

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5858984号
(P5858984)

(45) 発行日 平成28年2月10日(2016.2.10)

(24) 登録日 平成27年12月25日(2015.12.25)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	

請求項の数 8 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-505597 (P2013-505597)	(73) 特許権者	502379147
(86) (22) 出願日	平成23年3月22日 (2011.3.22)		イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド
(65) 公表番号	特表2013-525782 (P2013-525782A)		イスラエル国 76100 レホヴォト
(43) 公表日	平成25年6月20日 (2013.6.20)		ピー.オー.ボックス 95 アット ザ
(86) 国際出願番号	PCT/IL2011/000269		ワインツマン インスティテュート オブ
(87) 国際公開番号	W02011/132182		サイエンス
(87) 国際公開日	平成23年10月27日 (2011.10.27)	(74) 代理人	100103816
審査請求日	平成25年12月9日 (2013.12.9)		弁理士 風早 信昭
(31) 優先権主張番号	61/325,330	(74) 代理人	100120927
(32) 優先日	平成22年4月18日 (2010.4.18)		弁理士 浅野 典子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ErbB/ErbBリガンドに関連する疾患を治療するための分子及びその分子を使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

必要性のある対象における膵臓癌又は肺癌のための治療を選択する方法であって、前記方法は、対象からの生物学的サンプル中の少なくとも二つの同一でないErbBリガンドの量及び/又は活性を分析することを含み、前記少なくとも二つの同一でないErbBリガンドが、型トランスフォーミング増殖因子(TGF)、ヘパリン結合EGF様増殖因子(HB-EGF)、及びアンフィレギュリン(AR)からなる群から選択され、前記少なくとも二つの同一でないErbBリガンドが、癌でない細胞又は組織と比較して予め決定されたレベルより上の上方制御された量及び/又は活性を示すとき、前記少なくとも二つの同一でないErbBリガンドが、対象における膵臓癌又は肺癌の治療のための標的として選択され、前記治療は、前記少なくとも二つの同一でないErbBリガンドに特異的に結合する少なくとも一種の抗体又はそのフラグメントであって、前記少なくとも二つの同一でないErbBリガンドの量及び/又は活性を下方制御する少なくとも一種の抗体又はそのフラグメントを含むことを特徴とする方法。

【請求項2】

前記生物学的サンプルが、癌細胞を含むことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記生物学的サンプルが、血液、血漿、唾液、生検、頬の内側をこすることで得られた試料、及び洗浄からなる群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記少なくとも二つの同一でないE r b Bリガンドが、型トランスフォーミング増殖因子(TGF)及びヘパリン結合EGF様増殖因子(HB-EGF)であることを特徴とする請求項1に記載の使用。

【請求項5】

必要性のある対象における膵臓癌又は肺癌の治療のために特定された医薬を製造するための、少なくとも二つの同一でないE r b Bリガンドに特異的に結合する少なくとも一種の抗体又はそのフラグメントであって、前記少なくとも二つの同一でないE r b Bリガンドの量及び/又は活性を下方制御する少なくとも一種の抗体又はそのフラグメントの治療有効量の使用であって、前記対象が、請求項1~4のいずれかに記載の方法に従った治療のために選択されていることを特徴とする使用。

10

【請求項6】

前記少なくとも一種の抗体が、少なくとも二種の抗体を含み、前記少なくとも二種の抗体が、前記少なくとも二つの同一でないE r b Bリガンドに結合することを特徴とする請求項5に記載の使用。

【請求項7】

前記抗体が、EGF様ドメインのエピトープに結合することを特徴とする請求項5に記載の使用。

【請求項8】

ゲンシタピンをさらに含むことを特徴とする請求項5に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌などの過剰増殖性の疾患を治療するための標的を選択する方法、及びかかる疾患を治療するための薬剤の組み合わせに関する。

【背景技術】

【0002】

チロシンキナーゼ受容体のE r b Bファミリー及びそれに結合するリガンドは、胚発生及び成体期の組織リモデリングにおいて重要な役割を果たす。シグナル伝達は、リガンド結合で開始し、これは受容体の二量体化及びリン酸化をもたらし、増殖、分化、移動及び生存を含む様々な細胞過程を生じる。

30

【0003】

四つの密接に関連したE r b B受容体がある：上皮増殖因子(EGF)、型トランスフォーミング増殖因子(TGF)、ヘパリン結合EGF様増殖因子(HB-EGF)、アンフィレギュリン(AR)、ベータセルリン(BTC)、エプレギュリン(EPR)、及びエピゲンに結合するE r b B-1(上皮増殖因子受容体(EGFR))；ニューレギュリン増殖因子に結合するE r b B-3及びE r b B-4；及び現在のところリガンドが知られていないE r b B-2(HER2)。

【0004】

全てのE r b Bファミリーのリガンドは、上皮増殖因子(EGF)モチーフとして集約的に称される、保存された間隔及び内容において六つのシステインを含む50~60アミノ酸長さの配列を共有する。このモチーフは、受容体認識の役割を有する中心的構造及び機能的特徴である。増殖因子は、I型膜貫通タンパク質として合成され、(タンパク質分解プロセスを介して)ドメイン外脱落が生じ、これにより(EGF様ドメインを含む)可溶性増殖因子が放出される。可溶性リガンドは次に、離れた細胞、隣接する細胞、又はその起源の細胞上の受容体に結合してそれを活性化し、膜に付着されたりリガンドの中には、隣接する細胞の膜上のEGFRを活性化することができるものもある。この作用機構は、可溶性リガンドとは異なる生物学的結果を誘導することができる。

40

【0005】

E r b Bは、乾癬、関節硬化症、及びいくつかの種類のヒトの癌を含むいくつかの疾患に關与することが記載されている。例えば、上皮起源の多くの腫瘍は、これらの細胞表面

50

上に ErbB-1 の増大されたレベルを発現する [Ulrich, A. ら. (1984) Nature 309, 418-425]。増大された ErbB 受容体発現を有する腫瘍は、TGF の又は他の ErbB リガンドの増大した生産をしばしば示し、オートクリンループによる受容体の活性化を可能にする。

【0006】

臨床研究は、一つ以上の ErbB リガンドの過剰発現は、減少した患者の生存と関連することを示す。例えば、原発性結腸直腸腫瘍の標本内の TGF の幅広い発現は、肝臓転移を発展させる危険性の 50 倍以上の増大と関連している [Barozzi, C. ら. (2002) Cancer 94, 647-657]。膀胱癌では、多数の ErbB リガンド (AR, HB-EGF, TGF, 及び特に EPR) の増大した発現は、減少した患者の生存と関連する [Thogersen, V. B. ら. (2001) Cancer Res 61, 6227-6233]。それに加えて、転移性疾患における増大した TGF の発現は、貧弱な患者の生存と関連し [De Jong, K. P. ら. (1998) Hepatology 28, 971-979]、頭部及び首の腫瘍における TGF の増大した発現は、減少した患者の生存と関連する [Grandis, J. R. ら. (1998) J Cell Biochem 69, 55-62]。さらに、いくつかのリガンド、特に TGF, AR, 及び HB-EGF の腫瘍細胞における発現は、化学療法に対する抵抗性と関連する [Eckstein, N. ら. (2008) J Biol Chem 283, 739-750; Wang, F. ら. (2007) Oncogene 26, 2006-2016]。

【0007】

出現しつつあるデータは、特定の腫瘍における特定の ErbB リガンドの発現は、予後と異なって関連することを示す。胸部の腫瘍サンプルにおける EGF 発現は、より好ましい予後と関連しているが、TGF 発現は、より攻撃的な腫瘍と関連している [Revillion, F. ら. (2008) Int J Biol Markers 23, 10-17]。同様に、マイクロアレイ分析は、乳癌の初期の過形成前駆体は、正常な胸組織と比較して増大した AR 転写、及び減少した EGF 転写を示すことを明らかにしている [Lee, S. ら. (2007) Am J Pathol 171, 252-262]。非小細胞肺癌腫 (NSCLC) を有する患者において、TGF 及び AR の血清濃度は、腫瘍の攻撃性と関連する [Lemos-Gonzalez, Y. ら. (2007) Br J Cancer 96, 1569-1578]。これらの結果をまとめると、このデータは、TGF 及び AR は、EGFR に関連する腫瘍細胞の攻撃性及び化学耐性と関連しており、一方、EGF は、TGF 及び AR による病理性シグナル伝達の刺激に実際に対抗することができるということを示唆する [Wilson, K. J. ら. (2009) Pharmacol Ther 122, 1-8]。

【0008】

ErbB に関連する癌の治療のために現在承認されている医薬は、ErbB-1 に指向されたモノクローナル抗体 (EGFR、例えばエルピツクス/セツクシマブ)、又は HER2 に指向されたモノクローナル抗体 (ErbB-2、例えばヘルセプチン/トラスツマブ)、又は小分子のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI、例えばタルセバ/エルロチニブ) を含む [Britten, C. D. (2004) Mol Cancer Ther 3, 1335-1342; Weiner, L. M., and Borghaei, H. (2006) Hum Antibodies 15, 103-111]。モノクローナル抗体 (例えばトラスツマブ) 又はチロシンキナーゼ阻害剤 (例えばゲフィチニブ) に対する後天的な抵抗性は、ErbB 受容体又はリガンドの上方制御としばしば関連しており、例えば、トラスツマブに対する抵抗性について生体内で選択されたヒトの乳癌細胞は、EGFR 及び ErbB リガンド TGF, HB-EGF 及び NRG1 を顕著に過剰発現した [Ritter, C. A. ら. (2007) Clin Cancer Res 13, 4909-4919]。同様に、EGFR 及び HER2 を標的とするモノクローナル抗体は、機能的な受容体及び医薬回避機構を阻害することによって、ドセタキセルの抗腫瘍効果

10

20

30

40

50

を増大させる [Bijman, M. N. ら. (2009) Anticancer Drugs 20, 450 - 460; Freeman, D. J. ら. (2009) Mol Cancer Ther 8, 1536 - 1546]。

【0009】

それに加えて、リガンドを直接標的とする代替的な戦略が提案されている。一つのかかる戦略は、個別のリガンドに対して特異的なモノクローナル抗体である。例えば、ペバシズマブは、血管内皮増殖因子A (VEGF-A) に結合するヒト化モノクローナル抗体である [Hurwitz, H., ら. (2004) N Engl J Med 350, 2335 - 2342; Shih, T., and Lindley, C. (2006) Clin Ther 28, 1779 - 1802]。別の戦略は、「リガンドトラップ」、つまり、特定の受容体の可溶性リガンド結合ドメインを使用する。かかるリガンドトラップの例は、エタネルセプトであり、これは、ヒトの免疫グロブリンG (IgG) のFc領域に融合されたTNF-受容体のリガンド結合ドメインを含む融合タンパク質であり、関節リウマチの治療に使用される [Mohler, K. M., ら. (1993) J Immunol 151, 1548 - 1561]。別の代替案は、脱落因子、つまりディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ (ADAM) ファミリーのメンバーの阻害であり、これらのメンバーは、EGFRリガンドの脱落 (機能的なEGFRリガンドの生産のために重要な現象) を媒介すると考えられる [Kataoka, H. (2009) J Dermatol Sci 56, 148 - 153; Kenny, P. A., and Bissell, M. J. (2007) J Clin Invest 117, 337 - 345; Merchant, N. B., ら. (2008) Clin Cancer Res 14, 1182 - 1191]。

10

20

【0010】

ErbbBリガンドを標的化する追加のモノクローナル抗体は、技術分野において記載されている。例えば、WO2009/026705は、骨関節炎の治療のためにTGFを標的化するモノクローナル抗体を記載する。

【0011】

米国特許第7501122号は、抗ErbbB2抗体の組み合わせでの治療を記載する。特に、この米国特許は、ヒト化された抗ErbbB2抗体を使用した癌 (例えば乳癌、結腸癌) の治療を教示する。この発明の教示によって記載された抗体は、上皮増殖因子受容体 (EGFR) 又はEGFRリガンド (例えば、EGF, TGF-、又はHB-EGF) を過剰発現する癌におけるErbbB受容体のリガンド活性化を阻害するために、一緒に又は個別に投与されることができ、それにより癌細胞の増殖を阻害する。

30

【0012】

米国特許第7485302号は、抗ErbbB2抗体及び化学療法剤を使用して癌を治療する方法を記載する。特に、この米国特許は、上皮増殖因子受容体 (EGFR) 又はそのリガンド (例えばTGF) を過剰発現する癌 (例えば、乳癌、肺癌) の治療のために化学療法剤を抗ErbbB2抗体と共に使用することを教示する。

【発明の概要】

【0013】

本発明のある実施形態の側面によれば、過剰増殖性の疾患をその必要性のある対象において治療するための標的を選択する方法が提供される。前記方法は、対象からの生物学的サンプル中の少なくとも一つのErbbBリガンドの量及び/又は活性を分析することを含み、予め決定されたレベルより上の非過剰増殖性の細胞又は組織と比較して上方制御された量及び/又は活性を示すErbbBリガンドが、過剰増殖性の疾患を治療するための標的として選択されることを特徴とする。

40

【0014】

本発明のある実施形態の側面によれば、以下のことを含むことを特徴とする、過剰増殖性の疾患をその必要性のある対象において治療する方法が提供される：(a) 請求項1の方法に従って、過剰増殖性の疾患を治療するための標的を選択すること；及び(b) 前記

50

標的の量及び／又は活性を下方制御する薬剤の治療有効量を前記対象に投与し、それにより前記対象における過剰増殖性の疾患を治療すること。

【0015】

本発明のある実施形態の側面によれば、以下のことを含むことを特徴とする、過剰増殖性の疾患をその必要性のある対象において治療する方法が提供される：(a) 第一のErbBリガンドの量及び／又は活性を下方制御する薬剤の治療有効量を投与すること；及び(b) 第二のErbBリガンドの量及び／又は活性を下方制御する薬剤の治療有効量を投与し、それにより前記対象における過剰増殖性の疾患を治療すること、ただし、前記第一のErbBリガンドと前記第二のErbBリガンドは同一でない。

【0016】

本発明のある実施形態の側面によれば、医薬的に許容可能な担体と、第一のErbBリガンドの量及び／又は活性を下方制御する第一の活性薬剤と、第二のErbBリガンドの量及び／又は活性を下方制御する第二の活性薬剤とを含む医薬組成物であって、前記第一のErbBリガンドと前記第二のErbBリガンドは同一でないことを特徴とする医薬組成物が提供される。

【0017】

本発明のある実施形態の側面によれば、包装材料と、第一のErbBリガンドの量及び／又は活性を下方制御する第一の活性薬剤と、第二のErbBリガンドの量及び／又は活性を下方制御する第二の活性薬剤とを含む製造物品であって、前記第一のErbBリガンドと前記第二のErbBリガンドは同一でなく、製造物品は、過剰増殖性の疾患の治療のために包装材料中に又は包装材料上に印刷されて特定されていることを特徴とする製造物品が提供される。

【0018】

本発明のある実施形態の側面によれば、TGFβのEGF様ドメインの少なくとも一つのエピトープに特異的に結合することができるモノクローナル抗体又はそのフラグメントであって、Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM) に寄託された受託番号CNCM I - 4292 (クローン番号551.6.103) によって記載されるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが提供される。

【0019】

本発明のある実施形態の側面によれば、HB-EGFのEGF様ドメインの少なくとも一つのエピトープに特異的に結合することができるモノクローナル抗体又はそのフラグメントであって、Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM) に寄託された受託番号CNCM I - 4291 (クローン番号898.47) によって記載されるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが提供される。

【0020】

本発明のある実施形態によれば、前記薬剤が、前記標的に特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む。

【0021】

本発明のある実施形態によれば、前記薬剤が、前記標的に特異的に結合するsiRNAを含む。

【0022】

本発明のある実施形態によれば、前記投与することが、少なくとも二種の薬剤を投与することを含み、前記少なくとも二種の薬剤の各々が同一でない標的に特異的に結合する。

【0023】

本発明のある実施形態によれば、前記薬剤が、前記第一のErbBリガンド及び／又は前記第二のErbBリガンドに特異的に結合する抗体又はそのフラグメントを含む。

【0024】

本発明のある実施形態によれば、前記薬剤が、前記第一のErbBリガンド及び／又は

10

20

30

40

50

前記第二の E r b B リガンドに特異的に結合する s i R N A を含む。

【 0 0 2 5 】

本発明のある実施形態によれば、前記方法は、前記対象に化学療法剤を投与することをさらに含む。

【 0 0 2 6 】

本発明のある実施形態によれば、前記過剰増殖性の疾患が癌である。

【 0 0 2 7 】

本発明のある実施形態によれば、前記癌が膵臓癌である。

【 0 0 2 8 】

本発明のある実施形態によれば、前記癌が肺癌である。

10

【 0 0 2 9 】

本発明のある実施形態によれば、前記生物学的サンプルが癌細胞を含む。

【 0 0 3 0 】

本発明のある実施形態によれば、前記分析することが E L I S A によって行われる。

【 0 0 3 1 】

本発明のある実施形態によれば、前記 E r b B リガンドが、上皮増殖因子 (E G F)、型トランスフォーミング増殖因子 (T G F)、ヘパリン結合 E G F 様増殖因子 (H B - E G F)、アンフィレギュリン (A R)、ベータセルリン (B T C)、エプレギュリン (E P R)、エピゲン、及びニューレギュリン増殖因子からなる群から選択される。

