

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-524693

(P2006-524693A)

(43) 公表日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 5
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-510024 (P2006-510024)	(71) 出願人	504333972 メディミュン、インコーポレーテッド アメリカ合衆国 20878 メリーラン ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メディミ ュン ウェイ
(86) (22) 出願日	平成16年4月12日 (2004. 4. 12)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月5日 (2005. 12. 5)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/011482	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02004/091375	(74) 代理人	100119183 弁理士 松任谷 優子
(87) 国際公開日	平成16年10月28日 (2004. 10. 28)		
(31) 優先権主張番号	60/462, 024		
(32) 優先日	平成15年4月11日 (2003. 4. 11)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E p h A 2 および非腫瘍性過増殖性細胞障害

(57) 【要約】

本発明は、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害、特に上皮細胞または内皮細胞の過増殖に関わる障害の治療、処置または予防を意図した方法および組成物に関する。1つの実施形態においては、本発明の方法は、EphA2作動性細胞においてEphA2に結合し且つEphA2細胞質尾部リン酸化を増強し及び/又はEphA2自己リン酸化を増強する1以上のEphA2作動性物質の有効量の投与を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の方法は、EphA2に結合し且つEphA2活性(自己リン酸化以外)を減少させる1以上のEphA2作動性物質の有効量の投与を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の方法は、EphA2に結合し且つ病原性細胞表現型(例えば、病原性上皮細胞表現型または病原性内皮細胞表現型)を軽減する1以上のEphA2作動性物質の有効量の投与を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の方法は、非常に低い K_{off} 速度でEphA2に結合するEphA2抗体である1以上のEphA2作動性物質の有効量の投与を含む。好ましい実施形態においては、本発明の物質はモノクローナル抗体である。本発明はまた、本発明の1以上のEphA2作動性物質を、単独で、または非腫瘍性過増殖性細胞もしくは過剰細胞蓄積障害に対する療法において有用な1以上の他の物質と組合されて含む医薬組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

非腫瘍性過増殖細胞または過剰細胞蓄積障害の治療を要する患者における非腫瘍性過増殖細胞または過剰細胞蓄積障害の治療方法であって、EphA2作動性物質の治療的に有効な量を該患者に投与することを含んでなり、該EphA2作動性物質がEphA2に結合し、かつ、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、病原性細胞表現型を軽減し、またはEphA2活性を減少させ、該活性が自己リン酸化以外であることを特徴とする方法。

【請求項2】

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺線維症、アスベスト肺、IPF、DIP、UIP、腎線維症、肝線維症、他の線維症、気管支過剰応答、乾癬および脂漏性皮膚炎よりなる群から選ばれる過増殖性上皮細胞障害である、請求項1記載の方法。 10

【請求項3】

過増殖性上皮細胞障害の病原性細胞表現型が、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、炎症性因子の分泌または上皮細胞もしくは内皮細胞の過増殖である、請求項2記載の方法。

【請求項4】

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害が、再狭窄、過増殖性血管疾患、ペーチェット症候群、アテローム性動脈硬化症および黄斑変性よりなる群から選ばれる過増殖性内皮細胞障害である、請求項1記載の方法。 20

【請求項5】

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害が過増殖性線維芽細胞障害である、請求項1記載の方法。

【請求項6】

過増殖性内皮細胞障害の病原性細胞表現型が、増加した細胞遊走、細胞体積、細胞外マトリックス分子の分泌、マトリックスメタロプロテイナーゼの分泌または内皮細胞過増殖である、請求項4または5記載の方法。

【請求項7】

該EphA2作動性物質が抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項1記載の方法。 30

【請求項8】

該EphA2作動性物質が、小分子アゴニスト、酵素活性アンタゴニスト、リボザイム、siRNAおよびEphA2アンチセンス分子よりなる群から選ばれる、請求項1記載の方法。

【請求項9】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項7記載の方法。

【請求項10】

モノクローナル抗体が、抗体-EphA2結合に適した条件下、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2に結合する、請求項9記載の方法。

【請求項11】

モノクローナル抗体がEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248もしくはB233である、またはEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248もしくはB233由来のCDRを含む、請求項9記載の方法。 40

【請求項12】

モノクローナル抗体がヒト抗体である、請求項7、9または10のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項7、9、10または11のいずれか1項記載の方法。

【請求項14】

該投与が、未処理細胞におけるEphA2リン酸化のレベルと比較して処理細胞におけるEphA2リン酸化を増強する、請求項1記載の方法。

【請求項15】

該投与が、未処理細胞におけるEphA2発現のレベルと比較して処理細胞におけるEphA2発現を低下させる、請求項1記載の方法。

【請求項16】

1以上の追加的な非腫瘍性過増殖性細胞の投与または過剰細胞蓄積障害療法を更に含む、請求項1記載の方法。

【請求項17】

病原性上皮細胞または内皮細胞表現型が、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、フィブロネクチンの分泌、炎症性因子の分泌または上皮細胞もしくは内皮細胞の過増殖である、請求項16記載の方法。

10

【請求項18】

喘息または慢性閉塞性肺疾患の治療を要する患者における喘息または慢性閉塞性肺疾患の治療方法であって、1以上のEphA2作動性物質の治療的に有効な量を該患者に投与することを含んでなり、該EphA2作動性物質がEphA2に結合し、かつ、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、病原性細胞表現型を軽減し、またはEphA2活性を減少させ、該活性が自己リン酸化以外であることを特徴とする方法。

【請求項19】

再狭窄の治療を要する患者における再狭窄の治療方法であって、1以上のEphA2作動性物質の治療的に有効な量を該患者に投与することを含んでなり、該EphA2作動性物質がEphA2に結合し、かつ、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、病原性細胞表現型を軽減し、またはEphA2活性を減少させ、該活性が自己リン酸化以外であることを特徴とする方法。

20

【請求項20】

病原性内皮細胞表現型が、細胞遊走、細胞体積、細胞外マトリックス分子の分泌、マトリックスメタロプロテイナーゼの分泌または内皮細胞過増殖である、請求項19記載の方法。

【請求項21】

該EphA2作動性物質が抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項18または19記載の方法。

30

【請求項22】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項21記載の方法。

【請求項23】

モノクローナル抗体が、抗体-EphA2結合に適した条件下、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2に結合する、請求項22記載の方法。

【請求項24】

モノクローナル抗体がEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248またはB233である、請求項22記載の方法。

40

【請求項25】

モノクローナル抗体がヒト抗体である、請求項21、22または23のいずれか1項記載の方法。

【請求項26】

モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項21、22、23または24のいずれか1項記載の方法。

【請求項27】

1以上の免疫調節剤の投与を更に含む、請求項1、15または17のいずれか1項記載の方法。

【請求項28】

50

免疫調節剤が、IL-9に免疫特異的に結合する抗体である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

1以上の抗ウイルス剤の投与を更に含む、請求項1または17のいずれか1項記載の方法。

【請求項30】

抗ウイルス剤が抗RSV剤である、請求項29記載の方法。

【請求項31】

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を有することが判明している又は疑われる患者において、非腫瘍性過増殖性細胞もしくは過剰細胞蓄積障害を診断するための又は非腫瘍性過増殖性細胞もしくは過剰細胞蓄積障害に対する療法の有効性をモニターするための方法であって、

10

a) EphA2を作動させ、EphA2活性を減少させ又は病原性細胞表現型を軽減するEphA2抗体と該患者の細胞とを接触させ、

b) 該細胞へのEphA2抗体結合を検出することを含んでなり、

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を有さない対照患者より高いEphA2抗体結合レベルの検出が、該患者が過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を有することを示すことを特徴とする方法。

【請求項32】

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害が、喘息、慢性閉塞性肺疾患、肺線維症、気管支過剰応答、乾癬、脂漏性皮膚炎、嚢胞性線維症、再狭窄、過増殖性血管疾患、ベーチェット症候群、アテローム性動脈硬化症および黄斑変性よりなる群から選ばれる、請求項31記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2003年4月11日付け出願の米国仮特許出願第60/462,024号（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）の優先権を主張するものである。

【0002】

1. 発明の分野

本発明は、非腫瘍性過増殖性細胞（または過剰細胞蓄積）、特に過増殖性上皮細胞および内皮細胞が関わる障害の治療、処置または予防を意図した方法および組成物に関する。本発明の方法は、EphA2に結合しEphA2シグナリングを惹起してEphA2の発現および/または活性を減少させる1以上のEphA2作動性物質の有効量の投与を含む。ある実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質はEphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ、病原性細胞表現型（例えば、病原性上皮細胞表現型または病原性内皮細胞表現型）を軽減する。好ましい実施形態においては、EphA2作動性物質は、抗EphA2抗体、好ましくはモノクローナル抗体、好ましくは、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有するものである。本発明はまた、本発明の1以上のEphA2作動性物質を、単独で、または非腫瘍性過増殖性細胞もしくは過剰細胞蓄積障害に対する療法において有用な1以上の他の作用物質と組合されて含む医薬組成物を提供する。診断方法、および治療的に有用な物質のスクリーニング方法も提供する。

30

40

【背景技術】

【0003】

2. 発明の背景

EphA2

EphA2は、成体上皮内で発現される130kDaの受容体チロシンキナーゼであり、成体上皮においては、それは低レベルで見出され、細胞-細胞接着の部位において富化される（Zan tekら, Cell Growth & Differentiation 10:629, 1999; R. A. Lindbergら, Molecular & Cellular Biology 10:6316, 1990）。EphA2は、細胞膜に繋ぎ止められたリガンド（エフリン（Ephrin）A1~A5として公知である）に結合するため、この細胞下局在は重要である

50

(Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90:403; Galeら, 1997, Cell & Tissue Research 290: 227)。リガンド結合の主要な結果はEphA2の自己リン酸化である(Lindbergら, 1990, 前掲)。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ホチロシン含量の非存在下で活性を保有する(Zantekら, 1999, 前掲)。EphA2に対する抗体は既に製造されており、癌の治療において有用であることが提示されている(例えば、国際特許公開番号W0 01/12840およびW0 01/12172; 米国仮特許出願第60/379,322および60/379,368; 米国特許第5,824,303号を参照されたい)。EphA2のアップレギュレーションは、ヒト結腸癌細胞においてデオキシコール酸(DCA)によりerk1/2経路依存的に誘導される(Liら, 2003, J Cancer Res. Clin. Oncol., 129:703)。

【0004】

喘息

喘息は、間欠性気道閉塞により特徴づけられる障害である。西洋諸国においては、それは小児集団の15%および成人集団の7.5%を冒す(Strachanら, 1994, Arch. Dis. Child 70:174-178)。子供および青年におけるほとんどの喘息はハウスダストダニおよびネコ鱗屑アレルゲンのような吸入アレルゲンに対するIgE媒介性アレルギー(アトピー)により開始される。しかし、喘息患者の全てがアトピー性であるわけではなく、ほとんどのアトピー性個体は喘息を有さない。したがって、この障害を誘発するためにはアトピー以外の要因が必要である(Fraserら編, (1994) Synopsis of Diseases of the Chest. WB Saunders Company, Philadelphia: 635-53; Djukanovicら, 1990, Am. Rev. Respir. Dis. 142: 434-457)。喘息は著しく家族性であり、遺伝的要因と環境的要因との相互作用によるものである。遺伝的要因は、喘息になり易くするよう正常遺伝子の機能を改変する、正常遺伝子の変異体(「多型」)であると考えられている。

【0005】

喘息は、反復性の喘鳴および間欠性の気流制限により同定されうる。喘息傾向は気管支過剰応答の測定により定量され、この場合、ヒスタミンまたはメタコリンのような気管支収縮剤に対する個体の用量-応答曲線を作成する。該曲線は、一般には、気流における20%の減少をもたらす用量(PD20)、または最初の気流測定と最後の投与との間の曲線の傾き(勾配)により要約される。

【0006】

アトピー性応答においては、アレルゲン刺激に反応してIgEがB細胞により産生される。これらの抗体は、IgEの高アフィニティー受容体に結合することによりマスト細胞を覆い、細胞膜の不安定化および炎症伝達物質の遊離を招く一連の細胞事象を開始させる。これは粘膜炎症、喘鳴、咳、くしゃみ及び鼻づまりを引き起こす。

【0007】

アトピーは、(i)一般的なアレルゲンに反応した陽性皮膚プリック試験結果、(ii)アレルゲンに関する特異的血清IgEの存在の検出、または(iii)全血清IgEの上昇の検出により診断されうる。

【0008】

COPD

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、固定(fixed)気道障害の2つの状態、すなわち、慢性気管支炎および肺気腫を示すためにしばしば用いられる包括的な用語である。慢性気管支炎および肺気腫の最大の原因は喫煙であり、COPD患者の約90%が現在または過去における喫煙者である。喫煙者の約50%が慢性気管支炎を引き起こすが、身体障害性(disabling)気道閉塞を引き起こすのは喫煙者の15%に過ぎない。ある動物、特にウマもCOPDに罹患する。

【0009】

COPDに関連した気道閉塞は進行性であり、気道機能亢進を伴うことがあり、部分的に可逆性でありうる。非特異的気道過剰応答もCOPDの発生に何らかの役割を果たしている可能性があり、肺機能の低下の加速化を予測させうる。

【0010】

10

20

30

40

50

COPDは死亡および身体障害の重要な原因である。それは現在、米国および欧州において第4位の死亡原因である。治療指針は、該障害による罹患率および死亡率の低下を促すための早期発見および禁煙プログラムの実施を主張している。しかし、早期発見および診断は多数の理由により困難となっている。COPDは何年もかかって発生し、気管支炎の急性エピソードはCOPDの早期徴候として一般医によって気づかれないことが多い。多数の患者は2以上の障害（例えば、慢性気管支炎または喘息性気管支炎）の特徴を示し、該障害の病因の早期においては特に、明確な診断を困難にする。また、多数の患者は、肺機能の低下に伴う、より重篤な症状（例えば、呼吸困難、持続的な咳および喀痰の生成）を経験するまでは、医学的援助を望まない。結果として、大多数の患者は、該障害の、より進行した段階になるまで、診断も治療もされない。

10

【0011】

ムチン

ムチンは、気道、胃腸管、女性生殖管などの上皮細胞により分泌される糖タンパク質のファミリーである。ムチンは粘液の粘弾性をもたらす（Thorntonら, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:9561-9566）。ヒトにおいては9つのムチン遺伝子（MUC 1、MUC 2、MUC 3、MUC 4、MUC 5A、MUC 5B、MUC 6、MUC 7およびMUC 8）が発現されることが公知である（Bobekら, 1993, *J. Biol. Chem.* 268:20563-9; Dusseynら, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:3168-78; Gendlerら, 1991, *Am. Rev. Resp. Dis.* 144:S42-S47; Gumら, 1989, *J Biol. Chem.* 264:6480-6487; Gumら, 1990, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171:407-415; Lesuffleurら, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:13665-13673; Meerzamanら, 1994, *J. Biol. Chem.* 269: 12932-12939; Porchetら, 1991, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 175:414-422; Shankarら, 1994, *Biochem. J.* 300:295-298; Toribaraら, 1997, *J. Biol. Chem.* 272:16398-403）。慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患、気管支拡張症、喘息、嚢胞性線維症および細菌感染症のような多数の気道障害がムチンの過剰産生により特徴づけられる（Prescottら, *Eur. Respir. J.*, 1995, 8:1333-1338; Kimら, *Eur. Respir. J.*, 1997,10:1438; Steigerら, 1995, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 12:307-314）。ムチン分泌過多により引き起こされる粘液障害は気道粘液詰まりを引き起こし、これは慢性感染、気流閉塞および時には死を招く。例えば、ゆっくりと進行する不可逆的な気流制限により特徴づけられる障害である慢性閉塞性肺疾患（COPD）は先進国における主要死亡原因である。呼吸障害は、主として、気道壁の肥厚による内腔径の減少、ならびに杯細胞過形成および分泌過多により引き起こされる粘液の増加よりなる。上皮増殖因子（EGF）は上皮細胞増殖およびムチンの産生/分泌をアップレギュレーションすることが公知である（Takeyamaら, 1999, *PNAS* 96:3081-6; Burgelら, 2001, *J. Immunol.* 167:5948-54）。EGFは杯細胞のようなムチン分泌細胞を増殖させ、気道上皮内のムチン産生を増加させる（Leeら, 2000, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278:L185-92; Takeyamaら, 2001, *Am. J Respir. Crit. Care. Med.* 163:511-6; Burgelら, 2000, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:705-12）。歴史的には、粘液分泌過多は2通りの方法、すなわち、排除を促す物理的方法および粘液破壊剤で治療されている。いずれのアプローチも患者に対する有意な利益も粘液閉塞の軽減ももたらしてはいない。したがって、ムチン産生を減少させるための、およびムチン分泌過多に関連した障害を治療するための方法が得られれば望ましいであろう。

20

30

40

【0012】

線維症

肝臓、腎臓、肺および他の内臓の進行性線維症は、しばしば、死を招いたり移植が必要となる臓器不全を引き起こす。これらの疾患には米国および全世界において数百万人が罹患している。例えば、肝線維症は米国における非悪性胃腸疾患による主な死亡原因である。さらに、線維症の進行は、慢性肝疾患患者における罹患率および死亡率の、唯一の最も重要な決定因子であることが、益々認識されてきている（Poynard, T. P.ら, 1997, *Lancet* 349:825-832）。線維症はマトリックス成分の過剰沈着により特徴づけられる。これは、正常な組織構造の破壊および組織機能の低下を招く。

【0013】

50

肺線維症は損傷因子により引き起こされることがあり、過敏応答性肺炎および強力な炎症応答に関連している。特発性肺線維症（IPF）は、肺胞内の単核細胞、および間質におけるほとんど存在しない細胞浸潤により特徴づけられる剥離型間質性肺炎（DIP）に関連している。IPFは、斑状間質浸潤および肺胞壁肥厚により特徴づけられる通常型間質性肺炎（UIP）にも関連している。肺線維症の組織学的特徴は、肺胞壁肥厚（これは「蜂巣」効果を含みうる）、化生上皮、ならびに増殖/ECM蓄積、筋原線維芽細胞分化および線維増殖性病巣を含む線維芽細胞への変化を含む。

【0014】

創傷治癒と線維症とは類似経路をたどる。どちらも、上皮への損傷、およびそれに続く、線維芽細胞の増殖および分化ならびにECM沈着を含む。どちらも、TGF およびPDGFのような細胞シグナリングメッセンジャーにより媒介される。創傷治癒においては、創傷が治癒すると組織再生が終了する。しかし、線維症においては、細胞増殖は停止せず、連続的なECM沈着、およびプロテアーゼ活性の欠如を招く。プレオマイシンは、感受性系統のマウスへの投与の4週間以内に、肺上皮細胞死、ついで急性好中球流入、ついで慢性炎症、および実質線維症を誘発する。肺線維症のモデルとしての、プレオマイシンで処理された肺上皮細胞は、肺実質内の線維増殖および他の病的状態を含む、ヒトIPFの中心的な病的特徴を模擬する（DunsmoreおよびShapiro, 2004, J. Clin. Invest. 113:180-182）。プレオマイシンにより誘発される線維症は、Fas媒介性アポトーシスを阻止する可溶性Fasの添加により予防される（Kuwanoら, 1999, J. Clin. Invest. 104:13-9）。IPF組織の上皮におけるFas媒介性アポトーシスはFasおよび/またはFasリガンドの増加により特徴づけられる。したがって、上皮アポトーシスの低下を引き起こす可溶性Fasのような因子は線維症に対する予防をも示す。

10

20

【0015】

アスベスト肺（間質性線維症）は、アスベスト線維の吸入による、びまん性肺線維症として定義される（C. A. Staples, Radiologic Clinics of North America, 30 (6): 1195, 1992）。それは職業関連肺損傷の主要原因の1つである（Merck Index, 1999 (17th ed.), 622）。アスベスト肺は15~20年の潜伏期間の後に特徴的に生じ、暴露が停止した後であっても疾患の進行を伴い、胸膜斑の非存在下ではめったに生じない（C. Peacock, Clinical Radiology, 55: 425, 2000）。線維症は、細気管支内およびその周囲に最初に生じ、下葉内の肺の胸膜下部分において優勢であり、ついで中心部へ進行する（C. A. Staples, Radiologic Clinics of North America, 30 (6): 1195, 1992）。アスベスト肺は、空咳に加えて進行性呼吸困難の潜行性発症を引き起こしうる。アスベスト症を有する喫煙者においては肺癌の頻度が増加し、用量-応答関係が観察されている（Merck Index, 1999 (17th ed.), 623）。

30

【0016】

線維性疾患を診断し治療するための更なる方法が必要とされている。例えば、アスベスト肺のような線維性肺疾患に対する治療法で有効なものは知られていない。

【0017】

再狭窄

血管形成術、ステント留置法、アテレクトミーおよび移植を含む血管介入は、しばしば、望ましくない作用により困難となる。患者の体内に移植または挿入された医療用装置に対する暴露により、身体組織は、有害な生理反応を示す。例えば、あるカテーテルまたはステントの挿入または移植は血管内の塞栓または凝塊の形成を招きうる。血管介入に対する他の有害な反応には、過形成を招きうる内皮細胞増殖、再狭窄、すなわち、動脈の再開塞、血管の閉塞、血小板凝集および石灰化が含まれる。再狭窄の治療は、しばしば、2回目の血管形成術またはバイパス手術を含む。特に、再狭窄は、再狭窄の治療において血管介入により引き起こされる内皮細胞損傷により生じうる。

40

【0018】

血管形成術は部分閉塞アテローム性動脈硬化症病変部位の動脈内へのバルーンカテーテルの挿入を含む。バルーンの膨張は血管内膜を破壊し閉塞を拡張すると意図される。閉塞

50

の約20～30%が僅か数日または数週間のうちに再閉塞する (Eltchaninoffら, 1998, J. Am Coll. Cardiol. 32:980-984)。ステントの使用は再閉塞率を減少させるが、有意な割合が尚も再狭窄する。血管形成術後の再狭窄の率は、プラークの長さを含む多数の要因に左右される。狭窄率は、存在する危険因子に応じて10%～35%変動する。さらに、1年後の反復血管造影は、該処置を受けた血管の僅か約30%で見掛け上正常な内腔を示すに過ぎない。

【0019】

再狭窄は、バルーン損傷または臨床血管形成術の後にアテロームおよび動脈過形成病変の両方において見出される平滑筋細胞を伴った、コラーゲンおよびプロテオグリカンを含む細胞外マトリックスの蓄積により引き起こされる。平滑筋細胞増殖に関する内腔狭窄における遅延の一部は、新血管内膜平滑筋細胞によるマトリックス物質の連続的同化作用により生じうる。種々のメディエーターが *in vivo*での平滑筋細胞によるマトリックス合成を改変しうる。

10

【0020】

新血管内膜過形成

新血管内膜過形成は、移植片アテローム性動脈硬化症、狭窄症および血管移植片閉塞を引き起こす病的過程である。新血管内膜過形成は、種々の形態の血管損傷、および高圧動脈循環内への摘出的 (harvest) および外科的な移植に対する主な静脈移植片応答の後で一般に認められる。

【0021】

血管壁の中央層 (すなわち、中層 (media layer)) 内の平滑筋細胞は活性化され、分裂し、増殖し、内層 (最内層) 内へ遊走する。得られた異常な新血管内膜細胞は、サイトカイン、ケモカインおよび接着分子を含む炎症性分子を発現し、これらは、閉塞性新血管内膜疾患および最終的には移植片不全を招く事象のカスケードを更に誘発する。

20

【0022】

平滑筋細胞の増殖は新血管内膜過形成応答において決定的に重要な事象である。種々のアプローチを用いた研究は、平滑筋細胞増殖の阻止が、正常な血管表現型および機能の維持をもたらして、新血管内膜過形成および移植片不全の軽減を引き起こしたことを明らかに示している。

【0023】

前記の適応症に対する既存の治療は不適當であり、したがって、前記適応症に対する改良された治療が必要とされている。

30

【0024】

本明細書中の参考文献の引用または考察は、それが本発明の先行技術であると自認するものとして解釈されるべきではない。

【発明の開示】

【0025】

3. 発明の概要

本発明者らは、EGFがEphA2発現の増強をタンパク質およびmRNAの両方の発現のレベルで引き起こすことを見出した。特定のメカニズムにより束縛されるものではないが、EGF刺激性EphA2発現、したがって増強されたEphA2活性の直接的効果は、EGFの存在下で上皮細胞および内皮細胞における表現型変化を引き起こしうる。

40

【0026】

本発明者らは、EphA2を作動させる (すなわち、EphA2自己リン酸化を惹起する) 物質が、実際には、EphA2発現を減少させることを見出した。いずれの作用メカニズムにも束縛されることを意図するものではないが、作動性抗体は、EphA2自己リン酸化を誘導して後続のEphA2分解により発現がダウンレギュレーションされるようにすることにより、過増殖を抑制しうる。したがって、1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質はEphA2の細胞質尾部リン酸化を増強する。

【0027】

50

また、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害に罹患した対象における過増殖性細胞または過剰細胞蓄積は、非罹患対象における細胞の表現型形質とは異なる表現型形質を示す。例えば、過増殖性上皮細胞呼吸障害においては、罹患対象からの、EphA2を発現する非増殖性気道上皮細胞は、ムチン分泌の増加、ムチン分泌性細胞（例えば、杯細胞）への分化の増強、炎症性因子の分泌の増加、および過増殖または過剰細胞蓄積を示している。他の過増殖性内皮または上皮細胞障害においては、罹患対象からの、EphA2を発現する内皮または上皮細胞は、細胞遊走の増強、細胞体積の増加、細胞外マトリックス分子（例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなど）の分泌の増加、マトリックスメタロプロテイナーゼ（例えば、ゼラチナーゼ、コラゲナーゼおよびストロメリシン（stromelysin））の分泌の増加および/または過増殖を示す。

10

【0028】

したがって、本発明はまた、1以上の病原性細胞表現型を抑制する本発明のEphA2作動性物質を提供する。非腫瘍性過増殖性障害（例えば、過増殖性上皮細胞障害、例えば喘息、COPD、肺線維症、アスベスト肺、IPF、DIP、UIP、腎線維症、肝線維症、他の線維症、気管支過剰応答、乾癬、脂漏性皮膚炎、嚢胞性線維症または過増殖性内皮細胞障害、例えば再狭窄、過増殖性血管疾患、ベーチェット症候群、アテローム性動脈硬化症および黄斑変性または過増殖性線維芽細胞障害）に罹患した患者における過増殖性または蓄積性細胞を、1以上の病原性細胞表現型を軽減するそのようなEphA2作動性物質にさらすと、過増殖性障害の症状を引き起こす細胞の能力が妨げられ又は低下する。さらに、ある実施形態においては、1以上の病原性細胞表現型を軽減するそのようなEphA2作動性物質の添加は、過増殖性細胞の増殖または過剰細胞蓄積を遅延または停止させ、あるいは細胞の数の減少または排除を引き起こす（すなわち、例えば壊死またはアポトーシスを介して過増殖性細胞の殺細胞を招く）。特定の実施形態においては、該疾患または障害は前悪性細胞、例えば過形成、化生または形成異常を含む。

20

【0029】

1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は喘息ではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害はCOPDではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は乾癬ではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は肺線維症ではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は再狭窄ではない。

30

【0030】

本発明は、EphA2に結合し且つEphA2アゴニストであり及び/又はEphA2活性を減少させ及び/又は病原性細胞表現型を抑制する。EphA2作動性物質は抗体、好ましくはモノクローナル抗体であり、これは、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有しうる。1つの実施形態においては、本発明の方法において使用する抗体はEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5である。より一層好ましい実施形態においては、本発明の方法において使用する抗体はヒトまたはヒト化Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5である。

【0031】

したがって、本発明は、EphA2に結合し且つEphA2細胞質尾部リン酸化を増強しEphA2自己リン酸化を増強しEphA2発現および/または活性（自己リン酸化以外）を減少させ及び/又は病原性細胞表現型（例えば、病原性上皮細胞表現型または病原性内皮細胞表現型）を減少させる本発明の1以上のEphA2作動性物質を投与することを含む、対象におけるEphA2の過剰発現および/または非腫瘍性過増殖（特に上皮細胞または内皮細胞におけるもの）に関連した障害を予防、治療または処置することを意図した予防および治療計画ならびに医薬組成物に関する。

40

【0032】

好ましい実施形態においては、EphA2作動性物質は、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、炎症性因子の分泌、非腫瘍性細胞の過増殖、細胞遊走（好ましい実施形態においては、転移を除く）、細胞体積および/または細胞外マトリックス分子

50

もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼ、例えばフィブロネクチンの分泌を減少させる。好ましい実施形態においては、本発明の方法は、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害、特に、上皮細胞または内皮細胞の過増殖および/蓄積あるいは線維芽細胞の過増殖を示す（そして、ある程度は、それらにより引き起こされたり悪化する）障害の症状を予防、治療または処置するために使用する。本発明の物質は、1以上の他の非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害療法と組合せて投与することが可能である。特に、本発明は、本発明の1以上のEphA2作動性物質の治療的または予防的に有効な量を、本発明のEphA2作動性物質の投与以外の1以上の他の非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害療法の治療的または予防的に有効な量の投与と組合せて対象に投与することを含む、対象における非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を予防、治療または処置するための方法を提供する。他の実施形態においては、本発明は、本発明のEphA2作動性物質と組合せて免疫調節剤、EphA4作動性物質または抗ウイルス剤を投与することによる、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療、予防または処置するための方法を提供する。好ましい実施形態においては、呼吸器感染に関連した呼吸障害、例えば喘息、COPD、線維症、気管支過剰応答、嚢胞性線維症などを、1以上のEphA2作動性物質および1以上の抗呼吸器剤、例えば抗RSV抗体（例えば、パリピズマブ（palivizumab）またはA4B4；2001年11月28日付け出願のPCT出願番号PCT/US01/44807を参照されたい）、抗HMPV抗体および/または抗PIV抗体で治療、処置または予防する。

10

【0033】

本発明の方法および組成物は、未治療の患者において有用であるばかりでなく、現在の標準的および実験的な非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害療法に対して部分的または完全に治療抵抗性の患者の治療においても有用である。

20

【0034】

また、本発明は、本発明のEphA2作動性物質のスクリーニング方法を提供する。特に、候補EphA2作動性物質は、EphA2への結合およびEphA2細胞質尾部リン酸化の増強、EphA2自己リン酸化の増強またはEphA2活性（自己リン酸化以外）の減少、EphA2分解の増強、病原性細胞表現型の軽減に関してスクリーニングされうる。本発明のEphA2作動性物質が抗体である実施形態においては、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有する抗体を同定するために、当技術分野でよく知られた抗体結合動力学のアッセイ（例えば、BIACOREアッセイ）を用いて、EphA2抗体をスクリーニングすることが可能である。

30

【0035】

もう1つの実施形態においては、病原性細胞表現型を抑制するEphA2作動性物質を同定するために、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞への上皮細胞の分化、炎症性因子の分泌、非腫瘍性過増殖、非腫瘍性細胞遊走、細胞体積の増加および/または細胞外マトリックス分子もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼの分泌を予防または軽減する能力に関して候補物質をスクリーニングすることが可能である。

【0036】

本発明は更に、非腫瘍性過増殖性細胞障害の治療の効力を評価するために本発明のEphA2抗体を使用する診断方法を提供し、この場合、モニターする治療は、EphA2に基づくもの、またはEphA2に基づかないものでありうる。一般に、EphA2発現の増強は非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の症状の増強に関連している。したがって、個々の治療によるEphA2発現（例えば、EphA2 mRNAまたはポリペプチドの発現）の軽減は、治療が非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の症状を改善していることを示す。本発明の診断方法は、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を予知または予測するためにも使用することが可能である。本発明の抗体は、凍結または固定細胞または組織アッセイの免疫組織化学的分析にも使用することが可能である。

