形成することがほとんどできなかったが(1視野当たり平均0.1コロニー)、MCF-7^{EphA2}細胞はより大きいまたより数多くのコロニーを形成し(1視野当たり4.7コロニー; $P < 0.01$)、それらは少なくとも3週間持続した(図5A、データ示さず)。軟寒天ではコロニー形成が増加したにも拘わらず、単層培養においてはMCF-7^{EphA2}細胞の増殖は対応する対照と相違はなく(図5B)、したがって、これは、EphA2の増殖促進活性が、固着非依存性の(悪性)細胞増殖をモデルする実験条件を使うとき、最も顕著だったことを示している。

10

20

30

40

50

【0216】

軟寒天でのコロニー形成の増加と一致し、正位に移植されたMCF-7^{EphA2}細胞はより大きいまたより急速に増殖する腫瘍をin vivoで形成した。生後6週～8週の胸腺欠損(nu/nu)マウスをHarlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN)より購入した。指示される場合、エストラジオール制御放出ペレット(0.72mgの17 β -エストラジオール、60日製剤)を滅菌した14ゲージの外針によって腫瘍移植の24時間前に皮下注入し、60日間を超え継続する実験については、60日毎にペレットを交換した。1x10⁶個のMCF-7^{neo}またはMCF-7^{EphA2}細胞を直接視覚化しながら乳房脂肪パッドに注入した。指示される場合、タモキシフェン(1mg)を経口胃管栄養法により週6日投与した。

【0217】

補充エストロゲン(17 β -エストラジオール、Sigma社より購入)の存在下で、MCF-7^{EphA2}細胞は対応する対照と比較して腫瘍の体積が2倍の増加を示した(図6A)。切除の時点において、より血管および局所浸潤的である点で、EphA2過剰発現腫瘍は対照腫瘍と表現型が異なった(データ示さず)。これらの腫瘍がEphA2を発現したことを確認するため、切除した腫瘍の細胞全体の溶解液についてEphA2特異的抗体を用いてウェスタン・ブロット分析を行った(図6B)。次いで等量のサンプルのローディングを検証するため、メンブレンを一部剥がし β -カテニン抗体で再精査した。EphA2の相対量は、入力(input)細胞(移植前)より腫瘍サンプルにおいて高く、このことは、腫瘍がEphA2レベルの高い細胞から生じたことを示している。In vitroとin vivoのモデルでの知見を比較すると、EphA2過剰発現はより攻撃的な表現型を生むことが示される。

【0218】

平行実験を外来性エストロゲンの非存在下で行った。エストロゲンを実験的に欠乏させると、対照細胞とMCF-7^{EphA2}細胞間で細胞の挙動の相違が増した。MCF-7^{EphA2}細胞は対応する対照細胞よりもより効率的に軟寒天でコロニーを形成し続けたが(図7A)、この細胞は外来性エストロゲンの非存在下では増殖しなかった(図7B)。これに対して、対照細胞が単層で増殖するには補充エストロゲンが必要であった(図7B)。またMCF-7^{EphA2}細胞は、補充エストロゲン非存在下で潜在的腫瘍形成能を保持した。対照MCF-7細胞が触知できる腫瘍を形成することは稀であったが、MCF-7^{EphA2}細胞は12週間以上持続する腫瘍を形成した(図7C、データ示さず)。このように、in vitroとin vivoのアッセイ系は共に、EphA2過剰発現は外来性エストロゲンの必要性を減少させることを確認する。

【0219】

MCF-7^{EphA2}細胞のタモキシフェンに対する感受性を測定した。タモキシフェン(4-ヒドロキシタモキシフェンをSigma社より購入)は対照MCF-7細胞の軟寒天でのコロニー形成を少なくとも60%減少させた。タモキシフェンのMCF-7^{EphA2}細胞に対する阻害作用はより控えめであった(25%の阻害、図8A)。特に、過剰量のエストラジオールはタモキシフェンの阻害効果を上回ったが、これはこの知見の特異性に対しさらなる証拠を与えるものである(図8A)。同様に、MCF-7^{EphA2}細胞の潜在的腫瘍形成能は対照(MCF-7^{neo})細胞と比較してタモキシフェンに対してより感受性が低かった(図8B)。

【0220】

タモキシフェン感受性はしばしばエストロゲン受容体発現と関連しているため、MCF-7^{EphA2}においてエストロゲン受容体の発現と活性をアッセイした。ウェスタン・ブロット分析により、対照細胞およびMCF-7^{EphA2}細胞のER α およびER β が同程度のレベルであることが明らかになった(図9A~9B)(ER α およびER β 抗体はChemicon社、Temecula, CAより購入した)。さらに、対照細胞およびMCF-7^{EphA2}細胞において同程度のレベルのエストロゲン受容体活性が検知され、またこの酵素活性はタモキシフェンに対して感受性を保っていた(図9E~9F)。エストロゲン受容体活性をERE-TK-CATベクター(これは単一のEREをコードする。Indiana大学医学部Nakshatri博士からの寛大な贈り物)を使い、無刺激状態において、エストラジオール(10⁻⁸M)刺激およびタモキシフェン(10⁻⁶M)阻害後に測定した。フェノールレッド不含で活性炭処理した血清を入れたプレートで細胞を2日間培養し、リン酸カルシウム法を使いERE-TK-CAT(5 μ g)を用いてトランスフェクトした。 β -ガラクトシダー

10

20

30

40

50

ゼ発現ベクターであるRSV/ -ガラクトシダーゼ(2 µg、Nakshatri博士の贈り物)を対照として共トランスフェクションした。適当な選択薬剤を含む新鮮な培地をトランスフェクションの24時間後に加えた。細胞を24時間後に回収し、CAT活性を既報(Nakshatriら、1997、Mol. Cell. Biol. 17:3629~3639頁)に従い評価した。これらの結果は、MCF-7^{EphA2}細胞でエストロゲン受容体が発現されタモキシフェンに対し感受性を保つことを示しており、このことは、MCF-7^{EphA2}がエストロゲンにほとんど依存しないようにさせる欠陥が、エストロゲンシグナル伝達の下流に存在することを示している。