【 0 0 3 2 】

本発明のある実施形態によれば、前記第一の E r b B リガンドが 型トランスフォーミング増殖因子 (T G F) を含む。

20

【 0 0 3 3 】

本発明のある実施形態によれば、前記第二の E r b B リガンドがヘパリン結合 E G F 様増殖因子 (H B - E G F) を含む。

【 0 0 3 4 】

本発明のある実施形態によれば、前記医薬組成物は、化学療法剤をさらに含む。

【 0 0 3 5 】

本発明のある実施形態によれば、前記製造物品は、化学療法剤をさらに含む。

【 0 0 3 6 】

本発明のある実施形態によれば、前記第一の活性薬剤と前記第二の活性薬剤は、別個の医薬組成物中に処方されている。

30

【 0 0 3 7 】

本発明のある実施形態によれば、前記第一の活性薬剤と前記第二の活性薬剤は、単一の医薬組成物中に処方されている。

【 0 0 3 8 】

本発明のある実施形態によれば、前記モノクローナル抗体又はそのフラグメントは、検出可能な成分を含む。

【 0 0 3 9 】

本発明のある実施形態によれば、前記モノクローナル抗体又はそのフラグメントは、モノクローナル抗体又はそのフラグメントに取り付けられた細胞毒性薬剤を含む。

40

【 0 0 4 0 】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的用語及び/又は科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料と類似又は同等である方法及び材料を本発明の実施又は試験において使用することができるが、例示的な方法及び/又は材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法及び実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 1 】

50

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し添付の図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面について行う説明によって、本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

【0042】

【図1A - 1E】図1A - 1Eは、組み換えEGF様リガンドの構築、発現、及び生物学的活性、並びにGPI固定TGF β を使用したTGF β 阻害抗体の検出を示す。図1Aは、チオレドキシン(TRX)ドメイン、ヒスチジンボックス(6XH_{is})、隣接因子X_a開裂部位、及びカルボキシル末端EGF様ドメインを含む一般的なキメラタンパク質の略図を示す。図1Bは、アクリルアミドゲルのクーマシーブルー染色を示し、細菌発現を使用して調製されてNiNTAカラムで精製されたTGF β 及びHB-EGFを示す。分子量マーカーは、キロダルトンで示されている。図1Cは、チロシン残基にEGFRリン酸化を誘導する能力について試験することによって証明されるように、精製されたタンパク質の生物学的活性を示す。細胞は、24ウェルプレートに播種され、洗浄され、精製された融合タンパク質の増大する濃度でインキュベートされた(TRX-TGF β : 2, 20, 200 ng/ml; TRX-HB-EGF: 3, 30, 300 ng/ml)。EGF(10 ng/ml)は、正の対照として使用された。10分間のインキュベーション後、細胞は、溶解され、清澄化された抽出物は、抗ホスホチロシン(P-Tyr)抗体で免疫プロット(IB)された。図1Dは、Erbb-2のシグナルペプチド(SP)、TGF β (又はHB-EGF)のEGF様ドメイン、HAペプチドタグ、及び原形質膜を固定することを可能にするGPI脂質アンカーを含む一般的なGPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)融合タンパク質のドメイン構造を示す略図である。残基数は、TGF β に言及する。EGF様ドメインのシステイン残基は、ハイライトされている。図1Eは、免疫化されたマウスからの抗血清の増大した量の存在において試験されるようにEGFRのTGF β によって誘導されたリン酸化を示す。細胞は、24ウェルプレートに播種され、洗浄され、TGF β で免疫化されたマウスからの抗血清の増大した体積(120 μ lの全量に希釈された0.2, 2, 4, 6, 8及び10 μ lの血清; 対照: 未処置の動物からの10 μ lの血清)と共に、及びTGF β (5 ng/ml)あり又はなしでインキュベートされた。抗ホスホチロシンmAbは、リン酸化EGFRを検出するために使用された。

【0043】

【図2A - 2C】図2A - 2Cは、抗TGF β mAbの抗原特異性及び機能試験を示す。図2Aは、抗原特異性を示す。96ウェルプレートは、示されたリガンド(0.1 ng/ml)で被覆され、次に、抗TGF β mAb 551(灰色)と共に、又は生理的食塩水(黒色)と共に2時間インキュベートされた。その後、ウェルは、HRPにコンジュゲート化された抗マウス抗体で1時間インキュベートされ、ATBSで30分間インキュベートされた。シグナルは、ELISAリーダー(420 nmに設定)を使用して決定された。図2Bは、TGF β の市販の調製物との抗TGF β mAbの免疫沈降を示す。抗TGF β mAb 551抗体は、抗マウスFc抗体にコンジュゲート化されたビーズを使用してTGF β (50 ng; Sigma)を免疫沈降させるために使用された。免疫複合体は、mAb 551でプロットされた。分子量マーカー(7キロダルトン)が示されている。図2Cは、TGF β によって誘導されるEGFRのリン酸化を特異的に阻害するmAb 551の能力を示す。細胞は、24ウェルプレートに播種され、10時間インキュベートされた後、洗浄され、示されたリガンド及び抗TGF β mAbの増大する濃度(15, 80, 160 μ g/ml)あり又はなしで10分間インキュベートされた。その後、細胞は、溶解され、清澄化された抽出物は、示されたように抗ホスホチロシンmAb又は抗EGFR mAbで免疫プロット(IB)された。

【0044】

【図3A - 3C】図3A - 3Cは、抗HB-EGF mAbの機能試験を示す。図3Aは

、抗原特異性を示す。96ウェルプレートは、示されたりガンド(0.1ng/ml)で被覆され、次に、抗HB-EGF mAb 898(白色)、抗HB-EGF mAb 878(灰色)、又は抗HB-EGF mAb 384(黒色)と共に2時間インキュベートされた。その後、ウェルは、HRPにコンジュゲート化された抗マウス抗体で1時間インキュベートされ、ATBSで30分間インキュベートされた。シグナルは、ELISAリーダー(420nmに設定)を使用して決定された。図3Bは、異なる抗HB-EGF mAbを使用したHB-EGFの市販の調製物の免疫沈降を示す。示されたHB-EGFに対するmAbは、抗マウスFc抗体にコンジュゲート化されたビーズを使用してHB-EGF(Sigma; St. Louis, MO)を免疫沈降(IP)させるために使用された。免疫複合体は、HB-EGFに対するmAb 327で免疫プロットされた。分子量マーカーが示されている。図3Cは、HB-EGFによって誘導されるEGFRのリン酸化を特異的に阻害するHB-EGF mAbの能力を示す。HeLa又はT47D細胞のまばらな単層は、洗浄され、HB-EGF(3ng/ml)及び異なるHB-EGF mAb(384, 878, 898)で10分間インキュベートされた。その後、細胞は、溶解され、清澄化された抽出物は、抗ホスホチロシンmAb、抗EGFR mAb(HeLa)、又は抗Erbb-3 mAb(T47D)で免疫プロット(IB)された。

【0045】

【図4A-4B】図4A-4Bは、抗TGFと抗HB-EGF mAbの組み合わせによる、ヒト膵臓癌細胞の(生体外及び生体内での)増殖及び腫瘍原性の効果的な阻害を示す。図4Aは、本発明のmAbで処置された膵臓癌細胞の生体外での減少した細胞増殖を示す。BxPC3細胞(2×10^4 個)は、96ウェルプレートに播種され、一晚接着され、抗TGF又は抗HB-EGF mAb(それぞれ30µg/ml)、又は両方のmAbの混合物(それぞれ15µg/ml)を添加された。細胞増殖は、96時間後にMTT法を使用して六連で決定された。平均±SDが示されている。実験は、二回繰り返された。図4Bは、本発明のmAbで処置されたマウスにおける膵臓癌細胞の生体内での減少した細胞増殖を示す。メスのヌードマウス(6週齢)は、 2×10^6 個のBxPC3細胞を皮下接種された。いったん腫瘍が触診できるようになったら(5~7日後)、マウスは無作為に群に分けられ、抗TGF又は抗HB-EGF mAb(それぞれ一注入当たり125µg)、又は両方のmAbの組み合わせ(それぞれ一注入当たり125µg)を腹腔内注入された。マウスは、9, 16, 20, 23, 26, 30, 33, 37, 40及び44日目にmAbで処置された。対照群は、12匹のマウスを含んでおり、各処置群は、8匹のマウスを含んでいた。マウスの体重の間には差は観察されなかった(データは示さず)。

【0046】

【図5A-5B】図5A-5Bは、二つのmAbと化学療法の組み合わせによるヒト膵臓癌細胞の(生体内及び生体外での)増殖の効果的な阻害を示す。図5Aは、化学療法と共に、本発明のmAbで処置された膵臓癌細胞の生体外での減少した細胞増殖を示す。BxPC3細胞(2×10^4 個)は、図4Aで上述したようにして処置された。ただし、ゲンシタピン(50mg/ml)が、単独で又は抗TGF mAbと抗HB-EGF mAb(それぞれ15µg/ml)の混合物との組み合わせで使用された。実験は、二回繰り返された。図5Bは、化学療法と共に、本発明のmAbで処置されたマウスにおける膵臓癌細胞の生体内での減少した細胞増殖を示す。メスのヌードマウス(6週齢)は、 2×10^6 個のBxPC3細胞を皮下接種された。いったん腫瘍が触診できるようになったら(5~7日後)、マウスは無作為に群に分けられた。第一群は、TGF及びHB-EGFに対して特異的なmAb(それぞれ一注入当たり250µg; 白色の矢印で示される)の混合物を腹腔内注入された。第二群(11匹のマウス)は、16日目及び21日目にゲンシタピン(腹腔内注入、体重1kg当たり150mg; 黒色の矢印で示される)で処置された。第三群(6匹のマウス)は、ゲンシタピンとmAbの組み合わせで処置された。対照群(11匹のマウス)は、生理的食塩水で処置された。腫瘍体積の平均±SDが示されている。体重の監視は、体重のゆっくりとした増大を除いては、いかなる一貫した傾向

10

20

30

40

50

及び差を検出しなかった（データは示さず）。

【0047】

【図6A-6D】図6A-6Dは、抗TGF及び抗HB-EGF mAbによる、動物モデル中のヒトの腫瘍細胞の増殖の阻害を示す。MiPaCaヒト膵臓癌細胞（図6A及び6C）、又はヒト肺腫瘍細胞系H1437（図6B及び6D）の触診可能な腫瘍を有するヌードマウスは、1週間に2回、抗TGFと抗HB-EGF mAbの組み合わせ（それぞれ125 μ g）で処置された。MiPaCa異種移植片を有するマウスは、14, 18, 21, 24, 27, 30, 34及び37日目にmAbで処置された。対照群は、8匹のマウスを含んでおり、処置群は、5匹のマウスを含んでいた。H1437異種移植片を有するマウスは、6, 10, 14, 17及び21日目にmAbで処置された。対応する対照群は、15匹のマウスを含んでおり、処理群は、11匹のマウスを含んでいた（図6B）。腫瘍体積（図6A~B）及び体重（図6C~D）が示されている。黒丸は、mAb（抗TGF及び抗HB-EGF）で処置されたマウスを示し、白丸は、対照のマウスを示す。

10

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明は、癌などの過剰増殖性の疾患を治療するための標的を選択する方法、及びかかる疾患を治療するための薬剤の組み合わせに関する。

【0049】

本発明の原理及び操作は、図面及び付随する説明を参照してより良く理解されることができる。

20

【0050】

本発明の少なくとも一つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示される細部、又は、実施例によって例示される細部に限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、あるいは、様々な方法で実施、又は、実行される。また、本明細書中において用いられる表現法及び用語法は説明のためであって、限定として見なされるべきでないことを理解しなければならない。

【0051】

Erbbタンパク質は、乾癬や関節硬化症、及びいくつかの種類ヒトの癌を含むいくつかの疾患に関連していることが知られている。臨床研究は、一つ以上のErbbリガンドの過剰発現は、減少した患者の生存と相関することを示す。

30

【0052】

本発明者は、癌の治療のための療法が、特定の患者に由来する生物学的サンプル中のErbbの発現プロフィールに基づいて、特定の患者の要求に応じて選択されて個別に調節されることができるということを提案する。さらに、本発明者は、Erbbリガンド（例えば、TGFとHB-EGF）であって、両方とも特定の腫瘍において特異的に上方制御されているErbbリガンドを標的とする二つのモノクローナル抗体での組み合わせ処置が、その腫瘍の増殖を有意に減少させ、癌治療において有利であることを示している。

【0053】

具体的には、本発明者は、膵臓腫瘍は、EGFR及びErbbリガンド（つまり、TGF, HB-EGF、及びAR）が関与するいくつかのオートクリンループ（以下の表1参照）を維持することを示している。本発明者は、TGFを標的にする特異的なモノクローナル抗体（mAb551、以下の実施例3）、及びHB-EGFを標的にする特異的なモノクローナル抗体（mAb898, mAb878、及びmAb384、以下の実施例4）を作成し、これらの抗体がそれらの標的リガンドに対して特異的であることを示した（図2A及び3A）。さらに、これらのmAbの単独での又は組み合わせでの使用は、生体外で（図4A）及び生体内で（図4B）、腫瘍の増殖を有意に減少させた。重要なことに、これらのmAbをゲンシタピンのような従来の化学療法剤に添加すると、治療の効率が増大した（図5A~B）。これはたぶん、細胞毒性に対して腫瘍を感作し、化学耐性の発症を遅らせたためである。これらの知見をまとめると、本発明の教示は、Erbbリガ

40

50

ンドを標的とするモノクローナル抗体の治療的な価値を示し、かかる抗体を腫瘍の治療に使用することを示唆する。

【0054】

従って、本発明によれば、過剰増殖性の疾患をその必要性のある対象において治療する方法であって、前記方法は、(a)対象からの生物学的サンプル中の少なくとも一つのEr b Bリガンドの量及び/又は活性を分析することを含み、予め決定されたレベルより上の非過剰増殖性の細胞又は組織と比較して上方制御された量及び/又は活性を示すEr b Bリガンドが、過剰増殖性の疾患を治療するための標的として選択されること、及び(b)前記標的の量及び/又は活性を下方制御する薬剤の治療有効量を前記対象に投与し、それにより前記対象における過剰増殖性の疾患を治療することを含む方法が提供される。

10

【0055】

本明細書で使用される用語「治療する/処置する」は、疾患の発症を防止すること、疾患の症状を緩和すること、弱めること、和らげること、又は除去すること、疾患の進行を遅らせること、逆転させること、又は阻止すること、又は疾患を治癒することを示す。

【0056】

本明細書で使用される場合、句「過剰増殖性の疾患」は、迅速な及び/又は制御されない細胞分裂によって特徴付けられるいかなる疾患であって、発症及び/又は進行についてEr b Bリガンド(活性及び/又は発現)に依存する疾患を示す。かかる疾患は、癌性のものであってもよいし、良性のものであってもよい。

【0057】

過剰増殖性の疾患は、以下のものを含むことができるが、これらに限定されない：癌；乾癬、紫外線角化症、脂漏性角化症、葉状魚鱗癬、中毒性湿疹、アレルギー性湿疹、アトピー性皮膚炎、及びボーエン病などの皮膚疾患；骨髓異形成症候群、子宮頸部上皮内症；ガードナー症候群などの家族性腸ポリープ；口腔白板症；組織球増殖症；ケロイド；血管腫；炎症性関節炎；過角化、及び関節炎を含む落屑丘性皮疹。また、疣贅などのウイルスによって誘導される過剰増殖性の疾患、及びEBVによって誘導される疾患(即ち、感染性単核細胞症)、癒痕形成、再狭窄、動脈硬化、ステント内狭窄、血管移植片再狭窄などの血管増殖性疾患；繊維症疾患；糸球体腎炎；黄斑変性疾患；前立腺肥大及び脂肪腫などの良性増殖疾患；自己免疫疾患；心臓の律動不整；子宮内膜症、子宮筋腫(子宮平滑筋腫)、月経過多、子宮腔部びらん、子宮頸管ポリープ；及び椎間板の欠損又は疾患も含まれる。

20

【0058】

特定の実施形態によれば、過剰増殖性の疾患は、癌である。

【0059】

本明細書で使用される場合、用語「癌」は、発症及び/又は進行についてEr b Bリガンド(活性及び/又は発現)に依存する癌性疾患を示す。癌細胞は、制御されない増殖、特化した機能の損失、不死性、顕著な転移能力、抗アポトーシス活性の顕著な増大、迅速な増殖及び増殖速度、及び特定の特徴的な形態及び細胞マーカーなどの表現型に関連されることができる。ある状況では、癌細胞は、腫瘍の形態であり、かかる細胞は、動物の体内で局所的に存在しうるか、又は白血球のように独立した細胞として血流中を循環することができる。本明細書で使用される用語「癌」は、いかなる段階及びいかなる形態のすべての種類の癌を含むことは理解されるだろう。

30

40

【0060】

本発明の方法を介して治療しやすい腫瘍疾患の種類は、良性腫瘍、疣贅、ポリープ、前癌、及び悪性腫瘍/癌を含む。

【0061】

本発明の方法を使用して治療されることができる腫瘍疾患の具体例は、以下のものを含むが、これらに限定されない：遺伝性副腎皮質腺癌；膀胱癌；乳癌；導管性乳癌；侵襲性導管内乳癌；散発性乳癌；感染性乳癌；4型乳癌；1型乳癌；3型乳癌；乳卵巣癌；パークットのリンパ腫；子宮頸癌；大腸直腸腺腫；大腸直腸癌；遺伝性非ポリープ性1型大腸

50

直腸癌；遺伝性非ポリープ性2型大腸直腸癌；遺伝性非ポリープ性3型大腸直腸癌；遺伝性非ポリープ性6型大腸直腸癌；遺伝性非ポリープ性7型大腸直腸癌；隆起性皮膚線維肉腫；子宮内膜癌；食道癌；線維肉腫性多型膠芽腫胃癌；多発性グロムス腫瘍；肝芽腫；肝細胞癌；急性リンパ芽球性白血病；急性骨髄性白血病；好酸球増加を伴う急性骨髄性白血病；急性非リンパ球白血病；慢性骨髄性白血病；リー・フラウメニ症候群；肺癌性脂肪肉腫；小細胞肺癌；非ホジキンリンパ腫；リンチ癌家族性症候群I I；男性生殖細胞腫瘍；マスト細胞白血病；髄質性甲状腺；髄芽腫；悪性黒色腫；髄膜腫；多発性内分泌腫瘍形成；素因性悪性骨髄；粘液肉腫；神経芽腫；骨肉腫；卵巣癌；漿液性卵巣癌；卵巣癌腫；卵巣性索腫瘍；膵臓癌；膵臓内分泌腫瘍；家族性非クロム親和性パラガングリオーマ；石灰化上皮腫；下垂体腫瘍；侵襲性前立腺腺癌；前立腺癌；乳頭状家族性散発性腎臓癌腫；網膜芽細胞腫；家族性ラブドイド（rhabdoid）素因症候群；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肺の小細胞癌；柔組織肉腫、扁平細胞癌、頭部及び頸部の基底細胞癌；T細胞急性リンパ芽球白血病；膠芽腫を伴うターコット症候群；食道癌を伴う白斑症；子宮頸癌；ウィルムス腫瘍2型；ウィルムス腫瘍1型。