40

【0037】

もう1つの実施形態においては、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。

【0038】

50

3.1. 定義

本明細書中で用いる「物質」なる語は、所望の生物学的効果を有する分子を意味する。物質には、限定するものではないがペプチド、ポリペプチド、タンパク質（翻訳後修飾タンパク質を含む）、抗体などを含むタンパク質性分子；または小分子（1000ダルトン未満）、無機もしくは有機化合物；または限定するものではないが二本鎖もしくは一本鎖DNAまたは二本鎖もしくは一本鎖RNAおよび三本鎖核酸分子を含む核酸分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。物質は、任意の公知生物（動物、植物、細菌、真菌および原生生物またはウイルスを含むが、これらに限定されるものではない）から、あるいは合成分子のライブラリーから誘導されうる。EphA2作動性物質である物質は、EphA2に結合し、かつ、EphA2発現および/または活性（自己リン酸化以外）を減少させ、および/または病原性細胞表現型を軽減する（例えば、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、炎症性因子の分泌、細胞過増殖、細胞遊走、細胞体積、細胞外マトリックス分子もしくはマトリックスメタロプロテナーゼの分泌を減少させる）。好ましい実施形態においては、EphA2作動性物質は、抗体、好ましくは、モノクローナル抗体、好ましくは、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有するものである。EphA2作動性物質である抗体は、EphA2リガンド結合部位内に存在するエピトープに結合しても、結合しなくてもよい。

10

【0039】

本明細書中で用いる「EphA2に免疫特異的に結合する抗体またはそのフラグメント」なる語は、EphA2ポリペプチドまたはEphA2ポリペプチドのフラグメント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フラグメントを意味する。好ましくは、EphA2ポリペプチドまたはそのフラグメントに免疫特異的に結合する抗体またはフラグメントは他の抗原とは交差反応しない。EphA2ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体またはフラグメントは、イムノアッセイまたは当業者に公知の他の技術により同定することが可能である。本発明の抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え法により製造された抗体、多重特異性抗体（二重特異性抗体を含む）、ヒト抗体（例えば、単一特異性、二重特異性など）、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、イントラボディ（intrabody）、一本鎖Fv（scFv）（例えば、単一特異性、二重特異性など）、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド連結Fv（sdFv）および抗イディオタイプ（抗Id）抗体、イントラボディ（intrabody）、および前記のいずれかのものでエピトープ結合性フラグメントが含まれるが、これらに限定されるものではない。特に、本発明の抗体には、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、EphA2抗原に免疫特異的に結合する抗原結合性部位（例えば、抗EphA2抗体の相補性決定領域（CDR）の1以上）を含有する分子が含まれる。好ましくは、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作動性抗体またはフラグメントはEphA2を作動させるに過ぎず、他の活性を有意には作動させない。

20

30

【0040】

本明細書中で用いる「腫瘍性」なる語は、非腫瘍性細胞とは異なる表現型形質、例えば、軟寒天のような三次元基質におけるコロニーの形成または三次元基底膜もしくは細胞外マトリックス調製物（例えば、MATRIGEL（商標））における管状網状構造体もしくはクモの巣状マトリックスの形成を示し遠隔部位へ転移する能力を有する細胞が関わる疾患に関するものである。非腫瘍性細胞は軟寒天内では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において、特徴的な球状構造体を形成する。腫瘍細胞は、その発生中に、種々のメカニズムを介して、特徴的な一連の機能的能力を獲得する。そのような能力には、アポトーシスの回避、増殖シグナルの自己充足、抗増殖シグナルに対する不感受性、組織侵襲/転移、無制限な複製能、および持続的血管新生が含まれる。したがって、「非腫瘍性」は、その状態、疾患または障害が癌細胞を含まないことを意味する。

40

【0041】

本明細書中で用いる「誘導體」なる語は、アミノ酸残基の置換、欠失または付加の導入により改変された、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、EphA2ポリペプチド

50

に免疫特異的に結合する抗体、またはEphA2ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体フラグメントのアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。本明細書中で用いる「誘導体」なる語は、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、EphA2ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体、またはEphA2ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体フラグメントのうち、修飾されているもの、すなわち、該ポリペプチドへの任意のタイプの分子の共有結合により修飾されているものをも意味する。例えば、限定するものではないが、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体または抗体フラグメントを、例えばグリコシル化、アセチル化、ペジル化(pegylation)、リン酸化、アミド化、公知保護/遮断基による誘導体化、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への連結などにより修飾することが可能である。EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体または抗体フラグメントの誘導体は、限定するものではないが特異的・化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシン(tunicamycin)の代謝的合成などを含む当業者に公知の技術を用いる化学的修飾により修飾することが可能である。さらに、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体または抗体フラグメントの誘導体は1以上の非古典的アミノ酸を含有しうる。1つの実施形態においては、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、抗体または抗体フラグメントと類似または同一の機能を有する。もう1つの実施形態においては、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体または抗体フラグメントの誘導体は、未改変ポリペプチドと比べて改変された活性を有する。例えば、誘導体抗体またはそのフラグメントは、そのエピトープに、より強固に結合し、またはタンパク質分解に対して、より抵抗性でありうる。

10

20

【0042】

本明細書中で用いる「EphA2アゴニスト」は、EphA2タンパク質のリン酸化およびそれに続く分解の増強を引き起こす、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗体フラグメント、大分子または小分子(1000ダルトン未満)を含む任意の物質を意味する。また、抗体であるEphA2作動性物質は、低い K_{off} 速度を有していても、有していなくてもよい。

【0043】

本明細書中で用いる「エピトープ」なる語は、動物における、好ましくは哺乳動物における、最も好ましくはヒトにおける抗原性または免疫原性活性を有する、EphA2ポリペプチドの部分の意味する。免疫原性活性を有するエピトープは、動物において抗体応答を惹起する、EphA2ポリペプチドの部分である。抗原性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)により測定した場合に抗体が免疫特異的に結合する、EphA2ポリペプチドの部分である。抗原性エピトープは必ずしも免疫原性である必要はない。

30

【0044】

本明細書中で用いる「断片(フラグメント)」なる語は、EphA2ポリペプチドまたはEphA2ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体のアミノ酸配列の少なくとも5個の連続的アミノ酸残基、少なくとも10個の連続的アミノ酸残基、少なくとも15個の連続的アミノ酸残基、少なくとも20個の連続的アミノ酸残基、少なくとも25個の連続的アミノ酸残基、少なくとも40個の連続的アミノ酸残基、少なくとも50個の連続的アミノ酸残基、少なくとも60個の連続的アミノ酸残基、少なくとも70個の連続的アミノ酸残基、少なくとも80個の連続的アミノ酸残基、少なくとも90個の連続的アミノ酸残基、少なくとも100個の連続的アミノ酸残基、少なくとも125個の連続的アミノ酸残基、少なくとも150個の連続的アミノ酸残基、少なくとも175個の連続的アミノ酸残基、少なくとも200個の連続的アミノ酸残基または少なくとも250個の連続的アミノ酸残基のアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを包含する。好ましくは、抗体フラグメントはエピトープ結合性フラグメントである。

40

【0045】

本明細書中で用いる「ヒト乳児」なる語は、24月齢未満、好ましくは16月齢未満、12月齢未満、6月齢未満、3月齢未満、2月齢未満または1月齢未満のヒトを意味する。早産ヒト

50

乳児は、少なくとも40週未満の妊娠持続期間、35週未満の妊娠持続期間において産まれたヒトを意味する。特定の実施形態においては、早産ヒト乳児は30～35週の妊娠持続期間のものである。特定の実施形態においては、早産ヒト乳児は35～38週の妊娠持続期間のものである。ある実施形態においては、早産ヒト乳児は38週の妊娠持続期間のものであり、好ましくは、乳児は38週未満の妊娠持続期間のものである。

【0046】

本明細書中で用いる「ヒト化抗体」なる語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限度の配列を含有する非ヒト（例えば、マウス）抗体、好ましくはキメラ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または相補性決定（CDR）残基が、所望の特異性、アフィニティー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のような非ヒト種からの抗体（ドナー抗体）からの超可変領域残基またはCDR残基により置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合には、構造モデリングに基づき、例えば、ヒト化抗体のアフィニティーを改善するために、ヒト免疫グロブリンの1以上のフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基または他の残基により置換される。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には見出されない残基を含みうる。これらの修飾は、抗体の性質を更に改良するために行われる。一般に、超可変領域の全て又は実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものとして一致しており、FRの全て又は実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを、ヒト化抗体は含む。ヒト化抗体は、所望により、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのFcの少なくとも一部を含む。更なる詳細は、Jonesら、1986、Nature 321: 522-525; Reichmannら、1988、Nature 332:323-329; Presta、1992、Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596、Queenら、米国特許第5,585,089号を参照されたい。

【0047】

本明細書中で用いる「過増殖性細胞障害」および「過剰細胞蓄積障害」は、腫瘍性でない障害であって、細胞過増殖または任意の形態の過剰細胞蓄積が該障害の病的な状態または症状を引き起こす又はそれに寄与する障害を意味する。いくつかの実施形態においては、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害は上皮細胞の過増殖により特徴づけられる。過増殖性上皮細胞障害には、喘息、COPD、肺線維症、気管支過剰応答、乾癬、脂漏性皮膚炎および嚢胞性線維症が含まれるが、これらに限定されるものではない。他の実施形態においては、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害は内皮細胞の過増殖により特徴づけられる。過増殖性内皮細胞障害には、再狭窄、過増殖性血管疾患、ベーチェット症候群、アテローム性動脈硬化症および黄斑変性が含まれるが、これらに限定されるものではない。他の実施形態においては、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害は線維芽細胞の過増殖により特徴づけられる。

【0048】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原結合を引き起こす、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」からのアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン内の残基24～34（L1）、50～56（L2）および89～97（L3）ならびに重鎖可変ドメイン内の31～35（H1）、50～65（H2）および95～102（H3）；Kabatら、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」からのアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメイン内の残基26～32（L1）、50～52（L2）および91～96（L3）ならびに重鎖可変ドメイン内の26～32（H1）、53～55（H2）および96～101（H3）；ChothiaおよびLesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917）を含む。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書中に定義されている超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。

【0049】

本明細書中で用いる「免疫調節剤」なる語は、対象の免疫系を調節（モジュレーション）する物質を意味する。特に、免疫調節剤は、対象の免疫系が1以上の外来抗原に応答す

10

20

30

40

50

る能力を改変する物質である。特定の実施形態においては、免疫調節剤は、対象の免疫応答の一態様を変化させる物質である。本発明の好ましい実施形態においては、免疫調節剤は、対象の免疫応答を抑制または軽減する物質（すなわち、免疫抑制剤）である。好ましくは、対象の免疫応答を抑制または軽減する免疫調節剤は、対象の免疫系が1以上の外来抗原に応答する能力を抑制または軽減する。ある実施形態においては、IL-9に免疫特異的に結合する抗体が免疫調節剤である。

【0050】

本明細書中で用いる「組合せ」なる語は、2以上の予防用および/または治療用物質の使用を意味する。「組合せ」なる語の使用は、過増殖性上皮もしくは内皮細胞障害または過剰細胞蓄積に関連した障害を有する対象に予防用および/または治療用物質を投与する順序を限定するものではない。第1の予防用または治療用物質を、過増殖性上皮もしくは内皮細胞障害または過剰細胞蓄積に関連した障害を有していた、有する又はそれに感受性である対象への第2の予防用または治療用物質の投与の前（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）、該投与と同時にまたは該投与の後（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）に投与することが可能である。予防用または治療用物質は、本発明の物質が他方の物質と共に作用して単独投与の場合より大きな利益が得られるような順序および時間間隔で対象に投与される。任意の追加的な予防用または治療用物質を、その他の追加的な予防用または治療用物質と共に任意の順序で投与することが可能である。ある実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質は、免疫調節剤または抗ウイルス剤と組合せて投与することが可能である。

10

20

【0051】

本明細書中で用いる「処置する」および「処置」なる語は、障害の治癒をもたらさない、予防用または治療用物質から対象が得る有益な効果を意味する。ある実施形態においては、障害の進行または悪化を抑えるために障害を「処置」するために、対象に1以上の予防用または治療用物質を投与する。

【0052】

本明細書中で用いる「病原性細胞表現型」なる語は、過増殖性障害の病的状態を引き起こす又はそれに寄与する、過増殖している細胞が果たしている機能を意味する。病原性上皮細胞表現型には、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞への分化、炎症性因子の分泌および過増殖が含まれる。病原性内皮細胞表現型には、細胞遊走（転移は含まない）の増強、細胞体積の増加、細胞外マトリックス分子（例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなど）またはマトリックスメタロプロテイナーゼ（例えば、ゼラチナーゼ、コラゲナーゼおよびストロメリシン（stromelysin））の分泌および過増殖が含まれる。これらの病原性細胞表現型の1以上は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害に罹患した患者において症状を引き起こし又はそれに寄与する。

30

【0053】

本明細書中で用いる（治療用物質に関する）「増強」なる語は、治療用物質のその一般的な又は承認された用量での効力における改善を意味する。

40

【0054】

本明細書中で用いる「予防する」および「予防」なる語は、予防用または治療用物質の投与によりもたらされる、対象における障害の再発、広がり又は開始の予防を意味する。

【0055】

本明細書中で用いる「予防用物質」なる語は、EphA2の過剰発現および/または細胞（特に上皮細胞または内皮細胞）の過増殖に関連した障害の広がり、開始または再発の予防において使用しうる任意の物質を意味する。ある実施形態においては、「予防用物質」なる語は、EphA2の発現を減少させEphA2細胞質尾部リン酸化を増強しEphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ及び/又は病原性細胞表現型を抑制するEphA2作動性物質を意味す

50

る。ある実施形態においては、EphA2予防用物質は、低い K_{off} 速度を有しうるモノクローナル抗体である。ある実施形態においては、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2、EA5またはそれらのヒト化形態が予防用物質である。「予防用物質」なる語は、過増殖性障害の広がり、開始または再発を予防するためのEphA2に基づかない療法において、あるいは限定するものではないが免疫調節療法および/または抗ウイルス療法を含む症状の改善に有用な他の療法において使用する物質をも意味しうる。

【0056】

本明細書中で用いる「予防的に有効な量」は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害、特に、上皮もしくは内皮細胞の過増殖または線維芽細胞の過増殖により引き起こされるそのような障害の広がり、開始または再発の予防をもたらすのに十分な予防用物質の量を意味する。予防的に有効な量は、限定するものではないが過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の素因を有する者、例えば、遺伝的な素因を有する者、タバコの煙にさらされる者、上気道感染に感染する又は既に感染している者、血管形成術を受けた者または過増殖性障害の病歴を有する者において、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の広がり、開始または再発を予防するのに十分な予防用物質の量を意味しうる。予防的に有効な量は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の予防において予防利益をもたらす予防用物質の量をも意味しうる。さらに、本発明の予防用物質に関する予防的に有効な量は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の予防において予防利益をもたらす、単独の又は他の物質と組合された予防用物質の量を意味する。この用語は、本発明のEphA2作動性物質の量に関して用いられる場合には、全体的な予防を改善する又は別の予防用物質の予防効力もしくはそれとの相乗効果を増強する量を包含しうる。

【0057】

本明細書中で用いる「プロトコール」は、投与スケジュールおよび投与計画を含む。

【0058】

本明細書中で用いる「治療抵抗性」なる語は、個々の治療に応答しない過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を意味する。ある実施形態においては、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害が療法に対して治療抵抗性であるということは、該障害に関連した症状の少なくとも幾つかの有意な部分がある療法により排除されない又は軽減されないことを意味する。過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害が治療抵抗性であるかどうかの判定は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療の有効性をアッセイするための当技術分野で公知の任意の方法により *in vivo* または *in vitro* で行うことが可能である。いくつかの実施形態においては、喘息の治療の有効性を、発作の頻度および肺の過剰応答をモニターすることにより測定する。他の実施形態においては、COPDの治療の有効性を、細菌感染の数、運動能力における患者の自己評価および一秒量または十秒量 (FEV_1 または FEV_{10}) をモニターすることにより測定する。

【0059】

本明細書中で用いる「副作用」なる語は、予防用または治療用物質の望ましくない作用および有害な作用を含む。不利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。予防用または治療用物質の有害な作用は害になりうる又は不愉快でありうる又は危険でありうる。副作用の具体例には、悪心、嘔吐、無食欲、腹部痙攣、発熱、疼痛、体重減少、脱水、脱毛、呼吸困難、不眠、眩暈、粘膜炎、神経および筋肉作用、疲労、口腔乾燥および食欲不振、投与部位における腫脹または発疹、インフルエンザ様症状、例えば発熱、悪寒および疲労、消化管障害およびアレルギー反応が含まれるが、これらに限定されるものではない。患者が経験する更なる望ましくない作用は数多くあり、当技術分野で公知である。多数がPhysicians' Desk Reference (56th ed., 2002)に記載されている。

【0060】

本明細書中で用いる「一本鎖Fv」または「sFv」なる語は、抗体の V_H および V_L ドメインを含みこれらのドメインが単一ポリペプチド鎖内に存在する抗体フラグメントを意味する。一般には、Fvポリペプチドは更に、抗原結合のための所望の構造をsFvが形成するのを

可能にする、 V_H および V_L ドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。sFvの概説としては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, RosenbergおよびMoore編 Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【0061】

本明細書中で用いる「対象」および「患者」なる語は互換的に用いられる。本明細書中で用いる対象は、好ましくは哺乳類、例えば非霊長類（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）、最も好ましくはヒトである。

【0062】

本明細書中で用いる「療法」なる語は、EphA2の過剰発現および/または特に上皮細胞または内皮細胞の細胞過増殖に関連した障害の予防、治療または処置において使用しうる任意のプロトコール、方法および/または物質を意味する。

【0063】

本明細書中で用いる「治療用物質（治療剤）」は、EphA2の過剰発現および/または過増殖に関連した障害、特に上皮細胞または内皮細胞の過増殖により引き起こされる障害の予防、治療または処置において使用しうる任意の物質を意味する。ある実施形態においては、「治療用物質」なる語は、EphA2発現を減少させEphA2細胞質尾部リン酸化を増強しEphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ及び/又は病原性細胞表現型を抑制するEphA2作動性物質を意味する。ある実施形態においては、EphA2治療用物質は、低い K_{off} 速度を有するモノクローナル抗体である。ある実施形態においては、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5が予防用物質である。「治療用物質」なる語は、過増殖性障害を治療するためのEphA2に基づかない療法において、あるいは免疫調節療法および/または抗ウイルス療法を含む症状の改善に有用な他の療法において使用する物質をも意味する。

【0064】

本明細書中で用いる「治療プロトコール」は、1以上の治療用物質のタイミングおよび投与の計画を意味する。

【0065】

本明細書中で用いる「治療的に有効な量」は、EphA2の過剰発現および/または過増殖に関連した障害を治療または処置するのに十分な治療用物質の量、好ましくは、そのような障害に関連した症状を除去、緩和または抑制するのに十分な量を意味する。治療的に有効な量は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の開始を遅延または最小限化するのに十分な治療用物質の量を意味しうる。治療的に有効な量は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療または処置において治療利益をもたらす治療用物質の量をも意味しうる。さらに、本発明の治療用物質に関する治療的に有効な量は、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療または処置において治療利益をもたらす、単独の又は他の療法と組合された治療用物質の量を意味する。この用語は、本発明のEphA2作動性物質の量に関して用いられる場合には、全体的な治療を改善する、あるいは望ましくない作用を軽減または回避する、あるいは別の治療用物質の治療効力またはそれとの相乗効果を増強する量を包含しうる。

【0066】

本明細書中で用いる「治療する」および「治療」なる語は、1以上の予防用または治療用物質の投与によりもたらされる、障害の症状の根絶、軽減または改善、特に、喘息、COPD、線維症または再狭窄の根絶、除去、緩和または抑制を意味する。ある実施形態においては、そのような用語は、そのような症状を有する対象への1以上の予防用または治療用物質の投与によりもたらされる、喘息、COPD、線維症または再狭窄に関連した症状を最小限化することを意味する。

【0067】

4. 図面の説明

図1A~1B: EGFはEphA2の発現を増強する。HMT-3522細胞、変異体S1（非腫瘍形成性不死

10

20

30

40

50

化上皮細胞系)をEGFと共にインキュベートした。(A)定量PCR分析は、EGFで処理されていない対照細胞と比較してEGF処理によりEphA2 mRNAレベルが増加することを示した。(B)EphA2特異的D7抗体での全細胞溶解物のウエスタンブロット分析は、EGFで処理されていない対照細胞と比較してEGF治療でEphA2タンパク質レベルが増加することを示した。分子量標準の相対移動度を左側に示す。

【0068】

図2A~2B: *in vivo*での肺上皮上のEphA2発現。BALB/cマウスからの肺組織をEphA2特異的抗体で染色した。正常マウス(A)およびRSV感染マウス(B、右パネル)は基底層の上皮細胞上の染色を示した。杯細胞により産生されたムチンを染色する過ヨウ素酸-シッフ(PAS)試薬を使用した染色(B、左パネル)は、RSV感染マウスからの肺組織内のEphA2とは異なる細胞上に存在することが判明した。 10

【0069】

図3: EphA2モノクローナル抗体の動力学的分析。固定化EphA2-FcへのEphA2モノクローナル抗体の結合の動力学をアッセイするために、BIACORE(商標)アッセイを用いた。Eph099B-208.261は実線で示されており、B233は点線で示されており、EA2は破線で示されており、陰性対照は正方形で示されている。

【0070】

図4: EphA2アンチセンスはEphA2タンパク質レベルを減少させる。MDA-MB-231細胞の単層を2 μ g/mlのEphA2アンチセンスまたは逆アンチセンス(IAS)オリゴヌクレオチドで37で24時間トランスフェクトした。EphA2特異的D7抗体での全細胞溶解物のウエスタンブロット分析は、アンチセンスオリゴヌクレオチドでのトランスフェクションがEphA2タンパク質レベルを減少させることを証明している。該膜を取り出し、ローディング対照としてのパキシリン抗体で再プローブした。分子量標準の相対移動度を左側に示す。 20

【0071】

図5A~5D: Eph099B-208.261およびB233抗体のV_LおよびV_Hのアミノ酸配列。CDRの配列が示されている。

【0072】

図6: 形質転換上皮における接着およびシグナリングの改変。正常上皮は、安定な細胞-細胞接着および弱い細胞外マトリックス(ECM)接着、低い細胞遊走、低い細胞増殖ならびに低いEphA2レベルを示す。しかし、形質転換上皮は、弱い細胞-細胞接着、増強されたECM接着、高い細胞遊走、高い細胞増殖および高いEphA2レベルを含む、組織再生に、より特徴的な、改変した接着およびシグナリングを示す。 30

【0073】

図7: EphA2のアップレギュレーションは上皮の接着性を改変する。位相差顕微鏡検査またはE-カドヘリンおよびパキシリン染色によるMCF10A乳房上皮細胞の検査は、EphA2がアップレギュレーションされた細胞においては、対照細胞と比較して低下した細胞-細胞接着を示している。

【0074】

図8: EphA2過剰発現細胞における高レベルのフィブロネクチン。Neo(レーン1)またはEphA2(レーン2)を過剰発現するMCF10A乳房上皮細胞からの抽出物のウエスタンブロットは、EphA2発現の増強と共にフィブロネクチン発現の上昇を示している。 40

【0075】

図9: EphA2抗体はフィブロネクチン分解を誘導する。B13 EphA2抗体で処理されたMDA-MB-231乳癌細胞からの抽出物のウエスタンブロットは、24時間にわたるEphA2タンパク質レベルの減少およびフィブロネクチンの分解、ならびにそれとは対照的な、時間が経過しても安定なままであるパキシリンタンパク質レベルを示している。

【0076】

図10: 細胞形態およびP-Tyr局在化の変化。リン酸化チロシン(P-Tyr)を示すために染色されたBeas2B細胞の顕微鏡検査は、未処理対照細胞と比較して、プレオマイシンで24時間処理された細胞においては、フォーカルアドヒージョンにおけるP-Tyrを示している。 50

【 0 0 7 7 】

図11：プレオマイシン処理細胞におけるフォーカルアドヒージョンの存在。プレオマイシン処理Beas2B細胞はフォーカルアドヒージョンを示している。

【 0 0 7 8 】

図12：プレオマイシンで損傷された上皮はIL-8を分泌する。漸増量のプレオマイシンで処理されたBeas-2B細胞は24時間にわたって漸増レベルのIL-8を分泌する。

【 0 0 7 9 】

図13：プレオマイシンで損傷された上皮はIL-6を分泌する。漸増量のプレオマイシンで処理されたBeas-2B細胞は24時間にわたって漸増レベルのIL-6を分泌する。

【 0 0 8 0 】

図14：プレオマイシン処理Beas-2B細胞におけるアポトーシスの誘導。Beas-2Bの蛍光標示式細胞分取器（FACS）分析は、プレオマイシン処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したアポトーシス事象を示している。

10

【 0 0 8 1 】

図15：FACSデータ。

【 0 0 8 2 】

図16：プレオマイシンはCD95（Fas）発現を増強する。Beas-2B細胞のFACS分析は、プレオマイシンでの処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したCD95/Fas発現を示している。

【 0 0 8 3 】

図17：プレオマイシンはBeas-2B気管支上皮においてEphA2をアップレギュレーションする。Beas-2B気管支上皮細胞のウエスタンブロットは、プレオマイシンでの24時間の処理の後の、安定なままであるパキシリンの発現レベルと比較して増強したEphA2発現を示している。

20

【 0 0 8 4 】

図18：プレオマイシンはBeas-2B細胞におけるEphA2表面発現を増強する。Beas-2B細胞のFACS分析は、プレオマイシンでの処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したEphA2表面発現を示している。

【 0 0 8 5 】

図19：プレオマイシンはEphA2の過剰発現および機能改変を誘導する。Beas-2B気管支上皮細胞のウエスタンブロットは、プレオマイシンでの処理の24時間後のEphA2発現の増強（これはEphA2のアップレギュレーションを示す）を示しており、一方、P-Tyrレベルが若干減少することを示している（これはEphA2の機能の改変を示す）。

30

【 0 0 8 6 】

5. 発明の詳細な説明

EGFは、過増殖性上皮細胞障害、特に喘息およびCOPD（すなわち、気道上皮細胞の増殖およびムチン分泌の増加によるもの）ならびに過増殖性内皮細胞障害、特に再狭窄（すなわち、新血管内膜過形成の増強によるもの）に関連していることが既に公知である。本発明は、部分的には、EGFがEphA2発現における増強をも引き起こすという本発明者らの知見に基づく。特定のメカニズムにより束縛されるものではないが、EGFはEphA2の発現の増強を引き起こし、それにより、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害（特に、上皮細胞または内皮細胞の過増殖または線維芽細胞の過増殖により特徴づけられるもの）に関連した細胞表現型を引き起こすEphA2活性を増強する。

40

【 0 0 8 7 】

このEphA2発現および/または活性（自己リン酸化以外）の上昇の減少は、非腫瘍性過増殖性細胞もしくは過剰細胞蓄積障害または過増殖性線維芽細胞障害に関連した症状を改善しうる。EphA2発現および/または活性（自己リン酸化以外）のレベルのそのような減少は本発明のEphA2作動性物質により達成されうる。特に、EphA2作動性物質は、EphA2細胞質尾部リン酸化の増強、EphA2自己リン酸化の増強、EphA2分解の増強、EphA2活性（自己リン酸化以外）の減少および/または病原性細胞表現型の軽減を引き起こしうる。本発

50

明EphA2作動性物質が抗体である実施形態においては、EphA2抗体は、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有しうる。

【0088】

いずれの作用メカニズムにも束縛されるものではないが、EphA2依存的症状のこの抑制は、EphA2を作動させてEphA2自己リン酸化を引き起こしそれによりEphA2の分解を招くEphA2作動性物質により達成される。EphA2発現の減少および、それによるEphA2活性（自己リン酸化以外）の減少により、病状が軽減する。

【0089】

したがって、本発明は、EphA2の過剰発現および/またはEphA2活性の増強および/または細胞（特に、上皮細胞および内皮細胞）の過増殖に関連した障害の治療、抑制および処置をもたらす方法および組成物に関する。本発明の更なる組成物および方法は、本発明のEphA2作動性物質と組合された他のタイプの有効成分を含む。

10

【0090】

本発明はまた、現在の治療に部分的または完全に治療抵抗性となっている非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療、抑制および処置のための方法に関する。

【0091】

本発明は更に、EphA2に基づく又はEphA2に基づかない非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療の効力を評価するために本発明のEphA2抗体を使用する診断方法を提供する。本発明の診断方法は、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の重症度を予知または予測するためにも使用することが可能である。

20

【0092】

本発明は、EphA2に結合しEphA2アゴニストであり及び/又はEphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、EphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ及び/又は病原性細胞表現型を軽減する物質のスクリーニングおよび同定を提供する。EphA2作動性物質は抗体、好ましくはモノクローナル抗体、好ましくは、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有するものでありうる。

【0093】

5.1. EphA2作動性物質

前記のとおり、本発明は、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強しEphA2自己リン酸化を増強しEphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ及び/又は病原性細胞表現型を軽減する（例えば、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、炎症性因子の分泌、細胞過増殖、細胞遊走、細胞体積および/または細胞外マトリックス分子もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼの分泌を減少させる）EphA2アゴニストの投与を含む。本発明のそのような作動性物質には、限定するものではないがペプチド、ポリペプチド、タンパク質（翻訳後修飾タンパク質を含む）、抗体などを含むタンパク質性分子；または小分子（1000ダルトン未満）、無機もしくは有機化合物；または限定するものではないが二本鎖もしくは一本鎖DNAまたは二本鎖もしくは一本鎖RNAおよび三本鎖核酸分子を含む核酸分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0094】

5.2. ポリペプチド作動性物質

本発明の方法は、ポリペプチドであるEphA2作動性物質を含む。1つの実施形態においては、ポリペプチド作動性物質は、EphA2に免疫特異的に結合しEphA2を作動させる（例えば、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ、および/または病原性細胞表現型を軽減する）EphA2抗体またはそのフラグメントである。もう1つの実施形態においては、ポリペプチド作動性物質は、EphA2に結合しEphA2を作動させうる（例えば、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、EphA2発現細胞の生存を低下させ、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ、および/または病原性細胞表現型を軽減する）EphA2リガンド（例えば、エフリン（Ephrin）A1-Fc融合タンパク質を含むエフリンA1）またはその断片である。

40

50

【 0 0 9 5 】

5.2.1. ポリペプチド作動性物質としての抗体

1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質は、EphA2に免疫特異的に結合しEphA2細胞質尾部リン酸化を増強しEphA2自己リン酸化を増強しEphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させ病原性細胞表現型を軽減する（例えば、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、炎症性因子の分泌、非腫瘍性細胞過増殖、細胞遊走（転移以外）、細胞体積および/または細胞外マトリックス分子もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼの分泌を減少させる）および/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2に結合する抗体（好ましくはモノクローナル抗体）またはそのフラグメントを含む。1つの実施形態においては、該抗体は（例えば、EphA2リガンド結合部位の内部または外部のエピトープにおいて）EphA2の細胞外ドメインに結合し、好ましくはまた、EphA2を作動させ、例えば、EphA2リン酸化を増強し、好ましくは、EphA2分解を引き起こす。もう1つの実施形態においては、該抗体はEphA2、好ましくはEphA2の細胞外ドメインに結合し、好ましくはまた、過増殖細胞数または過剰細胞蓄積（例えば、内皮細胞、ムチン分泌細胞、ムチン分化細胞に分化する細胞および/または内皮細胞）を抑制し、更に一層好ましくは減少させる。他の実施形態においては、該抗体は、非腫瘍性過増殖細胞または過剰細胞蓄積障害療法において使用される別の物質の存在下、病原性細胞表現型を抑制または軽減する。もう1つの実施形態においては、該抗体は、好ましくは $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} で、より好ましくは $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2の細胞外ドメインに結合する。他の実施形態においては、該抗体は 10^{-3} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-4} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-5} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-6} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-7} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-8} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-9} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満または 10^{-10} s^{-1} 未満の K_{off} でEphA2に結合する。