【0221】

EphA2発現レベルを減少させた増殖MCF-7^{EphA2}細胞を軟寒天内でアッセイした。EphA2モノクローナル抗体EA2は、EphA2の活性化とそれに続く分解を誘発した。EphA2発現レベルの減少がEA2治療後2時間以内に認められ、EphA2はそれに続く少なくとも24時間検出されないままであった(図10A)。対照MCF-7細胞の軟寒天内でのコロニー形成はタモキシフェンに対し感受性があり(図10C)、EA2がこの応答性をさらに変えることはなかった(なぜなら、これらの細胞は内在性EphA2を欠いているからである。)。タモキシフェンに対し、このMCF-7^{EphA2}細胞は、対応する対照(タモキシフェンにより75%阻害)と比較して、より感受性が低かった(タモキシフェンにより25%阻害)。EA2は軟寒天内でのコロニー形成を減少(最高19%)させたが、EA2とタモキシフェンの組合せはより劇的に軟寒天内でのコロニー形成を減少(80%を超える)させた。このように、EA2での治療は対照MCF-7細胞と同程度の表現型を回復させた。EphA2を標的とした抗体は乳癌細胞のタモキシフェンに対する感受性を再び高めさせることができることを、この知見は示している。

【0222】

すべての統計分析はMicrosoft社Excel(Seattle, WA)を用い学生tテストを用いて行い、P 0.05を有意と定義した。In vivoでの腫瘍増殖分析はGraphPad Software(San Diego, CA)を使って行った。

【0223】

6.4 前立腺上皮内新生物でのEphA2発現

EphA2の免疫反応性は腫瘍性前立腺上皮細胞と非腫瘍性のものとを識別した。根治的恥骨後式前立腺全摘出の93例を、インディアナ大学医療センターの外科病理学の記録から入手した。患者の年齢は44歳から77歳にわたった(平均63歳)。根治的前立腺全摘出試料の原発腫瘍をグリーンソンの方法(Bostwick「Neoplasms of the prostate」、BostwickとEble編集、1997、Urologic Surgical Pathology、St. Louis: Mosby出版社、343~422頁; GleasonとMellinger 1974、J. Urol. 111:58~64頁)に従い分類した。グリーンソン分類は4から10にわたった。病理病期を1997年版TNM(腫瘍、リンパ節、転移)基準(Flemingら、1997、AJCC Cancer Staging Manual、Philadelphia: Raven and Lippincott出版社)に従い評価した。病理病期は、T2a(n=9患者数)、T2b(n=43)、T3a(n=27)およびT3b(n=14)であった。13患者に手術時にリンパ節転移があった。

【0224】

ホルマリン固定した根治的前立腺全摘出試料切片の5 µm厚連続切片を、免疫蛍光染色に使用した。最大量の腫瘍を含みグリーンソン分類で最も高い悪性度を持つ組織魂を選んだ。各症例を代表する1枚のスライドをそれぞれ分析した。スライドをキシレンで2回5分間脱パラフィン処理し、段階濃度のエタノールと蒸留水を用い水和した。切片をEDTA(pH 8.0)と30分間加熱することで抗原を回復した。3%のH₂O₂に15分間インキュベートすることで内在性ペルオキシダーゼ活性を不活性化した。Protein Block(DAKO社)を20分間用い非特異的結合部位をブロックした。次いで組織切片をマウス抗ヒトEphA2モノクローナル抗体(IgG1、1:100に希釈)と共に室温で一晩インキュベートし、続いてビオチン化2次抗体(DAKO社、Carpintera、CA)とペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンで処理し、そして3,3'-ジアミノベンジジン(3,3'-DAB)を過酸化水素存在下での色素原として使用した。それぞれの処理過程で陽性および陰性対照を平行処理した。

【0225】

各症例について同じスライドの良性上皮、高悪性度前立腺上皮内新生物(PIN)および腺

癌において、染色の範囲と強度を評価した。免疫反応の程度が最も高い顕微鏡視野を分析用に選んだ。各症例について少なくとも1000個の細胞を分析した。各症例について染色を示している細胞の割合を、0%から95%にわたる5%刻みの尺度で半定量的に評価した。数的な染色強度スコアを0ないし3と定める(0:染色なし、1:弱い染色、2:中程度の染色、3:強い染色)(Jiangら、2002、Am.J.Pathol.160:667~671頁;Chengら、1996、Am.J.Pathol.148:1375~1380頁)。

【0226】

良性上皮、高悪性度PINおよび腺癌における免疫反応細胞の平均割合を、ウイルコクソンランクテスト(Wilcoxon paired signed rank test)を用い比較した。良性上皮、高悪性度PINおよび腺癌におけるEphA2に対する染色強度は、相関と順序のある分類データのためのコ克蘭・マンテル・ヘンツェルテストを用い比較した。分散分析(ANOVA)で有意差が明らかになった場合は、対比較を行った。p値が0.05未満のときに有意であるとみなし、またすべてのp値は2組アッセイによるものであった。

【0227】

EphA2免疫反応は高悪性度前立腺上皮内新生物(PIN)と癌のすべての症例について認められたが、良性上皮細胞では認められなかった。例えば、EphA2発現(免疫反応細胞の平均割合および染色強度の両方)は、良性上皮細胞と比較して高悪性度PINと癌において増加した(表3および表4)。同様に、EphA2免疫反応(免疫反応細胞の平均割合および染色強度の両方)は、高悪性度PINと比較して前立腺癌において増加した(表3および表4)。この免疫反応は腫瘍性上皮細胞の細胞膜と細胞質において明らかであった(データ示さず)。これに対して、腫瘍に隣接した間質細胞ではEphA2免疫反応は認められなかった。高悪性度PIN群では、22%がグレード1の染色強度、73%がグレード2の染色強度、そして5%がグレード3の染色強度を示した(表3)。腺癌群では、13%の症例がグレード1の染色強度、50%がグレード2の染色強度、そして37%がグレード3の染色強度を示した。一方、正常な上皮群では、66%の症例がグレード1の染色強度を示したが、残りの症例はEphA2タンパク質に対する免疫反応を示さなかった(グレード0染色強度)(表3)。正常上皮細胞でのEphA2免疫反応細胞の平均割合は12%であり、高悪性度PINでは67%、そして前立腺腺癌においては85%であった(表4)。

【0228】

高レベルのEphA2は腫瘍性前立腺上皮細胞を良性のものから識別できたが、EphA2は疾患重症度の他の組織学および病理学的パラメータとは相関していなかった。例えば、大部分の前立腺癌において高レベルのEphA2が認められたが、グリーソン分類、病理病期、リンパ節転移、前立腺外拡大(extraprostatic extension)、切除断端(surgical margins)、血管浸潤、神経周囲浸潤、あるいは前立腺に他の高悪性度PIN部分が存在することは関係していなかった(表5)。