10

【0062】

前癌は、当該技術分野で良く特徴付けられており、知られている（例えば、Bern J J. and Henson DE., 2003. Classifying the precancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3: 8を参照）。本発明の方法を介して治療されることが出来る前癌のクラスは、後天性の小さな又は顕微鏡レベルの前癌、異型核を有する後天性の大きな病変、癌に進行する遺伝性の過剰増殖症候群と共に生じる前駆体病変、及び後天性の拡散過形成及び拡散変質形成を含む。小さな又は顕微鏡レベルの前癌の例は、HGSIL（高度の子宮頸の扁平上皮内病変）、AIN（肛門上皮内腫瘍形成）、声帯の異形成、（大腸の）迷入陰窩、PIN（前立腺上皮内腫瘍形成）を含む。異型核を有する後天性の大きな病変の例は、管状腺腫、AILD（タンパク質障害を伴う血管性免疫芽球性リンパ腺症）、異形髄膜腫、胃ポリープ、大班乾癬、骨髄異形成、乳頭状移行上皮内癌、過剰芽細胞を伴う難治性貧血、及びシュナイダー乳頭を含む。癌に進行する遺伝性の過剰増殖症候群と共に生じる前駆体病変の例は、異形性ほくる症候群、C細胞腺腫、及びMEAを含む。後天性の拡散過形成及び拡散変質形成の例は、AIDS、異形リンパ球過形成、骨のパジエット病、移植後リンパ球増殖疾患、及び潰瘍性大腸炎を含む。

20

30

【0063】

本発明のこの側面の特定の実施形態によれば、癌は、膵臓癌又は肺癌である。

【0064】

本明細書で使用される場合、句「膵臓癌」は、腺腫、扁平腺腫、印環細胞癌、ヘパトイド癌、コロイド腺癌、未分化癌、破骨細胞様巨細胞を伴う未分化癌、及び島細胞癌を含むがこれらに限定されない膵臓の悪性新生物を示す。

【0065】

本明細書で使用される場合、句「肺癌」は、小細胞肺癌、組み合わされた小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肉腫様癌、唾液腺腫瘍、カルチノイド腫瘍、扁平腺腫、及び胸膜肺プラストーマを含むがこれらに限定されない肺組織における未制御の細胞増殖を示す。

40

【0066】

本願明細書で使用される場合、句「その必要性のある対象」は、過剰増殖性の疾患（例えば癌）を有するか、又は過剰増殖性の疾患を有する可能性のある対象を示す。対象は哺乳動物、例えばヒトであることができる。例えば、治療される疾患が膵臓癌の場合、対象は典型的には、転移あり又はなしの、任意の段階の膵臓癌であると診断された対象である。

【0067】

本明細書で使用される場合、用語「Erbbリガンド」は、以下のものを示す：GenBank登録番号NM 001963又はNP 001954に規定される上皮増殖因子（EGF）遺伝子生成物（即ち、タンパク質又はmRNA）；GenBank登録番号N

50

M 003236 又は NP 003227 に規定される 型トランスフォーミング増殖因子 (TGF) 遺伝子生成物; GenBank 登録番号 NM 001945 又は NP 001936 に規定されるヘパリン結合 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) 遺伝子生成物; GenBank 登録番号 NM 001657 又は NP 001648 に規定されるアンピレギュリン (AR) 遺伝子生成物; GenBank 登録番号 NM 001729 又は NP 001720 に規定されるベータセルリン (BTC) 遺伝子生成物; GenBank 登録番号 NM 001432 又は NP 001423 に規定されるエピレギュリン (EP R) 遺伝子生成物; GenBank 登録番号 NM 001013442 又は NP 001013460 に規定されるエピゲン遺伝子生成物; GenBank 登録番号 NM 004495 又は NP 004486 に規定されるニューレギュリン 1 (NRG1)、GenBank 登録番号 NM 013981 又は NP 053584 に規定されるニューレギュリン 2 (NRG2)、GenBank 登録番号 NM 001010848 又は NP 001010848 に規定されるニューレギュリン 3 (NRG3)、及び GenBank 登録番号 NM 138573 又は NP 612640 に規定されるニューレギュリン 4 (NRG4) を含むニューレギュリン遺伝子生成物。

10

【0068】

以下の表 1 に示されるように、及び以下の実施例 1 に記述されるように、本発明者は、癌細胞は、上方制御されたレベルの ErbB リガンドを、それらの別個の組み合わせで分泌することを発見した。

【0069】

20

本明細書で使用される場合、ErbB リガンドの量は、細胞内、細胞膜、細胞表面及び/又は細胞の近位の ErbB リガンド (例えば ErbB リガンドの mRNA、ErbB リガンドのポリペプチド) の量を示す。本明細書で使用される場合、ErbB リガンドの活性は、その適切な ErbB 受容体にそれが結合して (例えば、EGF、TGF、又は HB-EGF の ErbB-1 受容体への結合)、それを活性化させる (例えば、細胞内シグナル伝達経路を活性化させる) ことを示す。

【0070】

過剰増殖性の疾患の治療のための標的を選択するために、生物学的サンプルはまず、対象から得られて、ErbB リガンドの量及び/又は活性について分析される。

【0071】

30

一つの実施形態によれば、サンプルは、血液、血漿、唾液などの体液を含む。

【0072】

サンプルは、以下の細胞を含む細胞を含んでもよいが、それらに限定されない: 血液細胞、骨髄細胞、膵臓細胞、肺細胞、肝細胞、脾臓細胞、腎臓細胞、心臓細胞、卵巣細胞、乳房組織の細胞、皮膚細胞 (例えば、内皮細胞、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞)、リンパ節細胞。特定の実施形態によれば、細胞は、癌細胞を含む。かかる細胞は、以下のものを含む、当該技術分野では公知の方法を使用して得られることができる: 微細針生検、針生検、芯針生検、及び手術生検 (例えば、脳又は肝生検)、頬の内側をこすること、及び洗浄。

【0073】

40

次に、ErbB リガンドの量及び/又は活性は、ErbB リガンドをコードする RNA の発現レベルを検出する (例えば、ノーザンプロット分析、RT-PCR 分析、RNA インサイチュハイブリダイゼーション染色、インサイチュ RT-PCR 染色を使用して) か、又は ErbB リガンドタンパク質それ自体を検出する (例えば、ウェスタンプロット、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、放射線免疫アッセイ (RIA)、蛍光活性化細胞分別 (FACS)、免疫組織化学分析を使用して) ための当該技術分野では公知のいかなる構造的、生物学的、又は生化学的方法も使用してサンプル中で検出されることができる。

【0074】

次に、ErbB リガンドの量又は活性は、対照サンプル中の ErbB リガンドの量又は

50

活性と比較される。もし試験サンプル中の E r b B リガンドの量又は活性が対照サンプルと比較して増大（例えば、少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 5 倍）していたならば、そのリガンドは、治療の標的として選択されることができる。

【 0 0 7 5 】

対象のサンプルと比較される対照サンプルは、典型的には同じ種、年齢及び亜集団（例えば、喫煙者 / 非喫煙者）の健康な個体から得られることができる。代替的に、対照サンプルは、患者自身の非過剰増殖性組織（例えば、非癌性組織）に由来することもできる。代替的に、対照データは、データベース又は文献からとられることもできる。

【 0 0 7 6 】

いったん好適な標的が選択されると、治療は、その量及び / 又は活性を下方制御する任意の薬剤を使用して行われることができる。

10

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される場合、標的の量及び / 又は活性に関して用語「下方制御する」は、E r b B リガンドの量及び / 又は活性を防止すること、低減させること、阻害すること、減少及び / 又は削減することを示す。一つの実施形態によれば、減少させることは、レベルが対照サンプルと比較して実質的に上昇しないように行われる。別の実施形態によれば、レベルは、E r b B リガンドの活性を完全に削減するように最大限に減少される。

【 0 0 7 8 】

過剰増殖性の細胞（例えば、癌細胞）中の E r b B リガンドの量及び / 又は活性を低減 / 下方制御するために、本発明のこの側面に従って多数の薬剤が使用されることができる。

20

【 0 0 7 9 】

従って、例えば、E r b B リガンドの発現レベルを減少させることは、転写及び / 又は翻訳に干渉する様々な分子（例えば、アンチセンス s i R N A、リボザイム、DNA ザイム）を使用してゲノム及び / 又は転写レベルで、又は例えばアンタゴニスト、抗体、ポリペプチドを開裂させるかもしくはペプチドの機能を阻害する酵素を使用してタンパク質レベルで行われることができる。

【 0 0 8 0 】

以下のものは、本発明の E r b B リガンドの量及び / 又は活性を減少させることができる薬剤のリストである。

30

【 0 0 8 1 】

本発明の E r b B リガンドを下方制御（又はその発現レベルを減少）させることができる薬剤の一例は、E r b B リガンドに特異的に結合することができる抗体又は抗体フラグメントである。好ましくは、抗体は、E r b B リガンドの少なくとも一つのエピトープ（例えば E r b B リガンドの E G F 様ドメイン）に特異的に結合する。一つの実施形態によれば、抗体は、任意の他の E r b B リガンドと比較して、特定の E r b B リガンドに対して少なくとも 2 倍高い親和性を有する。一つの実施形態によれば、抗体は、任意の他の E r b B リガンドと比較して、特定の E r b B リガンドに対して少なくとも 5 倍高い親和性を有する。一つの実施形態によれば、抗体は、任意の他の E r b B リガンドと比較して、特定の E r b B リガンドに対して少なくとも 10 倍高い親和性を有する。

40

【 0 0 8 2 】

本発明のこの側面の別の好ましい実施形態によれば、抗体は、少なくとも 1 μ M、200 n M、100 n M、1 n M の最小親和性でそれらの標的 E r b B リガンドに結合する。

【 0 0 8 3 】

本発明のこの側面の抗体は、既存の抗体（例えば、公的に入手可能なハイブリドーマ、又は商業的に入手可能な抗体）、又は当該技術分野では周知で以下にさらに記述される方法に従って生成された、新規作成抗体から選択されることができる。商業的に入手可能な抗体の例は、E G F モノクローナル抗体（例えば、A b a z y m e からの C l o n e S - 2 1）、H B - E G F モノクローナル抗体（例えば、R & D s y s t e m s からの C l o n e 1 2 5 9 2 3 及び C l o n e 4 0 6 3 1 6）、及び T G F モノクローナル

50

抗体（例えば、AbcamからのClone 134A-2B3及びClone 189-2130.1）である。

【0084】

本明細書で使用される場合、用語「エピトープ」は、抗体のパラトープが結合する抗原上の任意の抗原決定基を示す。

【0085】

抗原決定基は通常、アミノ酸や炭水化物側鎖などの分子の化学的に活性な表面グループからなり、特定の三次元構造特徴、及び特定の荷電特徴を有する。

【0086】

本明細書で使用される用語「抗体」は、完全な抗体分子、並びにその機能的なフラグメント、例えば、Fab、F(ab')₂及びFv、又は単一ドメイン分子、例えば抗原のエピトープに対するV_H及びV_Lを含む。これらの機能的な抗体フラグメントは次のように定義される：(1) Fabは、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有するフラグメントであり、完全な抗体を酵素パパイニンで消化して、無傷の軽鎖と、一方の重鎖の一部とを生じさせることによって作製することができる；(2) Fab'は、完全な抗体をペプシンで処理し、その後、還元して、無傷の軽鎖と、重鎖の一部とを生じさせることによって得ることができる抗体分子のフラグメントである；2つのFab'フラグメントが1つの抗体分子あたり得られる；(3) (Fab')₂は、その後の還元を行うことなく、完全な抗体を酵素ペプシンで処理することによって得ることができる抗体のフラグメントである；F(ab')₂は、2つのジスルフィド結合によって一緒にされた2つのFab'フラグメントのダイマーである；(4) Fvは、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；(5) 単鎖抗体（「SCA」）は、遺伝子的に融合された単一鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによって連結されて、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である；そして(6) 単一ドメイン抗体は、抗原に対して十分な親和性を示す単一のV_H又はV_Lドメインからなる。

【0087】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及びそのフラグメントの生成方法は、この技術分野では広く知られている（例えば、Harlow及びLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、New York、1988を参照のこと。これは参照により本明細書に組み込まれる）。

【0088】

本発明による抗体フラグメントは、抗体のタンパク質分解的加水分解によって調製することができる、あるいは、フラグメントをコードするDNAの大腸菌又は哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養又は他のタンパク質発現システム）における発現によって調製することができる。抗体フラグメントは、従来の方法による完全な抗体のペプシン消化又はパパイニン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントを、抗体をペプシンで酵素切断して、F(ab')₂として示される5Sフラグメントを得ることによって製造することができる。このフラグメントは、3.5SのFab'一価フラグメントを製造するために、チオール還元剤、及び場合により、ジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基に対する保護基を使用してさらに切断することができる。あるいは、ペプシンを使用する酵素切断により、2つの一価Fab'フラグメント及びFcフラグメントが直接的に得られる。これらの方法は、例えば、Goldenbergの米国特許第4036945号及び同第4331647号、並びにそれらに含まれる参考文献に記載されている（それらの特許は本明細書によりその全体が参照により組み込まれる）。また、Porter, R. R., Biochem. J., 73: 119~126、1959も参照のこと。抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽鎖-重鎖フラグメントを形成させるための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、又は他の酵素的、化学的もしくは遺伝学的な技術などもまた、フラグメントが、無傷の抗体によって認識される

10

20

30

40

50

抗原に結合する限り、使用することができる。

【0089】

FvフラグメントはV_H鎖及びV_L鎖の会合を含む。この会合は、Inbar他、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、69:2659~62、1972に記載されているように非共有結合性であり得る。あるいは、可変鎖を、分子間ジスルフィド結合によって連結することができ、又は、グルタルアルデヒドなどの化学剤によって架橋することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリinkerによってつながれたV_H鎖及びV_L鎖を含む。これらの単鎖抗原結合タンパク質(sFv)は、オリゴヌクレオチドによりつながれたV_Hドメイン及びV_LドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。この構造遺伝子は発現ベクターに導入され、続いて、発現ベクターは大腸菌などの宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞により、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖が合成される。sFvを製造するための様々な方法が、例えば、Whitlow及びFilpula、Methods、2:97~105、1991; Bird他、Science、242:423~426、1988; Pack他、Bio/Technology、11:1271~77、1993; Ladner他、米国特許第4946778号(これは本明細書によりその全体が参照により組み込まれる)によって記載されている。

10

【0090】

抗体フラグメントの別の形態は、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識ユニット」)は、目的とする抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される。例えば、Larrick及びFry、Methods、2:106~10、1991を参照のこと。

20

【0091】

非ヒト(例えば、ネズミ)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、又は抗体の他の抗原結合性の部分配列など)のキメラ分子である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域(CDR)に由来する残基が、所望する特異性、親和性及び能力を有する、マウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRに由来する残基によって置換されているヒト免疫グロブリンレシピエント抗体が含まれる。場合により、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても、あるいは取り込まれたCDR配列又はフレームワーク配列においても、そのいずれにも見出されない残基を含むことができる。一般に、ヒト化抗体は、実質的にはすべての可変ドメイン又は1つ以上の(典型的には2つ)可変ドメインを含み、この場合、CDR領域のすべて又は実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、FR領域のすべて又は実質的にすべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部を、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の一部を少なくとも含む[Jones他、Nature、321:522~525(1986); Riechmann他、Nature、332:323~329(1988); Presta、Curr. Op. Struct. Biol.、2:593~596(1992)]。

30

40

【0092】

非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法がこの技術においては広く知られている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、輸入残基と呼ばれており、この輸入残基は、典型的には、輸入可変ドメインに由来する。ヒト化は、齧歯類のCDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに使用することによって、Winter及び共同研究者の方法に従って本質的には行うことができる[Jones他、Nature、32

50

1 : 5 2 2 ~ 5 2 5 (1 9 8 6) ; R i e c h m a n n 他、N a t u r e、3 3 2 : 3 2 3 ~ 3 2 7 (1 9 8 8) ; V e r h o e y e n 他、S c i e n c e、2 3 9 : 1 5 3 4 ~ 1 5 3 6 (1 9 8 8)]。従って、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全でないヒト可変ドメインが非ヒト種由来の対応する配列によって置換されているキメラ抗体である（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号）。実際、ヒト化抗体は典型的にはヒト抗体であり、この場合、一部の C D R 残基及びおそらくは一部の F R 残基が、齧歯類抗体における類似部位に由来する残基によって置換される。