10

20

【 0 0 9 6 】

1つの実施形態においては、該抗体はEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248またはB233である。もう1つの実施形態においては、本発明の方法において使用する抗体はEA2またはEA5（2003年5月12日付け出願の米国特許出願第10/463,783号、発明の名称“EphA2 Agonistic Monoclonal Antibodies and Methods of Use Thereof”（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）であり、本発明のハイブリドーマ産生抗体EA2（株EA2.31）およびEA5（株EA5.12）は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定に従い2002年5月22日付けでAmerican Type Culture Collection（ATCC, P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108）に寄託されており、それぞれ受託番号PTA-4380およびPTA-4381（それぞれ、参照により本明細書中に組み入れることとする）が割当てられている。もう1つの実施形態においては、本発明の方法において使用する抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のいずれかと同じエピトープに結合し、あるいは例えばELISAまたは他の任意の適当なイムノアッセイによりアッセイした場合に、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のいずれかと、EphA2への結合に関して競合する。Eph099B-102.147、Eph099B-208.261およびEph099B-210.248を産生するハイブリドーマは、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定に従い2002年8月7日付けでAmerican Type Culture Collection（ATCC, P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108）に寄託されており、それぞれ受託番号PTA-4572、PTA-4573およびPTA-4574（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書中に組み入れることとする）が割当てられている。示されているCDRを有するEph099B-208.261およびB233の V_L および V_H のアミノ酸配列を図5（配列番号1～8）に示す。好ましい実施形態においては、該抗体はヒト抗体であるか、またはヒト化されている。もう1つの好ましい実施形態においては、該抗体はヒトフレームワークにおいてEph099B-208.261およびB233のCDRの1以上を有する。

30

40

【 0 0 9 7 】

本発明の抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え法により製造された抗体、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

50

体、イントラボディ (intrabody)、一本鎖Fv (scFv) (例えば、単一特異性、二重特異性など)、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド連結Fv (sdFv) および抗イデオタイプ (抗Id) 抗体、イントラボディ (intrabody)、および前記のいずれかのもののエピトープ結合性フラグメントが含まれるが、これらに限定されるものではない。特に、本発明の方法において使用する抗体には、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、EphA2に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有しEphA2のアゴニストであり及び/又は病原性細胞表現型を抑制もしくは軽減し及び/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2に結合する分子が含まれる。本発明の免疫グロブリン分子は免疫グロブリン分子の任意のタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂) またはサブクラスでありうる。

【0098】

本発明は、単一ドメイン抗体、例えばラクダ化 (camelized) 単一ドメイン抗体 (例えば、Muyldermansら, 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttallら, 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; ReichmannおよびMuyldermans, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25; 国際特許公開番号WO 94/04678およびWO 94/25591; 米国特許第6,005,079号 (それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする) を参照されたい) を含む。1つの実施形態においては、本発明は、単一ドメイン抗体が形成されるような修飾を伴う本発明のEphA2作動性抗体 (例えば、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、またはEphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性 (自己リン酸化以外) を減少させ、病原性細胞表現型を軽減し、または低い K_{off} 速度でEphA2に結合する他の任意の作動性抗体) の V_H ドメインのいずれかのアミノ酸配列を有する2つの V_H ドメインを含む単一ドメイン抗体を提供する。もう1つの実施形態においては、本発明はまた、本発明のEphA2作動性抗体 (例えば、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2、EA5、またはEphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性 (自己リン酸化以外) を減少させ、病原性細胞表現型を軽減し、または低い K_{off} 速度でEphA2に結合する他の任意の作動性抗体) のいずれかからの V_H CDRの1以上を含む2つの V_H ドメインを含む単一ドメイン抗体を提供する。好ましい実施形態においては、本発明は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248またはB233のいずれかからの V_H CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する2つの V_H ドメインを含む単一ドメイン抗体を提供する。

【0099】

本発明の抗体はEphA2イントラボディ (intrabody) (第5.2.1.1節を参照されたい) を含む。イントラボディである本発明の抗体作動性物質はEphA2に免疫特異的に結合し、EphA2を作動させる。より具体的な実施形態においては、本発明のイントラボディはEphA2の細胞内ドメインに免疫特異的に結合し、EphA2分解を引き起こす。もう1つの具体的な実施形態においては、該イントラボディはEphA2の細胞内ドメインに結合し、EphA2発現細胞の細胞増殖、成長および/または生存を減少および/または遅延させる。もう1つの具体的な実施形態においては、該イントラボディはEphA2の細胞内ドメインに結合し、内皮細胞層の完全性を維持/再構築する。

【0100】

本発明の方法において使用する抗体は、鳥類および哺乳類 (例えば、ヒト、マウス、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) を含む任意の動物に由来しうる。最も好ましい実施形態においては、該抗体はヒト抗体であるか、またはヒト化されている。本明細書中で用いる「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、ヒト免疫グロブリンライブラリーから又はヒト遺伝子由来の抗体を発現するマウスから単離された抗体を含む。

【0101】

本発明の方法において使用する抗体は単一特異性、二重特異性、三重特異性またはそれ以上の多重特異性でありうる。多重特異性抗体はEphA2ポリペプチドの種々のエピトープ

に免疫特異的に結合することが可能であり、またはEphA2ポリペプチドおよび異種エピトープ（例えば、異種ポリペプチドまたは固体支持体物質）の両方に免疫特異的に結合しうる。例えば、国際特許公開番号W0 93/17715、W0 92/08802、W0 91/00360およびW0 92/05793; Tuttら, 1991, J. Immunol. 147:60-69; 米国特許第4,474,893号、第4,714,681号、第4,925,648号、第5,573,920号および第5,601,819号; ならびにKostelnyら, 1992, J. Immunol. 148:1547-1553を参照されたい。

【0102】

5.2.1.1 イントラボディ

ある実施形態においては、本発明で使用する抗体は細胞内エピトープに結合する。すなわち、それはイントラボディ (intrabody) である。イントラボディは、抗原に免疫特異的に結合しうる抗体の少なくとも一部を含み、好ましくは、その分泌をコードする配列を含有しない。そのような抗体は抗原に細胞内で結合するであろう。1つの実施形態においては、イントラボディは一本鎖Fv (「sFv」) を含む。sFvは抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む抗体フラグメントであり、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖内に存在する。一般には、sFvポリペプチドは更に、抗原結合のための所望の構造をsFvが形成するのを可能にする、V_HおよびV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。sFvの概説としては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, RosenbergおよびMore編 Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。もう1つの実施形態においては、イントラボディは、好ましくは、機能しうる分泌配列をコードしておらず、したがって細胞内に残存する（全般的には、Marasco, WA, 1998, "Intrabodies: Basic Research and Clinical Gene Therapy Applications" Springer: New Yorkを参照されたい）。

10

20

【0103】

イントラボディの製造は当業者によく知られており、例えば米国特許第6,004,940号、第6,072,036号、第5,965,371号（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。さらに、イントラボディの構築はOhageおよびSteipe, 1999, J. Mol. Biol. 291: 1119-1128; Ohageら, 1999, J. Mol. Biol. 291:1129-1134; およびWirtzおよびSteipe, 1999, Protein Science 8: 2245-2250（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）において考察されている。イントラボディの製造においては、組換え分子生物学的技術も用いることが可能である。

30

【0104】

1つの実施形態においては、本発明のイントラボディは抗原への完全抗体（すなわち、完全な定常ドメインおよび可変領域を有するもの）の結合有効性の少なくとも75%を保有する。より好ましくは、イントラボディは完全抗体の結合有効性の少なくとも85%を保有する。さらに好ましくは、イントラボディは完全抗体の結合有効性の少なくとも90%を保有する。より一層好ましくは、イントラボディは完全抗体の結合有効性の少なくとも95%を保有する。

【0105】

イントラボディの製造においては、関心のあるV_HおよびV_Lドメインの両方に関する可変領域をコードするポリヌクレオチドを、そのようなドメインのPCR増幅の鋳型として例えばハイブリドーマmRNAまたは脾臓mRNAを使用することによりクローニングすることが可能である（Huseら, 1989, Science 246:1276）。1つの好ましい実施形態においては、V_HおよびV_Lドメインをコードするポリヌクレオチドを、リンカーをコードするポリヌクレオチド配列により連結して、一本鎖抗体 (sFv) を得る。sFvは、典型的には、V_H-リンカー-V_LまたはV_L-リンカー-V_Hの順序で単一ポリペプチドを含む。該リンカーは、重鎖と軽鎖とがそれらの適切なコンホメーション配向で互いに結合するのを可能にするように選択される（例えば、参照により本明細書に組み入れるHustonら, 1991, Methods in Enzym. 203:46-121を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、天然Fvコンホメーションの歪みを最小にするよう、該リンカーはその融合点から各可変ドメインまでの距離（例えば、3.5nm）にまたがりうる。そのような実施形態においては、該リンカーは、少なくとも5アミ

40

50

ノ酸残基、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基またはそれ以上のポリペプチドである。もう1つの実施形態においては、該リンカーは、合体部位のV_HおよびV_Lドメインに対する立体的干渉を引き起こすべきではない。そのような実施形態においては、該リンカーは35アミノ酸以下、30アミノ酸以下、または25アミノ酸以下である。したがって、最も好ましい実施形態においては、該リンカーは15~22アミノ酸残基長である。もう1つの実施形態においては、該リンカーは親水性であり、V_HおよびV_Lドメインが抗原認識に必要なコンホメーションをとりうるよう十分に柔軟である。イントラボディは、同じV_HおよびV_Lドメイン間に挿入される種々のリンカー配列で製造される。個々のペアのV_HおよびV_Lドメインのための適当な特性を有するリンカーは、それぞれに対する抗原結合の度を評価することにより実験的に決定されうる。リンカーの具体例には、表1に開示する配列が含まれるが、それらに限定されるものではない。

10

【表1】

配列	配列番号
(Gly Gly Gly Gly Ser) ₃	配列番号 1
Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	配列番号 2
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr	配列番号 3
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln	配列番号 4
Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp	配列番号 5
Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly	配列番号 6
Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser Leu Asp	配列番号 7
Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp	配列番号 8

20

【0106】

1つの実施形態においては、イントラボディは細胞質内で発現される。他の実施形態においては、イントラボディは種々の細胞内位置に局在化している。そのような実施形態においては、イントラボディを特定の位置へ導くために、特定の局在化配列をイントラボディポリペプチドに結合させることが可能である。イントラボディは、例えば以下の細胞内位置に局在化する：小胞体 (Munroら, 1987, Cell 48: 899-907; Hangejordenら, 1991, J. Biol. Chem. 266:6015)；核 (Lanfordら, 1986, Cell 46:575; Stantonら, 1986, PNAS 83:1772; Harlowら, 1985, Mol. Cell Biol. 5:1605; Papら, 2002, Exp. Cell Res. 265:288-93)；核小体領域 (Seomiら, 1990, J. Virology 64:1803; Kubotaら, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 162:963; Siomiら, 1998, Cell 55:197)；エンドソーム区画 (Bakkeら, 1990, Cell 63:707-716)；ミトコンドリアマトリックス (Pugsley, A. P., 1989, "Protein Targeting", Academic Press, Inc.)；ゴルジ装置 (Tangら, 1992, J. Bio. Chem. 267:10122-6)；リポソーム (Letourneurら, 1992, Cell 69:1183)；ペルオキシソーム (Papら, 2002, Exp. Cell Res. 265:288-93)；トランスゴルジ網 (Papら, 2002, Exp. Cell Res. 265:288-93)；および細胞膜 (Marchildonら, 1984, PNAS 81:7679-82; Hendersonら, 1987, PNAS 89:339-43; Rheeら, 1987, J. Virol. 61:1045-53; Schultzら, 1984, J. Virol. 133: 431-7; Ootsuyamaら, 1985, Jpn. J. Can. Res. 76:1132-5; Ratnerら, 1985, Nature 313:277-84)。局在化シグナルの具体例には、表2に開示する配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【表 2】

局在化	配列	配列番号
小胞体	Lys Asp Glu Leu	配列番号 9
小胞体	Asp Asp Glu Leu	配列番号 10
小胞体	Asp Glu Glu Leu	配列番号 11
小胞体	Gln Glu Asp Leu	配列番号 12
小胞体	Arg Asp Glu Leu	配列番号 13
核	Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val	配列番号 14
核	Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser	配列番号 15
核	Gln Pro Lys Lys Pro	配列番号 16
核	Arg Lys Lys Arg	配列番号 17
核	Lys Lys Lys Arg Lys	配列番号 18
核小体領域	Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln	配列番号 19
核小体領域	Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg	配列番号 20
核小体領域	Met Pro Leu Thr Arg Arg Arg Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Ala Pro Pro Thr Pro	配列番号 21
エンドソーム区画	Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro	配列番号 22
ミトコンドリアマトリックス	Met Leu Phe Asn Leu Arg Xaa Xaa Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg His Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Xaa	配列番号 23

10

20

30

【 0 1 0 7 】

局在化	配列	配列番号
ペルオキシソーム	Ala Lys Leu	配列番号 24
トランスゴルジ網	Ser Asp Tyr Gln Arg Leu	配列番号 25
細胞膜	Gly Cys Val Cys Ser Ser Asn Pro	配列番号 26
細胞膜	Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu	配列番号 27
細胞膜	Gly Gln Glu Leu Ser Gln His Glu	配列番号 28
細胞膜	Gly Asn Ser Pro Ser Tyr Asn Pro	配列番号 29
細胞膜	Gly Val Ser Gly Ser Lys Gly Gln	配列番号 30
細胞膜	Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu	配列番号 31
細胞膜	Gly Gln Thr Leu Thr Thr Pro Leu	配列番号 32
細胞膜	Gly Gln Ile Phe Ser Arg Ser Ala	配列番号 33
細胞膜	Gly Gln Ile His Gly Leu Ser Pro	配列番号 34
細胞膜	Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser	配列番号 35
細胞膜	Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu	配列番号 36

10

20

【0108】

V_HおよびV_Lドメインは、保存された構造的ジスルフィド結合を一般には有する免疫グロブリンドメインから構成される。イントラボディが還元環境中（例えば、細胞質）で発現される実施形態においては、そのような構造的特徴は存在し得ない。ジスルフィド結合形成の非存在から生じる免疫グロブリン構造の安定性の減少を補うために、イントラボディポリペプチド配列に対して突然変異を施すことが可能である。1つの実施形態においては、イントラボディのV_Hおよび/またはV_Lドメインは、それらの発現が還元環境中安定化されるよう、1以上の点突然変異を含有する（Steipeら、1994、J. Mol. Biol. 240:188-92；WirtzおよびSteipe、1999、Protein Science 8:2245-50；OhageおよびSteipe、1999、J. Mol. Biol. 291:1119-28；Ohageら、1999、J. Mol. Biol. 291:1129-34を参照されたい）。

30

【0109】

治療剤としてのイントラボディタンパク質

1つの実施形態においては、組換え的に発現されたイントラボディタンパク質を患者に投与する。予防または治療効果を媒介するために、そのようなイントラボディポリペプチドは細胞内に存在しなければならない。本発明のこの実施形態においては、イントラボディポリペプチドは「膜透過性配列」と会合している。膜透過性配列は、細胞の外側から細胞の内側へと細胞膜を透過しうるポリペプチドである。膜透過性配列は、別のポリペプチドに連結されると、細胞膜を介してそのポリペプチドの移行をも導きうる。

40

【0110】

1つの実施形態においては、膜透過性配列はシグナルペプチドの疎水性領域である（例えば、Hawiger、1999、Curr. Opin. Chem. Biol. 3:89-94；Hawiger、1997、Curr. Opin. Immunol. 9:189-94；米国特許第5,807,746号および第6,043,339号（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）。膜透過性配列は、任意のシグナルペプチドの疎水性領域に基づきうる。シグナルペプチドは、例えばSIGPEPデータベース（例えば、von Heijne、1987、Prot. Seq. Data Anal. 1:41-2；von HeijneおよびAb

50

rahmsen, 1989, FEBS Lett. 224:439-46を参照されたい) から選択することが可能である。イントラボディポリペプチドの導入のために特定の細胞型を標的化したい場合には、膜透過性配列は、好ましくは、その細胞型にとって内因性のシグナルペプチドに基づく。もう1つの実施形態においては、膜透過性配列はウイルスタンパク質(例えば、ヘルペスウイルスタンパク質VP22)またはその断片(例えば、Phelanら, 1998, Nat. Biotechnol. 16:440-3を参照されたい)である。特定のイントラボディおよび/または特定の標的細胞型のための適当な特性を有する膜透過性配列は、細胞膜越えのイントラボディの移行を各膜透過性配列が導く能力を評価することにより、実験的に決定することが可能である。膜透過性配列には、表3に開示する配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【表3】

10

配列	配列番号
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro	配列番号 37
Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro	配列番号 38
Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly	配列番号 39

【0111】

もう1つの実施形態においては、膜透過性配列は誘導体でありうる。この実施形態においては、膜透過性配列のアミノ酸配列は、アミノ酸残基の置換、欠失、付加および/または修飾の導入により改変されている。例えば、限定するものではないが、ポリペプチドを、例えばグリコシル化、アセチル化、ペジル化(pegylation)、リン酸化、アミド化、公知の保護/遮蔽基による誘導体化、タンパク質切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結により修飾することが可能である。膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は、限定するものではないが特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシン(tunicamycin)の代謝的合成などを含む当業者に公知の技術を用いる化学的修飾により修飾することが可能である。さらに、膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は1以上の非古典的アミノ酸を含有しうる。1つの実施形態においては、ポリペプチド誘導体は、未改変ポリペプチドと類似または同一の機能を有する。もう1つの実施形態においては、膜透過性配列ポリペプチドの誘導体は、未改変ポリペプチドと比べて改変された活性を有する。例えば、誘導体膜透過性配列ポリペプチドは、より効率的に細胞膜を通して移行し、またはタンパク質分解に対して、より抵抗性でありうる。

20

30

【0112】

膜透過性配列は、多数の方法によりイントラボディに結合させることが可能である。1つの実施形態においては、膜透過性配列とイントラボディとを融合タンパク質として発現させる。この実施形態においては、標準的な組換えDNA技術を用いて、膜透過性配列をコードする核酸を、イントラボディをコードする核酸に結合させる(例えば、Rojasら, 1998, Nat. Biotechnol. 16:370-5を参照されたい)。もう1つの実施形態においては、膜透過性配列とイントラボディとをコードする核酸配列間に、スパーサーペプチドをコードする核酸配列が配置される。もう1つの実施形態においては、膜透過性配列ポリペプチドをイントラボディポリペプチドに結合させるのを、それぞれを組換え的に別々に発現された後で行う(例えば、Zhangら, 1998, PNAS 95:9184-9を参照されたい)。この実施形態においては、該ポリペプチドを、当技術分野において標準的な方法により、ペプチド結合または非ペプチド結合(例えば、架橋試薬、例えば、グルタルアルデヒドまたはチアゾリジノ連結によるもの; 例えば、Hawiger, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:89-94を参照されたい)で連結させることが可能である。

40

【0113】

膜透過性配列-イントラボディポリペプチドの投与は非経口投与によるものでありうる。例えば、標的細胞を有する組織または器官へ供給する血管を介した局所灌流法を含む静

50

脈内注射、エアゾールの吸入、皮下または筋肉内注射、局所（例えば、皮膚創傷および病変）投与、例えば移植用に調製された骨髄細胞への直接的トランスフェクションおよびそれに続く、対象への移植、ならびに器官内への直接的トランスフェクションおよびそれに続く、対象への該器官の移植によるものでありうる。更なる投与方法には、経口投与（特に、該複合体が封入（カプセル化）されている場合）または直腸内投与（特に、該複合体が坐剤形態である場合）が含まれる。医薬上許容される担体には、生物学的その他で望ましくないことはない任意の物質が含まれる。すなわち、該物質は、望ましくない生物学的効果を何ら引き起こすことなく、また、それが含有されている医薬組成物のその他の成分のいずれとも有害な様態で相互作用することなく、選択された複合体と共に個体に投与されうる。

10

【0114】

膜透過性配列-イントラボディポリペプチドの投与のための条件は、当技術分野における教示（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., E. W. Martin (編), Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1990)を参照されたい）があれば、容易に決定されうる。in vivoにおける特定の細胞型を例えば器官または動脈/血管の切片の局所灌流法により標的化したい場合には、標的組織からの細胞を生検することが可能であり、その組織内への該複合体の輸入のための最適投与をin vitroで決定して、濃度および時間の長さを含むin vivo投与を最適化することが可能である。あるいは、in vivoにおける標的細胞に対する投与を最適化するために、同一細胞型の培養細胞を使用することも可能である。

20

【0115】

治療としてのイントラボディ遺伝子治療

もう1つの実施形態においては、（例えば、遺伝子治療の場合と同様にして）イントラボディをコードするポリヌクレオチドを患者に投与する。この実施形態においては、第5.7.1節に記載の方法を用いて本発明のポリヌクレオチドを投与することが可能である。

【0116】

5.2.1.2 抗体の製造方法

EphA2作動性抗体またはそのフラグメントは、抗体の合成のための当技術分野で公知の任意の方法、特に化学合成、または好ましくは組換え発現技術により製造することが可能である。

30

【0117】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組換え体およびファージディスプレイ技術またはそれらの組合せを含む当技術分野で公知の多種多様な技術を用いて製造することが可能である。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野で公知であり例えばHarlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerlingら, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, pp. 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981)（該参考文献の全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に教示されているものを含むハイブリドーマ技術を用いて製造することができる。本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は、ハイブリドーマ技術により製造された抗体には限定されない。「モノクローナル抗体」なる語は、任意の真核性、原核性またはファージクローンを含む単クローンに由来する抗体を意味し、それが製造された方法によらない。

40

【0118】

ハイブリドーマ技術を用いて特異的抗体を製造しそれに関してスクリーニングするための方法は、常套的なものであり当技術分野において良く知られている。簡潔に説明すると、EphA2（完全長タンパク質またはそのドメイン、例えば細胞外ドメインまたは細胞質尾部ドメイン）でマウスを免疫することが可能であり、免疫応答が検出されたら、例えば、EphA2に特異的な抗体を該マウス血清中で検出し、該マウス脾臓を集め、脾細胞を単離する。ついで該脾細胞を、良く知られた技術により、任意の適当な骨髄腫細胞、例えば、細胞系SP20（ATCCから入手可能）からの細胞またはNH0細胞に融合させる。ハイブリドーマ

50

を選択し、限界希釈によりクローニングする。ハイブリドーマクローンを、本発明のポリペプチドに結合しうる抗体を分泌する細胞に関して、当技術分野で公知の方法によりアッセイする。高レベルの抗体を一般には含有する腹水は、陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫することにより生成させることができる。

【0119】

したがって、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り、モノクローナル抗体を製造することが可能であり、この場合、好ましくは、EphA2またはその断片で免疫されたマウスから単離された脾細胞を骨髄腫細胞と融合させ、ついで、EphA2に結合しそれを作動させる抗体を分泌するハイブリドーマクローンに関して、該融合体から得られたハイブリドーマをスクリーニングすることにより、該ハイブリドーマを作製する。

10

【0120】

特異的EphA2エピトープを認識する抗体フラグメントは、当業者に公知の任意の技術により製造することができる。例えば、本発明のFabおよびF(ab')₂フラグメントは、(Fabフラグメントを製造するための)パパインまたは(F(ab')₂フラグメントを製造するための)ペプシンのような酵素を使用する免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により製造することができる。F(ab')₂フラグメントは可変領域、軽鎖定常領域、および重鎖のCH1ドメインを含有する。さらに、本発明の抗体は、当技術分野で公知の種々のファージディスプレイ法を用いて製造することも可能である。

【0121】

ファージディスプレイ法においては、機能的抗体ドメインが、それをコードするポリヌクレオチド配列を保持するファージ粒子の表面上に提示される。特に、V_HおよびV_LドメインをコードするDNA配列を動物cDNAライブラリー(例えば、リンパ組織のヒトまたはマウスcDNAライブラリー)から増幅する。V_HおよびV_LドメインをコードするDNAを、PCRにより、sFvリンカーと共に組換え、ファジミドベクター(例えば、pCANTAB 6またはpComb 3 HS S)内にクローニングする。該ベクターを大腸菌(E. coli)内にエレクトロポレーションし、該大腸菌(E. coli)にヘルパーファージを感染させる。これらの方法において使用するファージは、典型的には、fdおよびM13を含む線維状ファージであり、V_HおよびV_Lドメインは、通常、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIIのいずれかに、組換え法により融合される。関心のあるEphA2エピトープに結合する抗原結合性ドメインを発現するファージは、抗原を使用して選択または同定することができる。例えば、該ファージは、標識された抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して選択または同定することができる。本発明の抗体を製造するために使用しうるファージディスプレイ法の具体例には、Brinkmanら, 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; 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; 国際出願番号PCT/GB91/01134; 国際公開番号W0 90/02809、W0 91/10737、W0 92/01047、W0 92/18619、。W0 93/11236、W0 95/15982、W0 95/20401およびW097/13844; ならびに米国特許第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号および第5,969,108号(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されているものが含まれる。

20

30

40

【0122】

ファージは、EphA2結合性、特に、EphA2の細胞外ドメインに対する結合性、および作動活性、例えば、EphA2細胞質尾部リン酸化の増強、EphA2自己リン酸化の増強、EphA2活性(自己リン酸化以外)の減少、病原性細胞表現型(例えば、ムチンの分泌、ムチン分泌細胞へのEphA2発現細胞の分化、炎症性因子の分泌、細胞過増殖、細胞遊走、細胞体積および/または細胞外マトリックス分子もしくはマトリックスメタロプロテナーゼの分泌)の軽減に関してスクリーニングすることが可能である(例えば、スクリーニングの方法に

50

関しては第5.5節を参照されたい)。

【0123】

前記参考文献に記載されているとおり、ファージ選択の後、該ファージからの抗体コード領域を単離し、それを使用して、ヒト抗体を含む全抗体または任意の他の所望のフラグメントを得、例えば後記で説明するとおり哺乳類細胞、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内で発現させることができる。Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントを組換え的に製造するための技術も、国際特許公開番号W0 92/22324; Mullinaxら、1992, BioTechniques, 12:864, AJRI, 34: 26; およびBetterら、1988, Science 240:1041 (該参考文献の全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されているような当技術分野で公知の方法により用いることが可能である。

10

【0124】

全抗体を製造するためには、V_HまたはV_Lヌクレオチド配列、制限部位および該制限部位を保護するためのランキング配列を含むPCRプライマーを使用してsFvクローン内のV_HまたはV_L配列を増幅することが可能である。当業者に公知のクローニング技術を用いて、PCRにより増幅されたV_Hドメインを、V_H定常領域(例えば、ヒト 4定常領域)を発現するベクター内にクローニングし、PCRにより増幅されたV_Lドメインを、V_L定常領域(例えば、ヒト 4定常領域)を発現するベクター内にクローニングすることが可能である。好ましくは、V_HまたはV_Lドメインを発現するためのベクターは、EF-1 プロモーター、分泌シグナル、可変ドメイン用のクローニング部位、定常ドメイン、およびネオマイシンのような選択マーカーを含む。また、V_HおよびV_Lドメインを、必要な定常領域を発現する1つのベクター内にクローニングすることが可能である。ついで、当業者に公知の技術を用いて、完全長抗体、例えばIgGを発現する安定な又は一過性の細胞系を作製するために、重鎖変換ベクターおよび軽鎖変換ベクターを細胞系内にコトランスフェクトする。

20

【0125】

ヒトにおける抗体のin vivoでの使用およびin vitro検出アッセイを含むいくつかの用途には、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体を使用するのが好ましいかもしれない。ヒト患者の治療には完全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使用する前記のファージディスプレイ法を含む当技術分野で公知の種々の方法により製造することができる。米国特許第4,444,887号および第4,716,111号; ならびに国際特許公開番号W0 98/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735およびW0 91/10741(それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)も参照されたい。

30

【0126】

また、ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現し得ないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現しうるトランスジェニックマウスを使用することによっても製造することができる。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をランダムに又は相同組換えによりマウス胚幹細胞内に導入することが可能である。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域を、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えて、マウス胚幹細胞内に導入することが可能である。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別々に又はそれと同時に、非機能的にされうる。特に、J_H領域のホモ接合欠失は内因性抗体産生を妨げる。該修飾胚幹細胞を増殖させ、胚盤胞内にマイクロインジェクションしてキメラマウスを得る。ついでそれらのキメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現するホモ接合後代を得る。該トランスジェニックマウスを、選択された抗原、例えば本発明のポリペプチドの全部または一部で、常法により免疫する。通常のハイブリドーマ技術を用いて、該抗原に対するモノクローナル抗体を該免疫トランスジェニックマウスから得る。トランスジェニックマウスにより保持されているヒト免疫グロブリントランスジーンはB細胞分化中に再配列され、ついでクラススイッチおよび体細胞突然変異を受ける。したがって、そのような技術を用いて、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を製造することが可能である。ヒト抗体を製造するためのこの技術の総説としては、LonbergおよびHuszar(1995, Int. Rev. Immunol., 13:65-9

40

50

3)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を製造するためのこの技術ならびにそのような抗体を製造するためのプロトコールの詳細な考察には、例えば、国際特許公開番号WO 98/24893、WO 96/34096およびWO 96/33735;ならびに米国特許第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号および第5,939,598号(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。また、Abgenix, Inc.(Freemont, CA)およびMedarex(Princeton, NJ)等の企業が、前記と同様の技術を用いた、選択された抗原に対するヒト抗体の提供に参与している。

【0127】

キメラ抗体は、該抗体の、異なる部分が、異なる動物種に由来する分子、例えば、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である。キメラ抗体の製造方法は当技術分野において公知である。例えば、Morrison, 1995, Science, 229:1202; Oira, 1986, BioTechniques, 4:214; Gilliesら, 1989, J. Immunol. Methods, 125:191-202; ならびに米国特許第5,807,715号、第4,816,567号および第4,816,397号(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。非ヒト種由来の1以上のCDRとヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを含むキメラ抗体は、例えばCDRグラフティング(EP 239,400; 国際特許公開番号WO 91/09967; ならびに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号および第5,585,089号)、ベニアリング(veneering)またはリサーフェシング(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnickaら, 1994, Protein Engineering, 7:805; およびRoguskaら, 1994, PNAS 91:969)、および鎖シャフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)を含む当技術分野で公知の種々の技術を用いて製造することが可能である。1つの実施形態においては、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Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のV_L CDR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V_L CDRを含む。もう1つの実施形態においては、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Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のV_H CDR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V_H CDRを含む。1つの実施形態においては、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Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のV_L CDR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V_L CDRを含み、更に、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のV_H CDR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V_H CDRを含む。好ましい実施形態においては、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Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のV_L CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する3個のV_L CDR、およびEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5のV_H CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する3個のV_H CDRを含む。しばしば、フレームワーク領域内のフレームワーク残基は、抗原結合を改変(好ましくは改善)するためにCDR供与抗体由来の対応残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で良く知られた方法、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該CDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデル化、ならびに特定の位置における特異なフレームワーク残基を同定するための配列比較により同定される(例えば、米国特許第5,585,089号およびRiechmannら, 1988, Nature, 332:323(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。