【表3】

細胞の種類	染色強度グレード			
	0	1	2	3
良性上皮	31(33%)	61 (66%)	1 (1%)	0 (0%)
高悪性度PIN ^a	0 (0%)	20 (22%)	68 (73%)	5 (5%)
腺癌 ^{a, b}	0 (0%)	12 (13%)	47 (50%)	34 (37%)

^a染色強度のパーセントは正常細胞と比較して統計的に低かったことを示す。ウイルコクソンランクテスト(Wilcoxon paired signed rank test)を用いて測定した。P値=0.0001。

^b染色強度は高悪性度PINと比較して有意に高かった。(P<0.01、コ克蘭・マンテル・ヘンツェルテスト)。

【表4】

細胞の種類	染色細胞の平均(%) ±標準偏差	範囲(%)
正常細胞	12 ± 17	0~90
高悪性度PIN	67 ± 18 ^a	5~95
腺癌	85 ± 12 ^{a,b}	30~95

^a染色のパーセントは正常細胞と比較して統計学的に低いことを示す。ウイルコクソンラングテスト(Wilcoxon paired signed rank test)を用いて測定した。P値=0.0001。

^b染色の割合は高悪性度PINと比較して有意に高い。(P<0.01、ANOVA)。

10

【表5】

患者特性	全患者数に 対する% (n=93)	細胞染色w/EphA2 抗体の平均% (±標準偏差)	平均EphA2抗体染 色強度 (±標準偏差)
グリーソン分類1			
2	12	83±2	2.0±0.6
3	43	86±10	2.3±0.7
4	23	84±16	2.3±0.7
5	15	86±11	2.3±0.6
グリーソン分類2			
2	15	82±16	2.3±0.5
3	29	85±15	2.1±0.6
4	35	85±9	2.3±0.7
5	14	88±8	2.4±0.8
グリーソンスコア(合計)			
<7	28	83±12	2.2±0.6
7	35	85±14	2.2±0.7
>7	30	87±10	2.4±0.7
T分類			
T2a	9	89±6	2.3±0.5
T2b	43	84±12	2.2±0.7
T3a	27	84±15	2.2±0.7
T3b	14	63±10	2.4±0.6
リンパ節転移			
陽性	13	88±9	2.3±0.6
陰性	80	84±13	2.2±0.7
前立腺外拡大			
陽性	53	86±11	2.3±0.7
陰性	40	84±14	2.2±0.7
切除断端			
陽性	50	86±11	2.1±0.6
陰性	43	84±13	2.4±0.7
血管浸潤			
陽性	30	85±11	2.1±0.8
陰性	63	86±13	2.3±0.6
神経周囲浸潤			
陽性	82	82±15	2.4±0.5
陰性	11	85±12	2.2±0.7
高悪性度PIN			
陽性	89	85±12	2.3±0.7
陰性	4	85±9	2.0±0.8

20

30

40

6.5 転移性乳癌患者の治療

転移性乳癌患者で本発明のアゴニストモノクローナル抗体の薬物動態および安全性を評価するための研究を設計した。癌患者は現在タキソールとタキソテールによる治療を受けている。現在治療を受けている患者はその処方による治療を継続することが許されている。

【0230】

患者に本発明のモノクローナル抗体を1回静脈投与し、次いで、12週間にわたり同量の静脈投与を毎週繰り返し、4週間後から患者を分析する。本発明のモノクローナル抗体投与の安全性ならびに疾患活性の変化の可能性を、静脈投与を行う26週間にわたり評価する。種々の群の患者に同様に投与した評価するが、1mg/kg、2mg/kg、4mg/kgおよび8mg/kgの投与量を投与する。

10

【0231】

本発明の抗体を静脈注射のために5mg/mlおよび10mg/mlの製剤とする。反復皮下投与するためには80mg/mlの製剤が必要である。この研究のための投与にはさらに、本発明の抗体を100mg/mlの製剤とする。

【0232】

変化を腫瘍増殖の進行により測定または判定する。

【0233】

6.6 EphA2抗体のエピトープ解析

EphA2抗体のエピトープを特徴付づけた。EA2およびEA5は選択的に悪性細胞に結合する。抗EphA2モノクローナル抗体であるEA2およびEA5は、免疫蛍光染色法で示されるように、良性乳房上皮腫瘍細胞MCF-10A(図11C~11D)よりも悪性乳房上皮腫瘍細胞MDA-MB-231(図11A~11B)により強く結合する。さらに、EA2は悪性前立腺細胞に対し免疫反応性を示した。抗EphA2モノクローナル抗体EA2は、ホルマリン固定しパラフィン包埋した保管臨床サンプル中の悪性前立腺癌細胞を同定した(図12)。

20

【0234】

EA2は癌細胞上に露出したEphA2エピトープに優先的に結合するが、非癌細胞上のものには結合しない。非形質転換MCF-10A細胞または形質転換MDA-MB-231細胞を、10 μ g/mlのEA2と共に4で30分間インキュベートし、その後3%のホルマリン溶液で固定し、発蛍光団結合抗マウスIgGを用いて免疫標識した。EA2は形質転換細胞上のEphA2に優先的に結合する(図13D)。これに対して、別のEphA2抗体であるEph099B-233.152(ATCC受託番号_。同時係属の米国特許出願第_号、名称「EphA2モノクローナル抗体とその使用法」、2003年5月12日出願、代理人整理番号10271-097-999を参照のこと。)は、形質転換および非形質転換の両細胞で発現されたEphA2に結合する(図13A~13B)。非形質転換MCF-10A細胞を4mMのEGTAで20分間処理すると、細胞が解離した。EA2は、EGTA処理で解離された細胞上のEphA2と結合したが、未処理の細胞と結合しなかった(図14A~14B)。

30

【0235】

同等の実験をMCF-10AもしくはMDA-MB-231細胞を使って行った。EA2がEphA2に結合する量をフロー・サイトメトリーを用いて測定した(図17C~17D)。これらの細胞は、4mMのEGTAと10~15分間氷上でインキュベーション処理の後(上段パネル)、もしくはEGTAで処理をせず(中段パネル)、10 μ g/mlのEA2とインキュベートされた。次に細胞を3%のホルマリンで固定し、発蛍光団結合抗マウスIgGを用いて標識した。対照細胞は1次抗体(EA2)不在で2次抗体(発蛍光団結合抗マウスIgG)とだけインキュベートした(下段パネル)。次いで試料をフロー・サイトメトリー(Becton Dickinson社、FACStar Plus)を用いて評価した。EGTA処置はEA2の形質変換細胞への結合には影響を与えなかった(図17D, 上段および中段パネル)。これに対して、EA2の非形質転換細胞への結合は、EGTAとのインキュベーションにより増加した(図17C, 上段および中段パネル)。