【 0 0 9 3 】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー [H o o g e n b o o m 及び W i n t e r、J . M o l . B i o l .、2 2 7 : 3 8 1 (1 9 9 1) ; M a r k s 他、J . M o l . B i o l .、2 2 2 : 5 8 1 (1 9 9 1)] を含む、この分野で知られている様々な技術を使用して製造することができる。C o l e 他及び B o e r n e r 他、の技術もまた、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用することができる [C o l e 他、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y、A l a n R . L i s s、7 7 頁 (1 9 8 5) ; B o e r n e r 他、J . I m m u n o l .、1 4 7 (1) : 8 6 ~ 9 5 (1 9 9 1)]。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化されている遺伝子組換え動物（例えば、マウス）に導入することによって作製することができる。抗原投与したとき、ヒト抗体の産生が認められ、この場合、その産生は、遺伝子再配置、組み立て及び抗体レパートリーを含むすべての点に関してヒトにおいて見られる産生と非常に似ている。この方法は、例えば、米国特許第 5 5 4 5 8 0 7 号、同第 5 5 4 5 8 0 6 号、同第 5 5 6 9 8 2 5 号、同第 5 6 2 5 1 2 6 号、同第 5 6 3 3 4 2 5 号、同第 5 6 6 1 0 1 6 号、及び下記の科学的刊行物：M a r k s 他、B i o / T e c h n o l o g y、1 0、7 7 9 ~ 7 8 3 (1 9 9 2) ; L o n b e r g 他、N a t u r e、3 6 8 : 8 5 6 ~ 8 5 9 (1 9 9 4) ; M o r r i s o n、N a t u r e、3 6 8 : 8 1 2 ~ 1 3 (1 9 9 4) ; F i s h w i l d 他、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y、1 4 : 8 4 5 ~ 5 1 (1 9 9 6) ; N e u b e r g e r、N a t u r e B i o t e c h n o l o g y、1 4 : 8 2 6 (1 9 9 6) ; L o n b e r g 及び H u s z a r、I n t e r n . R e v . I m m u n o l .、1 3 : 6 5 ~ 9 3 (1 9 9 5) に記載されている。

【 0 0 9 4 】

細胞内の特定の区画の標的化が、細胞内抗体（これはまた「細胞内発現抗体細胞内発現抗体」として知られている）を使用して達成され得ることが理解される。細胞内抗体は本質的には、細胞内局在化シグナルが付加されている S C A である（例えば、E R、ミトコンドリア、核、細胞質）。この技術は当該分野では問題なく適用されている（総説については、R i c h a r d s o n 及び M a r a s c o (1 9 9 5、T I B T E C H、第 1 3 巻) を参照のこと）。細胞内発現抗体は、そうでない場合には多量に存在する細胞表面受容体の発現を事実上なくすこと、及び、タンパク質機能を細胞内で阻害することが示されている（例えば、R i c h a r d s o n 他、1 9 9 5、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 2 : 3 1 3 7 ~ 3 1 4 1 ; D e s h a n e 他、1 9 9 4、G e n e T h e r .、1 : 3 3 2 ~ 3 3 7 ; M a r a s c o 他、1 9 9 8、H u m a n G e n e T h e r .、9 : 1 6 2 7 ~ 4 2 ; S h a h e e n 他、1 9 9 6、J . V i r o l .、7 0 : 3 3 9 2 ~ 4 0 0 ; W e r g e、T . M . 他、1 9 9 0、F E B S L e t t e r s、2 7 4 : 1 9 3 ~ 1 9 8 ; C a r l s o n、J . R .、1 9 9 3、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 0 : 7 4 2 7 ~ 7 4 2 8 ; B i o c c a、S . 他、1 9 9 4、B i o / T e c h n o l o g y、1 2 : 3 9 6 ~ 3 9 9 ; C h e n、S - Y . 他、1 9 9 4、H u m a n G e n e T h e r a p y、5 : 5 9 5 ~ 6 0 1 ; D u a n、L 他、1 9 9 4、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 1 : 5 0 7 5 ~ 5 0 7 9 ; C h e n、S - Y . 他、1 9 9 4、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、9 1 : 5 9 3 2 ~ 5 9 3 6 ; B e e r l i、R . R . 他、1 9 9 4、J . B i o l . C h e m .、2 6 9 : 2 3 9 3 1 ~ 2 3 9 3 6 ; M h a s h i l k a r、A . M . 他、1 9

10

20

30

40

50

95、EMBO J.、14:1542~1551; PCT公開番号WO94/02610 (Marasco他); PCT公開番号WO95/03832 (Duan他)を参照のこと)。

【0095】

細胞内抗体発現ベクターを調製するために、目的とする標的タンパク質について特異的な抗体軽鎖及び抗体重鎖をコードするcDNAが、典型的には、マーカーについて特異的なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマから単離される。抗マーカーモノクローナル抗体又は組換えモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを、当該技術分野で既知の方法を使用して調製することができる。マーカータンパク質について特異的なモノクローナル抗体(例えば、ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体又はコンビナトリアルライブラリー由来の組換え抗体のどちらでもあっても)が特定されると、モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖をコードするDNAが標準的な分子生物学的技術によって単離される。ハイブリドーマ由来の抗体については、軽鎖及び重鎖のcDNAを、例えば、PCR増幅又はcDNAライブラリースクリーニングによって得ることができる。組換え抗体(例えば、ファージ呈示ライブラリーなど)については、軽鎖及び重鎖をコードするcDNAを、ライブラリースクリーニングプロセス時に単離された呈示パッケージ(例えば、ファージ)から回収することができ、抗体の軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子のヌクレオチド配列が決定される。例えば、多くのそのような配列が、Kabata, E. A. 他(1991)、Sequences of Proteins of Immunological Interest(第5版、米国厚生省、NIH刊行物番号91-3242)において、また、「Vbase」ヒト生殖細胞系配列データベースにおいて開示される。抗体の軽鎖配列及び重鎖配列が得られると、抗体の軽鎖配列及び重鎖配列は、標準的な方法を使用して組換え発現ベクターにクローン化される。

【0096】

軽鎖及び重鎖のミトコンドリア発現のために、ミトコンドリアの標的配列をコードするヌクレオチド配列が追加される[例えば、Bcl-2のCOOH末端シグナルアンカー(Nguyen, M.ら., 1993. J. Biol. Chem. 268:25265-25268)]。細胞内抗体発現ベクターは、細胞内抗体をいくつかの異なる形態のうちの一つでコードすることができる。例えば、一つの実施形態では、ベクターは、抗体の全長が細胞内で発現されるように抗体軽鎖及び重鎖の全長をコードする。別の実施形態では、ベクターは、Fabフラグメントが細胞内で発現されるように軽鎖の全長及び重鎖のVH/CH1領域のみをコードする。別の実施形態では、ベクターは、一本鎖抗体(scFv)をコードし、そこでは、軽鎖及び重鎖の可変領域がフレキシブルペプチドリンカーによって結合されて一本鎖分子として発現される。細胞内のマーカー活性を阻害するため、細胞内抗体をコードする発現ベクターは、上述のような標準的なトランスフェクション方法によって細胞中に導入される。

【0097】

いったん抗体のCDRが従来の遺伝子工学技術を使用して同定されたなら、それは、本明細書で記述する抗体の任意の形態又はそのフラグメントをコードする発現可能なポリヌクレオチドを作成するために使用されることができる。

【0098】

単一の抗体が二つのErbBリガンドを認識することができるパイエピトープ性抗体も想定されている。かかる抗体を作成する方法は、米国特許出願公開第2007178102号に開示されている。その内容は、参考によって本明細書に組み入れられる。

【0099】

以下の実施例(例えば実施例3,4)に詳述されるように、本発明者は、TGFを特異的に標的にする抗体(mAb-551と称する)、及びHB-EGFを特異的に標的にする抗体(mAb-898、mAb878及びmAb-384と称する)を作成した。さらに、本発明者は、これらの抗体でのマウスの生体内処置が腫瘍体積を減少させることを示した。

10

20

30

40

50

【0100】

従って、本発明のある実施形態によれば、TGFのEGF様ドメインの少なくとも一つのエピトープに特異的に結合することができるモノクローナル抗体又はそのフラグメントであって、Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM) に寄託された受託番号CNCM I - 4292 (クローン番号551.6.103) によって記載されるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが提供される。

【0101】

従って、本発明の別の実施形態によれば、HB-EGFのEGF様ドメインの少なくとも一つのエピトープに特異的に結合することができるモノクローナル抗体又はそのフラグメントであって、Collection Nationale De Cultures De Microorganismes (CNCM) に寄託された受託番号CNCM I - 4291 (クローン番号898.47) によって記載されるモノクローナル抗体又はそのフラグメントが提供される。

【0102】

本発明のErbBリガンドを下方制御することができる別の薬剤は、小さい干渉性RNA (siRNA) 分子である。RNA干渉は2つの工程プロセスである。開始工程と称される第一工程では、加えられたdsRNAがたぶんダイサー (dsRNA特異的リボヌクレアーゼのRNAase IIIファミリーの一員であり、dsRNA (直接導入されたか、又は発現ベクター、カセット又はウイルスを介して導入される) をATP依存性の様式で加工 (開裂) する) の作用によって21~23個のヌクレオチド (nt) の小さい干渉性RNA (siRNA) 分子へと消化される。連続する開裂事象はRNAを19~21bpの二本鎖 (siRNA) に分解し、それぞれの鎖は2-ヌクレオチド3'オーバーハングを有する (Hutvagner及びZamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002); 及びBernstein Nature 409:363-366 (2001))。

【0103】

エフェクター工程では、siRNA二本鎖はヌクレアーゼ複合体に結合してRNAによって誘導されるサイレンシング複合体 (RISC) を形成する。siRNA二本鎖のATP依存性巻き戻しがRISCの活性化のために要求される。次に、活性なRISCは、塩基対合相互作用によって相同な転写物を標的とし、mRNAをsiRNAの3'末端から12ヌクレオチドの断片へと開裂する (Hutvagner及びZamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002); Hammond他 (2001) Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001); 及びSharp Genes. Dev. 15:485-90 (2001))。開裂のメカニズムは未だ解明されようとしているが、研究は各RISCが単一のsiRNA及びRNaseを含むことを示している (Hutvagner及びZamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002))。

【0104】

RNAiの顕著な有効性のため、RNAi経路内の増幅工程が示唆されている。増幅は、加えられたdsRNAを複写すること (これはより多くのsiRNAを生み出す) によって、又は形成されたsiRNAを複製することによって生じることがありうる。代わりに又は追加的に、増幅はRISCの多数の代謝事象によって行われることがありうる (Hammond他 Nat. Rev. Gen. 2:110-119 (2001), Sharp Genes. Dev. 15:485-90 (2001), Hutvagner及びZamore Curr. Opin. Genetics and Development 12:225-232 (2002))。RNAiについてのさらなる情報については、Tuschl ChemBiochem. 2:239-245 (2001); Cullen Nat. Immunol. 3:597-599 (2002); 及びBrantl B

10

20

30

40

50

i o c h e m . B i o p h y s . A c t . 1 5 7 5 : 1 5 - 2 5 (2 0 0 2) の解説を参照されたい。

【0105】

本発明で用いるのに好適なRNAi分子の合成は以下のようにして行われることができる。まず、ErbBリガンド(例えば、上皮増殖因子(EGF)、GenBank登録番号NM 001963)をコードするmRNA配列標的はAAジヌクレオチド配列についてAUG開始コドンの下流に走査される。各AA及び3'隣接19ヌクレオチドの存在は潜在的なsiRNA標的部として記録される。好ましくはsiRNA標的部はオープンリーディングフレームから選択される。なぜなら、非翻訳領域(UTR)は制御タンパク質結合部に富んでいるからである。UTR結合タンパク質及び/又は翻訳開始複合体はsiRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合に干渉するかもしれない(Tuschl(2001) *ChemBiochem*. 2: 239-245)。しかし、非翻訳領域に指向されたsiRNAもGAPDHについて示されているように効果的であることは理解されるであろう。GAPDHについては、5'UTRに指向されたsiRNAは細胞内GAPDH mRNAの約90%の減少を媒介し、タンパク質レベルを有意に減少させた(www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)。

10

【0106】

次に、可能性のある標的部は、NCBIサーバ(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)から入手可能なBLASTソフトウェアなどのいかなる配列アラインメントソフトウェアを用いて適切なゲノムデータベース(例えばヒト、マウス、ラットなど)と比較される。他のコード配列に対して顕著な相同性を示す仮想的な標的部は取り除かれる。

20

【0107】

定性化する標的配列はsiRNA合成のための鋳型として選択される。好ましい配列は低いG/C含有量を含む配列である。なぜなら、かかる配列は、55%より高いG/C含有量を有する配列と比較してより効果的に遺伝子サイレンシングを媒介することが証明されているからである。いくつかの標的部は評価のために標的遺伝子の長さに沿って選択されることが好ましい。選択されたsiRNAのより良好な評価のためには、陰性コントロールを併用することが好ましい。陰性コントロールsiRNAは、siRNAと同じヌクレオチド組成を含むがゲノムに対する顕著な相同性を欠くことが好ましい。従って、いかなる他の遺伝子に対しても顕著な相同性を示さないという条件の下で、siRNAの混合されたヌクレオチド配列は用いられることが好ましい。

30

【0108】

選択されたsiRNAは、(例えば、固相合成を使用して)化学的に合成されたオリゴヌクレオチドであるか、又は(例えば、pRETRO-SUPERベクターを使用して)トランスフェクション後に細胞中にRNAiを誘導するためにプラスミドからコードされることができる。最近、レトロウイルス又はレンチウイルス由来のRNAiが開発され、生体内で長期間の遺伝子サイレンシングにおいて効果的であることが見出されている[Hao DL., et al., 2005, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 37(11): 779-83]。

40

【0109】

例えば、好適なErbBリガンドsiRNAは、EGF siRNA(例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc.のsc-39416)、又はTGF siRNA(例えばSanta Cruz Biotechnology, Inc.のsc-39423)、又はHB-EGF siRNA(例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc.のsc-39420)であることができる。

【0110】

本発明のErbBリガンドを下方制御することができる別のオリゴヌクレオチド薬剤が、ErbBリガンドのmRNA転写物又はDNA配列を特異的に切断することができるD

50

NAザイム分子である。DNAザイムは、一本鎖及び二本鎖の両方の標的配列を切断することができる一本鎖ポリヌクレオチドである (Breaker, R. R. 及び Joyce, G. G., *Chemistry and Biology*, 1995, 2: 655; Santoro, S. W. & Joyce, G. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 4262)。DNAザイムについての一般的なモデル (「10-23」モデル) が提案されている。「10-23」DNAザイムは、それぞれが7個~9個のデオキシリボヌクレオチドからなる2つの基質認識ドメインが隣接する、15個のデオキシリボヌクレオチドからなる触媒作用ドメインを有する。このタイプのDNAザイムはその基質RNAをプリン:ピリミジン接合部において効率的に切断することができる (Santoro, S. W. & Joyce, G. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; DNAザイムの総説については、Khachigian, L. M. [*Curr Opin Mol Ther*, 4: 119~21 (2002)] を参照のこと)。

10

【0111】

一本鎖及び二本鎖の標的の切断部位を認識する合成及び操作されたDNAザイムの構築及び増幅の様々な例が米国特許第6326174号 (Joyce他) に開示されている。ヒトウロキナーゼ受容体に対して向けられた類似する設計のDNAザイムが最近、ウロキナーゼ受容体の発現を阻害し、また、結腸ガン細胞の転移をインビボで首尾よく阻害することが認められた (Itoh他, 2002, アブストラクト409, *Ann Meeting Am Soc Gen Ther*, www.asgt.org)。別の適用では、

20

【0112】

本発明のErbBリガンドを下方制御はまた、ErbBリガンド (例えば、上皮増殖因子) をコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイゼーションすることができるアンチセンスポリヌクレオチドを使用することによって行うことができる。

【0113】

ErbBリガンドを下方制御するために使用されることができるアンチセンス分子の設計は、アンチセンスアプローチに対する2つの重要な側面を考慮に入れて行われなければならない。第一の側面は適切な細胞の細胞質中へのオリゴヌクレオチドの送達であり、第二の側面は細胞内の指定されたmRNAの翻訳を阻害するような態様で細胞内の指定されたmRNAに特異的に結合するオリゴヌクレオチドの設計である。

30

【0114】

従来技術は、幅広い種類の細胞中にオリゴヌクレオチドを効果的に送達するために用いられることができる多数の送達戦略を教示する (例えばLuft *J Mol Med* 76: 75-6 (1998); Kronenwett他, *Blood* 91: 852-62 (1998); Rajur他, *Bioconj Chem* 8: 935-40 (1997); Lavigne他, *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71 (1997) 及びAoki他 *Biochem Biophys Res Commun* 231: 540-5 (1997) を参照)。

40

【0115】

加えて、標的mRNA及びオリゴヌクレオチドの両方における構造的変化のエネルギーを計算に入れる熱力学サイクルに基づく標的mRNAに対する最高の予想された結合親和性を有する配列を同定するためのアルゴリズムも利用可能である (例えばWalton他, *Biotechnol Bioeng* 65: 1-9 (1999) 参照)。

【0116】

かかるアルゴリズムは、細胞におけるアンチセンスアプローチを実行するために成功して用いられている。例えば、Walton他によって開発されたアルゴリズムを用いて科学者はウサギのベータグロブリン (RBG) 及びマウスの腫瘍壊死因子アルファ (TNF

50

アルファ) 転写物に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計するのに成功している。同じ研究グループは、動的PCR技術によって評価されるように細胞培養物中で3つのモデル標的mRNA(ヒトの乳酸デヒドロゲナーゼA及びB及びラットのgp130)に対する合理的に選択されたオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性がホスホジエステル及びホスホオチオエートオリゴヌクレオチド化学を用いた2つの細胞型における3つの異なる標的に対する試験を含むほぼ全ての場合において有効であることを証明したことを最近報告している。

【0117】

加えて、インビトロシステムを用いて特定のオリゴヌクレオチドを設計してその有効性を予測するためのいくつかのアプローチも発表されている(Matveeva他, Nature Biotechnology 16, 1374-1375(1998))。

10

【0118】

いくつかの臨床試験はアンチセンスオリゴヌクレオチドの安全性、実行可能性及び活性を証明している。例えば癌の治療のために好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは成功して用いられており(Holmund他, Curr Opin Mol Ther 1: 372-85(1999))、一方、アンチセンスオリゴヌクレオチド標的化c-myc遺伝子、p53及びBcl-2を介した血液の悪性腫瘍の治療は、臨床試験の段階に入っており、患者によって耐えられることが示されている(Gerwitz Curr Opin Mol Ther 1: 293-306(1999))。