【0128】

5.2.2 ポリペプチド作動性物質としてのEphA2リガンド

もう1つの実施形態においては、ポリペプチド作動性物質は、EphA2に結合しEphA2を作動させる(例えば、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、EphA2発現細胞の生存を低下させ、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性(自己リン酸化以外)

を減少させ、および/または病原性細胞表現型を軽減しうる) EphA2リガンド(例えば、エフリン(Ephrin) A1) またはその断片である。特定の実施形態においては、EphA2に結合しそれを作動させるEphA2リガンドの能力を保有するEphA2リガンド断片(例えば、エフリンA1細胞外ドメイン)を本発明の方法において使用する。もう一つの実施形態においては、融合タンパク質は、EphA2に結合しそれを作動させるEphA2リガンドの能力を保有するEphA2リガンド断片(例えば、免疫グロブリン重鎖に融合したエフリンA1の細胞外ドメイン; PrattおよびKinch, 2002, Oncogene 21:7690-9(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい)を含む。好ましい実施形態においては、EphA2リガンド断片は可溶性である。EphA2リガンドの断片は、(例えば、Genbankアクセッション番号BC032698のエフリンA1配列のような当技術分野で公知のEphA2リガンド配列を使用して)製造することが可能であり、EphA2に結合しそれを作動させる能力に関してアッセイすることが可能である。一つの実施形態においては、該断片はEphA2のアミノ酸残基1~約400、500または600を含む。より具体的な実施形態においては、該断片はEphA2のアミノ酸残基1~534である。限定するものではないがアフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、電気泳動移動度シフトアッセイを含む、タンパク質間の結合を検出するための当技術分野で公知の任意の方法を用いることが可能である。EphA2リガンド断片である本発明のポリペプチド作動性物質は、内因性EphA2リガンド配列に対して100%、98%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%同一であるポリペプチドを含む。2つのアミノ酸配列の同一性(%)の決定は、BLASTタンパク質検索を含む、当業者に公知の任意の方法により行うことが可能である。

10

20

【0129】

5.2.3 修飾ポリペプチド作動性物質

本発明の方法において使用するポリペプチド作動性物質(例えば、抗体もしくはEphA2ポリペプチドリガンドまたはそれらの断片)には、修飾された誘導体、すなわち、共有結合が該抗体の免疫特異性を実質的に改変しないよう該抗体に任意のタイプの分子が共有結合することにより修飾された誘導体が含まれる。例えば、該抗体誘導体には、例えばグリコシル化、アセチル化、ペジル化(pegylation)、リン酸化、アミド化、公知の保護/遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾された抗体が含まれるが、これらに限定されるものではない。多数の化学修飾はいずれも、限定するものではないが特異的化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成を含む公知技術により行うことができる。また、該誘導体は1以上の非古典的アミノ酸を含有しうる。

30

【0130】

本発明の方法は、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ヶ月以上、3ヶ月以上、4ヶ月以上または5ヶ月以上の哺乳動物(好ましくはヒト)における半減期(例えば、血清半減期)を有する抗体またはそのフラグメントの使用をも含む。哺乳動物(好ましくはヒト)において延長されたポリペプチド作動性物質の半減期は、該哺乳動物における該ポリペプチド作動性物質の、より高い血清中濃度をもたらし、したがって、該ポリペプチド作動性物質の投与の頻度を減少させ、および/または該ポリペプチド作動性物質の投与量を減少させる。延長されたin vivo半減期を有するポリペプチド作動性物質は、当業者に公知の技術により製造することが可能である。例えば、延長されたin vivo半減期を有するポリペプチド作動性物質は、FcドメインとFcRn受容体との間の相互作用に關与するものとして同定されたアミノ酸残基を修飾(例えば、置換、欠失または付加)することにより製造することが可能である(例えば、国際特許公開番号WO 97/34631および2001年12月12日付け出願の米国特許出願第10/020,354号、発明の名称“Molecules With Extended Half-Lives, Compositions and Uses Thereof”(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい)。延長されたin vivo半減期を有するポリペプチド作動性物質は、高分子量ポリエチレングリコール(PEG)のような重合体分子を該ポリペプチド作動性物質に結合させることにより製造

40

50

することが可能である。PEGは、多官能性リンカーを伴って又は伴わずに、該ポリペプチド作動性物質のNまたはC末端へのPEGの部位特異的結合を介して、あるいはリシン残基上に存在するアミノ基を介して、該ポリペプチド作動性物質に結合させることが可能である。生物活性の喪失を最小にする直鎖状または分枝状重合体誘導体化を用いる。ポリペプチド作動性物質へのPEGの適切な結合を保証するために、結合の度合をSDS-PAGEおよびマスペクトロメトリーによりモニターする。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りポリペプチド作動性物質-PEG結合体から分離することが可能である。

【0131】

5.2.3.1 ポリペプチド作動性物質をコードするポリヌクレオチド

本発明のEphA2ポリペプチド作動性物質は、前記第5.2.1節および第5.2.2節に開示されているポリペプチド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から産生されるポリペプチドを含む。1つの実施形態においては、本発明の抗体は、第5.5節に記載のアッセイの1以上においてEphA2を作動させるモノクローナル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から産生されるEphA2モノクローナル抗体を含む。特定の実施形態においては、本発明の方法は、2002年8月7日付けでATCCに寄託されておりそれぞれ受託番号PTA-4572、PTA-4573およびPTA-4574が付与されているモノクローナル抗体Eph099B-102.147、Eph099B-208.261もしくはEph099B-210.248をコードするポリヌクレオチドまたはモノクローナル抗体B233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から産生されるEphA2モノクローナル抗体を使用する。もう1つの実施形態においては、本発明の方法において使用するEphA2リガンドポリペプチドは、EphA2リガンド（例えば、エフリン（Ephrin）A1）のEphA2結合ドメイン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から産生されるポリペプチドを含む。

【0132】

ハイブリダイゼーションのための条件は、高いストリンジェンシー、中間的なストリンジェンシーまたはより低いストリンジェンシーでありうる。例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーションのための条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）中、約45 でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、およびそれに続く、0.2×SSC/0.1% SDS中、約50~65 での1回以上の洗浄、高いストリンジェンシーの条件、例えば6×SSC中、約45 でのフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、およびそれに続く、0.1×SSC/0.2% SDS中、約60 での1回以上の洗浄、または当業者に公知の他の任意のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件（例えば、Ausubel, F. M.ら編, 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc.およびJohn Wiley and Sons, Inc., NY, p. 6.3.1-6.3.6および2.10.3を参照されたい）を含むが、これらに限定されるものではない。

【0133】

本発明のポリペプチド作動性物質をコードするポリヌクレオチドの入手、および該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列の決定は、当技術分野で公知の任意の方法により行うことが可能である。本発明の方法において使用するポリヌクレオチド作動性物質をコードするそのようなポリヌクレオチドは、（例えば、Kutmeierら, 1994, BioTechniques 17:242に記載のとおり）化学合成オリゴヌクレオチドから合体されうる。簡潔に説明すると、その方法は、該ポリペプチドをコードする該配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、それらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、ならびにそれに続く、PCRによるリガンドオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0134】

あるいは、本発明の方法において使用するポリペプチド作動性物質をコードするポリヌクレオチドは、適当な起源からの核酸から製造することが可能である。特定のポリペプチドをコードする核酸を含むクローンは入手できないが該ポリペプチドの配列が公知である場合には、該ポリペプチドをコードする核酸を化学合成し、または適当な起源（例え

10

20

30

40

50

ば、抗体cDNAライブラリー、または該抗体を発現する任意の組織もしくは細胞、例えば、本発明の抗体を発現するよう選択されたハイブリドーマ細胞、またはEpha2リガンドを発現する細胞から作製されたcDNAライブラリー、またはそのような組織もしくは細胞から単離された核酸、好ましくは、ポリA+RNA)から得ることが可能であり、これは、配列の3'および5'末端にハイブリダイズしうる合成プライマーを使用するPCR増幅により、または個々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り行うことが可能であり、それにより、例えば、該抗体またはEphA2リガンドをコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを同定することが可能である。ついで、PCRにより得られた増幅された核酸を、当技術分野でよく知られた任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクター内にクローニングすることが可能である。

10

【0135】

本発明の方法において使用するポリペプチド作動性物質のヌクレオチド配列を決定したら、例えばアミノ酸の置換、欠失および/または挿入を行って、異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、ヌクレオチド配列の操作のための当技術分野でよく知られた方法、例えば組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCRなどを用いて(例えば、Sambrookら, 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(それらの両方の全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい)、該ヌクレオチド配列を操作することが可能である。

20

【0136】

ポリペプチド作動性物質またはその断片をコードするヌクレオチド配列内に突然変異を導入するためには、アミノ酸置換をもたらす当業者に公知の標準的な技術、例えば部位特異的突然変異誘発およびPCR媒介突然変異誘発を用いることが可能である。好ましくは、該誘導体は、元のポリペプチド作動性物質またはその断片と比較して15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換を含む。好ましい実施形態においては、該誘導体は、1以上の推定非必須アミノ酸残基において行われた保存的アミノ酸置換を有する。

【0137】

本発明はまた、フレームワークまたは可変領域内に突然変異(例えば、1以上のアミノ酸置換)を有する本発明の任意のEphA2作動性抗体のアミノ酸を含む抗体または抗体フラグメントの使用を含む。好ましくは、これらの抗体内の突然変異は、それらが免疫特異的に結合する特定の抗原に対する該抗体のアビディティおよび/またはアフィニティを維持または増強する。ポリペプチド作動性物質とその結合相手との間の結合の度合をアッセイするためには、当業者に公知の標準的な技術(例えば、イムノアッセイまたはELISAアッセイ)を用いることが可能である。特定の実施形態においては、ポリペプチド作動性物質が抗体である場合には、EphA2抗原への結合を評価することが可能である。もう1つの実施形態においては、ポリペプチド作動性物質がEphA2リガンドである場合には、EphA2への結合を評価することが可能である。

30

40

【0138】

5.2.3.2 ポリペプチド作動性物質の組換え製造

ポリペプチド作動性物質(その誘導体、類似体または断片を含むが、これらに限定されるものではない)の組換え発現は、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を要する。ポリペプチド作動性物質をコードするポリヌクレオチドを得たら、当技術分野で良く知られた技術を用いる組換えDNA技術により、該ポリペプチド作動性物質の製造のためのベクターを製造することができる。ポリペプチドコード配列と適当な転写および翻訳制御シグナルとを含有する発現ベクターを構築するためには、当業者に良く知られた方法を用いることができる。したがって、ポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を製造するための方法が本明細書に記載されている。これら

50

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*遺伝的組換えが含まれる。したがって、本発明は、EphA2作動性ポリペプチド物質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。

【0139】

該発現ベクターを通常の技術により宿主細胞内に導入し、ついでトランスフェクト化細胞を通常の技術により培養して、ポリペプチド作動性物質を得る。したがって、本発明は、機能しうる形で異種プロモーターに連結されている、ポリペプチド作動性物質またはその断片をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。

【0140】

ポリペプチド作動性物質を発現させるためには、種々の宿主-発現ベクター系を使用することができる（例えば、米国特許第5,807,715号を参照されたい）。そのような宿主-発現系は、関心のあるコード配列が産生され次いで精製されうるビヒクルに相当するが、適当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された場合に本発明のポリペプチド作動性物質を*in situ*で発現しうる細胞にも相当する。これらには、抗体コード配列を含有する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された細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）およびビー・サチリス（*B. subtilis*））、抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス（*Saccharomyces*）およびピキア（*Pichia*））のような微生物、ポリペプチド作動性物質をコードする配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系、抗体コード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された又は組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMVおよびタバコモザイクウイルス、TMV）に感染した植物細胞系、あるいは哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現構築物を保持する哺乳類細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、NS0および3T3細胞）が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、大腸菌（*Escherichia coli*）のような細菌細胞、およびより好ましくは、特に全組換えポリペプチド作動性物質の発現には真核細胞を、ポリペプチド作動性物質の発現に使用する。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間（major intermediate）初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと組合されたチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳類細胞は、ポリペプチド作動性物質、特に抗体ポリペプチド作動性物質のための有効な発現系である（Foeckingら、1986、*Gene*, 45:101およびCockettら、1990、*Bio/Technology*, 8:2）。特定の実施形態においては、ポリペプチド作動性物質をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーターまたは組織特異的プロモーターにより調節される。

【0141】

細菌系においては、発現されるポリペプチドに意図される用途に応じて多数の発現ベクターが有利に選択されうる。例えば、医薬組成物の製造のために大量のそのようなタンパク質を製造したい場合には、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましいかもしれない。そのようなベクターには、大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpUR278（Rutherら、1983、*EMBO*, 12:1791）（この場合、融合タンパク質が産生されるよう、該抗体コード配列は個々に、*lacZ*コード領域とインフレームで該ベクター内に連結されうる）、pINベクター（Inouye & Inouye、1985、*Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster、1989、*J. Biol. Chem.*, 24:5503-5509）などが含まれるが、これらに限定されるものではない。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ポリペプチドを発現させるためには、pGEXベクターを使用することも可能である。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、吸着、およびマトリックスグルタチオン-アガロースビーズへの結合、およびそれに続く、遊離グルタチオンの存在下での溶出により、細胞溶解細胞から容易に精製されうる。クローン化標的遺

10

20

30

40

50

伝子産物がGST部分から遊離されうよう、pGEXベクターは、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する。

【0142】

昆虫細胞系においては、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして、オートグラフア・カリフォルニア (*Autographa californica*) 核多角体病ウイルス (AcNPV) を使用する。該ウイルスはスポドプテラ・フルジベルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞内で増殖する。該抗体コード配列を該ウイルスの非必須領域 (例えば、多角体遺伝子) 内に個々にクローニングし、AcNPVプロモーター (例えば、多角体プロモーター) の制御下に配置することができる。

【0143】

哺乳類宿主細胞においては、ウイルスに基づく多数の発現系を使用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合には、目的とするポリペプチドコード配列をアデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターおよび三成分リーダー配列) に連結することができる。ついでこのキメラ遺伝子を *in vitro* または *in vivo* 組換えによりアデノウイルスゲノム内に挿入することができる。該ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、領域E1またはE3) 内へ挿入は、感染宿主内で該ポリペプチド作動性物質を発現しうる生存可能な組換えウイルスを与える (例えば、Logan & Shenk, 1984, PNAS, 81:355-359を参照されたい)。挿入されたポリペプチドコード配列の効率的な翻訳のためには、特異的開始シグナルも要求されう。これらのシグナルはATG開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、全インサートの翻訳が保証されるためには、開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームと同調していなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然物および合成物の両方を含む種々のものに由来しうる。発現の効率は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含有させることにより向上させることが可能である (例えば、Bitterら, 1987, Methods in Enzymol., 153:516-544を参照されたい)。

【0144】

また、挿入配列の発現をモジュレーションし又は所望の特定の状態で遺伝子産物を修飾しプロセッシングする宿主細胞株を選択することが可能である。タンパク質産物のそのような修飾 (例えば、グリコシル化) およびプロセッシング (例えば、切断) は該タンパク質の機能に重要でありうる。種々の宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセッシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。発現された外来タンパク質の適切な修飾およびプロセッシングが保証されるよう、適当な細胞系または宿主系を選択することができる。この目的には、一次転写産物の適当なプロセッシング、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装置を有する真核宿主細胞を使用することができる。そのような哺乳類宿主細胞には、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、NS0 (いずれの免疫グロブリン鎖も内因的には産生しないマウス骨髄腫細胞系)、CRL7030およびHsS78Bst細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0145】

組換えタンパク質の長期的な高収率の産生のためには、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞系を操作することができる。ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用する代わりに、適当な発現制御要素 (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) により制御されるDNAおよび選択マーカーで宿主細胞を形質転換することができる。該外来DNAの導入の後、操作された細胞を富化培地内で1~2日間増殖させ、ついで選択培地と交換することができる。組換えプラスミド内の選択マーカーは該選択に対する耐性を付与し、細胞がその染色体内に該プラスミドを安定に組込んでフォーカスを形成するよう増殖するのを可能にし、そしてそれをクローニングし、細胞系にまで増殖させることが可能である。この方法は、ポリペプチド作動性物質を発現する細胞系を操作するために有利に用いられうる。そのような操作された細胞系は、ポリペプチド作動性物質と直接的または間接的に相互作用する組

10

20

30

40

50

成物のスクリーニングおよび評価において特に有用かもしれない。

【0146】

限定するものではないが単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら, 1977, Cell, 11:223)、グルタミンシンターゼ、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 (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202) および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) を含む多数の選択系を用いることが可能であり、それらの遺伝子は、それぞれ tk-、gs-、hgprt- または aprt- 細胞において使用することが可能である。また、以下の遺伝子に関する選択の基礎として、代謝拮抗物質耐性を用いることができる: dhfr, これはメトトレキサートに対する耐性を付与する (Wiglerら, 1980, PNAS 77:357 および O'Hareら, 1981, PNAS 78:1527); gpt, これはミコフェノール酸に対する耐性を付与する (Mulligan & Berg, 1981, PNAS 78:2072); neo, これはアミノグリコシド G-418 に対する耐性を付与する (Wu および Wu, 1981, 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 hyg, これはハイグロマイシンに対する耐性を付与する (Santerreら, 1984, Gene, 30:147)。所望の組換えクローンを選択するためには、組換え DNA 技術の当技術分野で一般に公知の方法を常套的に適用することが可能であり、そのような方法は、例えば、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); および Chapters 12 および 13, Dracopoliら (編), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapinら, 1981, J. Mol. Biol., 150:1 (それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に記載されている。

【0147】

ポリペプチド作動性物質の発現レベルはベクターの増幅により増加させることができる (総説としては、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, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987) を参照されたい)。ポリペプチド作動性物質を発現するベクター系内のマーカーが増幅可能な場合には、宿主細胞の培養内に存在するインヒビターのレベルの増加はマーカー遺伝子のコピー数を増加させる。増幅領域はポリペプチド作動性物質遺伝子と結合しているため、ポリペプチド作動性物質の産生も増加する (Crouseら, 1983, Mol. Cell. Biol., 3:257)。

【0148】

本発明の2つの発現ベクター (第1ベクターは重鎖由来ポリペプチドをコードし、第2ベクターは軽鎖由来ポリペプチドをコードする) で宿主細胞をコトランスフェクトすることが可能である。それらの2つのベクターは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同じ選択マーカー、または両方のプラスミドの維持を保證する異なる選択マーカーを含有しうる。あるいは、重鎖および軽鎖の両方のポリペプチドをコードしておりそれらが発現しうる単一のベクターを使用することが可能である。そのような場合には、過剰な毒性遊離重鎖を避けるために、該軽鎖は該重鎖の前に配置されるべきである (Proudfoot, 1986, Nature, 322:52 および Kohler, 1980, PNAS 77:2197)。該重鎖および軽鎖のコード配列は cDNA または ゲノム DNA を含みうる。

【0149】

本発明のポリペプチド作動性物質が組換え発現により産生されたら、ポリペプチドの精製のための当技術分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー (例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーおよびサイズカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術により、それを精製することができる。さらに、ポリペプチド作動性物質を、精製を促進する本明細書に記載の又は当技術分野で公知の異種ポリペプチド配列に融合させることが可能である。

10

20

30

40

50

【0150】

抗体である本発明のポリペプチド作動性物質は、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を既に含むベクターを使用して発現させることが可能である（例えば、米国特許第5,919,900号、第5,747,296号、第5,789,178号、第5,591,639号、第5,658,759号、第5,849,522号、第5,122,464号、第5,770,359号、第5,827,739号；国際特許公開番号WO 89/01036、WO 89/10404；Bebbingtonら，1992，BioTechnology 10:169を参照されたい）。抗体の可変ドメインは、重鎖全体、軽鎖全体または重鎖全体と軽鎖全体との両方の発現のためのそのようなベクター内にクローニングすることが可能である。二本鎖抗体の発現のための好ましい実施形態においては、重鎖と軽鎖との両方をコードするベクターを免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞内で共発現させることが可能である。

10

【0151】

5.3 ポリヌクレオチド作動性物質

本発明の方法においては、本発明のEphA2ポリペプチド作動性物質に加えて、核酸分子を使用することが可能である。限定するものではないがアンチセンス、リボザイムおよびRNA干渉技術を含む核酸分子を使用してEphA2発現を低下させることが可能である。ヌクレオチド作動性物質は、第5.7.1節に記載の方法に従い患者に投与することができる。

【0152】

5.3.1 アンチセンス

本発明は、アンチセンス核酸分子、すなわち、EphA2をコードするセンス核酸分子の全部または一部に相補的である（例えば、二本鎖cDNA分子コード鎖に相補的である又はmRNA配列に相補的である）分子を含む。したがって、アンチセンス核酸はセンス核酸に水素結合しうる。アンチセンス核酸はコード鎖全体またはその一部のみ（例えば、タンパク質コード領域（またはオープンリーディングフレーム）の全部または一部）に相補的でありうる。アンチセンス核酸分子は、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域の全部または一部に対してアンチセンスでありうる。非コード領域（「5'および3'非翻訳領域」）は、コード領域に隣接しアミノ酸には翻訳されない5'および3'配列である。1つの実施形態においては、アンチセンス核酸分子は

20

5'-CCAGCAGTACCGCTTCCTTGCCCTGCGCCG-3'（配列番号44）

である。

【0153】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチド長でありうる。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野で公知の方法を用いる化学合成および酵素連結反応により構築することができる。例えば、アンチセンス核酸（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）は、天然に存在するヌクレオチドまたは様々に修飾されたヌクレオチド（これは、該分子の生物学的安定性を増強するよう、またはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二本鎖の物理的安定性を増強するよう設計されている）を使用して化学合成することが可能であり、例えば、ホスホロチオアート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを使用することが可能である。アンチセンス核酸を製造するために使用しうる修飾ヌクレオチドの具体例には、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(ν)、ワイプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢

30

40

50

酸およびメチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)_wおよび2,6-ジアミノプリンが含まれる。あるいは、該アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス配向でサブクロニングされている発現ベクターを使用することにより生物学的に製造することも可能である(すなわち、挿入された核酸から転写されるRNAは、目的とする標的核酸、すなわちEphA2に対してアンチセンス配向のものとなる)。

【0154】

本発明のアンチセンス核酸分子は、典型的には、対象に投与されるか又はin situで生成し、それにより、それらは、本発明の選択されたポリペプチドをコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAにハイブリダイズまたは結合して、例えば転写および/翻訳の抑制により発現を抑制する。ハイブリダイゼーションは、安定な二本鎖形成する通常のヌクレオチド相補性によるもの、あるいは例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二本鎖の主溝における特異的相互作用によるものでありうる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の一例には、組織部位における直接的な注射が含まれる。あるいは、アンチセンス核酸分子を、選択された細胞を標的化するために修飾し、ついで全身投与することが可能である。例えば、全身投与の場合には、選択された細胞表面上で発現される受容体または抗原にアンチセンス分子が特異的に結合するよう、例えば、細胞表面受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体にアンチセンス核酸分子を連結させることにより、アンチセンス分子を修飾することが可能である。また、アンチセンス核酸分子は、本明細書に記載のベクターを使用して細胞に送達することが可能である。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を得るためには、強力なpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下にアンチセンス核酸分子が配置されたベクター構築物が好ましい。

10

20

【0155】

本発明のアンチセンス核酸分子は アノマー核酸分子である。 アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的二本鎖ハイブリッドを形成し、この場合、通常の 単位とは異なり、それらの鎖は互いに平行に伸びる(Gaultierら, 1987, Nucleic Acids Res. 15:6625)。アンチセンス核酸分子はまた、2'-o-メチルリボヌクレオチド(Inoueら, 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131)またはキメラRNA-DNA類似体(Inoueら, 1987, FEBS Lett. 215:327)を含みうる。

【0156】

5.3.2. リボザイム

本発明はまた、リボザイムを含む。リボザイムは、それに対する相補性領域を有するmRNAのような一本鎖核酸を切断しうるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。したがって、mRNA転写産物を触媒的に切断して該mRNAによりコードされるタンパク質の翻訳を抑制するために、リボザイム(例えば、HaselhoffおよびGerlach 1988, Nature 334:585-591に記載されているハンマーヘッド型リボザイム)を使用することが可能である。EphA2をコードする核酸分子に対する特異性を有するリボザイムは、EphA2のヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。例えば、米国特許第4,987,071号および第5,116,742号においては、切断すべきヌクレオチド配列に相補的である活性部位のヌクレオチド配列を有する、テトラヒメナ-L-19 IVS RNAの誘導体が構築されうる。あるいは、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAをRNA分子のプールから選択するために、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを使用することが可能である。例えば、BartelおよびSzostak, 1993, Science 261:1411を参照されたい。

30

40

【0157】

5.3.3 RNA干渉

ある実施形態においては、EphA2発現を低下させるためにRNA干渉(RNAi)分子を使用する。RNA干渉(RNAi)は、二本鎖RNA(dsRNA)が、それ自身の配列に対応する遺伝子の発現を抑制しうることに定義される。RNAiは、転写後遺伝子サイレンシングまたはPTGSとも称される。細胞の細胞質内で通常見出される唯一のRNA分子は一本鎖mRNAであるため、細胞は、dsRNAを認識し21~25塩基対含有断片(二本鎖らせんの約2ターン)に切断する酵素

50

を有する。該断片のアンチセンス鎖はセンス鎖から十分に分離し、それは内因性細胞mRNAの分子上の相補的センス配列にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションは該二本鎖領域内のmRNAの切断を誘発して、それがポリペプチドに翻訳されうることを妨げる。したがって、特定の遺伝子に対応するdsRNAの導入は、特定の組織および/または選択された時点において、細胞自身によるその遺伝子の発現をロックアウトする。

【0158】

哺乳類における遺伝子発現を妨げるために、二本鎖(ds)RNAを使用することが可能である(Wianny & Zernicka-Goetz, 2000, Nature Cell Biology 2: 70-75(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする))。dsRNAは、EphA2のヌル突然変異体と同じ表現型を得るために、EphA2の機能の抑制性RNAまたはRNAiとして使用される(Wianny & Zernicka-Goetz, 2000, Nature Cell Biology 2: 70-75)。

【0159】

5.4 予防/治療方法

本発明は、本発明の1以上のEphA2作動性物質を投与することを含む、対象におけるEphA2の過剰発現および/または特に上皮細胞の非腫瘍性細胞過増殖(例えば、喘息、COPD、肺線維症、アスベスト肺、IPF、DIP、UIP、腎線維症、肝線維症、他の線維症、気管支過剰応答、乾癬、脂漏性皮膚炎および嚢胞性線維症)および内皮細胞の非腫瘍性細胞過増殖(例えば、再狭窄、過増殖性血管疾患、ペーチェット症候群、アテローム性動脈硬化症および黄斑変性)に関連した障害を治療、予防または処置するための方法を含む。1つの実施形態においては、本発明の物質は、EphA2の過剰発現に関連した障害および/または非腫瘍性細胞過増殖障害の治療、予防または処置に有用な1以上の他の治療用物質と組合せて投与することが可能である。ある実施形態においては、本発明の1以上のEphA2作動性物質を、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療に有用な1以上の他の治療用物質と組合せて、哺乳類、好ましくはヒトに投与する。

【0160】

好ましい実施形態においては、本発明の1以上のEphA2作動性物質は抗体、好ましくはモノクローナル抗体である。より好ましい実施形態においては、本発明のEphA2作動性抗体はEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5である。ある好ましい実施形態においては、本発明の抗体はヒト化されている。他の実施形態においては、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5と比較して増強した活性、結合能などを有する、例えば1以上のアミノ酸置換を特に可変ドメイン内に有するEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248またはB233の変異体を提供する。

【0161】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明の治療および予防方法は、限定するものではないがEphA2に特異的なアンチセンス核酸、RNAiを媒介する二本鎖EphA2 RNA、抗EphA2リボザイムなどを含むEphA2発現のインヒビターの投与を含む(前記第5.3節を参照されたい)。

【0162】

本明細書に記載されている投与の量および頻度は、治療的に有効および予防的に有効なる語に包含される。投与量および頻度は更に、典型的には、投与する具体的な治療用または予防用物質、非腫瘍性過増殖性障害の重症度、投与経路ならびに患者の年齢、体重、応答性および過去の病歴に応じた各患者に特定の要因に従い様々なものとなる。適当な計画は、そのような要因を考慮することにより、および例えば文献で報告されている及びPhysician's Desk Reference (56th ed., 2002)において推奨されている投与量に従うことにより、当業者により選択されうる。

【0163】

5.4.1 患者集団

本発明は、EphA2過剰発現、細胞過増殖、特に上皮細胞および内皮細胞の過増殖、またはムチン産生の増強に関連した非腫瘍性障害を治療、予防および処置するための方法を提

供し、該方法は、それを要する対象に、本発明の1以上のEphA2作動性物質の治療的または予防的に有効な量を投与することによるものである。対象は、好ましくは哺乳類、例えば非霊長類（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、例えばシノモルグス（*cynomolgus*）サルおよびヒト）である。好ましい実施形態においては、対象はヒトである。

【0164】

本発明の方法および組成物は、非腫瘍性過増殖性障害に罹患している患者、あるいは非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害に罹患すると予想される者、例えば、非増殖性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の遺伝的素因を有する者（例えば、米国特許第6,387,615号および国際特許公開番号W0 95/05481を参照されたい）、あるいは非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害に過去に罹患したことがある者、あるいはタバコの煙にさらされている者、上気道感染（例えば、RSV、HMPVまたはPIV）に感染したことがある又は既に感染している患者、あるいは血管形成術を受けたことがある者に、本発明の1以上のEphA2作動性物質を投与することを含む。そのような（患）者は、例えばEphA2に基づかない治療により、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害に対して既に治療されていても、治療されていなくてもよい。本発明の方法および組成物は、一線級または二線級の治療として使用することが可能である。本発明はまた、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療するためにEphA2に基づかない治療を現在受けている患者、あるいはEphA2に基づかない治療の1以上に治療抵抗性である患者の治療を含む。本発明の方法および組成物は、EphA2に基づかない治療のいずれかの有害な作用または不耐性が生じる前に使用することが可能である。本発明はまた、治療抵抗性患者における症状を治療または改善するために本発明の1以上のEphA2作動性物質を投与するための方法を含む。本発明はまた、非増殖性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の素因を有する患者において非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の開始または再発を予防するために本発明の1以上のEphA2作動性物質を投与するための方法を含む。

10

20

【0165】

1つの実施形態においては、過増殖性上皮細胞障害（例えば、喘息またはCOPD）罹患すると予想される患者は、呼吸器ウイルス感染を有する又は有していたことがある患者である。もう1つの実施形態においては、呼吸器ウイルス感染は呼吸器合胞体ウイルス（RSV）によるものである。特定の実施形態においては、呼吸器ウイルス感染を有する又は有していたことがある患者は、ヒトの小児、乳児または早産乳児である（例えば、Zhoaら、2002、*Pediatr. Allergy Immunol.* 13:47-50; MessageおよびJohnston、2002、*Br. Med. Bull.* 61:29-43; Klinnertら、2001、*Pediatrics* 108:E69; Sigurs、2002、*Respiratory Res.* 4:S8-S14を参照されたい）。