40

【0236】

EA2は、EphA2リガンドのエフリン(Ephrin)A1と同じエピトープに結合しない。マイクロタイタープレートに10mg/mlのEphrinA1-F_cを用いて4で一晩コーティングした。EphA2の細

50

胞外ドメインをヒトIgG₁定常領域(EphA2-F_c)に結合させたものからなる融合タンパク質を、固定化EphrinA1-F_cとインキュベートして結合させた。ビオチン化EphrinA1-F_cまたはEA2をEphA2-EphrinA1-F_c複合体とインキュベートし、結合量を測定した。EphA2-EphrinA1-F_c複合体にさらに結合したEphrinA1-F_cは非常にわずかであったが、一方、かなりのレベルのEA2がEphA2-EphrinA1-F_c複合体に結合した(図15A)。

【0237】

EphA2-EphrinA1-F_c複合体を上記のように調製した。次にビオチン化EA2(10 μg/ml)をこの複合体と30分間インキュベートした。非標識の競合物質を、示した量でEphA2-EphrinA1-F_c-EA2複合体とインキュベートした。非標識EA2は濃度100ng/ml以上で標識EA2を置換することができた。非標識EphrinA1-F_cは、標識EA2を有意なほどには置換しなかった(図15B)。

10

【0238】

7. 均等物

当業者は、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識し、あるいは単に日常的な実験を用いて確かめることができるはずである。こうした均等物は、特許請求の範囲に包含されるものである。

【0239】

本明細書に記載したすべての刊行物、特許および特許出願は、あたかもその各々が具体的にかつ個別に参考として本明細書に取り込まれていたと同程度に、本明細書中に参照により本明細書に取り込むものとする。

20

【0240】

International Application No: PCT/

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 67-68 , lines 1-30: 1-18 of the description ,

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT ,

Further deposits are identified on an additional sheet ,

Name of depositary institution ,

American Type Culture Collection

10

Address of depositary institution (including postal code and country) ,

10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110-2209
US

Date of deposit , May 22, 2002

Accession Number , PTA-4380

B. ADDITIONAL INDICATIONS , (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet

20

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE , (if the indications are not all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS , (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later , (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

30

E. This sheet was received with the International application when filed (to be checked by the receiving Office)



(Authorized Officer)

The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau "

was

(Authorized Officer)

40

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

10801 University Blvd.,
Manassas, VA 20110-2209
USAccession No.Date of Deposit

PTA-4381

May 22, 2002

10

【図面の簡単な説明】

【 0 2 4 1 】

【図 1 A - B】EphA2抗体は、MDA-MB-231細胞中でチロシンリン酸化およびEphA2の分解を促進する。(A、B)EA2またはEA5または対照の存在下、MDA-MB-231細胞の単層を37℃で8時間インキュベートした。次いで、細胞溶解液をEphA2特異的抗体を用いて免疫沈降させ、SDS-PAGEによって分離し、ホスホチロシン特異的抗体を用いるウェスタン・ブロット分析にかけた(A)。メンブレンを剥がし、ローディング対照として、免疫沈降で使用したEphA2特異的抗体で再精査した(B)。EphA2リン酸化レベルは、抗体のインキュベーションに伴い増大する。

20

【図 1 C】EphA2抗体は、MDA-MB-231細胞中でチロシンリン酸化およびEphA2の分解を促進する。(C)30 μg/mlのEA2またはEA5または対照の存在下、MDA-MB-231細胞の単層を37℃で24時間インキュベートした。次いで、細胞溶解液をSDS-PAGEによって分離し、EphA2特異的抗体を用いるウェスタン・ブロット分析にかけた。EphA2タンパク質レベルは、抗体のインキュベーションに伴い低下する。比較のための分子量標準の移動度を各プロットの左に示す。抗体の重鎖(IgH)および軽鎖(IgL)を示す。

【図 2】EphA2抗体は、A549細胞中でチロシンリン酸化およびEphA2の分解を促進する。EA2またはEA5または対照(PBS)の存在下、A549細胞の単層を37℃で10分間(A、B)または5時間(C、D)インキュベートした。次いで、細胞溶解液をEphA2特異的抗体D7を用いて免疫沈降させ、SDS-PAGEによって分離し、ホスホチロシン特異的抗体を用いるウェスタン・ブロット分析にかけた(A、C)。メンブレンを剥がし、ローディング対照として、免疫沈降で用いたEphA2特異的抗体で再精査した(B、D)。

30

【図 3 A】EphA2抗体は、悪性腫瘍細胞の増殖をin vitroで抑制する。精製EphA2抗体を、軟寒天中で、悪性と良性の両方の腫瘍細胞と共に37℃で7日間インキュベートした。(A)A549悪性肺癌細胞を10 μg/mlまたは2.5 μg/mlのEA2またはEA5モノクローナル抗体または対照(PBS)と共にインキュベートした。用いたどちらの量の抗体も、軟寒天中で細胞増殖を抑制した。結果は、高倍率視野(HPF)あたりのコロニー数として報告する。

【図 3 B】EphA2抗体は、悪性腫瘍細胞の増殖をin vitroで抑制する。精製EphA2抗体を、軟寒天中で、悪性と良性の両方の腫瘍細胞と共に37℃で7日間インキュベートした。(B)良性MCF-7乳房上皮腫瘍細胞は、EphA2(MCF-7^{EphA2})の過剰発現によって悪性細胞に変換された。両方の腫瘍細胞型をEA2モノクローナル抗体または対照(PBS)と共にインキュベートした。EA2は、MCF-7^{EphA2}細胞が軟寒天中で増殖する能力を阻害する。結果は、高倍率視野(HPF)あたりのコロニー数として報告する。

40

【図 4 A - C】EphA2抗体EA2は、腫瘍細胞増殖をin vivoで阻害する。MDA-MB-231乳癌細胞を胸腺欠損マウスの(A)正位(orthotopically)または(B)皮下に移植した。(C)A549肺癌細胞を胸腺欠損マウスに皮下移植した。腫瘍が平均体積100mm³に成長した後、マウスに表示の抗体または陰性対照(PBSまたは1A7抗体)6mg/kgを3週間にわたり週2回腹腔内投与した。腫瘍増殖を評価し、腫瘍体積を初期腫瘍体積(100mm³)で割った比として示した。陰性対照が黒色で、EA2が白色である。