【0119】

最近、ヒトのヘパラーゼ遺伝子発現のアンチセンス媒介された抑制は、マウスモデル中のヒト癌細胞の胸膜転移を阻害することが報告されている(Uno他, Cancer Res 61: 7855-60(2001))。

20

【0120】

従って、現在のコンセンサスは、上記で記載されたように、非常に正確なアンチセンス設計アルゴリズム及び広範囲の様々なオリゴヌクレオチド送達システムをもたらしているアンチセンス技術の分野における最近の開発により、当業者は、過度な試行錯誤実験に頼ることを必要とすることなく、既知配列の発現を下方制御するために好適なアンチセンス法を設計し、実行することができるということである。

【0121】

ErbBリガンドの発現を下方制御することができる別の薬剤が、ErbBリガンド(例えば、EGF, TGF)をコードするmRNA転写物を特異的に切断することができるリボザイム分子である。リボザイムは、目的とするタンパク質をコードするmRNAの切断による遺伝子発現の配列特異的な阻害のためにますます使用されている[Welch他, Curr Opin Biotechnol, 9: 486~96(1998)]。任意の特定の標的RNAを切断するためにリボザイムを設計することができることにより、リボザイムは基礎研究及び治療的適用の両方において貴重なツールになっている。治療の領域では、リボザイムは、感染性疾患におけるウイルスRNA、ガンにおける優勢なガン遺伝子、及び、遺伝病における特定の体細胞変異を標的化するために利用されている[Welch他, Clin Diagn Virol, 10: 163~71(1998)]。最も注目すべきことは、HIV患者のためのいくつかのリボザイム遺伝子治療プロトコルが既に第1相試験中である。より近年には、様々なリボザイムが、トランスジェニック動物研究、遺伝子標的妥当性確認及び経路解明のために使用されている。いくつかのリボザイムが臨床試験の様々な段階にある。ANGIOZYMEは、ヒト臨床研究で研究されるための最初の化学合成されたリボザイムであった。ANGIOZYMEは、血管形成経路における重要な成分であるVEGF-r(血管内皮増殖因子受容体)の形成を特異的に阻害する。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.、並びに、他の企業が、抗血管形成治療剤の重要性を動物モデルで明らかにしている。HEPTAZYME、すなわち、C型肝炎ウイルス(HCV)RNAを選択的に破壊するために設計されたリボザイムは、C型肝炎ウイルスのRNAを細胞培養アッセイで低下させることにおい

30

40

50

て効果的であることが見出された (Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - WEBのホームページ)。

【0122】

細胞中での本発明のErbBリガンドの発現レベルを下方制御するために使用できる別の薬剤は、三重鎖形成オリゴヌクレオチド(TFO)である。最近の研究により、二本鎖のらせんDNAにおけるポリプリン/ポリピリミジン領域を配列特異的な様式で認識し、かつ、これに結合することができるTFOを設計できることが示されている。これらの認識規則がMaher III, L. J. 他、Science (1989)、245:725~730; Moser, H. E. 他、Science (1987)、238:645~630; Beal, P. A. 他、Science (1992)、251:1360~1363; Cooney, M. 他、Science (1988)、241:456~459; 及びHogan, M. E. 他、欧州特許公開375408号によって概略される。オリゴヌクレオチドの改変(例えば、インターカレーター及び骨格置換の導入など)、及び、結合条件(pH及びカチオン濃度)の最適化は、TFO活性に対する本来的な疾患(例えば、電荷反発及び不安定性など)を克服することを助けており、また、最近では、合成オリゴヌクレオチドが特定の配列に標的化され得ることが示された(最近の総説については、Seidman及びGlazer (2003)、J Clin Invest、112:487~94を参照のこと)。

10

【0123】

一般に、三重鎖形成オリゴヌクレオチドは下記の配列対応を有する：

20

オリゴ	3' - A G G T
二重鎖	5' - A G C T
二重鎖	3' - T C G A

【0124】

しかしながら、A - AT及びG - GCの三重鎖は、最大の三重らせん安定性を有することが示されている(Reither及びJeltsch, BMC Biochem, 2002、3:27)。同じ著者らは、A - AT及びG - GCの規則に従って設計されたTFOが非特異的な三重鎖を形成しないことを明らかにしている。このことは、三重鎖形成が実際に、配列特異的であることを示している。

30

【0125】

従って、ErbBリガンドの調節領域における任意の所与の配列について、三重鎖形成配列を考案することができる。三重鎖形成オリゴヌクレオチドは好ましくは、長さが少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは25ヌクレオチド、さらにより好ましくは30ヌクレオチド又はそれ以上から、50bp又は100bpまでである。

【0126】

TFOによる細胞のトランスフェクション(例えば、カチオン性リポソームによるトランスフェクション)、及び、標的DNAとの三重鎖らせん構造の形成は、立体的及び機能的な変化を誘導し、これにより、転写の開始及び伸長を妨げ、内因性DNAにおける所望される配列変化の誘導を可能にし、また、遺伝子発現の特異的な下方制御をもたらす。TFOにより治療された細胞における遺伝子発現のそのような抑制の例には、哺乳動物細胞におけるエピソームsupFG1遺伝子及び内因性HPRT遺伝子のノックアウト(Vasquez他、Nucl Acids Res. (1999)、27:1176~81; Puri他、J Biol Chem (2001)、276:28991~98)、並びに、Ets2転写因子(これは前立腺ガンの病因において重要である)の発現の配列特異的及び標的的特異的な下方制御(Carbone他、Nucl Acids Res. (2003)、31:833~43)、並びに、前炎症性ICAM-1遺伝子の配列特異的及び標的的特異的な下方制御(Besch他、J Biol Chem (2002)、277:32473~79)が含まれる。加えて、Vuyisich及びBealは近年、配列特異的なTFOがdsRNAに結合し、これにより、dsRNA依存性酵素(例えば、RNA依存性キナーゼなど)の活性を阻害することができることを示している(Vuyis

40

50

ich及びBeal、Nuc. Acids Res (2000)、28:2369~74)。

【0127】

加えて、上記の原理に従って設計されたTFOは、DNA修復を行うことができる誘導された変異誘発を誘導することができ、従って、内因性遺伝子の発現の下方制御及び上方制御の両方をもたらすことができる[Seidman及びGlazer、J Clin Invest (2003)、112:487~94]。効果的なTFOの設計、合成及び投与の詳細な記載を、米国特許出願公開第2003017068号及び同第20030096980(Froehler他)、同第20020128218号及び同第20020123476号(Emanuelle他)、並びに、米国特許第5721138号(Lawn)に見出すことができる。

10

【0128】

本発明の教示によれば、及び以下の実施例5及び6に詳述されるように、それぞれが異なるErbbリガンド(例えば、第一のErbbリガンド及び第二のErbbリガンド)を標的にする二つの薬剤(例えば、抗体)の対象への共投与は、腫瘍細胞の増殖を効果的に皆無にする。

【0129】

従って、本発明の別の側面によれば、過剰増殖性の疾患は、二つの薬剤、例えば、それぞれが同一でないErbbリガンドを標的にする二つの抗体又は二つのsiRNA分子の投与を介して治療されることができ、二つの薬剤の投与は、同時に行われてもよいし、一方が他方の後に行われてもよい。

20

【0130】

本発明は、Erbbリガンドを下方制御するために二つ以上の薬剤の使用を構想する。標的の数(及びその同一性)は典型的に、手順の分析段階で決定される。

【0131】

加えて、本発明は、阻害抗体、小さなキナーゼ阻害剤、及び可溶性リガンド受容体トラップ/デコイ[参考として本明細書中に組み込まれるCardo-Vilã.(2010)PNAS 107(11)5118-5123に詳述される]などのErbb受容体を下方制御する薬剤と共に使用されることもできる。

【0132】

本発明の薬剤(例えば、抗体、siRNA、又はそれをコードする発現ベクター)は、それ自体で、又はそれが好適な担体又は賦型剤と混合された医薬組成物として対象に投与されることができるとは理解されるだろう。

30

【0133】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の1つ又は複数と、他の化学的成分(例えば、生理学的に好適な担体及び賦形剤など)との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

【0134】

本明細書中において、用語「有効成分」は、生物学的効果を説明することができる薬剤(例えば、抗体、siRNA)を示す。

40

【0135】

本明細書中以降、表現「生理学的に許容可能な担体」及び表現「医薬的に許容可能な担体」は、交換可能に使用され得るが、生物に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性及び性質を妨げない担体又は希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現に包含される。

【0136】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖及びデンプン、セルロース誘導體、ゼラチン、植物油及びポリエチレングリコールが挙げられる。

50

【0137】

薬物の配合及び投与のための技術が「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co., Easton, PA、最新版)に見出されることができ、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

【0138】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達、又は非経口送達(これには、筋肉内注射、皮下注射及び髄内注射、並びに、クモ膜下注射、直接的な脳室内注射(例えば、右又は左脳室内注射)、心臓内注射(例えば、冠動脈内注射)、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射又は眼内注射が含まれる)が含まれることができる。

10

【0139】

あるいは、例えば、患者の身体の組織領域に直接的に調製物の注射をすることによって、全身的な方法よりも局所的に調製物を投与することができる。

【0140】

用語「組織」は、類似の構造及び/又は共通の機能を有する細胞の集合からなる生物の一部を示す。組織の例は、次のものを含むが、これらに限定されない：脳組織、網膜、皮膚組織、肝臓組織、膵臓組織、骨、軟骨、結合組織、血液組織、筋肉組織、心臓組織、血管組織、腎臓組織、肺組織、生殖腺組織、造血組織。

20

【0141】

本発明の医薬組成物は、この分野で十分に知られているプロセスによって、例えば、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化又は凍結乾燥のプロセスによって製造されることができ。

【0142】

本発明に従って使用される医薬組成物は、医薬品として使用されることができ調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤及び補助剤を含む1つ又は複数の生理学的に許容され得る担体を使用して従来の様式で配合されることができる。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

【0143】

注射の場合、本発明の医薬組成物の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合しうる緩衝液(例えば、ハンクス溶液、リンゲル溶液、又は生理学的な食塩緩衝液など)において配合されることができ。経粘膜投与の場合、浸透されるバリエーに対して適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

30

【0144】

経口投与の場合、化合物は、活性化合物をこの分野でよく知られている医薬的に許容され得る担体と組み合わせることによって容易に配合されることができ。そのような担体は、本発明の化合物が、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤及び懸濁物などとして配合されることを可能にする。経口使用される薬理的調製物は、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、錠剤又は糖衣錠コアを得るために、望ましい好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製されることができ。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；及び/又はポリビニルピロリドン(PVP)などの生理学的に許容され得るポリマーである。もし望むなら、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、又はアルギン酸もしくはその塩(例えば、アルギン酸ナトリウムなど)などの崩壊剤が加えられることができる。

40

【0145】

50

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、及び好適な有機溶媒又は溶媒混合物を含有しうる。色素又は顔料は、活性化化合物の量を明らかにするために、又は活性化化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤又は糖衣錠コーティングに加えられることができる。

【0146】

経口使用されうる医薬組成物としては、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、並びに、ゼラチン及び可塑剤（例えば、グリセロール又はソルビトールなど）から作製された軟いシールされたカプセルが挙げられる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（例えば、ラクトースなど）、結合剤（例えば、デンプンなど）、滑剤（例えば、タルク又はステアリン酸マグネシウムなど）、及び場合により安定化剤との混合で有効成分を含有することができる。軟カプセルでは、有効成分は、好適な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィン又は液状のポリエチレングリコールなど）に溶解又は懸濁されることができる。さらに、安定化剤が加えられることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路について好適な投薬形態でなければならない。

10

【0147】

口内投与の場合、組成物は、従来の方法で配合された錠剤又はトローチの形態を取ることができる。

【0148】

鼻吸入による投与の場合、本発明による使用のための有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン又は二酸化炭素）の使用により加圧パック又はネプライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投与量は、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって決定されることができる。ディスペンサーにおいて使用される、例えば、ゼラチン製のカプセル及びカートリッジは、化合物及び好適な粉末基剤（例えば、ラクトース又はデンプンなど）の粉末混合物を含有して配合されることができる。

20

【0149】

本明細書中に記載される調製物は、例えば、ボラス注射又は連続注入による非経口投与のために配合されることができる。注射用配合物は、場合により保存剤が添加された、例えば、アンプル又は多回用量容器における単位投薬形態で提供されることができる。組成物は、油性ビヒクル又は水性ビヒクルにおける懸濁物又は溶液剤又はエマルジョンにすることができる。懸濁化剤、安定化剤及び/又は分散化剤などの配合剤を含有することができる。

30

【0150】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態の活性調製物の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁物は、適切な油性又は水性の注射用懸濁物として調製されることができる。好適な親油性の溶媒又はビヒクルとしては、脂肪油（例えば、ゴマ油など）、又は合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）、トリグリセリド又はリポソームが挙げられる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール又はデキストランなどを含有することができる。場合により、懸濁物はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために、有効成分の溶解性を増大させる好適な安定化剤又は薬剤を含有することができる。

40

【0151】

あるいは、有効成分は、好適なビヒクル（例えば、無菌の、パイロジェン不含水溶液）を使用前に用いて構成される粉末形態であることができる。

【0152】

本発明の調製物はまた、例えば、カカオ脂又は他のグリセリドなどの従来座薬基剤を使用して、座薬又は停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合されることができる。

50

【0153】

本発明に関連した使用のために好適な医薬組成物として、有効成分が、その意図された目的を達成するために有効な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、「治療有効量」は、処置されている対象の疾患（例えば、癌）の症状を予防、緩和あるいは改善するために効果的であるか、又は、処置されている対象の生存を延ばすために効果的である、有効成分（即ち、抗体やs i R N Aなどの薬剤）の量を意味する。

【0154】

治療有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内であり、特に本明細書に与えられる詳細な開示に鑑みればそうである。

【0155】

本発明の方法において使用されるいかなる調製物についても、投与量又は治療有効量は、生体外アッセイから最初に推定されることができる。例えば、投与量は、動物モデルにおいて決定されることができ、そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用されることができる。

【0156】

本明細書中に記載される有効成分の毒性及び治療効力は、生体外、細胞培養物、又は実験動物における標準的な薬学的手法によって決定されることができる。これらの生体外、細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量範囲を定めるために使用されることができる。投与量は、用いられる投薬形態及び利用される投与経路に依存して変化する。正確な配合、投与経路及び投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択されることができる（例えば、Fingler、(1975)「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p. 1を参照のこと）。

【0157】

投薬量及び投薬間隔は、生物学的効果を誘導又は抑制するために十分な、有効成分の血漿又は組織のレベル（これは最小有効濃度（MEC）と呼ばれる）をもたらすために個々に調節することができる。MECは、それぞれの調製物について変化するが、場合により、生体外データから推定することができる。MECを達成するために必要な投薬量は、個人の特性及び投与経路に依存する。血漿中濃度を求めるために検出アッセイが使用されることができる。

【0158】

処置される状態の重篤度及び応答性に依存して、投薬は、単回又は複数回投与で行われることができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、又は治療が達成されるまで、又は疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

【0159】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている対象、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存するだろう。投薬量及び投薬タイミングは、個別の変化する状況の注意深く連続的な監視に反応するだろう。

【0160】

癌のためのモデルは、M i a P a C aヒト膵臓癌細胞を接種されたN C r -ヌードマウス（即ち、膵臓癌動物モデル）、又はヒト肺腫瘍細胞系H 1 4 3 7を接種されたN C r -ヌードマウス（即ち、肺癌動物モデル）を含む齧歯類の動物モデルを含むが、これに限定されない。

【0161】

上記のこととは無関係に、本発明の薬剤は、望ましくない副作用（例えば、上方制御された免疫応答）を回避するように選択された量で投与される。

【0162】

本発明の組成物は、所望されるならば、有効成分を含有する1つ又は複数の単位投薬形態物を含むパック又はディスペンサーデバイス（例えば、F D A（米国食品医薬品局）承認キットなど）で提供され得る。パックは、例えば、金属ホイル又はブリスターパ

10

20

30

40

50

ックなどのプラスチックホイルを含むことができる。パック又はディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が付随し得る。パック又はディスペンサーデバイスはまた、医薬品の製造、使用又は販売を規制する政府当局によって定められた形式で、容器に関連した通知によって適応させることがあり、この場合、そのような通知は、組成物の形態、あるいはヒト又は動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物について米国食品医薬品局によって承認されたラベル書きであり得るか、又は、承認された製品添付文書であり得る。適合し得る医薬用担体に配合された本発明の化合物を含む組成物もまた、上で詳述されたように、示された症状を処置するために調製され、適切な容器に入れられ、かつ標識され得る。

【0163】

本発明のEr b Bリガンドを下方制御する薬剤は、医薬組成物として好適に処方されることができ、その医薬組成物は、製造物品として包装されることができる。かかる製造物品は、過剰増殖性の疾患の治療において使用するためのラベル、及び医薬的に有効な量の薬剤（即ち、第一のEr b Bリガンドを下方制御する第一の薬剤と、第二のEr b Bリガンドを下方制御する第二の薬剤）を包装する包装材料を含む。本発明の薬剤は、別個の医薬組成物中に処方されてもよく、又は、単一の医薬組成物中に処方されてもよいことは理解されるだろう。