30

【0166】

他の実施形態においては、本発明はまた、現在の療法の代替手段としての、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療方法を提供する。1つの実施形態においては、現在の療法は患者に対して極めて毒性である（すなわち、許容できない又は耐えられない副作用を引き起こす）ことが判明している又は判明しうる。もう1つの実施形態においては、EphA2に基づく療法は、現在の療法と比較して軽減した副作用を有する。もう1つの実施形態においては、患者は現在の療法に治療抵抗性であることが判明している。そのような実施形態においては、本発明は、いずれの他の非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害療法をも伴わない本発明のEphA2作動性物質の1以上の投与を提供する。ある実施形態においては、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療するための別の療法の代わりに、本発明の1以上のEphA2作動性物質を、それを要する患者に投与することが可能である。

40

【0167】

1つの実施形態においては、EphA2に基づかない療法は、EphA4に基づく療法である。

【0168】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は喘息であり、EphA2に基づかない療法は

50

、例えば、吸入される 2アゴニスト、吸入されるコルチコステロイド、レチノイン酸、抗IgE抗体、ホスホジエステラーゼインヒビター、ロイコトリエンアンタゴニスト、抗IL-9抗体および/または抗ムチン療法（例えば、抗hCLCA1療法、例えば、Lomucin（商標））である。

【0169】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害はCOPDであり、EphA2に基づかない療方は、例えば、チオトロピウム（tiotropium）および/またはイプラトロピウム（ipratropium）である。もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は肺線維症であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、組換えヒトレラキシン、例えばConXn（商標）、メチルプレドニゾン、シクロホスファミド、コルチコステロイド、アザチオプリン、シクロホスファミド、ペニシラミン、コルヒチン、シクロスポリンおよび/またはプレドニゾンである。

10

【0170】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は気管支過剰応答であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、ブデソニド（budesonide）、ザフィルカスト（zafirlukast）、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ブデソニド、アンジオテンシンII 1型（AT1）受容体アンタゴニスト、例えばカンデサルタン（candesartan）シレキセチル（cilexetil）、および/またはEPI-2010（商標）のようなアデノシンA（1）受容体を標的化するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0171】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は乾癬であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、コルチコステロイド、カルシポトリエン（calcipotriene）、コールタール、アントラリン、レチノイド、サリチル酸、モイスチュライザーおよび/または光線療法である。

20

【0172】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は脂漏性皮膚炎であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、シクロピロキソラミン（ciclopiroxolamine）、ケトコナゾール、亜鉛ピリチオン（pyrithione）、テルビナフィン（terbinafine）および/またはピメクロリムス（pimecrolimus）である。

【0173】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は再狭窄であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、バクリタキセル、ドキシソルピシン、ジピリダモール、クロピドグレル（clopidogrel）および/またはアスピリンである。

30

【0174】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は過増殖性血管障害であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、サイクリン依存性キナーゼインヒビター、プロモクリプチンおよび/またはIL-2受容体特異的キメラ毒素、例えばDAD486-IL-2（商標）である。

【0175】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害はベーチェット症候群であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、コルチコステロイド、プレドニゾンまたは免疫抑制薬、例えばアザチオプリン、クロラムブシル、シクロスポリン、コルヒチンおよび/またはシクロホスファミドである。

40

【0176】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害はアテローム性動脈硬化症であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、遮断薬、フィブリン溶解/血栓溶解療法、ラロキシフェンおよび/またはスタチン療法である。

【0177】

もう1つの実施形態においては、過増殖性障害は黄斑変性であり、EphA2に基づかない療方は、例えば、レーザー手術および/または高レベルの抗酸化剤および亜鉛である。

【0178】

1つの実施形態においては、EphA2作動性物質は抗体である。もう1つの実施形態におい

50

ては、EphA2抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、B233、EA2またはEA5の1以上である。

【0179】

1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は喘息ではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害はCOPDではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は乾癬ではない。もう1つの実施形態においては、非腫瘍性過増殖性障害は再狭窄ではない。

【0180】

5.4.2 他の予防用/治療用物質

いくつかの実施形態においては、本発明は、本発明の1以上のEphA2作動性物質を、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療するための或いは非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の症状を軽減する他の任意の療法（例えば、前記の療法）と組合せて投与することによる、患者の非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療方法を提供する。患者への複数の治療用/予防用物質の投与は、それらの物質が一緒に作用して、それらが単独で投与された場合より大きな利益を与えるよう、完全に同時に又はある時間間隔で順次行うことが可能である。例えば、各治療用/予防用物質は、異なる時点で任意の順序で投与することが可能であるが、同時に投与しない場合には、それらは、所望の治療または予防効果が得られるよう十分に接近した時間間隔で投与すべきである。各治療用/予防用物質は、別々に、任意の適当な形態および任意の適当な経路で投与することが可能である。

10

20

【0181】

種々の実施形態においては、予防用または治療用物質は、5分未満の間隔、30分未満の間隔、1時間未満の間隔、約1時間の間隔、約1時間～約2時間の間隔、約2～約3時間の間隔、約3時間～約4時間の間隔、約4時間～約5時間の間隔、約5時間～約6時間の間隔、約6時間～約7時間の間隔、約7時間～約8時間の間隔、約8時間～約9時間の間隔、約9時間～約10時間の間隔、約10時間～約11時間の間隔、約11時間～約12時間の間隔、せいぜい24時間の間隔またはせいぜい48時間の間隔で投与する。好ましい実施形態においては、2以上の成分を患者の同一来院時に投与する。

【0182】

1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質を、過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療することが現在知られている療法（例えば、前記第5.4.1節を参照されたい）と組合せて投与する。もう1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質を、免疫調節剤、呼吸器ウイルスの複製を減少させる抗ウイルス剤、気管支拡張剤または抗ムチン療法と組合せて投与する。もう1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質を、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療することが現在知られている療法および免疫調節剤、呼吸器ウイルスの複製を減少させる抗ウイルス剤、気管支拡張剤または抗ムチン療法と組合せて投与する。

30

【0183】

もう1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質は、EphA4作動性物質（2003年6月6日付け出願の米国仮特許出願第60/476,909号および2003年9月16日付け出願の米国仮特許出願第60/503,356号（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）と組合せて投与する。

40

【0184】

5.4.2.1 免疫調節剤

ある実施形態においては、本発明は、本発明の1以上のEphA2作動性物質と1以上の免疫調節剤（すなわち、対象における免疫応答を調節する物質）とを含む組成物、および該組成物の投与または1以上の免疫調節剤と組合せられたEphA2に基づく予防用/治療用物質の投与を含む、対象における、過増殖性細胞（例えば、上皮細胞または内皮細胞）が関わる障害の治療方法を提供する。本発明の特定の実施形態においては、免疫調節剤はヒト対象における免疫応答を阻害または抑制する。免疫調節剤は当業者によく知られており、本発明

50

の方法および組成物において使用することが可能である。

【0185】

免疫調節剤は対象における免疫応答の1以上又は全ての態様に影響を及ぼしうる。免疫応答の態様には、炎症応答、補体カスケード、白血球およびリンパ球増殖、単球および/または好塩基球数、および免疫系の細胞間の細胞連絡が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の或る実施形態においては、免疫調節剤は免疫応答の態様の1つを調節（モジュレーション）する。他の実施形態においては、免疫調節剤は免疫応答の2以上の態様を調節する。本発明の好ましい実施形態においては、患者への免疫調節剤の投与は対象の免疫応答能の態様の1以上を抑制または軽減する。

【0186】

本発明においては、1以上の免疫調節剤を、本発明のEphA2作動性物質の前、後またはそれと同時に、非腫瘍性過増殖性細胞障害を有する対象に投与することが可能である。好ましくは、必要に応じて免疫応答の態様の1以上を軽減または抑制するために、1以上の免疫調節剤を、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を有する対象に投与する。免疫応答の態様の1以上を測定し、それにより、免疫調節剤を投与することが必要であるかどうかを判定するためには、当業者によく知られた任意の技術を用いることが可能である。好ましい実施形態においては、免疫応答の態様の1以上を一過性に軽減または抑制するために、1以上の免疫調節剤を、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を有する対象に投与する。免疫系の態様の1以上のそのような一過性の抑制または軽減は数時間、数日間、数週間または数ヶ月続きうる。免疫応答の態様の1以上の一過性の軽減または抑制は本発明のEphA2作動性物質の治療効果を増強する。

【0187】

好ましい実施形態においては、免疫調節剤はIL-9の量を減少させる。より好ましい実施形態においては、免疫調節剤は、IL-9に免疫特異的に結合する抗体（好ましくはモノクローナル抗体）またはそのフラグメントである（例えば、2004年4月12日付け出願のReedによる米国特許出願第__号、発明の名称“Methods of Preventing or Treating Respiratory Conditions”（Attorney Docket No. 10271-113-999）、2004年4月12日付け出願のReedによる米国特許出願第__号、発明の名称“Recombinant IL-9 Antibodies and Uses Thereof”（Attorney Docket No. 10271-112-999）、2004年4月12日付け出願のReedによる米国特許出願第__号、発明の名称“Anti-IL-9 Antibody Formulations and Uses Thereof”（Attorney Docket No. 10271-126-999）（それらの全ての全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）。特定の作用メカニズムにより束縛されるものではないが、抗IL-9抗体の使用はIL-9の生物学的効果を中和し、それにより炎症細胞のリクルートメント、上皮または新血管内膜の過形成、および上皮細胞のムチン産生を阻止または軽減する。

【0188】

他の実施形態においては、本発明の組成物および方法において使用しうる他の免疫調節剤は、免疫調節剤として機能することが知られている商業的に入手可能なものでありうる。免疫調節剤には、サイトカイン、抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、Fv、sFv、FabもしくはF(ab)₂フラグメントまたはエピトープ結合性フラグメント）、無機化合物またはペプチド模擬体のような物質が含まれるが、これらに限定されるものではない。免疫調節剤の更なる具体例には、抗IL-13モノクローナル抗体、抗IL-4モノクローナル抗体、抗IL-5モノクローナル抗体、抗IL-2R抗体（例えば、抗Tacモノクローナル抗体およびBT536）、抗CD4モノクローナル抗体、抗CD3モノクローナル抗体、抗CD3モノクローナルヒト抗体OKT3、抗CD8モノクローナル抗体、抗CD40リガンドモノクローナル抗体、抗CD2モノクローナル抗体、CTLA4免疫グロブリン、シクロホスファミド、シクロスポリンA、マクロライド抗生物質（例えば、FK506（タクロリムス））、メチルプレドニゾロン（MP）、コルチコステロイド、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン（シロリムス）、ミゾリピン、デオキシスベルグアリン、ブレクイナル（brequinar）、マロノニトリロアミンデス（malononitriloamindes）（例えば、レ

10

20

30

40

50

フルナミド (leflunamide))、 2-アゴニスト、ロイコトリエンアンタゴニスト、およびIgEレベルを減少させる物質が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0189】

免疫調節剤の免疫調節活性は、例えばCTLアッセイ、増殖アッセイ、共刺激分子およびサイトカインのような特定のタンパク質の発現に関するイムノアッセイ (例えば、ELISA) ならびにFACSを含む当業者によく知られた任意の技術により *in vitro* および / または *in vivo* で測定することが可能である。

【0190】

5.4.2.2. 抗ウイルス剤

ある実施形態においては、本発明は、本発明の1以上のEphA2作動性物質と1以上の抗ウイルス剤とを含む組成物、および該組成物の投与または1以上の抗ウイルス剤と組合されたEphA2に基づく予防用 / 治療用物質の投与を含む、対象における、過増殖性細胞が関わる障害の治療方法を提供する。本発明の特定の実施形態においては、該障害は過増殖性上皮細胞障害 (例えば、喘息またはCOPD) であり、抗ウイルス剤は呼吸器ウイルスによる感染を抑制し、または呼吸器ウイルスの複製を抑制もしくは軽減する。特定の実施形態においては、呼吸器ウイルスは呼吸器合胞体ウイルス (RSV)、ヒトメタニューモウイルス (Human Metapneumovirus) (HMPV) またはパラインフルエンザウイルス (PIV) である。抗ウイルス剤は当業者によく知られており、本発明の方法および組成物において使用することが可能である。特定の実施形態においては、EphA2に基づく抗ウイルス予防用 / 治療用物質を、呼吸器ウイルスに現在感染している又は呼吸器ウイルス感染を有していたことがあるヒトの小児、乳児または早産乳児である患者に投与する。乳児、特に早産乳児の時に呼吸器ウイルス (例えば、RSV) に感染した患者は、喘息および / またはCOPDを発生するリスクが高い (Zhoaら, 2002, *Pediatr. Allergy Immunol.* 13:47-50; Message and Johnston, 2002, *Br. Med. Bull.* 61:29-43; Klinnertら, 2001, *Pediatrics* 108:E69; Sigurs, 2002, *Respiratory Res.* 4:S8-S14)。

10

20

【0191】

好ましい実施形態においては、抗ウイルスRSV物質は1以上の抗RSVモノクローナル抗体である。本発明の方法で使用しうる抗RSV抗原抗体はRSVの抗原に免疫特異的に結合する。ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体はRSVのA群のRSV抗原に免疫特異的に結合する。ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体はRSVのB群のRSV抗原に免疫特異的に結合する。ある実施形態においては、抗体は1群のRSVの抗原に結合し、その他の群の類似抗原と交差反応する。

30

【0192】

ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体は、RSV核タンパク質、RSVリン酸化タンパク質、RSVマトリックスタンパク質、RSV小疎水性タンパク質、RSV RNA依存性RNAポリメラーゼ、RSV Fタンパク質および / またはRSV Gタンパク質に免疫特異的に結合する。

【0193】

ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体は、RSV核タンパク質、RSVヌクレオキャプシドタンパク質、RSVリン酸化タンパク質、RSVマトリックスタンパク質、RSV付着糖タンパク質、RSV融合糖タンパク質、RSVヌクレオキャプシドタンパク質、RSVマトリックスタンパク質、RSV小疎水性タンパク質、RSV RNA依存性RNAポリメラーゼ、RSV Fタンパク質、RSV Lタンパク質、RSV Pタンパク質および / またはRSV Gタンパク質の対立遺伝子変異体に結合する。

40

【0194】

RSV抗原に免疫特異的に結合する抗体は当技術分野において公知であることが認識されるべきである。例えば、パリビズマブ (palivizumab) は、小児患者におけるRSV感染の予防のために現在使用されているヒト化モノクローナル抗体である。特定の実施形態においては、本発明の方法で使用する抗体はパリビズマブ、A4B4 (例えば、国際出願公開番号W002/43660を参照されたい) またはその抗原結合性フラグメント (例えば、1以上の相補性決定領域 (CDR) および好ましくは、パリビズマブまたはA4B4の変域ドメインを含有する

50

もの)である。パリビズマブおよびA4B4のアミノ酸配列はJohnsonら, 1997, J. Infectious Disease 176:1215-1224および米国特許第5,824,307号; Youngら, 国際出願公開番号W0 02/43660, 発明の名称“Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment”; および2002年3月29日付け出願の米国仮特許出願第60/368,729号(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されている。

【0195】

ある実施形態においては、1以上の抗RSV抗原抗体には、パリビズマブ(palivizumab)またはA4B4が含まれるが、これらに限定されるものではない。ある実施形態においては、RSV抗原に免疫特異的に結合するの1以上の抗体またはその抗原結合性フラグメントは、Fc Rn受容体に対して、パリビズマブまたはA4B4のFcドメインより高いアフィニティーを有するFcドメインを含む。そのような抗体は、2001年12月12日付け出願の米国特許出願第10/020,354号(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に記載されている。ある実施形態においては、1以上の抗RSV抗原抗体には、AFFF、P12f2、P12f4、PI 1d4、A1e109、A12a6、A13c4、A17d4、A8c7、IX-493L1FR、H3-3F4、M3H9、Y10H6、DG、AFFF (1)、6H8、A8C7、L1-7E5、L2-15B10、A13a11、A1H5、A4B4 (1)、A4B4L1FR-S28RまたはA4B4-F52Sが含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの抗体は、Youngら, 国際出願公開番号W0 02/43660, 発明の名称“Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment” および2003年7月25日付け出願の米国特許出願第10/0628,088号, 発明の名称“Methods of Treating and Preventing RSV, HMPV, and PIV Using Anti-RSV, Anti-HMPV, and Anti-PIV Antibodies” および2003年3月31日付け出願の米国特許出願第10/403,180号, 発明の名称“Methods Of Administering/Dosing Anti-Rsv Antibodies For Prophylaxis And Treatment”(それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)に開示されている。

【0196】

ある実施形態においては、RSV抗原に結合する1以上の抗体はRSV抗原に対して、パリビズマブまたはA4B4がRSV F糖タンパク質に対して有するものより高いアビディティおよび/またはアフィニティーを有する。ある実施形態においては、RSV抗原に免疫特異的に結合する1以上の抗体は、RSV抗原に対して、任意の既に公知の抗RSV抗原特異的抗体またはその抗原結合性フラグメントより高いアフィニティーおよび/またはアビディティを有する。ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体はパリビズマブでもA4B4でもない。

【0197】

ある実施形態においては、本発明の方法および組成物において使用する抗体またはそのフラグメントは、RSVの株には無関係に1以上のRSV抗原に免疫特異的に結合する。特に、抗RSV抗原抗体はヒトRSV AおよびヒトRSV Bの抗原に結合する。ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体はRSVの株の1つかもう1つのRSV株からのRSV抗原に結合する。特に、抗RSV抗原抗体はヒトRSV Aの抗原に結合し且つヒトRSV Bには結合せず、あるいはその逆も成り立つ。特定の実施形態においては、該抗体またはその抗原結合性フラグメントはRSV F糖タンパク質、G糖タンパク質またはSHタンパク質に免疫特異的に結合する。ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体はRSV F糖タンパク質に免疫特異的に結合する。もう1つの好ましい実施形態においては、抗RSV抗原抗体またはその抗原結合性フラグメントはRSV F糖タンパク質のA、B、C、I、II、IV、VまたはVI抗原部位に結合する(例えば、Lopezら, 1998, J. Virol. 72:6922-6928(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい)。

【0198】

ある実施形態においては、抗RSV抗原抗体は抗RSV抗原抗体であり、2000年11月28日付け出願の米国特許出願第09/724,531号、2001年11月28日付け出願の米国特許出願第09/996,288号、および2001年11月28日付け出願の米国特許出願第09/996,265号(これらはすべて、発明の名称“Methods of Administering/Dosing Anti-RSV Antibodies for Prophylaxis and Treatment”であり、Youngらによるものであり、それらの全体を参照により本明細書

に組み入れることとする)の方法により製造される。本発明の方法において使用しうる安定化抗体製剤のための方法および組成物は、2002年6月14日付け出願の米国仮特許出願第60/388,921号および2002年6月14日付け出願の米国仮特許出願第60/388,920号に開示されている。

【0199】

他の実施形態においては、本発明の物質と組合せて投与される抗ウイルス剤は、HMPVおよび/またはPIVの複製を軽減または抑制する。そのような物質および治療方法の具体例に関しては、2003年7月25日付け出願の米国特許出願第10/628,088号、発明の名称“Methods of Treating and Preventing RSV, HMPV, and PIV Using Anti-RSV, Anti-HMPV, and Anti-PIV Antibodies”(その全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。

10

【0200】

5.4.3 コンジュゲート化 (conjugated) 抗体

本発明は、治療すべき非腫瘍性過増殖性障害(例えば、上皮細胞または内皮細胞の過増殖)に關与する細胞に予防用/治療用物質を標的化するための抗体の使用を含む。そのような予防用/治療用物質を抗体またはそのフラグメント(例えば、Fabフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、F(ab)₂フラグメントまたはそれらの一部)に組換え的に融合したり又は化学的に結合(コンジュゲート化)(共有結合および非共有結合の両方を含む)させる。1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性抗体またはそのフラグメントを、非腫瘍性過増殖性障害を治療するために使用する予防用/治療用物質に結合させる。そのような予防用/治療用物質は、EphA2に基づくもの(例えば、本発明の作動性物質)またはEphA2に基づかないもの(例えば、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害を治療することが現在知られている、EphA2に基づかない物質、免疫調節剤、呼吸器ウイルスの複製を軽減させる抗ウイルス剤、気管支拡張剤または抗ムチン療法)でありうる。

20

【0201】

抗体またはそのフラグメントは、予防用/治療用部分、例えば細胞毒、例えば静細胞因子または殺細胞因子、治療用物質または放射性金属イオン、例えば放射体に結合させることが可能である。細胞毒または細胞毒性因子には、細胞に有害である任意の物質が含まれる。具体例には、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、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、ミトザントロン、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、プロパノロール、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それらの類似体またはホモログが含まれる。治療用物質には、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキセート、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(例えば、メクロルエタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、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(例えば、ダウノルピシン(旧称ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(旧称アクチノマイシン))、プレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC)および抗有糸分裂剤(例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0202】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、与えられた生物学的応答を修飾する予防用/治療用物質または薬物部分に結合させることができる。治療剤または薬物部分は古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドでありうる。そのようなタンパク質には、例え

50

ば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、コレラ毒素またはジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、インターフェロン（IFN- α ）、インターフェロン（IFN- β ）、神経成長因子（NGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、組織プラスミノゲンアクチベーター（TPA）、アポトーシス剤（例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I（国際特許公開番号WO 97/33899を参照されたい））、AIM II（国際特許公開番号WO 97/34911を参照されたい）、Fasリガンド（Takahashiら，1994，J. Immunol.，6: 1567）およびVEGI（国際特許公開番号WO 99/23105を参照されたい）、血栓剤または抗血管新生剤（例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン）のようなタンパク質；あるいは例えばリンホカイン（例えば、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（例えば、成長ホルモン（「GH」））のような生物応答修飾物質が含まれうる。

10

【0203】

さらに、抗体は、放射性物質、または放射性金属イオンを結合させるのに有用な大環状キレターのような予防用／治療用部分に結合させることが可能である。ある実施形態においては、大環状キレターは、リンカー分子を介して抗体に結合されうる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。そのようなリンカー分子は当技術分野において一般に公知であり、Denardoら，1998，Clin. Cancer Res. 4:2483-90；Petersonら，1999，Bioconjug. Chem. 10:553；およびZimmermanら，1999，Nucl. Med. Biol. 26:943-50（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。

20

【0204】

もう1つの実施形態においては、（病態関連マーカーの認識により）非腫瘍性過増殖性障害に冒される上皮細胞または内皮細胞を標的化するがEphA2には免疫特異的に結合しない抗体またはそのフラグメントを、非腫瘍性過増殖性障害を治療するために使用する予防用／治療用物質に結合させる。そのような予防用／治療用物質はEphA2に基づくものである（例えば、本発明の作動性物質）。

【0205】

遊離物質と比較した場合の結合（コンジュゲート化）物質の相対的効力は多数の要因に左右されうる。例えば、（例えば、エンドサイトーシスによる）細胞内への抗体-物質の取り込みの速度、該抗体からの該物質の遊離の速度／効率、細胞からの該物質の輸出の速度などすべてが、該物質の作用に影響を及ぼしうる。物質の標的化送達に使用する抗体は、関連する細胞型（すなわち、治療すべき障害に関連している細胞型）によりエンドサイトーシスされる能力に関して、当技術分野で公知の任意の方法によりアッセイすることが可能である。また、物質を抗体に結合させるために用いる連結のタイプは、標的細胞内での該物質の作用が妨げられないよう、当技術分野で公知の任意の方法によりアッセイすべきである。

30

【0206】

もう1つの実施形態においては、抗体を、治療用物質を封入するために使用するリポソームに融合または結合させることが可能である（例えば、Parkら，1997，Can. Lett. 118:153-160；Lopes de Menezesら，1998，Can. Res. 58:3320-30；Tsengら，1999，Int. J. Can. 80:723-30；Crosassoら，1997，J. Pharm. Sci. 86:832-9を参照されたい）。好ましい実施形態においては、リポソームの薬物動態およびクリアランスは、PEGの脂質誘導体をリポソーム製剤内に含有させることにより改善される（例えば、Allenら，1991，Biochem Biophys Acta 1068:133-41；Huwylerら，1997，J. Pharmacol. Exp. Ther. 282:1541-6を参照されたい）。

40

【0207】

治療用／予防用物質は、限定するものではないがアルデヒド／シッフ結合、スルフヒドрил結合、酸不安定性結合、cis-アコミチル結合、ヒドラゾン結合、酵素分解性結合を含む当技術分野で公知の任意の方法により抗体に結合させることが可能である（全般的には

50

、Garnett, 2002, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:171-216を参照されたい)。治療用部分を抗体に結合させるための更なる技術は良く知られている。例えば、Arnonら, “*Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy*”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeldら(編), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら, “*Antibodies For Drug Delivery*”, in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinsonら(編), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “*Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review*”, in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pincheraら(編), pp. 475-506 (1985); “*Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy*”, in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwinら(編), pp. 303-16 (Academic Press 1985); およびThorpeら, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58を参照されたい。抗体をポリペプチド物質に融合または結合させるための方法は当技術分野で公知である。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号; EP 307,434、EP 367,166; 国際特許公開番号W0 96/04388およびW0 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を参照されたい。抗体を別の抗体に融合または結合させるための方法はSegal, 米国特許第4,676,980号に記載されている。物質への抗体の融合は必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じうる。そのようなリンカー分子は当技術分野で一般に公知であり、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。

【0208】

他の実施形態においては、遺伝子シャフリング (gene-shuffling)、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 (「DNAシャフリング」と総称される) の技術により、抗体特性を、望みどおりに改変することが可能である (例えば、より高いアフィニティを有し、より低い解離速度を有する抗体またはそのフラグメント)。全般的には、米国特許第号5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号ならびに第5,837,458号、ならびにPattenら, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, 1998, *Trends Biotechnol.* 16:76; Hanssonら, 1999, *J. Mol. Biol.* 287:2659、ならびにLorenzoおよびBlasco, 1998, *BioTechniques* 24:308を参照されたい。組換え前に変異導入型PCRによるランダム突然変異誘発、ランダムヌクレオチド挿入または他の方法に付すことにより、抗体もしくはそのフラグメントまたはコード化抗体もしくはそのフラグメントを改変することが可能である。特定の障害に関連した細胞上で発現された抗原に免疫特異的に結合する、抗体または抗体フラグメントをコードするポリヌクレオチドの部分の1以上を、1以上の異種分子の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、断片などの1以上と組換えることが可能である。

【0209】

他の実施形態においては、結合 (コンジュゲート化) 抗体またはそのフラグメントを更に、マーカー配列、例えば精製を促進するペプチドに融合させることが可能である。好ましい実施形態においては、該マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) において提供されるタグのようなヘキサヒスチジンペプチド (それらの多くは商業的に入手可能である) である (例えば、Gentzら, 1989, *PNAS* 86:821を参照されたい)。精製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に由来するエピトープに相当する赤血球凝集素 (HA) タグ (Wilsonら, 1984, *Cell*, 37:767)、および「flag」タグが含まれるが、これらに限定されるものではない。当技術分野で公知の任意の精製方法を用いることが可能である (例えば、国際特許公開W0 93/21232; EP 439,095; Naramuraら, 1994, *Immunol. Lett.* 39:91-99; 米国特許第5,474,981号; Gilliesら, 1992, *PNAS* 89:1428-1432; およびFellら, 1991, *J. Immunol.* 146:2446-2452を参照されたい)。

【0210】

他の実施形態においては、結合（コンジュゲート化）抗体またはそのフラグメントもしくは変異体を、単独で又は予防用/治療用物質と組合せて、診断用または検出可能物質に結合させることが可能である。そのような抗体は、臨床試験手続きの一部として非腫瘍性過増殖性障害の発生または進行をモニターまたは予知する（例えば、特定の療法の有効性を決定する）のに有用でありうる。そのような診断および検出は、検出可能な物質に該抗体を結合させることにより達成することができる。検出可能な物質には、限定するものではないがホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼのような種々の酵素；限定するものではないがストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンのような補欠分子族；限定するものではないがウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、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のような蛍光物質；限定するものではないがルミノールのような発光物質；限定するものではないがルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンのような生物発光物質；限定するものではないがビスマス (^{213}Bi)、炭素 (^{14}C)、クロム (^{57}Cr)、フッ素 (^{18}F)、ガドリニウム (^{153}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 、 ^{111}In 、 ^{111}In)、ヨウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタニウム (^{140}La)、ルテニウム (^{177}Lu)、マンガ (^{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 (^{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)、セレンウム (^{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}Tl)、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 (^{90}Yb)、亜鉛 (^{65}Zn) のような放射性物質；種々の陽電子放射断層撮影法を使用する陽電子放出性金属、ならびに非放射性常磁性金属イオンが含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

20

【0211】

5.5 本発明のEphA2作動性物質の同定

本発明は、EphA2を発現する細胞、特に上皮細胞または内皮細胞と共に物質をインキュベートし、ついでEphA2細胞質尾部リン酸化の増強、EphA2分解の増強、EphA2自己リン酸化の増強、EphA2活性（自己リン酸化以外）の減少、病原性細胞表現型の軽減に関してアッセイし、それにより本発明のEphA2作動性物質を同定することによる、本発明のEphA2作動性物質に関してアッセイおよびスクリーニングするための方法を提供する。好ましい実施形態においては、EphA2作動性物質は抗体、好ましくはモノクローナル抗体、好ましくは、低い K_{off} 速度（例えば、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} ）を有するものである。本発明はまた、例えば、病的症状の軽減および/または病態関連分子（例えば、ムチン、炎症性分子または細胞外マトリックス分子）の量の減少により、EphA2作動性物質を同定するための *in vivo* アッセイの使用を含む。

30

【0212】

5.5.1 EphA2細胞質尾部リン酸化を増強する物質

本発明は、EphA2を発現する細胞（特に上皮細胞または内皮細胞）を接触させた場合にEphA2リン酸化および/またはEphA2分解を増強するEphA2作動性物質に関してアッセイおよびスクリーニングするための方法を提供する。EphA2のリン酸化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公知の任意の方法を用いて、候補EphA2作動性物質をアッセイして、その活性を測定することが可能である（例えば、後記第6.3.1節を参照されたい）。

40

【0213】

5.5.2 病原性上皮または内皮細胞表現型を抑制する物質

本発明のEphA2作動性物質は、病原性上皮または内皮細胞表現型、例えばムチンの分泌、ムチン分泌細胞への分化、炎症性因子の分泌、ECM因子、特にフィブロネクチンの分泌

50

および/または過増殖を軽減(好ましくは抑制)しうる。当業者であれば、候補EphA2作動性物質を、そのような挙動をそれが抑制する能力に関してアッセイすることが可能である。

【0214】

いくつかの実施形態においては、候補物質をスクリーニングするために、肺上皮の*in vitro*モデルを使用することが可能である。細胞を培養して、気道の上皮組織に酷似した、ヒト由来気管/気管支上皮細胞(例えば、NHBEまたはTBE細胞)からの偽重層(pseudo-stratified)高分化モデル組織を形成させることができる。該培養を細胞培養インサート上、気-液界面において成長させて、気道炎症および刺激研究ならびに吸入毒性研究における揮発性物質の気相暴露を行うことが可能である。吸入薬送達研究のために、経上皮透過性を測定することが可能である。そのようなモデル系、例えばEpiAirway(商標) Tissue Model System(MatTek Corp., Ashland, MA)が商業的に入手可能である。