【図 4 D】EphA2抗体EA2は、腫瘍細胞増殖をin vivoで阻害する。(D)MDA-MB-231乳癌細胞

50

を胸腺欠損マウスに皮下移植した。腫瘍が平均体積 100mm^3 に成長した後、マウスに表示の抗体または陰性対照 6mg/kg を3週間にわたり週2回腹腔内投与した。屠殺後、総腫瘍体積を決定した。陰性対照が黒色で、EA2が白色である。

【図5】EphA2の過剰発現によって、悪性細胞の増殖が選択的に増大する。(A) 1mg/ml の17-エストラジオールの存在下で、 1×10^5 個の対照細胞(白色バー)またはMCF-7^{EphA2}細胞(黒色バー)を軟寒天中に懸濁させ、14日後に顕微鏡で評価した。EphA2を形質移入した細胞は、対応する対照(1コロニー/HPF; $P < 0.01$)よりも多くのコロニー(47コロニー/高倍率視野(HPF))を形成した。(B)単層増殖アッセイでは、対照細胞(白色の円)の増殖とMCF-7^{EphA2}細胞の増殖(黒色の正方形)とを区別しなかった。

【図6】EphA2の過剰発現によって、腫瘍化の可能性が増大する。(A)補充エストロゲン($1 \mu\text{M}$ の17-エストラジオール)の存在下で、 1×10^6 個の対照細胞(白色の円)またはMCF-7^{EphA2}細胞(黒色の正方形)を胸腺欠損マウスの乳房脂肪パッド(1群あたり $n=20$ 匹)に移植した。MCF-7^{EphA2}細胞によって形成された腫瘍は、対応する対照によって形成された腫瘍よりも有意に大きかった($P=0.027$)。 (B)入力細胞(input)または切除した腫瘍から単離した同等量のタンパク質溶解液(T)をEphA2抗体(D7)を用いるウェスタン・ブロット分析によって評価した。メンブレンを剥がし、ローディング対照として、 β -カテニンに特異的な抗体で再精査した。

【図7】EphA2の過剰発現によって、エストロゲンへの依存性が低減する。(A) 1×10^5 個の対照細胞(白色バー)またはMCF-7^{EphA2}細胞(黒色バー)を外来エストロゲンなしで軟寒天中に懸濁させ、14日後にコロニー形成を顕微鏡で評価した。MCF-7^{EphA2}細胞の単層増殖(B)および腫瘍化可能性(C)(黒色の正方形)は、補充エストロゲン不在下では、対応する対照(白色の円)よりも増大した(それぞれ $P < 0.01$ および $P < 0.004$)。

【図8】EphA2の過剰発現によって、タモキシフェンに対する感受性が低減する。(A) $1 \mu\text{M}$ のタモキシフェン(TAM)および/または $1 \mu\text{M}$ の17-エストラジオールの存在下で、 1×10^5 個のMCF-7細胞またはMCF-7^{EphA2}細胞を軟寒天中に懸濁させ、14日後にコロニー形成を顕微鏡で評価した。(B)補充エストロゲンの存在下で、MCF-7細胞(円)またはMCF-7^{EphA2}細胞(正方形)を乳房脂肪パッド(1群あたり $n=15$)に移植した。移植してから17日後にタモキシフェン処置を開始した。タモキシフェン処置(黒色の円および正方形)および生理食塩水処置動物(白色の円および正方形)の腫瘍体積を表示の時間に測定した。MCF-7^{EphA2}に対するタモキシフェンの抑制効果が対照細胞に対するものより小さいことに留意されたい($P=0.01$)。

【図9 A - D】MCF-7^{EphA2}細胞中でエストロゲン受容体が発現されるが、機能が変更される。MCF-7^{neo}対照細胞およびMCF-7^{EphA2}細胞中の(A)ER α および(B)ER β レベルをEphA2特異的抗体(D7)を用いるウェスタン・ブロット分析によって評価した。(C、D)メンブレンを剥がし、ローディング対照として、 β -カテニンに特異的な抗体で再精査した。

【図9 E - F】MCF-7^{EphA2}細胞中でエストロゲン受容体が発現されるが、機能が変更される。(E、F)CATレポーター系を使用してエストロゲン受容体活性を測定すると、対照細胞とMCF-7^{EphA2}細胞のエストロゲン受容体活性が同等であることが明らかになった。3回の実験を平均した結果を(F)のグラフに示す。E2はエストロゲン処置を示し、TAMはタモキシフェン処置を示し、変換率(%)は、CAT酵素によってアセチル化されていない基質(非AC)からアセチル化された基質(AC)へと変換された基質の量を示す。

【図10】EphA2アゴニスト抗体EA2によって、悪性の増殖が低減する。 $3 \mu\text{g/ml}$ のEA2の存在下、MCF-7EPhA2細胞を表示の時間だけインキュベートした後、サンプルを抜き取り、EphA2特異的抗体(D7)を用いるウェスタン・ブロット分析を行った。(B)メンブレンを剥がし、ローディング対照として、 β -カテニンに特異的な抗体で再精査した。(C)タモキシフェン(TAM、 $1 \mu\text{M}$)およびEphA2アゴニスト抗体(EA2、 $10 \mu\text{g/ml}$)の存在下又は不在下で、 1×10^5 個の対照細胞またはMCF-7^{EphA2}細胞を軟寒天中に懸濁させた。EA2によって、MCF-7^{EphA2}細胞のタモキシフェンに対する感受性が増大したことに留意されたい。

【図11】EA2およびEA5は、悪性細胞に選択的に結合する。抗EphA2モノクローナル抗体EA2(A、C)およびEA5(B、D)は、免疫蛍光染色によって示されるように、良性のMCF-10A乳房

10

20

30

40

50

上皮腫瘍細胞(C、D)よりも悪性のMDA-MB-231乳房上皮腫瘍細胞(A、B)と強く結合する。

【図12】EA2は、悪性前立腺細胞に対して免疫反応性である。抗EphA2モノクローナル抗体EA2は、ホルマリン固定しパラフィンに包埋した保存臨床標本において、悪性前立腺癌細胞を同定した。

【図13】EphA2 EA2抗体は、癌細胞と優先的に結合する。非形質転換MCF-10A細胞(A、C)または形質転換MDA-MB-231細胞(B、D)を、10 µg/mlのEph099B-233.152(A、B)またはEA2(C、D)と共に4でインキュベートした後、固定し、発蛍光団結合抗マウスIgGで免疫標識した。