【0164】

過剰増殖性の疾患の治療効果を増大させるため、本発明は、放射線療法又は化学療法のような追加の療法を対象に投与することをさらに構想する。鎮痛剤及び他の治療療法も想定される。化学療法剤の例は、以下のものを含むが、これらに限定されない：アナストロゾール、三酸化砒素、アスパラギナーゼ、アザシチジン、ベバクジマブ、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、プスルファン、カルステロン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、セレコキシブ、セツキシマブ、シスプラチン、クラドリピン、クロファラビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、アクチノマイシンD、ダルベポエチン、ダウノルピシンリポゾーマル、ダウノルピシン、デシタビン、デニロイキンジフチトックス、デキストラゾキサソ、ドセタキセル、ドキシソルピシン、ドロモスタノロンプロピオネート、エリオットのB溶液、エピルピシン、エボエチン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチン、フロクリジン、フルダラビン、フルオロウラシル5-FU、フルベストラント、ゲフィチニブ、ゲンシタビン、ゲンツズマブオゾガミシン、酢酸ゴセレリン、酢酸ヒストレリン、水酸化尿素、イブリツモマブチルキセタン、イダルピシン、イフォスファミド、イマチニブメシレート、インターフェロン 2a、インターフェロン 2b、イリノテカン、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、酢酸ロイプロリデ、レバミソール、ロムスチン、CCNU、メクロレタミン、窒素マスタード、酢酸メゲストロール、メルファラン、L-PAM、メルカプトプリン6-MP、メスナ、メトトレキレート、ミトマイシンC、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロンフェンプロピオネート、ネララビン、ノフェツモマブ、オブレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パリフェルミン、パミドロネート、ペガデマラーゼ、ペガスパルゲーゼ、ペグフィルグラスチン、ペメトレキセドジソジウム、ペントスタチン、ピポプロマン、プリカマイシンミトラマイシン、ナトリウムポルフィメル、プロカルバジン、キナクリン、ラスプリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチン、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、スニチニブマレエート、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシドVM-26、テストラクトン、チオグアニン6-TG、チオテーパ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノインATRA、ウラシルマスタード、バルルピシン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ゾレドロネート、及びゾレドロン酸。

【0165】

かかる化学療法剤（例えばゲンシタビン）は、本発明の抗体にコンジュゲート化されることもできる。

【0166】

10

20

30

40

50

加えて、本発明の抗体によって発揮される特定の生物学的活性を増大させるため、かかる抗体は、細胞毒性剤（即ち、薬剤）（例えば、シュードモナスの菌体外毒素 P E 3 5 , P E 3 8 , P E 4 0、シュードモナス・アエロギノーサの菌体外毒素 A (E T A)、及びジフテリアの毒素 (D T 3 9 0)) をさらに含んでもよく、これにより特異的な免疫毒性を形成する。かかる細胞毒性剤は、抗体に取り付けられることができる。

【 0 1 6 7 】

本発明によって教示される抗体は、過剰増殖性の細胞又は組織（例えば、癌細胞又は組織）における E r b B リガンドを検出するために、又はその下方制御を評価するためにさらに使用されることができる。診断適用のために、抗体は典型的には、検出可能な成分により標識される。検出可能な成分は、検出可能シグナルを直接的又は間接的のどちらかで生じさせることができる任意の成分が可能である。例えば、検出可能な成分は、放射性同位体、蛍光性化合物もしくは化学発光性化合物、又は、タグ（例えば、標識された抗体が結合することができる本明細書中上記に記載されるタグなど）であり得る。本発明の抗体は、任意の知られているアッセイ方法（例えば、競合的結合アッセイ、直接的及び間接的なサンドイッチアッセイ、並びに、免疫沈殿アッセイなど）において用いることができる。Z o l a、M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s : A M a n u a l o f T e c h n i q u e s、1 4 7 頁 ~ 1 5 8 頁 (C R C P r e s s、I n c .、1 9 8 7)。

10

【 0 1 6 8 】

本発明のこの態様の抗体は、本発明のこの態様の抗体、並びに、場合により、固体担体及び画像化試薬（例えば、抗体、発色性基質など）が、適切な緩衝液及び保存剤とともに好適な容器に包装され、診断のために使用され得る診断キットにおいて含まれることができる。

20

【 0 1 6 9 】

本明細書中で使用される用語「約」は、 $\pm 10\%$ を示す。

【 0 1 7 0 】

用語「含む／備える (c o m p r i s e s、c o m p r i s i n g、i n c l u d e s、i n c l u d i n g)」、「有する (h a v i n g)」、及びそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない (i n c l u d i n g b u t n o t l i m i t e d t o)」ことを意味する。

30

【 0 1 7 1 】

用語「からなる (c o n s i s t i n g o f)」は、「含み、それらに限定される (i n c l u d i n g a n d l i m i t e d t o)」ことを意味する。

【 0 1 7 2 】

表現「から本質的になる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f)」は、さらなる成分、工程及び／又は部分が、主張される組成物、方法又は構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物、方法又は構造がさらなる成分、工程及び／又は部分を含み得ることを意味する。

【 0 1 7 3 】

本明細書中で使用される場合、単数形態（「a」、「an」及び「the」）は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物 (a c o m p o u n d)」又は用語「少なくとも1つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含し得る。

40

【 0 1 7 4 】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上及び簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、並びに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1 ~ 6 などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲（例えば、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、2 ~ 4、2 ~ 6、3 ~ 6 など）、並びに、その範囲に含

50

まれる個々の数値（例えば、1、2、3、4、5及び6）を有すると見なさなければならぬ。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

【0175】

数値範囲が本明細書中で示される場合には常に、示された範囲に含まれる任意の言及された数字（分数又は整数）を含むことが意味される。第1の示された数字及び第2の示された数字「の範囲である／の間の範囲」という表現、及び、第1の示された数字「から」第2の示された数「まで及び／までの範囲」という表現は、交換可能に使用され、第1の示された数字と、第2の示された数字と、その間のすべての分数及び整数とを含むことが意味される。

【0176】

本明細書中で使用される用語「方法（method）」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術及び手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学及び医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術及び手順、又は、知られている様式、手段、技術及び手順から、化学、薬理学、生物学、生化学及び医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術及び手順が含まれるが、それらに限定されない。

【0177】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴は単一の実施形態に組み合わせて提供することもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にするため単一の実施形態の文脈で説明されている本発明の各種の特徴は、別個に又は適切なサブコンビネーションで、又は本発明の他の実施形態において好適に提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であると見なされるべきではない。

【0178】

本明細書の上記に詳述され、かつ添付の特許請求の範囲において特許請求される本発明の種々の実施形態及び側面は、以下の実施例に実験的裏付けを見出す。

【実施例】

【0179】

上記説明とともに、本発明を非限定的な様式で例示する以下の実施例を参照する。

【0180】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学及び組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I~III巻、Ausubel, R.M. 編(1994)；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、米国ニューヨーク(1988)；Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク(1998)；米国特許の第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5192659号及び同第5272057号に記載される方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻、Cellis, J.E. 編(1994)；「Current Protocols in Immunology」I~III巻、Coligan, J.E. 編(1994)；Stitesら編「

Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994); MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク(1980); 利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば: 米国特許の第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号及び同第5281521号; 「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J. 編(1984); 「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編(1985); 「Transcription and Translation」Hames, B. D. 及びHiggins S. J. 編(1984); 「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編(1986); 「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press(1986); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B. (1984) 及び「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ(1990); Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press(1996); これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

【0181】

実施例 1

腫瘍細胞系からのEGF様リガンドの分泌

材料及び実験手順

材料

増殖因子は、Peprotech Asia (Peprotech, Rocky Hill, NJ) から購入された。NiNTAビーズは、Novagen (Madison, WI) から購入された。抗マウスFc抗体にコンジュゲート化されたビーズ、ATBS (2, 2 - アジノ - ビス (3 - エチルペンズチオゾリン - 6 - スルホン酸) 及びMTT (3 - (4, 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2, 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロマイド) は、Sigma (Sigma, St. Louis, MO) から購入された。増殖因子アッセイのためのDuo - setキットは、R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN) から購入された。ハイグロマイシンは、Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入された。ゲンシタピンは、Eli Lilly LTD. (Eli Lilly LTD., Hampshire, England) から購入された。

【0182】

EGFR及びErbB - 3に対するモノクローナル抗体は、本明細書に記述されるようにして生成された。ホスホチロシン (p - Tyr) に対する抗体は、Santa - Cruz (Santa Cruz, CA) から購入された。西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート化抗マウス抗体は、Jackson Immuno Research Laboratories (West Grove, Pennsylvania)

10

20

30

40

50

から購入された。

【0183】

細胞系及び組織培養

HeLa, T47D, NSO及びMiaPaCaは、DMEM培地中で培養された。BxPC3細胞はRPMI培地中で培養された。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、ダルベッコの改変イーグル培地(DMEM)とF12の混合物(1:1)中で維持された。全ての培地は、10%の加熱により不活性化されたウシ胎児血清を添加された。

【0184】

ならし培地中のリガンド濃度の決定

ヒトの癌細胞系(1×10^6 個)は、10cmプレートに播種され、8mlの培地で被覆され、4日間インキュベートされた。次に、培地が採取され、リガンドは、DuoSet ELISAキットを製造者(R&D Systems, Minneapolis, MN)の指示に従って使用して定量された。

10

【0185】

結果

本発明者は、腫瘍細胞系からの様々なEGF様リガンドの分泌を試験した。この目的のため、本発明者は、EGFRの四つの異なるリガンド(即ちEGF, TGF, HB-EGF及びAR)の低濃度を検出することができる免疫学的キットを使用した。アッセイは、卵巣、胸、肺、及び脾臓などの幅広い範囲のヒト腫瘍に由来する13の癌細胞系によってならし培地で行われた(表1参照)。表1に詳述されるように、アッセイは、増殖因子の明確な組み合わせを検出し、そのうち、HB-EGF及びARは、試験された腫瘍細胞系によって分泌される最も豊富なりガンドであった。

20

【0186】

表 1 : ヒトの癌細胞系による EGF 様リガンドの生体外分泌

細胞系	腫瘍の種類	TGF α	EGF	HB-EGF	AR
MDA-MB-231	胸	111.9 \pm 1.0	-	616.7 \pm 27.9	1606.9 \pm 171.1
MDA-MB-468	胸	-	-	63.6 \pm 6.6	-
SKBR3	胸	-	4.8 \pm 1.0	-	34.4 \pm 6.2
A-431	類表皮	12.8 \pm 2.5	-	222.7 \pm 9.5	81.9 \pm 17.8
H1437	肺	27.0 \pm 2.6	-	60.9 \pm 27.0	2121.4 \pm 84.7
OVCAR3	卵巣	13.2 \pm 10.4	-	104.9 \pm 33.7	276.2 \pm 21.0
SKOV3	卵巣	-	-	-	28.1 \pm 12.4
TOV112	卵巣	-	-	83.4 \pm 4.2	-
BxPC3	膵臓	21.4 \pm 0.2	-	213.1 \pm 62.0	3305.5 \pm 49.6
MiaPaCa	膵臓	-	-	133.7 \pm 42.2	3794.2 \pm 15.2
PANC-1	膵臓	-	-	147.7 \pm 31.7	200.8 \pm 12.7
DU145	前立腺	26.1 \pm 2.6	-	126.9 \pm 25.6	2574.7 \pm 198.7
PC3	前立腺	14.2 \pm 9.5	2.9 \pm 2.1	324.6 \pm 53.5	3822.4 \pm 33.0

【 0 1 8 7 】

実施例 2

EGF 様リガンドのクローニング、発現、及び生物学的活性

材料及び実験手順

材料

上述の実施例 1 で詳述した通りである。

【 0 1 8 8 】

細菌及び哺乳類細胞における EGF 様リガンドのクローニング及び発現

TGF の EGF 様ドメイン (配列番号 1) 又は HB-EGF の EGF 様ドメイン (配列番号 3) は、pET32b ベクター中にクローニングされ、EGF 様ドメインの N 末端残基に隣接する因子 Xa 開裂部位を有する C 末端チオレドキシシン (TRX) 融合タンパク質として発現された。融合タンパク質は、標準的な手順を使用して大腸菌 (BL21) 中で発現された。一つのコロニーは一晚増殖され、200 ml の 2YT 中に希釈された。OD (600 nm) は、0.5 ~ 0.6 に到達するまで連続的に監視され、次に、1 mM の IPTG が添加され、培養物は 30 に移された。5 時間のインキュベーション後、細菌細胞は、氷上で冷却され、遠心分離され、20 mM の Tris pH 7.5、150 mM の NaCl、5 mM のイミダゾール、及び 1% の triton X-100 を含む混合物 20 ml 中で再懸濁された。次に、細胞は、超音波照射により破壊され、明澄な抽出物は

10

20

30

40

50

、予め平衡化されたNiNTAビーズに移された。ビーズは、同じ緩衝液を使用して洗浄され、300mMのイミダゾールで溶出された。

【0189】

GPI附着モチーフに結合されたEGF様ドメインを含む融合タンパク質の構築は、二つの工程で行われた。第一のPCR反応は、ラットのコンタクチン-1のGPIシグナル上で行われた。5'プライマーは、HAタグに続くNsiI部位を導入し、3'プライマーは、NotI部位を導入した。生成物は、NsiI及びNotI制限酵素を使用してpIRES-Hygベクター中にクローニングされた。第二工程は、重複PCRを使用した。第一の反応は、テンプレートとしてのHER2のシグナルペプチド、及びそれぞれのEGF様ドメインの5'配列を含む3'プライマーを使用した。第二のPCR反応は、テンプレートとしてのそれぞれのEGF様ドメイン、及びHER2シグナルペプチドの3'末端を含む5'プライマーを使用した。両方の反応の生成物は、精製され、1:1のモル比で組み合わせられ、これが別のPCR反応のテンプレートとして使用された。最終PCR生成物は、BamHI及びNsiI開裂部位を使用してpIRES-Hyg-GPIインフレーム(inframe)にクローニングされ、5'をHAタグに結合された。

10

【0190】

免疫プロット分析

細胞は、24ウェルプレートに播種された。24時間後、細胞は、洗浄され、様々な薬剤でインキュベートされた。10分間のインキュベートの後、細胞は、溶解され、明澄な抽出物は電気泳動され、次に、抗ホスホチロシンmAb、抗EGFR mAb(HeLa)、又は抗Erbb-3 mAb(T47D)で免疫プロットされた。

20

【0191】

結果

標的の天然の配座の特異的な認識及びそれへの特異的な結合は、モノクローナル抗体(mAb)に基づく療法の顕著な特徴である。ErbbリガンドのEGF様ドメインの正確な折り畳み及び活性のためには、高度に保存された三つのジスルフィド結合が必要であることが知られている[Van Zoelen, E. J., ら. (2000) Vitam Horm 59, 99-131]。従って、本発明者は、EGFR特異的リガンドのEGF様ドメインを、チオレドキシタンパク質(TRX、図1A)に結合された融合タンパク質として発現させることを選択した。融合タンパク質は、ニッケルカラム(例えば、NiNTAカラム)の使用による続く精製を可能にするヒスチジンリピートも含んでいた。加えて、因子Xa開裂部位が導入され、組み換えタンパク質の残りからのEGF様ドメインの放出を可能にした。(上述の材料及び方法の欄で詳述したような)細菌系中での発現後、二つのリガンド(TGF及びHB-EGF)は、NiNTAカラムを使用して精製され(図1B)、それらの生物学的活性は、チロシン残基上でのEGFRリン酸化を誘導するそれらの能力を試験することによって検証された(図1C)。図1Cに示されるように、組み換えリガンドは、それぞれの機能的に活性な配座を示した。従って、マウスは、以下に詳述されるように活性TRX融合タンパク質で続いて免疫化された。

30

【0192】

実施例3

TGFのEGF様ドメインに対して指向された拮抗抗体の作成

材料及び実験手順

材料

上述の実施例1で詳述した通りである。

【0193】

細菌及び哺乳類細胞におけるEGF様リガンドのクローニング及び発現

上述の実施例2で詳述した通りである。

【0194】

哺乳類細胞におけるEGF様リガンドの発現

EGF様ドメインを安定して発現するチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞のク

40

50

ローンを確立するため、本発明者は、リポフェクタミン (Invitrogen, Carlslbad, CA) を使用して対応する pIERS-Hyg をトランスフェクトし、ハイグロマイシン (2 $\mu\text{m}/\text{ml}$) を使用してクローンを選択した。選択の2週間後、安定にトランスフェクトされた細胞は、小さなコロニーとして出現し、これらのコロニーがスクリーニングされ、高発現を示すコロニーが増殖された。

【0195】

モノクローナル抗体の作成

5匹のメスの balb/c マウス (3ヶ月齢; Harlen, Israel) は、完全フロインドアジュバント中の 30 μm のタンパク質を皮下的にかつ一つの脚の内部フットパッド (intra foot pad) 中に注入された。3週間後、第二回の注入が不完全フロインドアジュバントで行われた。この注入の後、3週間の間隔で、PBS中の 30 μg のタンパク質の3~5回の注入が行われた。最後の注入の10日後、マウスは、放血され、血清は、抗体力価について試験された。最後の追加抗原投与の1ヶ月後、最高の力価を有する2匹のマウスは、もう2回の注入を二日間にわたって連続して受けた。最後の追加抗原投与の4日後、脾臓は、除去され、各個体の脾臓からの細胞は、 20×10^6 個の NS0/1 骨髄腫系と融合された。融合は、以前に記述されたように [Eshhar, Z., ら. (1980). J Immunol 124, 775-780]、41%のポリエチレングリコール 1500 (Serva, Heidelberg, GmbH) を使用して行われた。融合後、細胞は、96ウェルプレートに1ウェル当たり 2×10^4 個の生存している骨髄腫細胞の濃度で分散された。ハイブリッド細胞は、HATの存在下で増殖について選択された。陽性のハイブリッド培養物は、HATから引き離され、クローニングされて限界希釈で再クローニングされた。

【0196】

EGF様リガンドへのmAbの結合の生体外試験

96ウェルプレートは、示されたリガンド (0.1 ng/ml) で被覆され、37で3時間インキュベートされた。プレートは、2回洗浄され、PBST中の1%BSAで37で1時間ブロックされ、抗体 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 又は生理的食塩水で室温で3時間インキュベートされた。次に、ウェルは、抗マウスHRP抗体で20分間インキュベートされ、その後、ATBS (Sigma, St. Louis, MO) 試薬でインキュベートされた。シグナルは、ELISA読み取り器 (420nm) を使用して決定された。