10

【0215】

ムチン分泌

1つの実施形態においては、病原性上皮細胞表現型はムチン分泌である。多数の*in vitro*および*in vivo*アッセイにより、候補EphA2作動性物質を、ムチン分泌をそれが軽減または抑制する能力に関してアッセイすることが可能である。培養気道杯細胞からのムチン遊離を測定するために使用しうる*in vitro*アッセイの一例は、ハムスター気管表面上皮(HTSE)細胞培養系(米国特許第6,245,320号を参照されたい)。簡潔に説明すると、7~8週齢の雄ゴールデン・シリアン(Golden Syrian)ハムスター(Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, Ind.)から入手した気管を使用して、HTSE細胞を集める。ついで、Kimら, 1989, Exp. Lung Res. 15:299-314に記載されているとおりに、HTSE細胞をコラーゲンゲル上で培養する。Kimら, 1989, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 1:137-143に記載されているとおりに、コンフルエント細胞を標識用培地と共に24時間インキュベートすることにより、ムチンを代謝的に放射能標識する。24時間のインキュベーション時間の終了時に、使った培地(前処理サンプル)を集め、標識された培養をCa⁺⁺およびMg⁺⁺の非存在下でPBSで2回洗浄し、ついで候補EphA2作動性物質の存在下で30分間追跡する。該追跡培地は処理サンプルと称される。追跡時間の終了時に、浮遊細胞および細胞残渣を遠心分離により処理サンプルから取り出し、それらの標識ムチン含量に関してアッセイする。セファロースCL-4B(Pharmacia, Uppsala, Sweden)ゲル濾過カラムクロマトグラフィー後に取り出され

20

30

【0216】

分化特性を維持する気/液界面系内で維持される初代気管上皮細胞培養(Adlerら, 1992, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 6:550-556)および肺上皮細胞系(例えば、NIH-292細胞)のような他の*in vitro*アッセイを用いることが可能である。ムチンの量を測定するためには、標準的な分子生物学的技術、例えば、タンパク質発現レベルに関してはウエスタンブロットおよびELISA、ならびにRNA発現レベルに関してはPCRおよびノーザンブロット(これらに限定されるものではない)を用いることが可能である。

40

【0217】

本発明のEphA2作動性物質を同定するためには、*in vivo*アッセイを用いることも可能である。本発明のEphA2作動性物質を同定するためには、喘息またはCOPDの動物モデルを使用することも可能である。例えば、ムチン分泌細胞の分化に対する候補EphA2作動性物質の効果をアッセイするために、内毒素/LPS誘発性炎症のマウスモデルを使用することが可能である(Steigerら, 1995, J. Am. Respir. Cell Mol. Biol., 12:307-14および米国特許第6,083,973号)。簡潔に説明すると、LPS(シュードモナス・エリジノス(Pseudomonas aeruginosa)由来のLPS; Sigma Chemical)の400 μg/kg/用量/日の3日間の反復点滴

50

により、マウスまたはラットにおいて肺炎症を誘発することが可能である。最初のLPSチャレンジの24時間前から、動物を候補EphA2作動性物質で1日1回処理することが可能である。最後のLPSチャレンジの24時間後、深い麻酔下での放血により動物を犠死させた。肺にリン酸緩衝食塩水(2×5ml)を灌注して粘液層を洗い落とす。気管支灌注液を10分間遠心分離し、無細胞上清を凍結し、ムチンの存在量の測定のための分析まで-20℃で保存する。当技術分野で公知の任意の方法、例えば、アルシアンブルー(Alcian-blue)および/または過ヨウ素酸-シッフ染色を使用するドットプロットアッセイにより或いは抗ムチン抗体を使用するウエスタンブロット/ELISA分析により、ムチン分泌の量を測定することが可能である。

【0218】

本発明のEphA2作動性物質を同定するためには、喘息/COPDの他の動物モデル、例えば、IL-4(Temannら, 1997, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 16:471-8)、IL-13(Kupermanら, 2002, Nat. Med. July 1, epub ahead of print)またはIL-9を全身で又は肺組織のみにおいて過剰発現するマウスを使用することも可能である。本発明のEphA2作動性物質を同定するために、病的症状の軽減および気管支灌注液または誘発(induced)喀痰サンプル中のムチンの存在量の減少を用いることが可能である(Fahyら, 1993, Am. Rev. Respir. Dis. 147:1132-1137)。動物モデルのもう1つの例はマウス養子移入モデルであり、このモデルにおいては、TH1またはTH2レシピエントマウスの空中アレルゲン誘発が気道へのTHエフェクター細胞遊走を引き起こし、強力な好中球(TH1)および好酸球(TH2)肺粘膜炎症応答に関連している(Cohnら, 1997, J. Exp. Med. 186:1737-1747)。COPDの動物モデルの概説としては、SzelenyiおよびMarx, 2001, Arzneimittelforschung 51:1004-14を参照されたい。

【0219】

ムチン分泌細胞への分化

1つの実施形態においては、病原性上皮細胞表現型はムチン分泌細胞(例えば、杯細胞)への分化である。候補EphA2作動性物質を、ムチン分泌細胞への上皮細胞の分化を軽減または抑制するその能力に関してアッセイすることが可能である。本発明のEphA2作動性物質を同定するためには、喘息またはCOPDに関する動物モデルを使用することが可能である。例えば、ムチン分泌細胞の分化に対する候補EphA2作動性物質の影響をアッセイするために、LPS誘発性肺炎症を有する動物を使用することが可能である(米国特許第6,083,973号を参照されたい)。未処理対照である又は候補EphA2作動性物質で処理されたLPS誘発性肺炎症を有する動物を犠死させた後、一定速度(1ml/分で5ml)の気管内点滴による10%中性緩衝ホルマリンでの肺灌流を行う。ついで肺葉を解剖し、固定液に24時間浸した後、加工する。5μmのパラフィン切片を調製するためには、標準的な方法を用いることが可能である。肺組織内の粘液物質を検出するために、切片をアルシアンブルー(pH 2.5)および/または過ヨウ素酸/シッフ試薬および/または抗ムチン抗体で染色する。直径2mm以下の全ての気道を計数し、陽性染色細胞を含有する気道の割合を求めることにより、杯過形成に関する形態計測分析を行うことが可能である。

【0220】

炎症性因子の分泌

1つの実施形態においては、病原性上皮細胞または内皮細胞表現型は炎症性分子の分泌である。マスト細胞および好酸球は最初に炎症応答のメディエーターを遊離するが、過増殖性障害における上皮細胞はその表現型を、サイトカインおよびケモカインを分泌するものに改変する(Holgateら, 1999, Clin. Exp. Allergy 29:90-5)。候補EphA2作動性物質で処理された又は処理されていないin vitroまたはin vivo上皮細胞または内皮細胞における相違を定量するためには、サイトカイン/ケモカインの産生または分泌をアッセイするための当技術分野で公知の任意の方法を用いることが可能である。ある実施形態においては、IL-4、IL-9および/またはIL-13の産生または分泌をアッセイする。

【0221】

非腫瘍性過増殖

10

20

30

40

50

1つの実施形態においては、病原性上皮細胞または内皮細胞表現型は非腫瘍性過増殖である。生存、成長および/または増殖を評価するためには、当技術分野でよく知られた多数のアッセイを用いることが可能であり、(³H)-チミジン取り込みを測定することにより、直接的な細胞計数により、細胞周期マーカー(Rb、cdc2、サイクリンA、D1、D2、D3、Eなど)のような既知遺伝子の転写、翻訳または活性における変化を検出することにより、細胞増殖をアッセイすることが可能である。そのようなタンパク質およびmRNAおよび活性のレベルは、当技術分野でよく知られた任意の方法により測定することが可能である。例えば、タンパク質は、商業的に入手可能な抗体(例えば、多数の細胞周期マーカー抗体がSanta Cruz Inc.から入手可能である)を使用するウエスタンブロット法または免疫沈降法のような公知の免疫診断方法により定量することが可能である。mRNAは、当技術分野でよく知られた常套的な方法、例えば、ノーザン分析、RNアーゼプロテクション、逆転写を伴うポリメラーゼ連鎖反応などにより定量することが可能である。細胞生存度は、トリパンブルー染色または当技術分野で公知の他の細胞死もしくは生存マーカーを使用することにより評価することが可能である。

10

20

30

40

50

【0222】

本発明は、限定するものではないが以下のものを含む当技術分野で公知の種々の技術による細胞周期および細胞増殖分析を提供する。

【0223】

一例としては、増殖している細胞を同定するためのアッセイとしてプロモデオキシウリジン(BRDU)取り込みを用いることが可能である。BRDUアッセイは、新たに合成されたDNA内へのBRDUの取り込みにより、DNA合成をしている細胞集団を同定する。ついで、新たに合成されたDNAを、抗BRDU抗体を使用して検出することが可能である(Hoshinoら, 1986, *Int. J. Cancer* 38:369; Campanaら, 1988, *J. Immunol. Meth.* 107:79を参照されたい)。

【0224】

また、細胞増殖は、(³H)-チミジン取り込みを用いて調べることも可能である(例えば、Chen, 1996, *Oncogene* 13:1395-403; Jeoung, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:18367-73を参照されたい)。このアッセイはS相DNA合成の定量的特徴づけを可能にする。このアッセイにおいては、DNAを合成している細胞は、新たに合成されたDNAに(³H)-チミジンを取り込むことになる。ついで、シンチレーションカウンター内での放射性同位体の計数のような当技術分野における標準的な技術により、取り込みを測定することが可能である(例えば、Beckman LS 3800 Liquid Scintillation Counter)。

【0225】

細胞増殖を測定するためには、増殖細胞核抗原(PCNA)の検出を用いることも可能である。PCNAは36キログルトンのタンパク質であり、これは、増殖中の細胞、特に細胞周期の初期G1およびS相においては発現が上昇し、したがって、増殖中の細胞に関するマーカーとして働きうる。陽性細胞は、抗PCNA抗体を使用する免疫染色により同定される(Liら, 1996, *Curr. Biol.* 6:189-99; Vassilevら, 1995, *J. Cell Sci.* 108:1205-15を参照されたい)。

【0226】

細胞増殖は、時間経過と共に細胞集団のサンプルを計数(例えば、毎日の細胞計数)することにより測定することが可能である。細胞は、血球計算盤および光学顕微鏡検査(例えば、HyLite血球計算盤, Hausser Scientific)を用いて計数することが可能である。関心のある集団に関する増殖曲線を得るためには、細胞数を時間に対してプロットすることが可能である。好ましい実施形態においては、この方法により計数される細胞を、まず、トリパンブルー色素(Sigma)と混合して、生細胞が該色素を排除し該集団の生存メンバーとして計数されるようにする。

【0227】

細胞のDNA含量および/または分裂指数は、例えば、細胞のDNA倍数性値に基づいて測定することが可能である。例えば、細胞周期のG1相の細胞は、一般には、2N DNA倍数性値を

有する。DNAは複製されているが有糸分裂までは進行していない細胞（例えば、S期における細胞）は、2Nより高く4N DNA含量までの倍数性値を示すであろう。さらに、倍数性値および細胞周期速度論を、ヨウ化プロピジウムアッセイを用いて測定することが可能である（例えば、Turnerら、1998、Prostate 34:175-81を参照されたい）。あるいは、（化学量論的にDNAに結合する）DNAフォイルゲン染色の定量により、またはコンピューター化されたマイクロデンシトメトリー染色系でDNA倍数性を測定することが可能である（例えば、Bacus, 1989, Am. J. Pathol. 135:783-92を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、染色体スプレッド（spread）の調製によりDNA含量を分析することが可能である（Zabalou, 1994, Hereditas. 120:127-40; Pardue, 1994, Meth. Cell Biol. 44:333-351）。

【0228】

細胞周期タンパク質（例えば、CycA、CycB、CycE、CycD、cdc2、Cdk4/6、Rb、p21、p27など）の発現は、細胞または細胞集団の増殖状態に関する極めて重要な情報を提供する。例えば、抗増殖シグナル伝達経路における同定はp21^{Cip1}の誘導により示されうる。細胞内のp21の発現レベルの増加は細胞周期のG1への進入の遅延を引き起こす（Harperら、1993, Cell 75:805-816; Liら、1996, Curr. Biol. 6:189-199）。p21誘導は、商業的に入手可能（例えば、Santa Cruz）な特異的p21抗体を使用する免疫染色により同定することが可能である。同様に、商業的に入手可能な抗体を使用するウエスタンブロット分析により、細胞周期タンパク質を調べることが可能である。もう1つの実施形態においては、細胞周期タンパク質の検出の前に細胞集団を同調させる。細胞周期タンパク質は、関心のあるタンパク質に対する抗体を使用するFACS（蛍光標示式細胞分取器）分析により検出することが可能である。

10

20

【0229】

本発明のEphA2作動性物質は、細胞増殖が軽減または抑制されるよう細胞周期の長さ又は細胞周期の速度を変化させるその能力によっても同定することが可能である。1つの実施形態においては、細胞周期の長さは、（例えば、1以上の候補EphA2作動性物質と接触させた又は接触させていない細胞を使用して）細胞集団の倍加時間により測定する。もう1つの実施形態においては、細胞周期の進行の相を分析し、またはG1、SおよびG2/M画分を精製するために、FACS分析を用いる（例えば、Deliaら、1997, Oncogene 14:2137-47を参照されたい）。

【0230】

5.5.3 病原性内皮細胞表現型を抑制する物質

本発明のEphA2作動性物質は、好ましくは、病原性内皮細胞表現型、例えば細胞遊走（転移は含まない）の増強、細胞体積の増加、細胞外マトリックス分子（例えば、コラーゲン、フィブロネクチン、プロテオグリカンなど）またはマトリックスメタロプロテイナーゼ（例えば、ゼラチナーゼ、コラゲナーゼおよびストロメリシン（stromelysin））の分泌および過増殖を軽減（好ましくは抑制）しうる。当業者であれば、候補EphA2作動性物質を、そのような挙動を抑制するその能力に関してアッセイすることが可能である。

30

【0231】

細胞遊走

1つの実施形態においては、病原性内皮細胞表現型は細胞遊走（転移は含まない）の増強である。候補EphA2作動性物質を、内皮細胞遊走を軽減または抑制するその能力に関して（in vitroおよびin vivoの両方で）アッセイすることが可能である。内皮細胞遊走を測定するためには、当技術分野で公知の任意のアッセイを用いることが可能である。例えば、ポイデン・チェンバー遊走アッセイにおいて、遊走を評価することが可能である。簡潔に説明すると、内皮細胞（例えば、平滑筋細胞）を該チェンバーの上部ウェルに加えることが可能である。細胞付着後、1以上の候補EphA2作動性物質を上部チェンバーに加える。下部チェンバーの培地に加える誘引物質（例えば、PDGF）の存在下または非存在下、細胞を下部チェンバーへ遊走させる。下部チェンバーへ遊走した細胞を染色し、計数することが可能である。

40

【0232】

50

フィブロネクチンおよびマトリックスメタロプロテイナーゼのような細胞外マトリックス分子の分泌

1つの実施形態においては、病原性内皮細胞表現型はフィブロネクチンのような細胞外マトリックス分子またはマトリックスメタロプロテイナーゼの分泌である。候補EphA2作動性物質で処理された又は処理されていない *in vitro* または *in vivo* の内皮細胞における相違を定量するためには、細胞外マトリックス分子およびマトリックスメタロプロテイナーゼの産生または分泌に関してアッセイするための当技術分野で公知の任意の方法を用いることが可能である。例えば、発現レベルを定量するためには、ウエスタンブロットもしくはノーザンブロット分析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応またはELISAアッセイを用いることが可能である。マトリックスメタロプロテイナーゼの活性は、ザイモグラフィを含む当技術分野で公知の任意の方法により評価することが可能である（例えば、Badier-Commander, 2000, J. Pathol. 192:105-112を参照されたい）。

【0233】

1つの特定の実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質に関してスクリーニングするために、ゼラチナーゼA (MMP-2としても公知である) の発現レベルおよび/または活性レベルを減少させる能力を用いる。もう1つの実施形態においては、本発明のEphA2作動性物質に関してスクリーニングするために、フィブロネクチンの発現をモジュレーションする能力を用いる。

【0234】

非腫瘍性過増殖

1つの実施形態においては、病原性内皮細胞表現型は非腫瘍性過増殖である。生存、成長および/または増殖を評価するためには、当技術分野でよく知られた多数のアッセイを用いることが可能である。候補EphA2作動性物質の存在下および非存在下で内皮細胞の成長、増殖および/または細胞生存を評価するためには、第5.5節に列挙した任意の *in vitro* アッセイを用いることが可能である。内皮細胞過増殖の動物モデルを用いることも可能である。例えば、再狭窄の *in vivo* モデルに、ニュージーランドホワイトウサギを使用することが可能である（例えば、Feldmanら, 2000, Circulation; 101:908-16; Feldmanら, 2001, Circulation 103:3117-22; Frederickら, 2001, Circulation 104:3121-4を参照されたい）。簡潔に説明すると、直径3mmのバルーン（3×1分の膨張、10atm）を使用して、両側腸骨動脈バルーン血管形成術を行い、ついで、バルーン上に据え付けた長さ15mmのクラウン（Crown）ステント（Cordis）を右腸骨動脈内のみに移植した（30秒の膨張、10atm）。損傷の1、3、7、30または60日後、動物を安楽死させる。各時点で、右（ステント）および左（バルーン血管形成術）腸骨動脈を集め、氷冷蔵塩水でフラッシュし、脂肪組織があればそれを除去し、該動脈を2~3個の断片に分割した。該摘出動脈に関して形態計測的分析および免疫組織化学的分析を行う。ステント処理を行った動脈断片およびステント処理を行っていない動脈断片を4% パラホルムアルデヒド中で固定する。該動脈のヘマトキシリン-フロキシリン-サフラン染色横断切片に関して形態計測的分析を行う。免疫組織化学的分析には、動脈断片をOCT化合物中に包埋し、小型鉗子（microforcep）でステント支え（stent strut）を除去した後に液体窒素および冷却されたイソペンタン中で凍結する。4μmの横断切片を各ブロックから得、例えば細胞外マトリックス分子または抗マトリックスメタロプロテイナーゼ抗体で免疫染色する。

【0235】

5.5.4 EphA2活性を減少させるための物質

本発明は、EphA2活性（自己リン酸化以外）を減少させるEphA2作動性物質に関してアッセイおよびスクリーニングするための方法を提供する。リガンドの結合はEphA2の自己リン酸化を引き起こし（R. A. Lindbergら, Molecular & Cellular Biology 10:6316, 1990）、EphA2シグナリングをもたらすEphA2活性を引き起こす。しかし、他の受容体チロシキナーゼとは異なり、EphA2はリガンド結合またはホスホチロシン含量の非存在下で活性を保有する（Zantekら, Cell Growth & Differentiation 10:629, 1999）。いくつかの実施形態においては、リガンド結合または未結合EphA2の両方の活性（自己リン酸化以外）

10

20

30

40

50

を本発明のEphA2作動性物質により減少させる。

【0236】

1つの実施形態においては、リガンド結合EphA2のEphA2活性を減少させる。リガンド媒介性EphA2細胞質尾部リン酸化は、EphA2細胞質尾部とSHCのPTBおよびSH2ドメインとの相互作用を引き起こし、ERKキナーゼの核移行およびリン酸化を促進し、Elk-1転写因子の核誘導を増強する(PrattおよびKinch, 2002, Oncogene 21:7690-9)。EphA2作動性物質はリガンド媒介性EphA2シグナリングを減少させる。特定の実施形態においては、EphA2作動性物質はSHCとのリガンド媒介性EphA2相互作用を軽減する。もう1つの特定の実施形態においては、EphA2作動性物質はERKキナーゼのリガンド媒介性核移行および/またはリン酸化を軽減する。もう1つの特定の実施形態においては、EphA2作動性物質はElk-1転写因子 10
のリガンド媒介性核誘導を軽減する。EphA2作動性物質を、リガンド媒介性EphA2シグナリングを軽減するその能力に関してスクリーニングするためには、リガンド媒介性EphA2シグナリングをアッセイするための当技術分野における任意の方法、例えばレポーター遺伝子アッセイ、免疫沈降法、免疫プロット法、GST融合タンパク質プルダウンアッセイを用いることが可能である(例えば、PrattおよびKinch, 2002, Oncogene 21:7690-9を参照されたい)。

【0237】

もう1つの実施形態においては、リガンドに結合していないEphA2のEphA2活性を減少させる。そのような作動性物質は、リガンドに結合していない場合にEphA2発現細胞(特に上皮細胞または内皮細胞)内に存在するEphA2活性のレベルを減少させる候補EphA2作動性物質の能力を評価することにより同定される。いくつかの実施形態においては、EphA2が 20
リガンドに結合していない場合に存在する(例えば、キナーゼ活性アッセイにおける)EphA2活性を減少させる能力に関して、候補物質をスクリーニングする。他の実施形態においては、(例えば、Serologicals Corporation, Norcross, GAから入手可能なCATalyse Reporter Gene Assayのようなレポーター遺伝子アッセイにおいて)EphA2がリガンドに結合していない場合に活性であるEphA2シグナリングカスケードを経るシグナリングを減少させる能力に関して候補物質をスクリーニングする。

【0238】

5.5.5 低い K_{off} 速度を有する抗体

本発明の抗体は、EphA2受容体に免疫特異的に結合しそれを作動させる(すなわち、EphA2細胞質尾部リン酸化を増強し、EphA2分解を増強し、EphA2自己リン酸化を増強し、EphA2活性(自己リン酸化以外)を減少させ、病原性細胞表現型を軽減する)。本発明のそのような抗体を同定するためには、既に記載の方法(例えば、前記第5.5.1~5.5.4節を参照されたい)を用いることが可能である。また、本発明の方法においては、低い K_{off} 速度を有するEphA2抗体を使用することが可能である。 30

【0239】

EphA2に対する本発明のモノクローナル抗体またはそのフラグメントの結合アフィニティーおよびモノクローナル抗体-EphA2相互作用のオフ速度(off-rate)は、競合結合アッセイにより測定することが可能である。競合結合アッセイの一例は、漸増量の未標識EphA2の存在下、関心のあるモノクローナル抗体と共に標識EphA2(例えば、 ^3H または ^{125}I)を 40
インキュベートし、該標識EphA2に結合したモノクローナル抗体を検出することを含むラジオイムノアッセイである。EphA2に対するモノクローナル抗体のアフィニティーおよび結合オフ速度は、スキャッチャードプロット分析によるデータから決定することが可能である。第2のモノクローナル抗体との競合も、ラジオイムノアッセイを用いて測定することが可能である。この場合、漸増量の第2の未標識モノクローナル抗体の存在下、標識化合物(例えば、 ^3H または ^{125}I)に結合したモノクローナル抗体と共にEphA2をインキュベートする。

【0240】

好ましい実施形態においては、EphA2に対するモノクローナル抗体の結合オン(on)およびオフ(off)速度を測定するために、BIAcore速度論的分析を用いる。BIAcore速度論 50

的分析は、固定化EphA2またはその断片を表面上に含有するチップとの間のモノクローナル抗体の結合および解離を分析することを含む。

【0241】

EphA2に免疫特異的に結合する抗体は、好ましくは、 $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-3} s^{-1} 未満、 10^{-4} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-5} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-6} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-7} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-8} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-9} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満または 10^{-10} s^{-1} 未満の K_{off} 速度、すなわち、

$$K_{off}$$

(抗体(Ab) + 抗原(Ag) Ab-Ag)を有する。

【0242】

5.6 治療上または予防上の有用性の特徴づけ及び実証

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効力は、例えばLD₅₀ (集団の50%に致死的な用量) およびED₅₀ (集団の50%において治療的有効な用量) を測定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的方法により測定することが可能である。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療係数であり、比LD₅₀/ED₅₀として表されうる。大きな治療係数を示す予防用および/または治療用物質が好ましい。毒性副作用を示す予防用および/または治療用物質を使用することは可能ではあるが、未感染細胞に対する潜在的損傷を最小にして副作用を軽減するために、そのような物質を罹患組織部位に標的化する送達系を設計するよう留意すべきである。

【0243】

ヒトにおいて使用するために、ある範囲の量の予防用および/または治療用物質を製剤化するには、細胞培養アッセイおよび動物研究から得たデータを用いることが可能である。そのような物質の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど又は全く伴わないED₅₀を含む循環濃度の範囲内である。投与量は、使用する投与形態および用いる投与経路に応じて、この範囲内で様々なものとなりうる。本発明の方法において使用するいずれの物質に関しても、まず、細胞培養アッセイから、治療的に有効な量を評価することが可能である。細胞培養において決定したIC₅₀ (すなわち、症状の半最大抑制を達成する試験化合物の濃度) を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルにおいて用量を処方することが可能である。そのような情報を用いて、ヒトにおける有用な用量を、より正確に決定することが可能である。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定することが可能である。

【0244】

本発明に従い用いる療法の抗過増殖性細胞または抗過剰細胞蓄積障害活性は、抗過増殖上皮細胞障害および抗過増殖内皮細胞障害の研究のための種々の実験動物モデルを使用することによっても測定することが可能である。

【0245】

5.6.1 予防上/治療上の有用性の実証

本発明のプロトコルおよび組成物は、ヒトにおける使用の前に、好ましくは、in vitroにおいて、ついでin vivoにおいて、所望の治療または予防活性に関して試験される。例えば、特定の治療プロトコルの投与が適応するかどうかを判定するために用いるin vitroアッセイはin vitro細胞培養アッセイを含み、この場合、患者の組織サンプルを培養内で成長させ、プロトコルにさらし又は投与し、該組織サンプルに対するそのようなプロトコルの効果、例えば、EphA2細胞質尾部リン酸化の増強、EphA2自己リン酸化の増強、EphA2活性(自己リン酸化以外)の減少、病原性細胞表現型の軽減(例えば、ムチン分泌の軽減、ムチン分泌細胞マーカーの発現の軽減、EphA2発現上皮細胞または内皮細胞の生存/増殖の軽減、細胞遊走(転移を含まない)の軽減、細胞体積の減少および/または炎症性因子、細胞外マトリックス分子もしくはマトリックスメタロプロテイナーゼの分泌の軽減)を観察する。接触された細胞の前記特性のいずれかの実証は、該治療物質が、患者における病態を治療するのに有効であることを示すものである。あるいは、患者からの細胞を培養する代わりに、上皮細胞系または内皮細胞系の細胞を使用して治療物質およ

10

20

30

40

50

び方法をスクリーニングすることが可能である。障害病因に関連したそのようなパラメータを評価するためには、当技術分野において標準的な多数のアッセイを用いることが可能である（例えば、第5.5節を参照されたい）。

【0246】

いくつかの実施形態においては、該障害が非腫瘍性過増殖性肺上皮細胞障害である場合には、予防上/治療上の有用性を実証するために、肺上皮の *in vitro* モデルを使用することが可能である。細胞を培養して、気道の上皮組織に酷似した、ヒト由来気管/気管支上皮細胞（例えば、NHBEまたはTBE細胞）からの偽重層（pseudo-stratified）高分化モデル組織を形成させることができる。該培養を細胞培養インサート上、気-液界面において成長させて、気道炎症および刺激研究ならびに吸入毒性研究における揮発性物質の気相暴露を行うことが可能である。吸入薬送達研究のために、経上皮透過性を測定することが可能である。そのようなモデル系、例えばEpiAirway（商標）Tissue Model System（MatTek Corp., Ashland, MA）が商業的に入手可能である。

10

【0247】

他の実施形態においては、該障害は肺線維症であり、*in vitro* モデルは、プレオマイシンで処理されたBeas-2B細胞（SV40ウイルスでトランスフォームされた気管支上皮細胞）である。もう1つの実施形態においては、肺線維症に関する *in vivo* モデルは感受性マウス系統のプレオマイシン処理である。プレオマイシンは、マウスにおいて、肺上皮細胞死、ついで急性好中球流入、ついで慢性炎症および実質線維症を誘発する。肺線維症に関するモデルとしてのプレオマイシン処理肺上皮細胞はIPFのようなヒト肺線維症の重要な病的特徴を再現する。

20

【0248】

療法において使用するための化合物は、ヒトにおける試験の前に、限定するものではないがラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなどを含む適当な動物モデル系（例えば、前記の動物モデル）において試験することが可能である。ついで該化合物を適当な臨床試験において使用することが可能である。

【0249】

さらに、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療または予防のための本明細書に開示されている組合せ療法の予防上および/または治療上の有用性を評価するために、当業者に公知の任意のアッセイを用いることが可能である。

30

【0250】

5.6.2 投与量

非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療、処置または予防において有効である本発明の組成物の量は、標準的な研究技術により決定することが可能である。例えば、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療、処置または予防において有効である組成物の投与量は、動物モデル、例えば当業者に公知の動物モデルに該組成物を投与することにより決定することが可能である。また、所望により、最適な投与範囲を確認するために *in vitro* アッセイを用いることが可能である。

【0251】

好ましい有効量の選択は、当業者に公知のいくつかの要因の考慮に基づき、当業者により行われうる。そのような要因には、治療または予防すべき障害、含まれる症状、患者の体重、患者の免疫状態、および投与する医薬組成物の精度を反映することが当業者により知られている他の要因が含まれる。

40

【0252】

製剤中で使用する厳密な用量は、投与経路、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の重症度によっても左右され、臨床家の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有効量は、*in vitro* または動物モデル試験系から導かれた用量応答曲線から外挿されうる。

【0253】

抗体の場合には、患者に投与する量は、典型的には、患者の体重1kg当たり0.1mg~100m

50

gである。好ましくは、患者に投与する量は、患者の体重1kg当たり0.1mg~20mg、より好ましくは、患者の体重1kg当たり1mg~10mgである。一般には、ヒトおよびヒト化抗体は、ヒト体内では、外来ポリペプチドに対する免疫応答を伴う他の種からの抗体より長い半減期を有する。したがって、ヒト抗体の、より低い投与量、およびより低頻度の投与が可能となることが多い。

【0254】

患者に投与する他の治療用物質の場合には、種々の免疫調節剤、呼吸器ウイルスの複製を軽減する抗ウイルス剤、気管支拡張剤または抗ムチン療法の典型的な用量は当技術分野で公知である。本発明を考慮すると、ある実施形態は、組合せ治療計画においては、単剤の投与で推奨される用量より低い用量の投与を含むであろう。

10

【0255】

本発明は、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の予防、治療、処置または予防に有効であるとこれまでに考えられている用量より低い、公知の予防用または治療用物質の用量を投与する任意の方法を提供する。好ましくは、公知療法の、より低い用量は、より低い用量の本発明のEphA2作動性物質と組合せて投与される。

【0256】

5.7 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造において有用なバルク薬組成物（例えば、不純または非無菌組成物）、および単位投与形の製造に使用しうる非経口医薬組成物（例えば、対象または患者への投与に適した組成物）を含む。そのような組成物は、本明細書に開示されている予防用および/または治療用物質の、または該物質と製薬上許容される担体との組合せの、予防的または治療的に有効な量を含む。好ましくは、本発明の組成物は、本発明の1以上のEphA2作動性物質の予防的または治療的に有効な量と製薬上許容される担体とを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は、追加的な治療剤、例えば、免疫調節剤または抗ウイルス剤を含む。

20

【0257】

特定の実施形態においては、「製薬上許容される」なる語は、動物、より詳しくはヒトにおける使用に関して、米国連邦政府または州政府の規制機関により承認されていること、または米国薬局方もしくは他の一般に認知されている薬局方に掲載されていることを意味する。「担体」なる語は、治療剤と共に投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全および不完全））、賦形剤またはビヒクルを意味する。そのような医薬担体は無菌の液体、例えば水および油、例えば石油、動物、植物または合成由来のもの、例えばラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などでありうる。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。食塩水および水性デキストロスおよびグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射液に使用されうる。適当な医薬賦形剤には、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、コメ、コムギ、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。該組成物は、所望により、少量の湿潤剤、乳化剤またはpH緩衝化剤を含有することも可能である。これらの組成物は、溶液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放剤などの形態をとりうる。