【図14】EphA2 EA2抗体は、細胞-細胞接触の低減によって露出したEphA2エピトープに優先的に結合する。(A、B)EGTAによる処理の前(A)または後(B)に、非形質転換MCF-10A細胞を4でEA2によって標識してから、固定し、発蛍光団結合抗マウスIgGで免疫標識した。(C、D)EGTAによる処理の前(グラフ中央)または後(グラフ上部)に、非形質転換MCF-10A細胞(C)または形質転換MDA-MB-231細胞(D)をEA2で標識した。対照細胞を2次抗体のみと共にインキュベートした(グラフ下部)。フロー・サイトメトリーを使用して、EA2-EphA2結合の量を測定した。

【図15】EphA2 EA2エピトープは、リガンド結合部位とは異なる。(A)EphA2-F_cを固定化エフリン(Ephrin)A1-F_cと共にインキュベートし、それに結合させた。標識エフリンA1-F_c(黒色)またはEA2(白色)をEphA2-エフリンA1-F_c複合体と共にインキュベートし、結合量を測定した。(B)EphA2-F_cを固定化エフリンA1-F_cと共にインキュベートし、それに結合させた。次いで、標識EA2をEphA2-エフリンA1複合体と共にインキュベートした。非標識の競合物質を表示の量のEphA2-エフリンA1-EA2複合体と共にインキュベートした。競合物質は、エフリンA1-F_c(黒色)またはEA2(白色)とした。

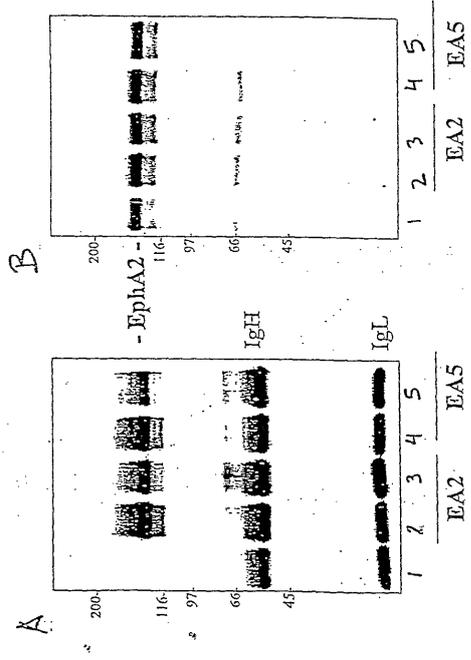
【図16A】EA2のVLおよびVHの配列。EA2の(A)VL(それぞれ配列番号1および9)のアミノ酸配列および核酸配列を示す。CDRの配列を示してある。