【0197】

免疫沈降アッセイ

mAbは、抗マウスFc抗体にコンジュゲート化されたアガロースビーズで45分間インキュベートされた。その後、ビーズは、PBS中で2回洗浄され、HB-EGF又はTGF (Sigma, St. Louis, MO) で1時間インキュベートされた。免疫複合体は、HB-EGFに対するmAb 327で免疫プロットされた。

【0198】

結果

TRX含有融合タンパク質は、完全フロインドアジュバント (Tifco, Detroit, Michigan) を使用して、Balb/c マウスを免疫化するために使用された (50 $\mu\text{g}/\text{動物}$)。4回の腹腔内注入の後、血清は、採取され、抗リガンド応答について試験された。抗血清及びハイブリドーマスクリーニングを容易にするために、本発明者は、原形質膜上にTGFのEGF様ドメインを発現する安定なチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞系を確立した。EGF様ドメインは、HER2シグナルペプチド、HA-ペプチドタグ、及びGPIアンカー (グリコシルホスファチジルイノシトール) モチーフに融合された。このモチーフは、原形質膜への融合タンパク質の脂質ベースの固定に関与する (図1D)。免疫化されたマウスからの抗血清は、GPI固定されたリガンドを発現するCHO細胞に特異的に結合するその能力について試験された。加えて、本発明者は、リガンド誘導EGFRリン酸化を阻害する抗血清の能力を試験した。図1E (例示的アッセイ) に示されるように、EGFRのTGFによって誘導されるリン酸化は、免

10

20

30

40

50

疫化されたマウスからの抗血清の増大した量の存在において試験された。続いて、2匹の陽性マウスの脾臓を使用してハイブリドーマが確立され、これらのハイブリドーマは、次に表面に露出されたGPI-TGF融合タンパク質を認識するそれらの能力、及び哺乳類の組み換えリガンドを弱化させるそれらの能力についてスクリーニングされた(データは示さず)。

【0199】

選択された抗TGF mAb (mAb-551と称される)を機能的に特性決定するために、本発明者は、ELISAアッセイを使用してその特異性を試験した。このアッセイにより、mAb-551は、TGFのみに結合し、試験された他の四つのリガンド(AR, EGF, HB-EGF, NRG1、図2A)には結合しないことが確認された。さらに、抗TGF mAbは、TGFの市販の調製物を免疫沈降させることが見出された(図2B)。さらに、本発明者は、mAb-551は、TGFによって誘導されるEGFRリン酸化を特異的に阻害する能力を有する(図2C)が、EGF又はHB-EGFによって誘導されるEGFRの活性化は阻害されない(図2C)ことを確認した。これらの結果は総合的に、TGFによって媒介されるオートクリンループを妨害するmAb-551の好適さを確立した。

10

【0200】

実施例4

HB-EGFのEGF様ドメインに対して指向された拮抗抗体の作成
材料及び実験手順
材料

20

上述の実施例1で詳述した通りである。

【0201】

細菌及び哺乳類細胞におけるEGF様リガンドのクローニング及び発現

上述の実施例2で詳述した通りである。

【0202】

哺乳類細胞におけるEGF様リガンドの発現

上述の実施例3で詳述した通りである。

【0203】

モノクローナル抗体の作成

上述の実施例3で詳述した通りである。

30

【0204】

EGF様リガンドへのmAbの結合の生体外試験

上述の実施例3で詳述した通りである。

【0205】

免疫沈降アッセイ

上述の実施例3で詳述した通りである。

【0206】

結果

本発明者は、別の主要な増殖刺激EGF様リガンドであるHB-EGFに対するmAbを作成した。本発明者は、HB-EGFに対する三つのmAb及び固定されたHB-EGFを使用して、特異性、及びErbbファミリーの他の増殖因子に対する交差反応性の非存在を確認した(図3A)。次に、本発明者は、HB-EGFの市販の調製物を免疫沈降させることに対するハイブリドーマの三つの陽性クローンの能力を確認した(図3B)。加えて、本発明者は、HeLa及びT47D哺乳類癌細胞におけるHB-EGFによって誘導されるチロシンのリン酸化を試験することによって、HB-EGFに対する三つのmAb(mAb-898, mAb-878及びmAb-384)は、リガンドによって誘導される受容体の活性化を不定に阻害すると結論付けた(図3C)。

40

【0207】

実施例5

50

個別の抗体及びそれらの組み合わせの増殖阻害活性
材料及び実験手順
材料

上述の実施例 1 で詳述した通りである。

【 0 2 0 8 】

細菌及び哺乳類細胞における E G F 様リガンドのクローニング及び発現

上述の実施例 2 で詳述した通りである。

【 0 2 0 9 】

モノクローナル抗体の作成

上述の実施例 3 で詳述した通りである。

【 0 2 1 0 】

細胞増殖アッセイ (M T T)

B x P C 3 膵臓腫瘍細胞は、96 ウェルプレート (2 0 0 0 個の細胞 / ウェル) に 6 連で播種された。細胞は、様々な m A b の添加の前に一晩接着させられた。増殖は、24、48 及び 72 時間後に、M T T 法を以前に記述されたように [M o s s m a n n T . J . , I m m u n o l M e t h o d s . (1 9 8 3) 1 6 ; 6 5 (1 - 2) : 5 5 - 6 3] 使用して測定された。M T T (3 - (4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) - 2 , 5 - ジフェニルテトラゾリウムプロマイド) は、ウェルに添加され、2 時間後、細胞は (イソプロパノール中の) 4 m M の H C l に溶解された。吸光度は 5 7 0 n m で決定された。

【 0 2 1 1 】

動物中での m A b の抗腫瘍活性の決定

メスの異型 N C r ノードマウス (6 週齢 ; H a r l e n , I s r a e) は、 2×10^6 個のヒト癌細胞を皮下接種された。いったん腫瘍が触診可能になると (5 ~ 7 日後)、マウスは、無作為に群に分けられ、示された時点で m A b、化学療法、又は様々な組み合わせを腹腔内注入された。腫瘍体積は、1 週間に 2 回監視され、体重は、1 週間に 1 回測定された。

【 0 2 1 2 】

結果

組み合わせ療法は、単一療法より効率的であることがしばしば証明されている。T G F に対する拮抗抗体及び H B - E G F に対する拮抗抗体の利用可能性は、B x P C 3 膵臓腫瘍細胞が両方のリガンドを分泌した (上述の表 1 参照) という発見と共に、B x P C 3 細胞の腫瘍原性増殖に対する二つのオートクリン増殖因子を標的にする組み合わせ療法を試験するように本発明者を刺激した。この目的のため、本発明者は、作成された各 m A b の存在下で、又は二つの抗体の組み合わせ下で B x P C 3 細胞の増殖を定量した。結果 (図 4 A に示される) は、細胞増殖に対する m A b - 5 5 1 (T G F に対するもの) 及び m A b - 8 9 8 (H B - E G F に対するもの) の両方の阻害効果を証明した。重要なことに、両方の m A b での組み合わせ治療は、同時オートクリンループと一貫して B x P C 3 細胞の増殖に対する阻害効果を増大させた。

【 0 2 1 3 】

本発明者は、同一の膵臓 B x P C 3 異種移植片を使用して、二つの抗増殖因子 m A b を組み合わせる効率を生体内でチェックした。細胞は、(上述の材料及び方法の欄で記述されたようにして) マウスに皮下注入され、触診可能な腫瘍が出現するまで (5 ~ 7 日間) 増殖された。次に、マウスは、m A b (m A b - 5 5 1 又は m A b - 8 9 8) のうちの一方で、又は抗 T G F m A b と抗 H B - E G F m A b の組み合わせで 1 週間に 2 回処置された (図 4 B)。図 4 B に示されるように、これらの m A b の生体内活性は、生体外の結果より深い (p r o f o u n d) ように見えただけでなく、二つの m A b の組み合わせは、相乗効果をもたらし、各 m A b 単独で観察される腫瘍寸法の減少より大きい腫瘍寸法の減少をもたらされた (データは示さず)。加えて、本発明者は、膵臓細胞系 M i a P a C a - 2 及び肺癌細胞系 H 1 4 3 7 の異種移植片は、m A b - 5 5 1 又は m A b - 8 9

10

20

30

40

50

8での個別の治療より二つのmAbの組み合わせによって良好に阻害されたことを見出した(データは示さず)。従って、二つの増殖因子に対する抗体を組み合わせることは、幅広い増殖阻害効果を毒性なしに誘導するよう見える。

【0214】

実施例6

抗増殖因子抗体の組み合わせは、腫瘍を化学療法に対して感作する

材料及び実験手順

材料

上述の実施例1で詳述した通りである。

【0215】

細菌及び哺乳類細胞におけるEGF様リガンドのクローニング及び発現

上述の実施例2で詳述した通りである。

【0216】

モノクローナル抗体の作成

上述の実施例3で詳述した通りである。

【0217】

細胞増殖アッセイ(MTT)

BxPC3膵臓腫瘍細胞は、96ウェルプレート(2000個の細胞/ウェル)に6連で播種された。細胞は、二つのmAb(mAb-551又はmAb-898)又はゲンシタピンの添加の前に一晩接着させられた。増殖は、24、48及び72時間後に、MTT法を使用して測定された。MTT(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド)は、ウェルに添加され、2時間後、細胞は(イソプロパノール中の)4mMのHClに溶解された。吸光度は570nmで決定された。

【0218】

動物中でのmAbの抗腫瘍活性の決定

メスの異型NCrヌードマウス(6週齢;Harlen,Israe)は、 2×10^6 個のヒト癌細胞を皮下接種された。いったん腫瘍が触診可能になると(5~7日後)、マウスは、無作為に群に分けられ、ゲンシタピン(150mg/kg体重)で2回(16日目及び21日目)(腹腔内注入によって)処置され、二つのmAbあり又はなしで1週間に2回処置された。腫瘍体積は、1週間に2回監視され、体重は、1週間に1回測定された。

【0219】

結果

本発明者は、EGFRを刺激する自己生産増殖因子(ErbB-1)及びHER2を刺激する自己生産増殖因子(ErbB-2)は、ErbB-3/4と共に、化学療法及び放射線療法に対する膵臓腫瘍及び他の腫瘍の抵抗性において本質的な役割を果たすと仮定する。従って、本発明者は、かかるオートクリンループの阻害は、逃避機構を遮断して、従来の療法の毒性効果に対して腫瘍を再感作するかどうかを試験することを望んだ。このシナリオの初期の試験として、本発明者は、二つのmAbとゲンシタピン(進行した膵臓腫瘍の主要な化学療法剤)との組み合わせ効果を生体外で試験した。図5Aに示されるように、TGFに対する抗体及びHB-EGFに対する抗体(それぞれmAb-551及びmAb-898)の混合物を使用して、ゲンシタピンの増殖阻害効果が(培養されたBxPC3細胞に見られるように)増強された。

【0220】

次の実験において、本発明者は、動物における三つの組み合わせ(即ち、ゲンシタピン、mAb-551及びmAb-898)の、BxPC3細胞の腫瘍原性増殖に対する影響を試験した。細胞は、皮下注入され、触診可能な腫瘍が出現するまで増殖された。次に、マウスは、ゲンシタピン(150mg/kg体重)で、及び二つのmAbであり又はなしで二回(16日目及び21日目に)処置された。図5Bに示される結果は、ゲンシタピン

10

20

30

40

50

の二回の注入は、85%以上の腫瘍増殖阻害を生じたが、二つのmAbの混合物での繰り返し注入は、この化学療法剤の細胞毒性効果を増殖したことを証明する。

【0221】

実施例7

抗増殖因子抗体の組み合わせは、膵臓腫瘍及び肺腫瘍を生体内で有意に減少させる

材料及び実験手順

材料

上述の実施例1で詳述した通りである。

【0222】

細菌及び哺乳類細胞におけるEGF様リガンドのクローニング及び発現

10

上述の実施例2で詳述した通りである。

【0223】

モノクローナル抗体の作成

上述の実施例3で詳述した通りである。

【0224】

動物中でのmAbの抗腫瘍活性の決定

メスの異型NCrヌードマウス(6週齢; Harlen, Israe)は、 2×10^6 個のMiPaCaヒト膵臓癌細胞又はヒト肺腫瘍細胞系H1437を皮下接種された。いったん腫瘍が触診可能になると(5~7日後)、MiPaCa異種移植片を担持するマウスは、14, 18, 21, 24, 27, 30, 34及び37日目にmAb(それぞれ一回の注入当たり125 μ g)で処置された。対照群は、8匹のマウスを含んでおり、処置群は、5匹のマウスを含んでいた。H1437腫瘍異種移植片を担持するマウスは、6, 10, 14, 17及び21日目にmAb(それぞれ一回の注入当たり125 μ g)で処置された。対照群は、15匹のマウスを含んでおり、処置群は、11匹のマウスを含んでいた。腫瘍体積及びマウス体重は、監視された。

20

【0225】

結果

図6A~Dに示されるように、抗TGF β mAb及び抗HB-EGF mAbでのマウスの処置は、膵臓腫瘍及び肺腫瘍を有意に減少させた。

【0226】

30

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更及び変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更及び変形すべてを包含するものである。

【0227】

本明細書で挙げた刊行物、特許及び特許出願はすべて、個々の刊行物、特許及び特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用又は確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定であると解釈されるべきではない。

【0228】

40

テキストファイルの内容

以下のものは、本明細書に同封され、本願と共に提出されたテキストファイルの内容を記載する。ファイル情報は、ファイル名/バイトサイズ/作成日/オペレーティングシステム/機械フォーマットとして与えられている。