30

40

【0258】

一般に、本発明の組成物の成分は、別々に、または単位投与形（例えば、活性物質の量を表示したアンプルまたは薬袋（sachette）のような密閉容器内の凍結乾燥粉末または水非含有濃縮物）として一緒に混合して供給される。該組成物を注入により投与したい場合には、それを、医薬等級の無菌の水または塩類液を含有する注入ボトルに分注することが可能である。該組成物を注射により投与する場合には、投与前に成分が混合されうるよう、注射用無菌水または塩類液のアンプルが提供されうる。

【0259】

本発明の組成物は、中性または塩形態として製剤化することが可能である。製薬上許容

50

される塩には、陰イオンと共に形成されるもの、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもの、および陽イオンと共に形成されるもの、例えば、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、プロカインなどに由来するものが含まれる。

【0260】

種々の送達系が公知であり、本発明の作動性モノクローナル抗体、または本発明の作動性モノクローナル抗体と非腫瘍性過増殖性細胞もしくは過剰細胞蓄積障害の予防もしくは治療に有用な予防用もしくは治療用物質との組合せを投与するために用いられうる。該送達系としては、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、該抗体または抗体フラグメントを発現しうる組換え細胞内への封入、受容体媒介性エンドサイトーシス（例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい）、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などが挙げられる。本発明の予防用または治療用物質の投与方法には、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外および粘膜投与（例えば、鼻腔内、吸入および経口経路）が含まれるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態においては、本発明の予防用または治療用物質は、筋肉内、静脈内または皮下に投与する。該予防用または治療用物質は、任意の簡便な経路により、例えば、注入またはボラス注射、上皮または粘膜・皮膚裏打層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）を介した吸収により投与することが可能であり、他の生物活性物質と共に投与することが可能である。投与は全身的または局所的でありうる。 10 20

【0261】

特定の実施形態においては、本発明の予防または治療物質を、治療を要する領域に局所的に投与することが望ましいかもしれない。これは、限定するものではないが例えば局所注入により、注射により又はインプラントを使用して行うことが可能であり、該インプラントは、多孔性、無孔性またはゼラチン性物質、例えば膜、例えばシアラスチック（sialastic）膜、またはファイバー（繊維）により達成することができる。

【0262】

もう1つの実施形態においては、該予防用または治療用物質をコントロールリリースまたは徐放系において送達することが可能である。1つの実施形態においては、コントロールリリースまたは徐放を達成するために、ポンプを使用することが可能である（Langer, 前掲; Sefton, 1987, CRC Crit Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507; Saudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明の抗体またはそのフラグメントのコントロールリリースまたは徐放を達成するために、高分子物質を使用することが可能である（例えば、Medical Applications of Controlled Release, LangerおよびWise（編）, CRC Press., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall（編）, Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたい；また、Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105; 米国特許第5,679,377号、第5,916,597号、第5,912,015号、第5,989,463号、第5,128,326号；国際特許公開番号W0 99/15154およびW0 99/20253を参照されたい）。徐放剤において使用する高分子の具体例には、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-ビニルアセタート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、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-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルが含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましい実施形態においては、徐放製剤において使用する高分子は不活性であり、濾過可能な不純物を含有せず、保存に際して安定であり、無菌であり、生分解性である。もう1つの実施形態においては、コントロールリ 30 40 50

リース系または徐放系を、予防または治療標的の近傍に配置して、全身用量のごく一部の量で十分となるようにすることが可能である（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 前掲, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい）。

【0263】

コントロールリリース系は、Langerによる総説（1990, Science 249:1527-1533）において考察されている。当業者に公知の任意の技術を用いて、本発明の1以上の治療用物質を含む徐放剤を得ることが可能である。例えば、米国特許第4,526,938号；国際特許公開番号WO 91/05548およびWO 96/20698；Ningら, 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189；Songら, 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397；Cleekら, 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854；およびLamら, 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。

10

【0264】

5.7.1 遺伝子治療

特定の実施形態においては、遺伝子治療により上皮細胞または内皮細胞過増殖を治療、予防または処置するために、本発明の核酸（例えば、EphA2アンチセンス核酸、EphA2 dsRNA、EphA2リボザイム、またはEphA2イントラボディをコードする核酸）を投与する。遺伝子治療は、発現された又は発現可能な核酸を対象に投与することにより行う治療を意味する。本発明のこの実施形態においては、該核酸は予防または治療効果を生成し媒介する。

【0265】

当技術分野で利用可能な遺伝子治療のための方法のいずれかを本発明において用いることが可能である。典型的な方法を以下に説明する。

20

【0266】

遺伝子治療の方法の全般的総説としては、Goldspielら, 1993, Clinical Pharmacy 12:488；WuおよびWu, 1991, Biotherapy 3:87；Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573；Mulligan, 1993, Science 260:926-932；ならびにMorganおよびAnderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191；May, 1993, TIBTECH 11:155。使用しうる組換えDNA技術の当技術分野で一般に公知の方法はAusubelら（編）, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)を参照されたい。

30

【0267】

好ましい態様においては、本発明の組成物は本発明の核酸（例えば、EphA2アンチセンスまたはイントラボディ分子をコードする核酸）を含み、該核酸は、適当な宿主内で該核酸を発現する発現ベクターの一部である。特に、そのような核酸はプロモーター、好ましくは異種プロモーターを有し、該プロモーターは誘導性または構成的であり、場合によっては組織特異的である。もう1つの特定の実施形態においては、使用する核酸分子は、本発明の核酸の染色体内発現がもたらされるようゲノム内の所望の部位において相同組換えを促進する領域に隣接した本発明の核酸分子を含む（KollerおよびSmithies, 1989, PNAS 86:8932；Zijlstraら, 1989, Nature 342:435）。

【0268】

対象内への核酸の送達は直接的（この場合、該対象を該核酸または核酸含有ベクターに直接的にさらす）または間接的（この場合、細胞を、まず、in vitroで該核酸で形質転換し、ついで該対象に移植する）でありうる。これらの2つのアプローチは、それぞれ、in vivoまたはex vivo遺伝子治療として公知である。特定の実施形態においては、該核酸配列をin vivoで直接的に投与する。これは、当技術分野で公知の多数の方法のいずれかにより、例えば、それらを適当な核酸発現ベクターの一部として構築しそれらが細胞内のものとなるようそれを投与することにより、例えば、欠損型もしくは弱毒化レトロウイルスまたは他のウイルスベクターを使用する感染により（例えば、米国特許第4,980,286号を参照されたい）、あるいは裸DNAの直接的な注射により、あるいは微粒子射撃（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフ

40

50

エクト剤でのコーティング、リポソーム、微粒子もしくはマイクロカプセル内への封入の利用により。あるいは細胞内（例えば、膜透過性配列）および/または核内に進入することが知られているペプチドに連結された形態（例えば、チオエステル結合を介したもの）でそれらを投与することにより、あるいは受容体媒介性エンドサイトーシスにさらされるリガンドに連結された形態でそれを投与すること（WuおよびWu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429）（これは、該受容体を特異的に発現する細胞型を標的化するために用いられうる）などにより達成することが可能である。もう1つの実施形態においては、核酸-リガンド複合体を形成させることが可能であり、この場合、エンドソームを破壊して該核酸がリソソーム分解を回避するのを可能にする融合誘導ウイルスペプチドを該リガンドは含む。さらにもう1つの実施形態においては、特異的受容体を標的化することにより、細胞特異的取り込み及び発現のために、該核酸を *in vivo* で標的化することが可能である（例えば、国際特許公開番号 WO 92/06180; WO 92/22635 ; W092/20316; W093/14188, WO 93/20221 を参照されたい）。あるいは、該核酸を細胞内に導入し、相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA内に組込むことが可能である（KollerおよびSmithies, 1989, *PNAS* 86:8932; ならびにZijlstraら, 1989, *Nature* 342:435）。

10

【0269】

特定の実施形態においては、本発明の核酸配列を含有するウイルスベクターを使用する。例えば、レトロウイルスベクターを使用することが可能である（Millerら, 1993, *Meth. Enzymol.* 217:581）。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムの適切なパッケージングおよび宿主細胞DNA内への組込みに必要な成分を含有する。遺伝子治療において使用する核酸配列を1以上のベクター内にクローニングし、これは、対象内への該核酸の送達を促進する。レトロウイルスベクターに関する更なる詳細はBoesenら, 1994, *Biotherapy* 6:291-302に記載されており、これは、造血幹細胞を化学療法に抵抗性にするために *mdr1* 遺伝子を造血幹細胞へ送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載している。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明している他の参考文献としては以下のものが挙げられる：Clowesら, 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Kleinら, 1994, *Blood* 83:1467-1473; SalmonsおよびGunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141; ならびにGrossmanおよびWilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics Devel.* 3:110-114。

20

【0270】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用しうる他のウイルスベクターである。アデノウイルスは、呼吸器上皮へ遺伝子を送達するための特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、元々、呼吸器上皮に感染し、この部位において該ウイルスは軽度な疾患を引き起こす。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染しうるという利点を有する。KozarskyおよびWilson, 1993, *Current Opinion in Genetics Development* 3:499は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の総説を記載している。Boutら, 1994, *Human Gene Therapy* 5:3-10は、アカゲザルの呼吸器上皮に遺伝子を導入するためのアデノウイルスベクターの使用を示している。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の実例は、Rosenfeldら, 1991, *Science* 252:431 ; Rosenfeldら, 1992, *Cell* 68:143; Mastrangeliら, 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225; 国際特許公開番号 W094/12649; およびWangら, 1995, *Gene Therapy* 2:775に記載されている。好ましい実施形態においては、アデノウイルスベクターを使用する。アデノ随伴ウイルス（AAV）も、遺伝子治療における使用に関して提示されている（Walshら, 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300; および米国特許第5,436,146号）。

30

40

【0271】

細胞内への外来遺伝子の導入のための多数の技術が当技術分野で公知であり（例えば、LoefflerおよびBehr, 1993, *Meth. Enzymol.* 217:599; Cohenら, 1993, *Meth. Enzymol.* 217:618を参照されたい）、レシピエント細胞の、必要な発生的および生理的機能が破壊されない限り、それらは本発明において使用されうる。該技術は、核酸が細胞により発現され、好ましくは、その細胞後代により受け継がれ発現されうるよう、細胞内への核酸の

50

安定な導入をもたらすはずである。

【0272】

得られた組換え細胞は、当技術分野で公知の種々の方法により、対象に送達することが可能である。使用のための予想される細胞の量は、所望の効果、患者の状態などに左右され、当業者により決定されうる。

【0273】

5.8 キット

本発明は、本発明のEphA2作動性物質で満たされた1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。また、非腫瘍性過増殖性細胞または過剰細胞蓄積障害の治療に有用な1以上の他の予防用または治療用物質、あるいは他の関連物質（例えば、免疫調節剤および/または抗ウイルス剤）も、該医薬パックまたはキットに含まれうる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分の1以上で満たされた1以上の容器を含む医薬パックまたはキットを提供する。場合によっては、医薬または生物製品の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた形態の通達（この通達は、ヒトへの投与に関する、製造、使用または販売の、該機関による承認を表すものである）が、そのような容器に添付されている。

10

【0274】

本発明は、前記方法において使用しうるキットを提供する。1つの実施形態においては、キットは本発明の1以上のモノクローナル抗体を含む。もう1つの実施形態においては、キットは更に、過増殖性上皮障害の治療に有用な1以上の他の予防用または治療用物質を1

20

【0275】

6. 実施例

6.1 EGFはEphA2発現を増強する

HMT-3522細胞、変異体S1（非腫瘍形成性不死化上皮細胞系）を外因性EGFで処理し、EphA2レベルを測定した。未処理細胞およびEGF処理細胞の両方において、mRNA発現レベルを測定するために、定量RT-PCRを行った。ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）のmRNAレベルも測定し、対照として使用した。EphA2およびGAPDHを増幅するために使用したプライマーおよびPCR条件は以下のとおりであった。

30

【0276】

EPHA2 5'ATG GAG CTC CAG GCA GCC CGC 3' (配列番号40)、
5 GCC ATA CGG GTG TGT GAG CCA GC 3' (配列番号41)、
GAPDH 5'CAG TGG TGG ACC TGA CCT GCC GTC T 3' (配列番号42)、
5'CTC AGT GTA GCC CAG GAT GCC CTT GAG 3' (配列番号43)。

【0277】

PCR反応（50μlの全容量）を94 で2分間インキュベートした後、94 で1分間 / 60 で1分間 / 72 で1分間の35サイクルに付した。ついでサンプルを72 で10分間インキュベートした。EphA2プライマーは150bpの産物を与え、GAPDHプライマーは104bpの産物を与えた。

40

【0278】

EGF処理細胞内のEphA2 mRNAのレベルは1のとおりに定められた。未処理対照細胞は、処理細胞の発現レベルの85%のレベルでEphA2 mRNAを発現した。したがって、EphA2 mRNAレベルは、EGFで処理されていない対照細胞と比較して、EGF処理により増加した（図1A）。GAPDH PCR産物は示されていない。

【0279】

未処理細胞およびEGF処理細胞の両方において、EphA2タンパク質発現レベルを測定する

50

ために、全細胞溶解物のウエスタンブロット分析をEphA2特異的モノクローナル抗体D7で行った。EphA2タンパク質レベルは、EGFで処理されていない対照細胞と比較して、EGF処理により増加した(図1B)。

【0280】

6.2 モノクローナル抗体の製造

免疫化および融合

融合タンパク質EphA2-Fcを使用して、EphA2の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を製造した。この融合タンパク質は、該融合タンパク質の分泌を促進させるためにヒト免疫グロブリンに連結されたヒトEphA2の細胞外ドメインよりなるものであった。

【0281】

第0日および第7日に、5匹/群の2群(Balb/cマウス(A群)またはSJLマウス(B群))のマウスの左中足領域にTiterMax Adjuvant中の10 μ gのEphA2-Fc(全容量100 μ l)を注射した。第12日および第14日に、マウスの左中足領域にPBS中の10 μ gのEphA2-Fc(全容量100 μ l)を注射した。第15日に、左足および鼠径からの膝窩リンパ節および鼠径リンパ節を摘出し、(PEGを使用して)P3XBcl-2-13細胞と体細胞的に融合させた。

【0282】

抗体スクリーニング

標準的な分子生物学的技術(例えば、ELISAイムノアッセイ)を用いて、バルク(bulk)培養ハイブリドーマからの上清をEphA2に対する免疫反応性に関してスクリーニングした。さらに、EphA2にEphA2モノクローナル抗体(例えば、2002年8月7日付けでATCCに寄託されており、それぞれ受託番号PTA-4572、PTA-4573およびPTA-4574が割当てられているEph099B-102.147、Eph099B-208.261またはEph099B-210.248; B233; 2002年5月10日付け出願の米国仮特許出願第60/379,322号、発明の名称“EphA2 Monoclonal Antibodies and Methods of Use Thereof”および2003年5月12日付け出願の米国特許出願第10/436,783号、発明の名称“EphA2 Agonistic Monoclonal Antibodies and Methods of Use Thereof”も参照されたい)が結合するのを抑制する能力に関して、上清をスクリーニングすることが可能である。

【0283】

6.3 EphA2モノクローナル抗体はEphA2の機能を低下させる

6.3.1 EphA2のリン酸化および分解

EphA2抗体はMDA-MB-231細胞におけるEphA2のチロシンリン酸化および分解を促進した。細胞の単層をEphA2抗体または対照の存在下で37 $^{\circ}$ Cで8分間インキュベートした。ついで細胞溶解物をEphA2特異的抗体(D7; これは、Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NYから購入したものであり、2000年12月8日付けでAmerican Type Tissue Collectionに寄託されており、受託番号PTA 2755が割当てられている)で免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、ホスホチロシン特異的抗体(Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NYから購入した4G10)を使用するウエスタンブロット分析に付した。膜を取り出し、ローディング対照として免疫沈降において使用したEphA2特異的抗体(D7)で再プローブした。

【0284】

既に記載されているとおりに(Zantekら, 1999, Cell Growth Diff. 10:629-38)、ウエスタンブロット分析および免疫沈降を行った。簡潔に説明すると、細胞単層の界面活性剤抽出物を、1% Triton X-100(Sigma, St. Louis, MO)を含有するTris緩衝食塩水中で抽出した。タンパク質濃度を測定した後(BioRad, Hercules, CA)、1.5mgの細胞溶解物を免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース(Protran, Schleicher and Schuell, Keene, NH)にトランスファーした。増強化学発光(Pierce, Rockford, IL)およびオートラジオグラフィ(Kodak X-OMAT; Rochester, NY)により、抗体結合を検出した。EphA2リン酸化のレベルは該抗体の幾つかのインキュベーションにより増加することが判明した(データ非表示)。

【0285】

MDA-MB-231細胞の単層を本発明の抗体または対照の存在下、37 $^{\circ}$ Cで4時間または24時間

10

20

30

40

50

インキュベートした。ついで細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、EphA2特異的抗体 (D7) を使用するウエスタンブロット分析に付した。該抗体の多くはEphA2タンパク質レベルを減少させた (データ非表示)。

【0286】

6.4. EphA2抗体の動力的分析

BIACOREアッセイを用いて、本発明のモノクローナル抗体の K_{off} 速度を測定した。ハイブリドーマ上清内に存在するIgGを、測定に使用した。

【0287】

EphA2の固定化

標準的なアミン (NHS/EDCの1:1混合物70 μ l) 結合化学法を用いて、EphA2-FcをCM5センサーチップ上の表面に固定化した。簡潔に説明すると、ついで、10mM NaOAc (pH4) 中のEphA2-Fcの400nM溶液を該活性化表面に1000~1100 RUの密度まで注入した。ついで、未使用の反応性エステルを、1M Et-NH₂の70 μ lの注入により「キャップ化 (capped)」した。同様に、活性化および「キャップ化」対照表面を、基準表面として働くタンパク質の非存在下、同じセンサーチップ上で調製した。

【0288】

結合実験

EphA2ハイブリドーマ上清各250 μ lの注射を、EphA2-Fc表面および対照表面の両方に行い、結合応答を記録した。これらの上清は未希釈のまま使用した。各注射後、10分間の解離相データを集めた。精製されたEphA2モノクローナル抗体EA2 (EA2を産生するハイブリドーマは2002年5月22日付けでAmerican Type Culture Collectionに寄託されており、受託番号PTA-4380が割当てられている) を、陽性対照 (増殖培地250 μ l当たり1 μ g、5 μ gおよび25 μ g) として使用するために調製した。陰性対照モノクローナル抗体も、増殖培地250 μ l当たり5 μ gで調製した。これらの表面に増殖培地の対照注射も行った。各結合サイクル後、EphA2-Fc表面を1M NaCl-50mM NaOHの1回の1分間のパルス (注射) により再生させた。

【0289】

データ評価

「二重参照 (double-referencing)」として公知の技術において、人工的ノイズ (ブランク培地注射) および非特異的結合 (対照表面) の両方を差し引くことにより、結合データを補正した。したがって、センサーグラムオーバーレイ (sensorgram overlay) は「正味」の結合曲線を表す。Eph099B-208.261およびB233は、EA2より遅い K_{off} 速度を有する (図3)。また、Eph099B-102.147およびEph099B-210.248を含む本発明の他の抗体は、遅い K_{off} 速度を有する (データ非表示)。

【0290】

6.5. *in vivo*での肺上皮上のEphA2発現

正常BALB/cマウスをCO₂窒息により安楽死させた。パラフィン塊内に包埋し切片化する前に、肺組織を10%緩衝ホルマリンで膨らませることにより、該組織を維持した。脱パラフィン処理した10ミクロンの切片を、マウスEphA2に対する1:100希釈のポリクローナルウサギ血清と共にインキュベートした。結合抗体をビオチン結合抗ウサギ抗体 (1:500希釈)、ついでストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合体 (1:1000) で検出した。結合ホースラディッシュペルオキシダーゼをジアミノベンジジン (DAB) 染色で可視化した。基底層の上皮細胞はEphA2の発現を示した (図2A)。

【0291】

EphA2発現を、RSV感染マウスにおいても測定した。第0日に、正常BALB/cマウスを、ミョウバンアジュバント上に吸着された15 μ gのホルマリン不活化呼吸器合胞体ウイルス (FI-RSV) で腹腔内に免疫した。第5日に、同用量のFI-RSVを投与した。第12日に、100ml容量中の10⁶ プラーク形成単位 (pfu) の濃度の生RSVで、該マウスを鼻腔内にチャレンジした。既に記載されているとおりに、マウスを安楽死させ、肺組織を加工した。杯細胞を可視化するための標準的な技術に従い、EphA2染色に加えて、過ヨウ素酸-シッフ (PAS) 試

薬で組織を染色した。未感染肺組織の場合と同様に、基底層の上皮細胞はEphA2の発現を示した(図2B、右パネル)。ムチン分泌性杯細胞はEphA2を発現しない(図2B、左パネル)。

【0292】

6.6. EphA2アンチセンスオリゴヌクレオチドを使用するEphA2レベルの減少

EphA2活性化には無関係に上皮細胞においてEphA2発現を低下させる、アンチセンスオリゴヌクレオチドに基づくアプローチを開発した。EphA2タンパク質レベルを減少させるために、GenBankの配列評価を用いた判定でEphA2に特有であることが判明している配列(5'-CCAGCAGTACCGCTTCCTTGCCCTGCGGCCG-3'; 配列番号44)に対応する、ホスホロチオアートで修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドで、MDA-MB-231乳癌細胞を一過性にトランスフェクトした。逆アンチセンスオリゴヌクレオチド(5'-GCCGCGTCCCGTTCCTTCACCATGACGACC-3'; 配列番号45)を対照として使用した。Lipofectamine PLUS Reagent(Life Technologies, Inc.)を該製造業者のプロトコールに従い使用して、該細胞をオリゴヌクレオチド(2µg/ml)でトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、該細胞を抽出し、ウエスタンブロット分析に付した。

10

【0293】

ウエスタンブロット分析および免疫沈降を、既に記載されているとおりに(Zantekら, 1999, Cell Growth Diff. 10:629-38)行った。簡潔に説明すると、細胞単層の界面活性剤抽出物を、1% Triton X-100(Sigma, St. Louis, MO)を含有するTris緩衝食塩水中で抽出した。タンパク質濃度を測定した後(BioRad, Hercules, CA)、1.5mgの細胞溶解物を免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース(Protran, Schleicher and Schuell, Keene, NH)にトランスファーした。EphA2をEphA2特異的抗体(Upstate Biologicals, Inc., Lake Placid, NYから購入したD7)で検出した。サンプルローディングに関する対照として、該膜を取り出し、パキシリン抗体(University of North CarolinaのK. Burridge博士からの贈呈品)で再プローブした。増強化学発光(Pierce, Rockford, IL)およびオートラジオグラフィ(Kodak X-OMAT; Rochester, NY)により、抗体結合を検出した。

20

【0294】

アンチセンスオリゴヌクレオチドはMDA-MB-231細胞におけるEphA2発現を選択的に低下させるが、逆アンチセンス対照(IAS)は低下させないことが、ウエスタンブロット分析から証明された(図4)。

30

【0295】

6.7. 喘息またはCOPDを有する患者の治療

喘息またはCOPDを有する患者における本発明の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計画する。本発明の1回量のモノクローナル抗体を静脈内または肺投与により患者に投与し、4週間後から、12週間にわたる同じ投与経路による同用量での毎週の反復投与の後に分析する。本発明のモノクローナル抗体での治療の安全性、および26週間の投与にわたる障害活動度における潜在的变化を評価する。異なる患者群を同様に処理し、評価するが、これらの群には1mg/kg、2mg/kg、4mg/kgまたは8mg/kgの用量を投与する。

40

【0296】

呼吸器症状の発生および重症度により、変化を測定または判定する。

【0297】

6.8. 線維症の進行におけるEphA2の役割

線維症のin vitroモデルとして、Beas-2B細胞(SV40ウイルスでトランスフォームされた気管支上皮細胞)をブレオマイシン(25~100m単位/ml)で処理した。5時間後、IL-6およびIL-8の増加が検出された。この応答は損傷上皮に典型的なものである。24時間後、アポトーシスを媒介する受容体であるFasの増加が検出された。アポトーシスの増強(アネキシンV結合の増強による)および一般には細胞死の増強(ヨウ化プロピジウム取り込みにより検出される)も検出された。抗ホスホチロシン抗体を使用する免疫染色は、ブレオ

50

マイシン処理の24時間後に細胞形態および接着特性における変化を示した。処理の24時間後に、(ウエスタンブロットおよびFACS分析により) EphA2のアップレギュレーションも検出された。プレオマイシン処理はEphA2レベルの減少を引き起こしたが、これらの細胞においてはチロシンキナーゼのリン酸化が著しく低下し、このことは該分子の機能の改変を示唆している。

【0298】

6.8.1 材料および方法

in vitro試験のために、Beas-2B気管支上皮細胞(ATCCカタログ番号CRL-9609)を使用した。細胞系を作製するために、非癌性個体の剖検から得た正常ヒト気管支上皮から上皮細胞を単離した。該細胞にアデノウイルス12-SV40ウイルスハイブリッド(Ad12SV40)を感染させ、該細胞をクローニングした。該細胞は、血清に应答して扁平分化を受ける能力を保有しており、分化および/または発癌を誘発し又はそれらに影響を及ぼす化学的および生物学的物質をスクリーニングするために使用されうる。該細胞はケラチンおよびSV40 T抗原に対してポジティブ染色される(Reddelら, Immortalized human bronchial epithelial mesothelial cell lines. 米国特許第4,885,238号(1989年12月5日付け発行))。

10

【0299】

免疫蛍光 . 個々の細胞を可視化するために、細胞をカバーグラス上で増殖させた。~70%コンフルエンスの密度において、細胞を25m単位/mlのプレオマイシンまたはベクター(PBS)で処理した。24時間後、サンプルを3.7%ホルムアルデヒド溶液中で固定し、0.5% Triton X-100中で抽出し、抗ホスホチロシンクローンPY20(Upstate; Charlottesville, VA)を使用して染色した。フィコエリトリン結合ロバ抗マウス抗体(BD Biosciences; San Jose, CA)およびエピ蛍光(epifluorescence)顕微鏡検査を用いて、免疫染色を可視化した。

20

【0300】

ウエスタンブロット分析 . 細胞単層を、1% Triton-X-100を含有するバッファー中、氷上で5分間抽出した。タンパク質濃度をクーマシーブルー染色(Pierce; Rockford, IL)により測定した後、等量のタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース(Protran; Schleicher & Schuell; Keene, NH)にトランスファーした。製造業者(Pierce)により推奨されているとおりに、増強化学発光により、抗体結合を検出した。

【0301】

免疫沈降 . 免疫沈降実験は、EphA2抗体D7(Upstate; Charlottesville, VA)およびウサギ抗マウス(Chemicon)結合プロテインA-セファロース(Sigma)を使用して、4で2.5時間行った。免疫沈降体を細胞溶解バッファー中で3回洗浄し、SDSサンプルバッファー(5% SDS、3.8% DTT、25% グリセロールおよび0.1% プロモフェノールブルーを含有するTrisバッファー)中で再懸濁させ、10% SDS-PAGEにより分離した。

30

【0302】

硫酸プレオマイシンへの暴露後にBEAS-2B細胞により産生されたサイトカインのLuminex分析 . 使用した材料: 硫酸プレオマイシン, Sigma Cat. # B2434, Lot 102K0753, 1.8 U/mg, 20mg; Beadlyte Human Multicytokine Beadmaster Kit, Upstate Cat. # 48-100, Lot 26301; Human IL-6 Beadmates, Upstate Cat. # 46-106, Lot 24204; Human IL-8 Beadmates, Upstate Cat. # 46-108, Lot 24205; Luminex 100装置; BEAS-2B細胞, ATCC Cat. # CRL-9609; BEGM Bulletキット(増殖培地), Cambrex Cat. # CC3170。

40

【0303】

BEAS-2B細胞を、BEGM/10% FBS中、96ウェルプレート内に 3×10^4 /ウェルでプレーティングした。翌日、培地を二重に除去し、プレオマイシンの希釈物(100、50、25、10および0mU/ml)を含有する同じ培地で置換した。37、5% CO₂での5時間のインキュベーションの後、上清を集め、500×gで室温で3分間遠心分離し、-20で保存した。該細胞上清中のサイトカイン産生を、Luminex 100を使用して、Beadmasterキットの指示に従い分析した。

【0304】

50

アポトーシスアッセイ . 2⁵細胞/ウェルのBeas-2B細胞を6ウェル組織培養処理プレート上でプレーティングした。細胞をウェルに一晩付着させた。翌日、100mU/mL プレオマイシンをウェルに加えた。24時間のプレオマイシン暴露後、細胞を0.25% トリプシンで解離させ、300×gで遠心分離し、通常の細胞培養培地で洗浄した。Annexin-V FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) を使用して、アネキシン (Annexin) V結合アッセイを行った。FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して、アネキシンV結合およびPI取り込みを測定した。

【0305】

6.8.2 結果

MCF-10Aは、細胞骨格の免疫染色を用いる細胞接着の分析を可能にしうる非トランスフォーム化上皮系である (Kinchら, 1995, J. Cell. Biol. 130 (2):461-71)。EphA2の過剰発現が細胞-ECM付着を増強することを示すために、これらの細胞そのものを使用した。EphA2のアップレギュレーションは、プレオマイシン処理上皮 (この場合も、EphA2がアップレギュレーションされる) において認められるものに類似した形態学的変化を引き起こしうる。同様に、EphA2の過剰発現はフィブロネクチンの発現を増強し、それにより細胞-ECM付着を増強する。上皮は初期創傷応答中にフィブロネクチンを産生するため、このことは、EphA2のアップレギュレーションが創傷治癒-線維形成におけるこの事象の上流に位置することを示唆している。MDA-MB-231での逆の実験において、高いフィブロネクチン内因性レベルを有する細胞 (例えば、MDA-MB-231) の、EphA2抗体での処理は、フィブロネクチンレベルを減少させるのに十分なものである。

10

20

【0306】

MCF10A乳房上皮細胞を、E-カドヘリンおよびパクシリン染色を伴う蛍光顕微鏡検査および位相差顕微鏡により検査した。顕微鏡分析は、EphA2がアップレギュレーションされた細胞においては、対照細胞と比較して低下した細胞-細胞接着を示し (図7)、このことは、EphA2のアップレギュレーションが上皮の接着特性を改変することを示している。

【0307】

Neo (レーン1) またはEphA2 (レーン2) を過剰発現するMCF10A乳房上皮細胞からの抽出物のウエスタンブロット (図8) は、EphA2発現の増強と共にフィブロネクチン発現の上昇を示しており、このことは、EphA2過剰発現細胞がフィブロネクチンのレベルを増加させたことを示している。B13 EphA2抗体で処理されたMDA-MB-231乳癌細胞からの抽出物のウエスタンブロット (図9) は、24時間にわたるEphA2タンパク質レベルの減少およびフィブロネクチンの分解、ならびにそれとは対照的な、時間が経過しても安定なままであるパクシリンタンパク質レベルを示しており、このことは、EphA2抗体がフィブロネクチンの分解を誘導することを示している。