【図16B】EA2のVLおよびVHの配列。EA2の(B)VH(それぞれ配列番号5および13)のアミノ酸配列および核酸配列を示す。CDRの配列を示してある。

10

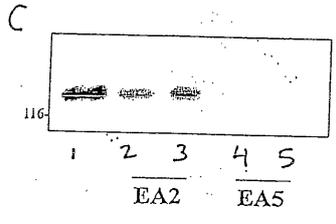
20

【 1 A - B】

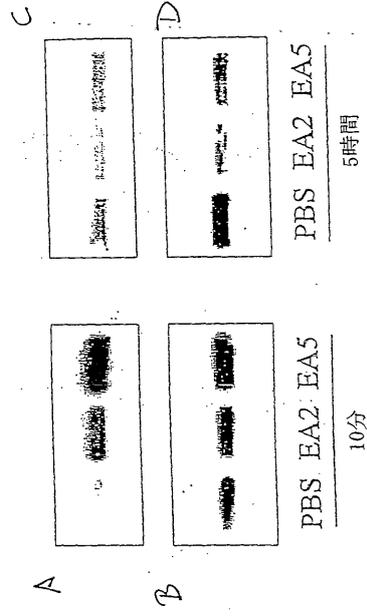


1A-1B

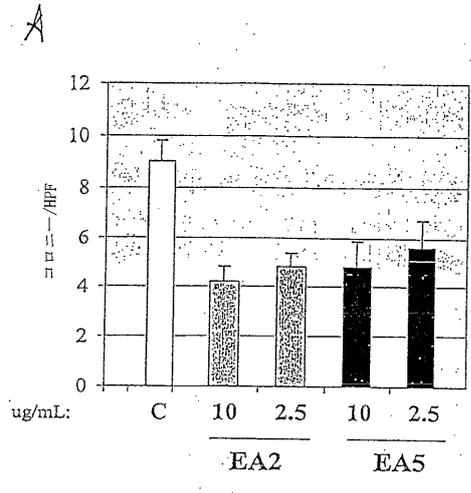
【 1 C】



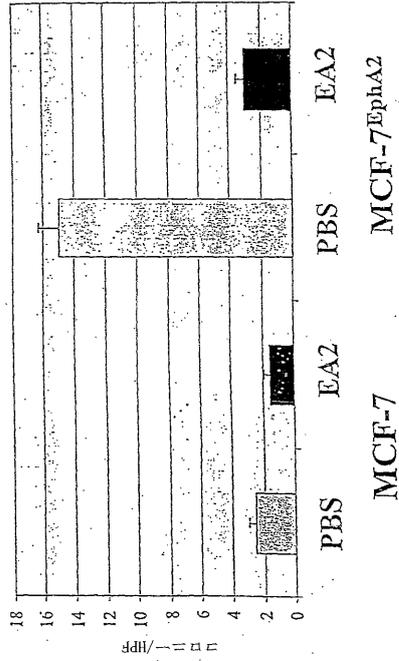
【 2】



【 3 A】

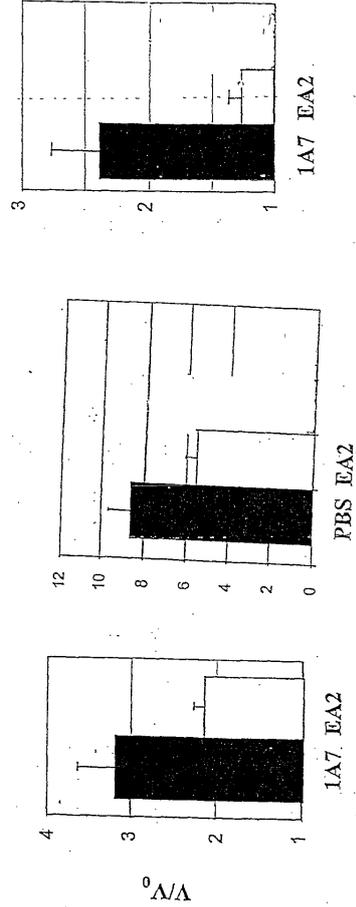


【図 3 B】



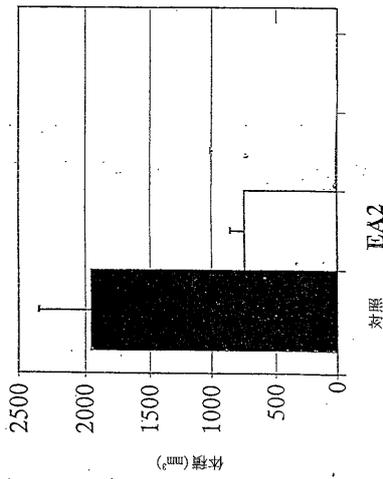
3

【図 4 A - C】

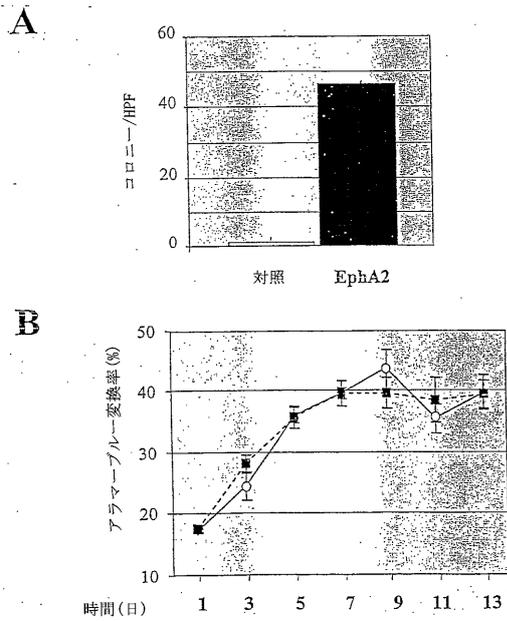


0A/A

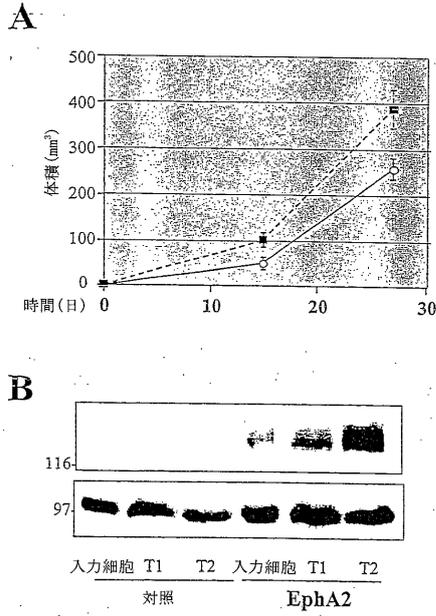
【図 4 D】



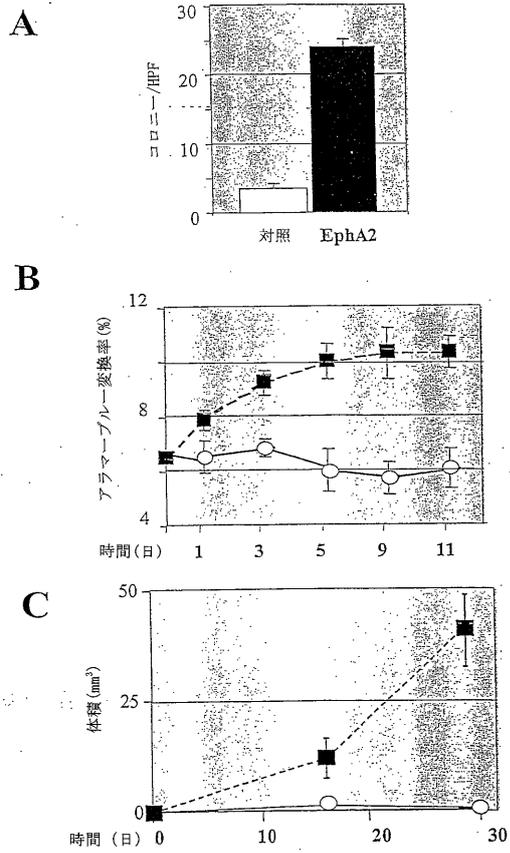
【図 5】



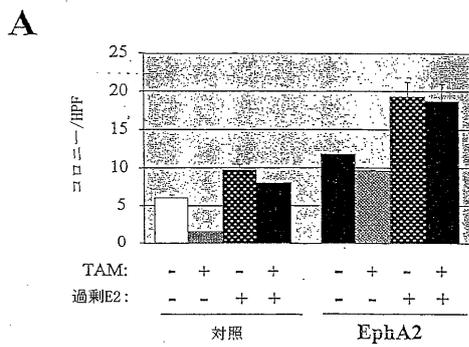
【図 6】



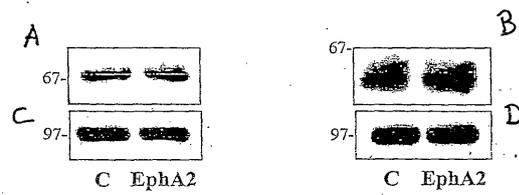
【図 7】



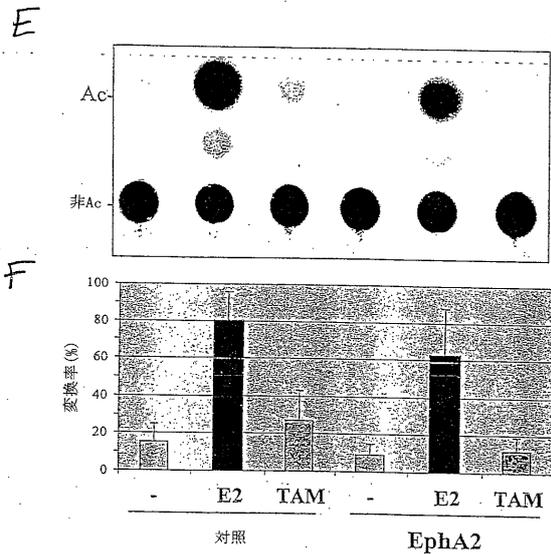
【図 8】



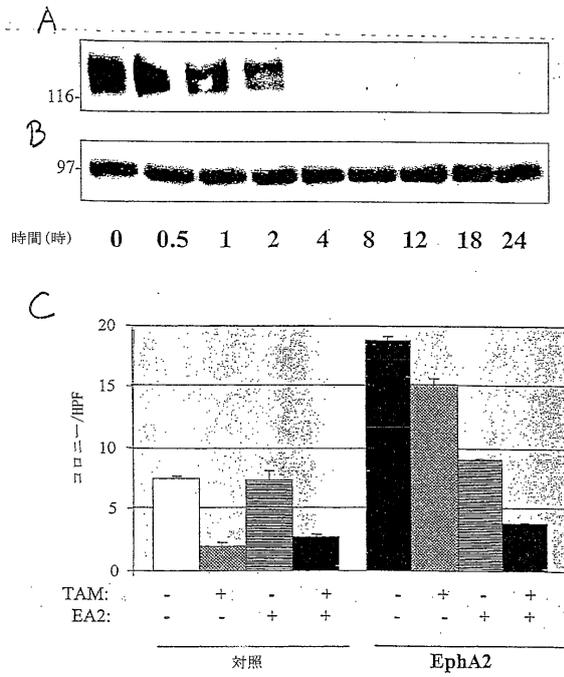
【図 9 A - D】



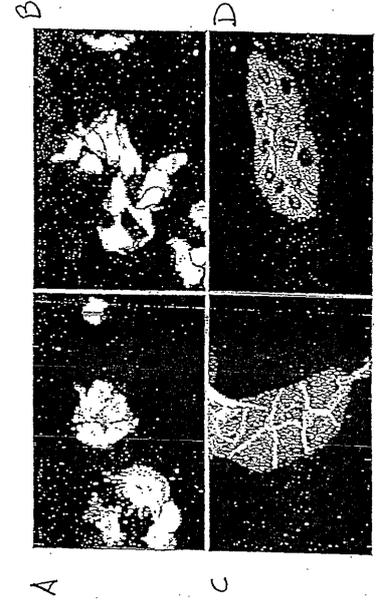
【図 9 E - F】



【図10】



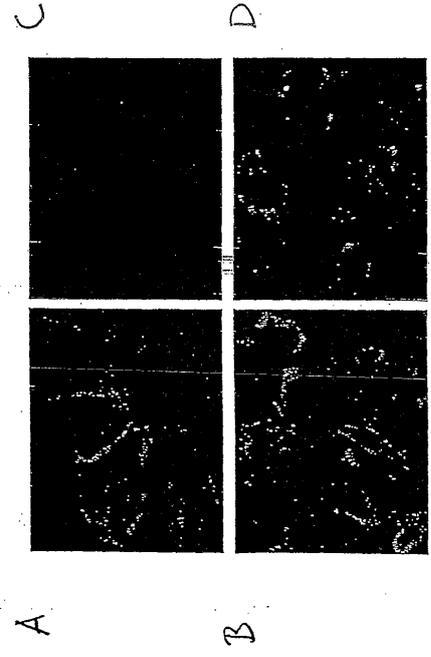
【図11】



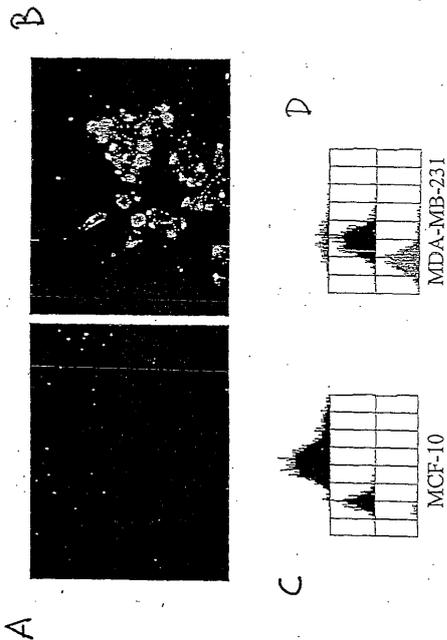
【図12】



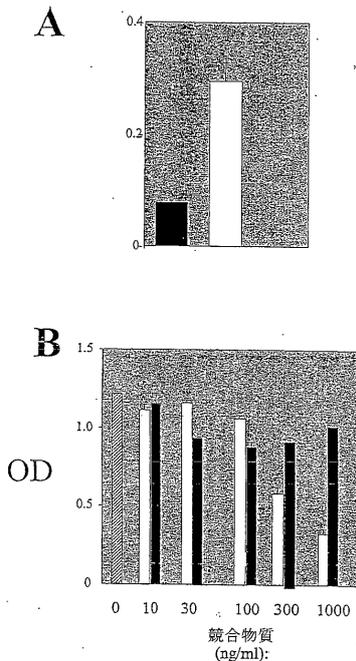
【図13】



【 14 】



【 15 】



【 16 A 】

EA2可変軽鎖

```

gac atc aag atg acc cag tct cca tct tcc atg tat gca tct cta gga 48
Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
gag aga gtc act atc act tgc aag gag agt cag gac att aat aac tat 96
Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30
tta agc tgg ttc cag cag aaa cca ggg aaa tct cct aag acc ctg atc 144
Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45
tat cgt gca aac aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
agt gga tct ggg caa gat tat tct ctg acc atc agc agc ctg gag tat 240
Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80
gaa gat atg gga att tat tat tgt ctg aaa tat gat gag ttt cag tac 288
Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

```

【 16 B 】

EA2可変重鎖

```

gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
tcc ctg aaa ctg tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
acc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc 144
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
gca acc att agt agt ggt ggt act tac acc tac tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc agg aac acc ctg tac 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
ctg caa atg agc agt ctg aag tct ggg gac aca gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
aca aga gaa gct atc ttt act tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act 336
Thr Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
gtc tct gca 345
Val Ser Ala
115

```

【配列表】

0004585968000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
			C 1 2 P	21/08	

(31)優先権主張番号 60/460,358
 (32)優先日 平成15年4月3日(2003.4.3)
 (33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-4380
 微生物の受託番号 ATCC PTA-4381

(74)代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100096183
 弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773
 弁理士 藤田 節

(72)発明者 キンチ, マイケル, エス.
 アメリカ合衆国 2 0 8 8 2 メリーランド州, レイトンズヴィル, フーヴァー ファーム ドラ
 イブ 1 9 6 2 7

(72)発明者 カールズ - キンチ, ケリー
 アメリカ合衆国 2 0 8 8 2 メリーランド州, レイトンズヴィル, フーヴァー ファーム ドラ
 イブ 1 9 6 2 7

(72)発明者 スチュワート, ジェーン, シー.
 アメリカ合衆国 4 7 9 0 6 インディアナ州, ウェスト ラファイエット, ウィンドウッド レ
 ーン 1 0 1 5

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 国際公開第01/012172(WO, A1)
 Cell Growth & Differentiation, 1999年, Vol.10, p.629-638

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09
 C07K 16/32
 C12P 21/08
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)