Sequence_Listing/1,869 bytes/18 April 2010/PC/Notepad

【図1A - 1E】

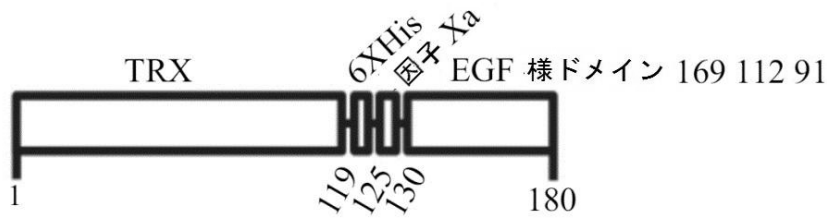


FIG. 1A

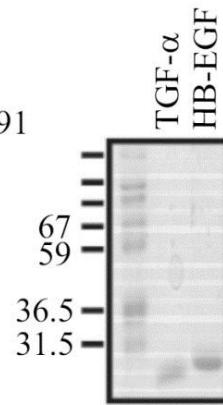


FIG. 1B

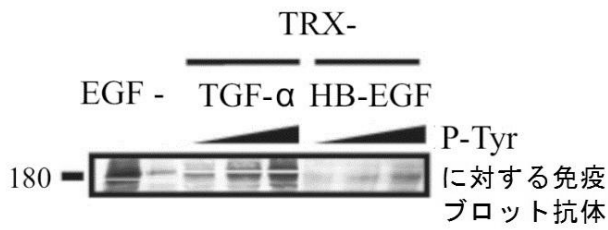


FIG. 1C

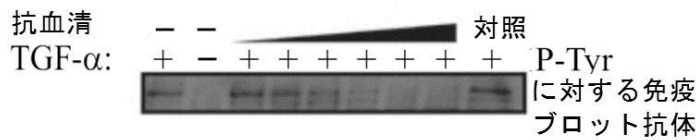


FIG. 1E

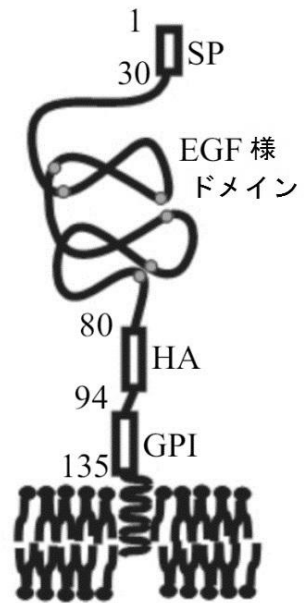


FIG. 1D

【 図 2 A - 2 C 】

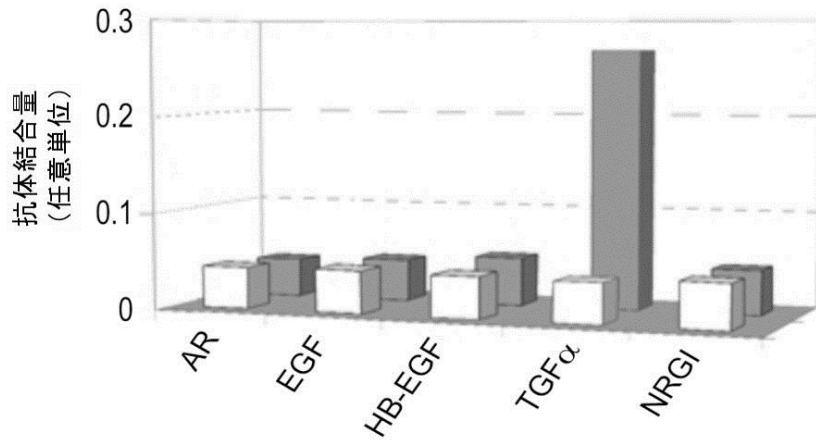


FIG. 2A

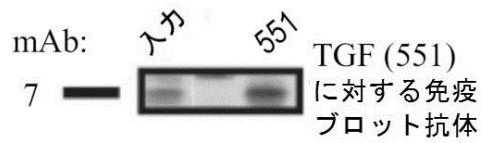


FIG. 2B

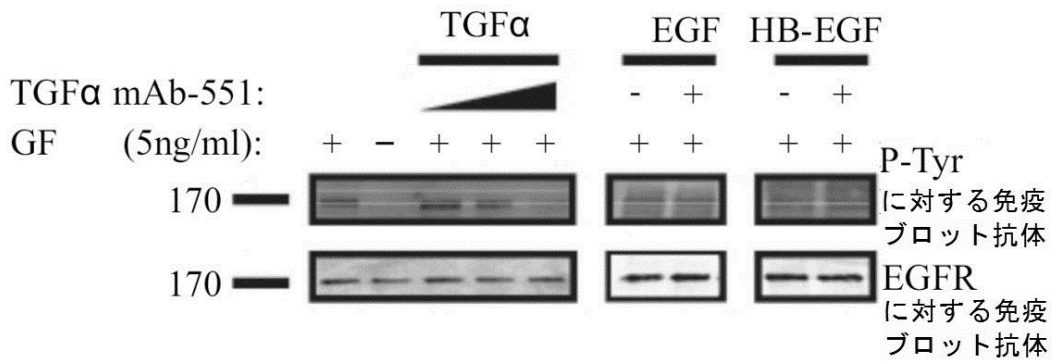


FIG. 2C

【 図 3 A - 3 C 】

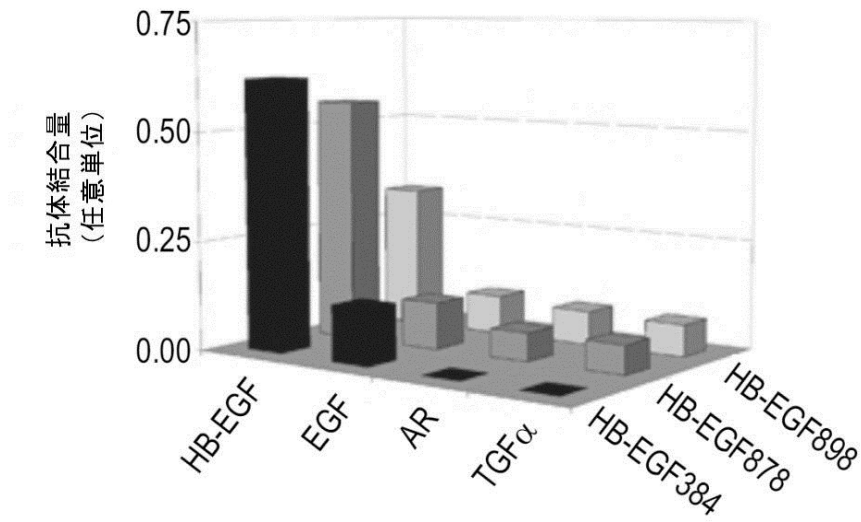


FIG. 3A

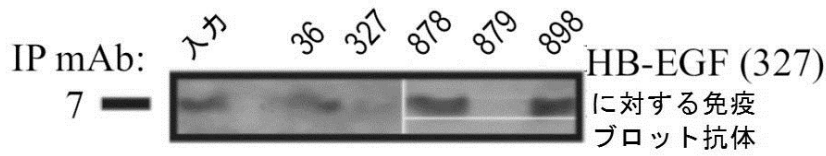


FIG. 3B

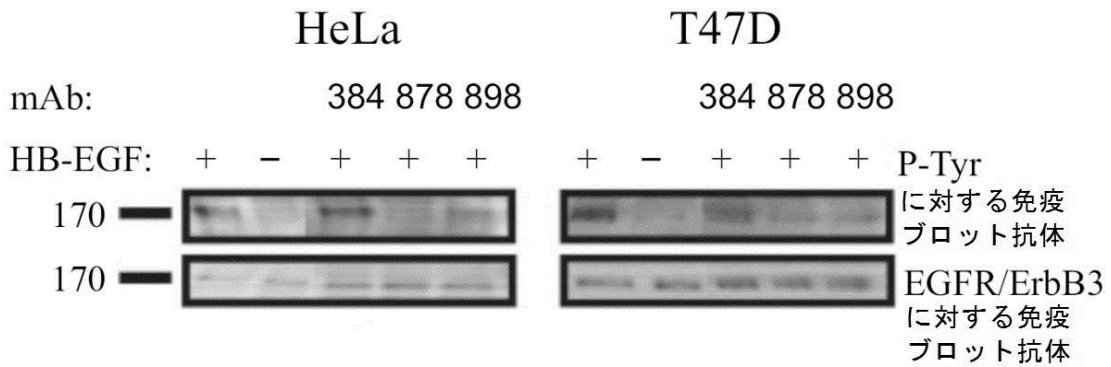


FIG. 3C

【図 4 A - 4 B】

FIG. 4A

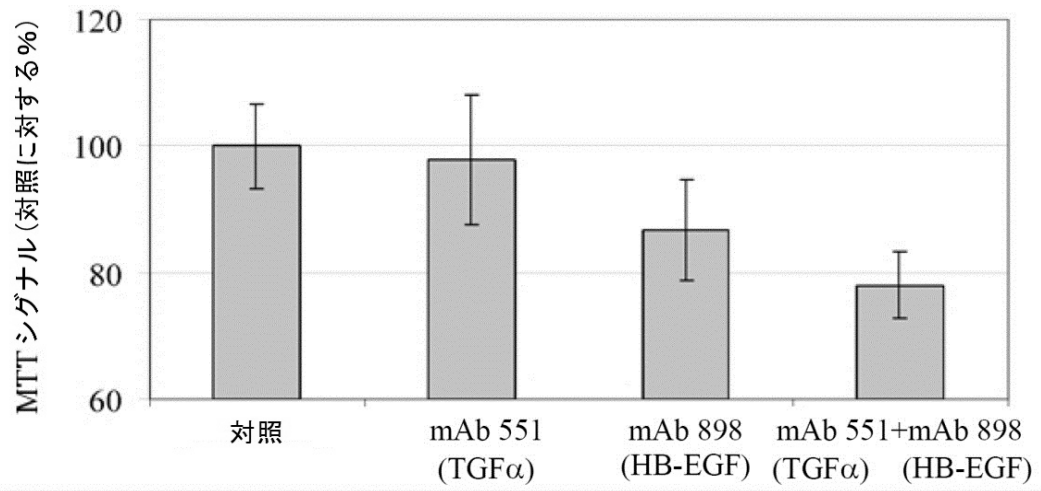
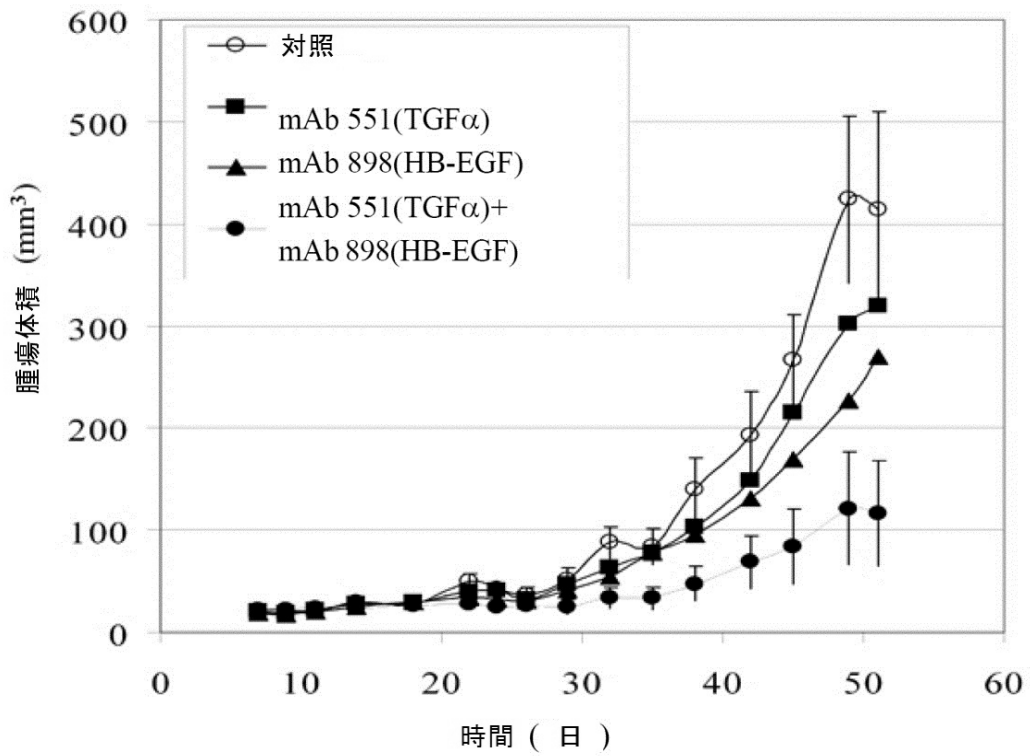


FIG. 4B



【図5A - 5B】

FIG. 5A

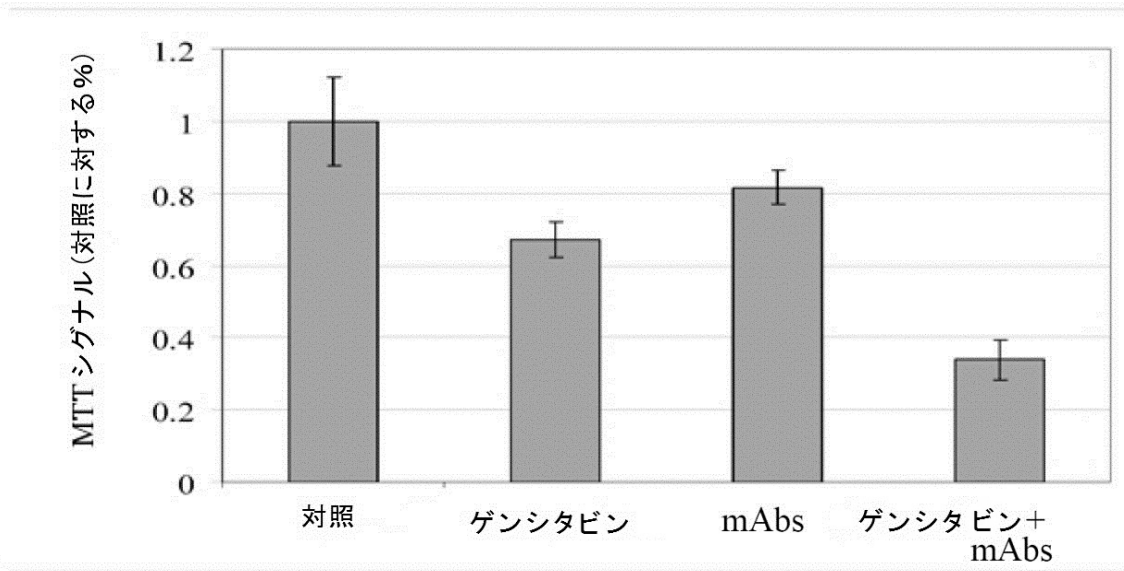
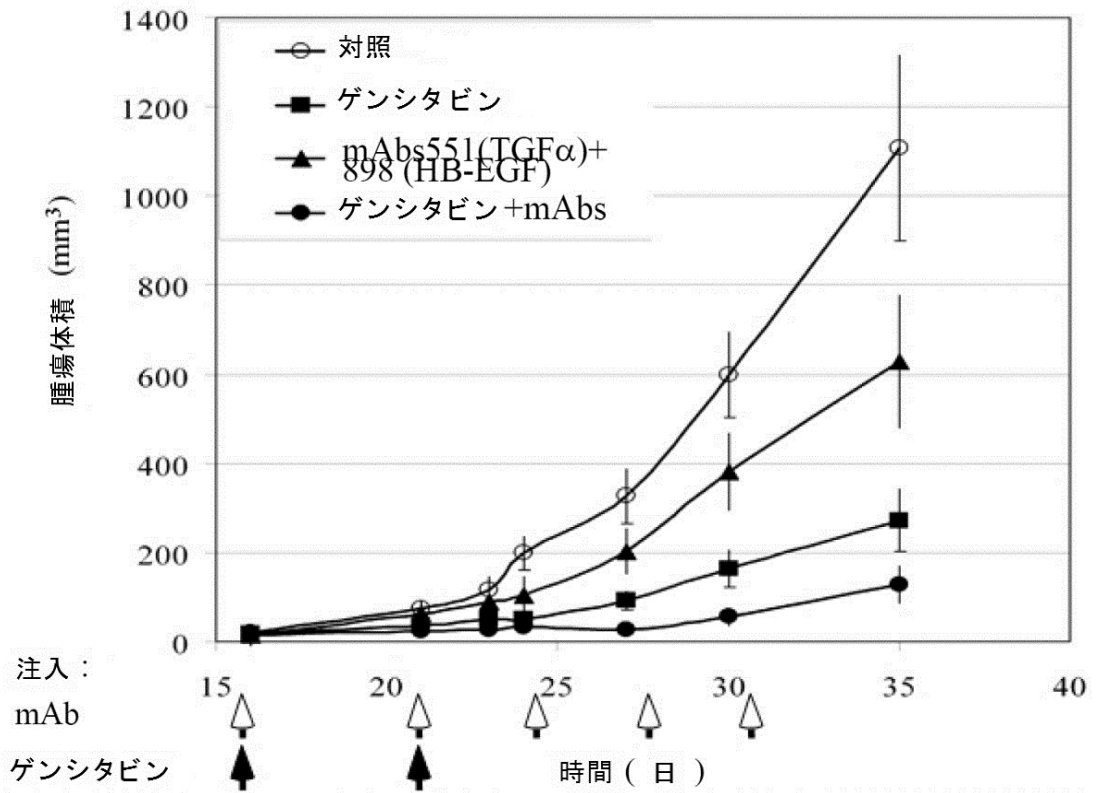


FIG. 5B



【 図 6 A - 6 D 】

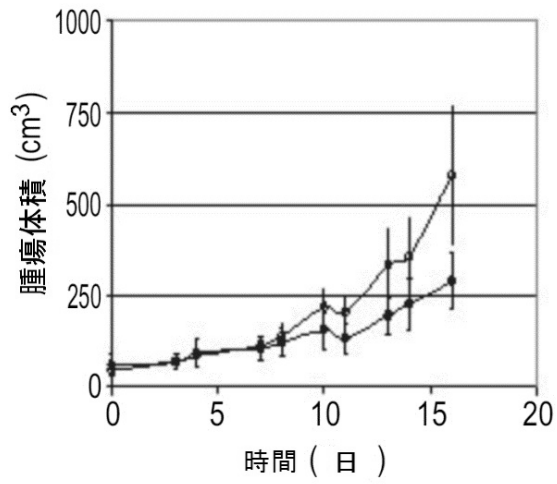


FIG. 6A

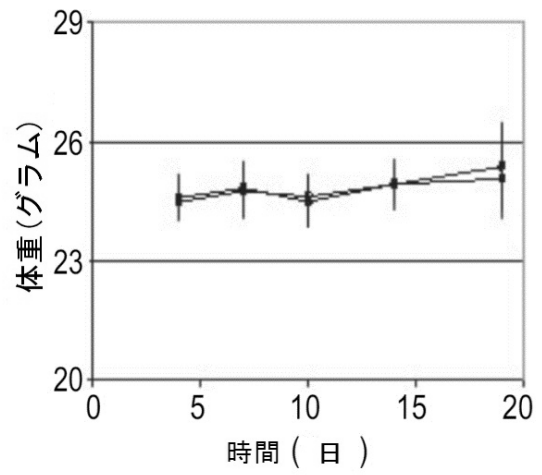


FIG. 6C

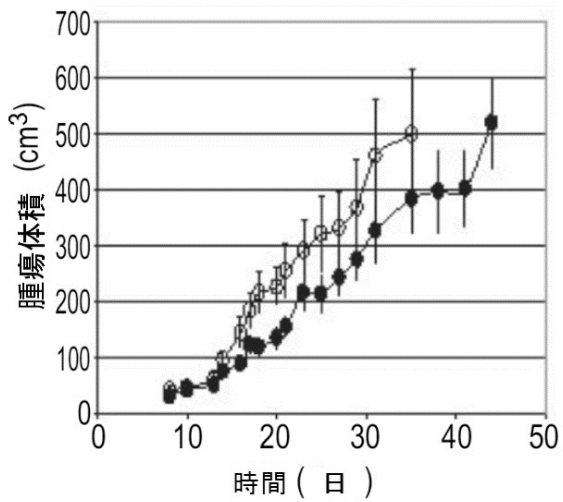


FIG. 6B

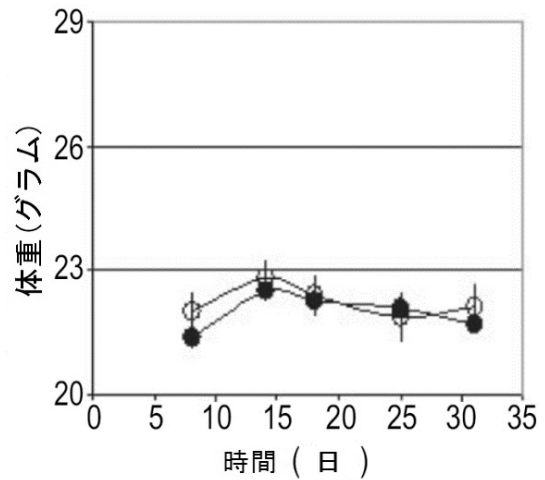


FIG. 6D

【 配列表 】

[0005858984000001.xml](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 0 7 K 16/22	(2006.01)	A 6 1 K	48/00
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 0 7 K	16/22
		C 1 2 P	21/08

(72)発明者 リンゼン, モシト
 イスラエル, 76100 レホボト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ ウエイ
 ズマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロップメン
 ト カンパニー リミテッド内

(72)発明者 ヤーデン, ヨセフ
 イスラエル, 76100 レホボト, ザ ウエイズマン インスティテュート オブサイエ
 ンス, シムタ 4エー

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 国際公開第2008/047723(WO, A1)
 米国特許出願公開第2009/0324491(US, A1)
 特表2010-505934(JP, A)
 国際公開第2008/044068(WO, A2)
 特開2009-007255(JP, A)
 国際公開第2009/040134(WO, A1)
 特表2003-503365(JP, A)
 MIYAMOTO S, CANCER RESEARCH, 米国, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2004
 年 8月15日, V64 N16, P5720-5727
 Castillo, J. et al., Amphiregulin Contributes to the Transformed Phenotype of Human Hep
 atocellular Carcinoma Cells, Cancer Res., 2006年 6月15日, Vol.66, No.12, P.612
 9-6138

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8