30

【0308】

リン酸化チロシン (P-Tyr) を示すために染色されたBeas2B細胞の蛍光顕微鏡検査 (図10) は、未処理対照細胞と比較して、プレオマイシンで24時間処理された細胞においては、細胞接着の部位 (例えば、接着点 (フォーカルアドヒージョン)) にP-Tyrが高度に局在化していることを示しており、このことは、プレオマイシン処理により得られた細胞形態およびP-Tyr局在化における変化を示している。プレオマイシン処理Beas2B細胞は更に、プレオマイシンで処理されていない対照細胞より顕著なフォーカルアドヒージョンを示している (図11)。

40

【0309】

漸増量のプレオマイシンで処理されたBeas-2B細胞は24時間にわたって漸増レベルのIL-8 (図12) およびIL-6 (図13) を分泌した。このことは、プレオマイシンで損傷された上皮が、免疫分泌応答の増強を伴うことを示している。他のサイトカインおよび因子、例えばIL-1、IL-、IL-7、TNF-、エオタキシン、MCP-1、ランテス (Rantes) およびMIP-1の分泌も試験したが、これらのレベルの変化は検出されなかった。

【0310】

蛍光標示式細胞分取器 (FACS) によるBeas-2Bの分析 (図14) は、アネキシン (annexin

50

) V結合アッセイにより測定した場合の、プレオマイシン処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したアポトーシス事象を示しており、このことは、これらの細胞におけるアポトーシスの誘導を示している。Beas-2B細胞のFACS分析は、プレオマイシンでの処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したCD95/Fas発現を示しており(図16)、このことは、プレオマイシンがCD95(Fas)発現を増強することを示している。Beas-2B気管支上皮細胞のウエスタンブロットは、プレオマイシンでの24時間の処理の後の、パキシリン(これは、対照および処理サンプルにおいて同等レベルで発現される細胞骨格タンパク質であり、したがって、同じサンプルローディングに関する対照実験を行うために使用される)の発現レベルと比較して増強したEphA2発現を示している(図17)。パキシリンレベルは安定なままであり、このことは、プレオマイシンがBeas-2B気管支上皮においてEphA2を特異的にアップレギュレーションすることを示している。

10

【0311】

Beas-2B細胞のFACS分析は、プレオマイシンでの処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したEphA2表面発現を示しており(図18)、このことはプレオマイシンが気管支上皮細胞においてEphA2発現を増強することを示している。

【0312】

Beas-2B気管支上皮細胞のウエスタンブロット分析は、プレオマイシンでの24時間の処理の後のEphA2発現の増強(これはEphA2のアップレギュレーションを示す)を示しており(図19)、一方、P-Tyrレベルが若干減少することを示している(これはEphA2の機能の改変を示す)。

20

【0313】

7. 均等物

当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態の多数の均等物を認識し、またはせいぜい通常の実験により確認しうるのであろう。そのような均等物は特許請求の範囲に含まれると意図される。

【0314】

本明細書に挙げられている全ての刊行物、特許および特許出願を、それぞれの刊行物、特許または特許出願が参照により本明細書に組み入れられると具体的および個々に示されているのと同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。

【図面の簡単な説明】

30

【0315】

【図1A】EGFはEphA2の発現を増強する。HMT-3522細胞、変異体S1(非腫瘍形成性不死化上皮細胞系)をEGFと共にインキュベートした。(A)定量PCR分析は、EGFで処理されていない対照細胞と比較してEGF処理によりEphA2 mRNAレベルが増加することを示した。

【図1B】EGFはEphA2の発現を増強する。HMT-3522細胞、変異体S1(非腫瘍形成性不死化上皮細胞系)をEGFと共にインキュベートした。(B)EphA2特異的D7抗体での全細胞溶解物のウエスタンブロット分析は、EGFで処理されていない対照細胞と比較してEGF治療でEphA2タンパク質レベルが増加することを示した。分子量標準の相対移動度を左側に示す。

【図2】in vivoでの肺上皮上のEphA2発現。BALB/cマウスからの肺組織をEphA2特異的抗体で染色した。正常マウス(A)およびRSV感染マウス(B、右パネル)は基底層の上皮細胞上の染色を示した。杯細胞により産生されたムチンを染色する過ヨウ素酸-シッフ(PAS)試薬を使用した染色(B、左パネル)は、RSV感染マウスからの肺組織内のEphA2とは異なる細胞上に存在することが判明した。

40

【図3】EphA2モノクローナル抗体の動力学的分析。固定化EphA2-FcへのEphA2モノクローナル抗体の結合の動力学をアッセイするために、BIACORE(商標)アッセイを用いた。Eph099B-208.261は実線で示されており、B233は点線で示されており、EA2は破線で示されており、陰性対照は正方形で示されている。

【図4】EphA2アンチセンスはEphA2タンパク質レベルを減少させる。MDA-MB-231細胞の単層を2 μ g/mlのEphA2アンチセンスまたは逆アンチセンス(IAS)オリゴヌクレオチドで37で24時間トランスフェクトした。EphA2特異的D7抗体での全細胞溶解物のウエスタンブ

50

ロット分析は、アンチセンスオリゴヌクレオチドでのトランスフェクションがEphA2タンパク質レベルを減少させることを証明している。該膜を取り出し、ローディング対照としてのパキシリン抗体で再プローブした。分子量標準の相対移動度を左側に示す。

【図5】Eph099B-208.261およびB233抗体の V_L および V_H のアミノ酸配列。CDRの配列が示されている。

【図6】形質転換上皮における接着およびシグナリングの改変。正常上皮は、安定な細胞-細胞接着および弱い細胞外マトリックス（ECM）接着、低い細胞遊走、低い細胞増殖ならびに低いEphA2レベルを示す。しかし、形質転換上皮は、弱い細胞-細胞接着、増強されたECM接着、高い細胞遊走、高い細胞増殖および高いEphA2レベルを含む、組織再生に、より特徴的な、改変した接着およびシグナリングを示す。

10

【図7】EphA2のアップレギュレーションは上皮の接着性を改変する。位相差顕微鏡検査またはE-カドヘリンおよびパキシリン染色によるMCF10A乳房上皮細胞の検査は、EphA2がアップレギュレーションされた細胞においては、対照細胞と比較して低下した細胞-細胞接着を示している。

【図8】EphA2過剰発現細胞における高レベルのフィブロネクチン。Neo（レーン1）またはEphA2（レーン2）を過剰発現するMCF10A乳房上皮細胞からの抽出物のウエスタンブロットは、EphA2発現の増強と共にフィブロネクチン発現の上昇を示している。

【図9】EphA2抗体はフィブロネクチン分解を誘導する。B13 EphA2抗体で処理されたMDA-MB-231乳癌細胞からの抽出物のウエスタンブロットは、24時間にわたるEphA2タンパク質レベルの減少およびフィブロネクチンの分解、ならびにそれとは対照的な、時間が経過しても安定なままであるパキシリンタンパク質レベルを示している。

20

【図10】細胞形態およびP-Tyr局在化の変化。リン酸化チロシン（P-Tyr）を示すために染色されたBeas2B細胞の顕微鏡検査は、未処理対照細胞と比較して、プレオマイシンで24時間処理された細胞においては、フォーカルアドヒージョンにおけるP-Tyrを示している。

【図11】プレオマイシン処理細胞におけるフォーカルアドヒージョンの存在。プレオマイシン処理Beas2B細胞はフォーカルアドヒージョンを示している。

【図12】プレオマイシンで損傷された上皮はIL-8を分泌する。漸増量のプレオマイシンで処理されたBeas-2B細胞は24時間にわたって漸増レベルのIL-8を分泌する。

【図13】プレオマイシンで損傷された上皮はIL-6を分泌する。漸増量のプレオマイシンで処理されたBeas-2B細胞は24時間にわたって漸増レベルのIL-6を分泌する。

30

【図14】プレオマイシン処理Beas-2B細胞におけるアポトーシスの誘導。Beas-2Bの蛍光標示式細胞分取器（FACS）分析は、プレオマイシン処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したアポトーシス事象を示している。

【図15】FACSデータ。

【図16】プレオマイシンはCD95（Fas）発現を増強する。Beas-2B細胞のFACS分析は、プレオマイシンでの処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したCD95/Fas発現を示している。

【図17】プレオマイシンはBeas-2B気管支上皮においてEphA2をアップレギュレーションする。Beas-2B気管支上皮細胞のウエスタンブロットは、プレオマイシンでの24時間の処理の後の、安定なままであるパキシリンの発現レベルと比較して増強したEphA2発現を示している。

40

【図18】プレオマイシンはBeas-2B細胞におけるEphA2表面発現を増強する。Beas-2B細胞のFACS分析は、プレオマイシンでの処理の24時間後の、未処理対照細胞と比較して増強したEphA2表面発現を示している。

【図19】プレオマイシンはEphA2の過剰発現および機能改変を誘導する。Beas-2B気管支上皮細胞のウエスタンブロットは、プレオマイシンでの処理の24時間後のEphA2発現の増強（これはEphA2のアップレギュレーションを示す）を示しており、一方、P-Tyrレベルが若干減少することを示している（これはEphA2の機能の改変を示す）。

【配列表】

50

SEQUENCE LISTING

<110> MedImmune, Inc.

<120> EphA2 and Hyperproliferative Cell Disorders

<130> 10271-060-228

<150> 60/462,024

<151> 2003-04-11

<160> 45

10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

20

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Ser Gly Arg Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
1 5 10

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr Gln
1 5 10 15

<210> 5

<211> 14

30

40

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
 1 5 10

<210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 6

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
 1 5 10

<210> 7
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 7

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Asp

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 8

Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Glu Leu Ala Phe Arg Ser Leu Asp
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 9

Lys Asp Glu Leu
 1

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Asp Asp Glu Leu
 1

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Glu Glu Leu
 1

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Glu Asp Leu
 1

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Asp Glu Leu
 1

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

Pro Gln Lys Lys Ile Lys Ser
 1 5

10

20

30

40

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Pro Lys Lys Pro
 1 5

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Arg Lys Lys Arg
 1

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Lys Lys Arg Lys
 1 5

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ala His Gln
 1 5 10

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln Arg
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 19
 <212> PRT

10

20

30

40

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Pro Leu Thr Arg Arg Arg Pro Ala Ala Ser Gln Ala Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Pro Thr Pro

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro
 1 5 10 15

<210> 23

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 23

Met Leu Phe Asn Leu Arg Xaa Xaa Leu Asn Asn Ala Ala Phe Arg His
 1 5 10 15

Gly His Asn Phe Met Val Arg Asn Phe Arg Cys Gly Gln Pro Leu Xaa
 20 25 30

<210> 24

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Lys Leu

1

<210> 25

10

20

30

40

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Ser Asp Tyr Gln Arg Leu
 1 5

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 26

Gly Cys Val Cys Ser Ser Asn Pro
 1 5

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 27

Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu
 1 5

<210> 28
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 28

Gly Gln Glu Leu Ser Gln His Glu
 1 5

<210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Gly Asn Ser Pro Ser Tyr Asn Pro
 1 5

40

<210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Val Ser Gly Ser Lys Gly Gln
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu
1 5

10

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Gln Thr Leu Thr Thr Pro Leu
1 5

20

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Gln Ile Phe Ser Arg Ser Ala
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 34

Gly Gln Ile His Gly Leu Ser Pro
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 35

Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser
1 5

<210> 36

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Gly Cys Thr Leu Ser Ala Glu Glu
 1 5

<210> 37
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 37

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 38

Ala Ala Val Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

30

Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly
 1 5 10 15

<210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 40

atggagctcc aggcagcccg c

21

40

<210> 41
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: PCR primer

<400> 41
 gccatacggg tgtgtgagcc agc 23

<210> 42
 <211> 25
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: PCR primer 10

<400> 42
 cagtgggtga cctgacctgc cgtct 25

<210> 43
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: PCR primer 20

<400> 43
 ctcagtgtag cccaggatgc ccttgag 27

<210> 44
 <211> 31
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence: phosphorothioate-modified
 antisense oligonucleotides 30

<400> 44
 ccagcagtac cgcttccttg ccttgaggcc g 31

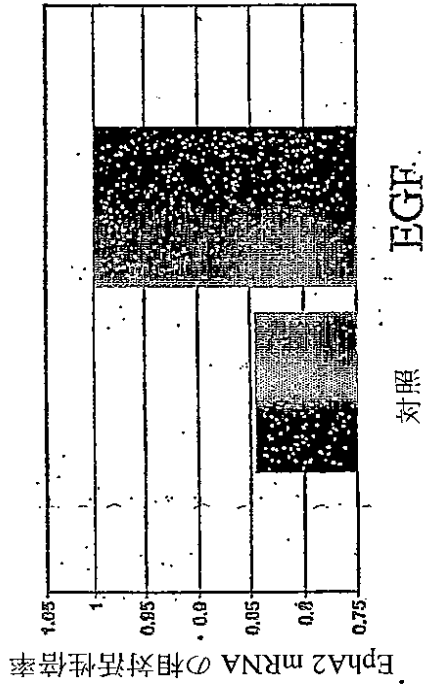
<210> 45
 <211> 30
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 40
 <223> Description of artificial sequence: phosphorothioate-modified
 antisense oligonucleotides

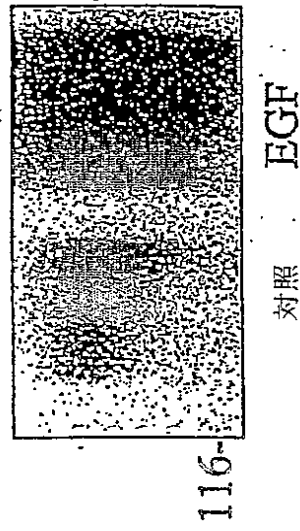
<400> 45
 gccgcgtccc gttccttcac catgacgacc 30

【 図 1 A 】



A

【 図 1 B 】

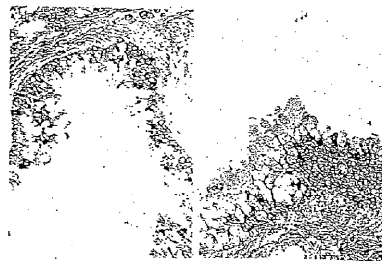


B

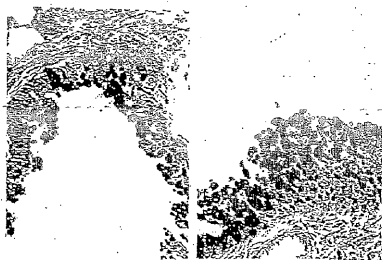
【 図 2 】



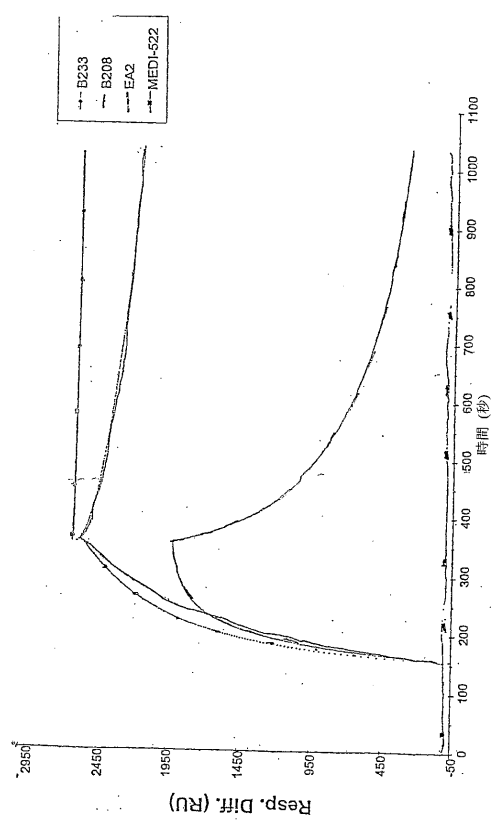
2A



2B

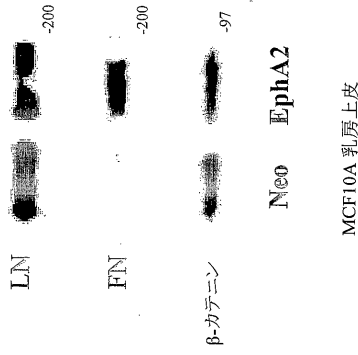


【 図 3 】



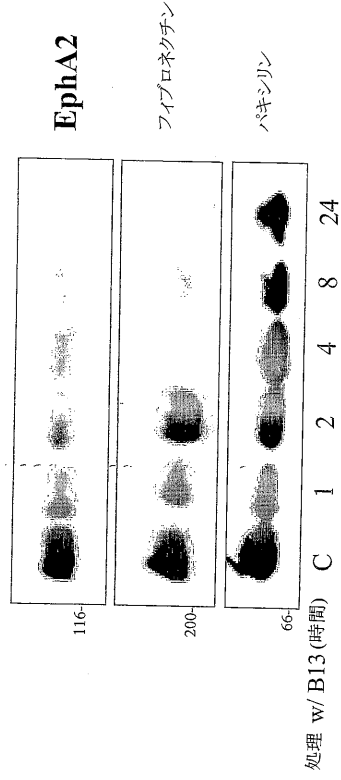
【 図 8 】

EphA2 過剰発現細胞における高レベルのフィブロネクチン



【 図 9 】

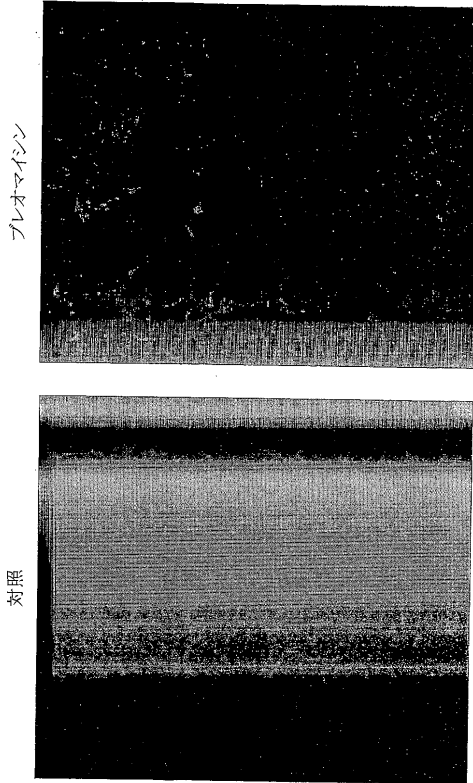
EphA2 抗体はフィブロネクチン分解を誘導する



MDA-MB-231 乳癌

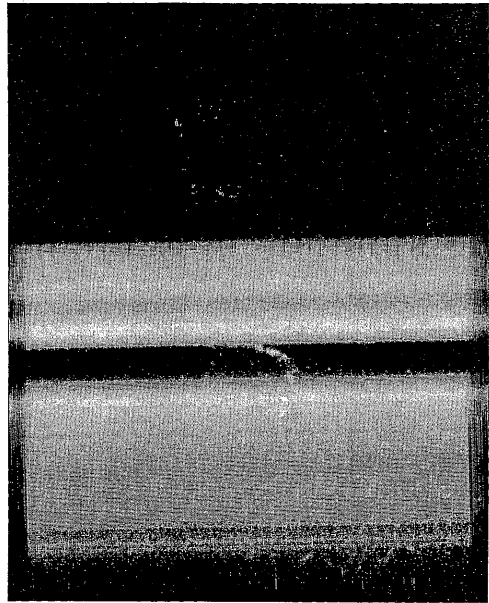
【 図 10 】

細胞形態および P-Tyr 局在化の変化



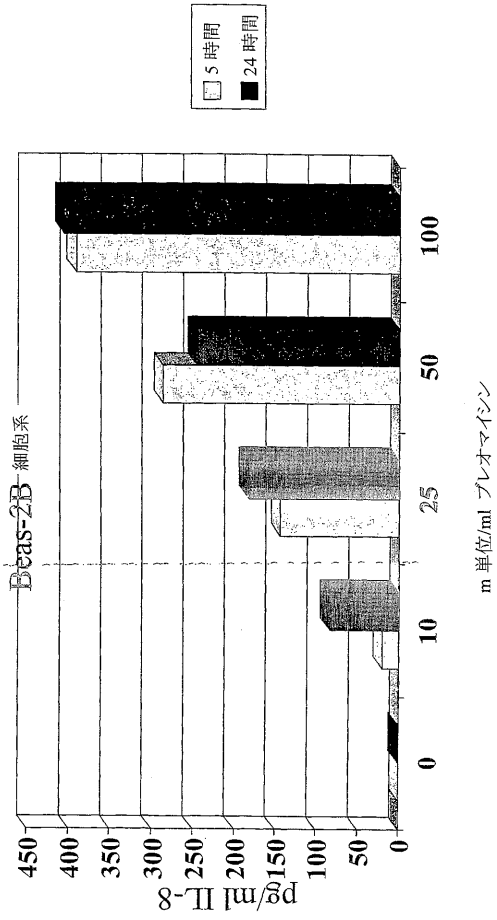
【 図 11 】

プレオマイシン処理細胞におけるフォーカルアドヒージョンの存在



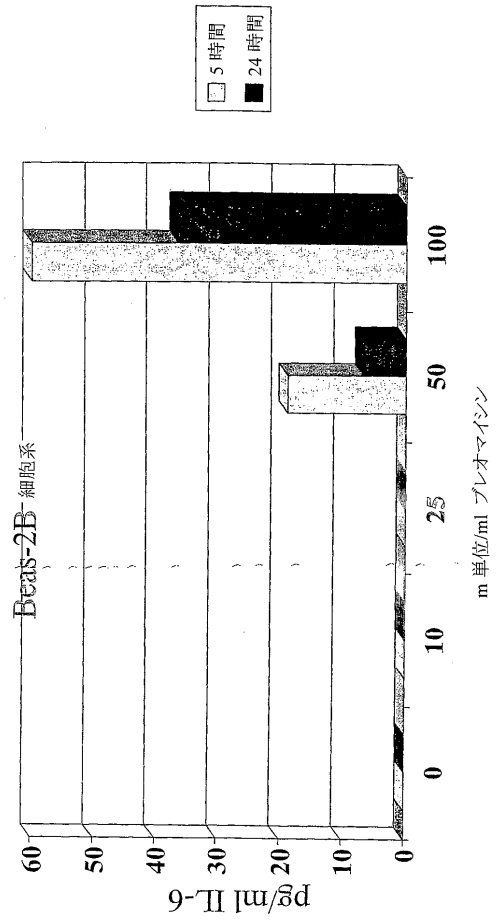
【 図 1 2 】

プレオマイシンで損傷された上皮は IL-8 を分泌する

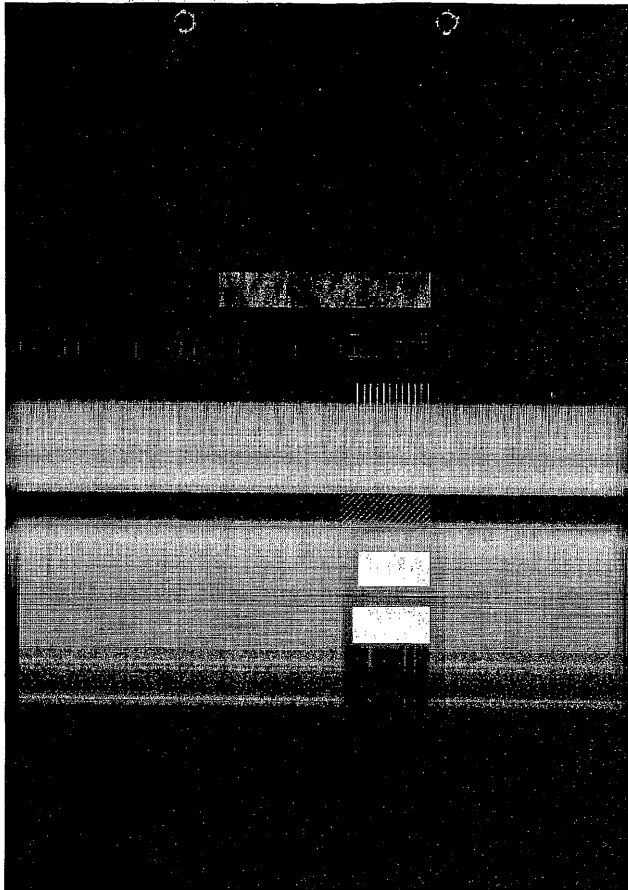


【 図 1 3 】

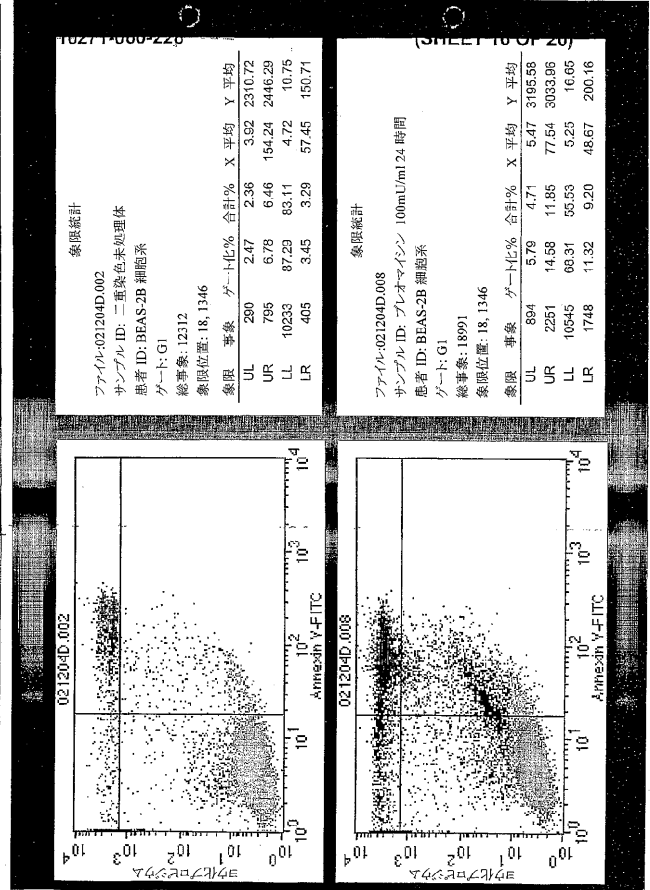
プレオマイシンで損傷された上皮は IL-6 を分泌する



【 図 1 4 】

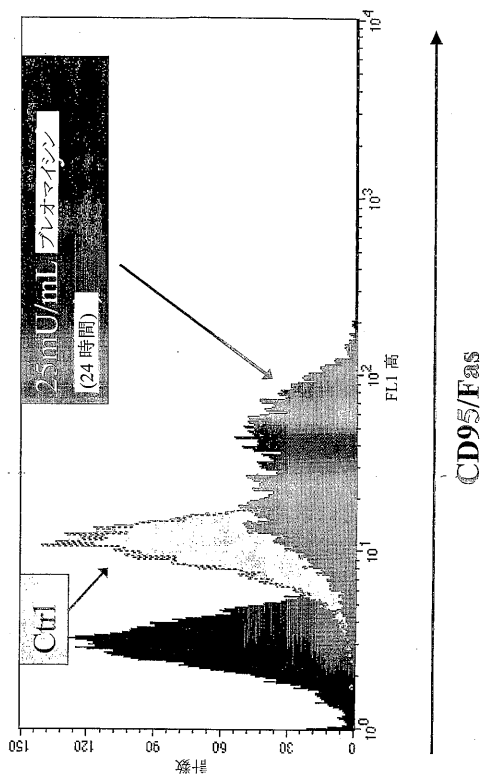


【 図 1 5 】



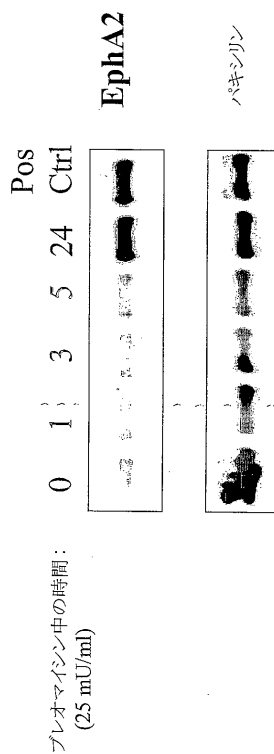
【 図 1 6 】

プレオマイシンは CD95(Fas)を増強する
Beas-2B 細胞



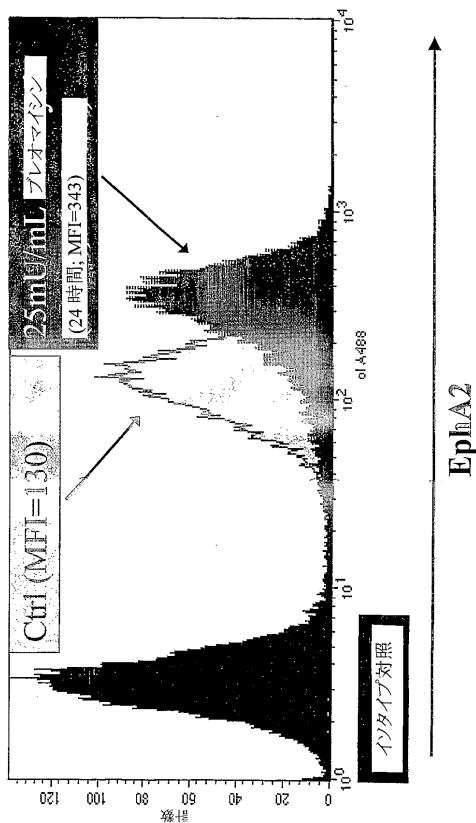
【 図 1 7 】

プレオマイシンは Beas-2B 気管支上皮において EphA2 を
アップレギュレーションする



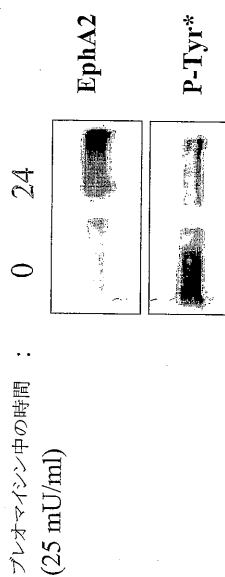
【 図 1 8 】

プレオマイシンは EphA2 表面発現を増強する
Beas-2B 細胞



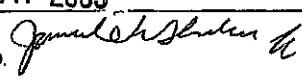
【 図 1 9 】

プレオマイシンは EphA2 の過剰発現および機能変化を誘導する



Beas2B 気管支上皮
*IP: 抗 EphA2(D7)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/11482
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/00, 39/395, 49/00 US CL : 424/184.1, 130.1; 424/9.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/184.1, 130.1; 424/9.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) medline, biosis, cancerlit, uspat, derwent		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/12172 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION) 22 February 2001 (22.02.2001)	1-32
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 05 May 2005 (05.05.2005)		Date of mailing of the international search report 19 MAY 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Gary B. Nickol Ph.D.  Telephone No. 703-308-0196

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	P
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 16/40	
	C 0 7 K 16/46	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (72) 発明者 キーナー, ピーター, エー.
 アメリカ合衆国 1 8 9 0 1 ペンシルバニア州, ドイルズタウン, サドルビュー レーン 2
- (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 ランガーマン, ソロモン
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, バルチモア, クロス カントリー ブールヴァード 6 6 0 6
- (72) 発明者 リード, ジェニファー, エル.
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 1 メリーランド州, クラークスバーグ, ピエモン トレイル ロード 1 2 6 5 6

F ターム(参考) 4C084 AA13 AA19 AA23 MA02 ZA33 ZA36 ZA40 ZA45 ZA59 ZA75
 ZA81 ZA89 ZB21
 4C085 AA13 AA14 BB31 CG21 DD88 EE01
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA36 ZA40 ZA45 ZA59
 ZA75 ZA81 ZA89 ZB21
 4H045 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 EA23 FA72 FA74