

(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2005-538701
(P2005-538701A)**

(43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int.Cl. ⁷		F 1	テーマコード (参考)	
C 12 N	15/09	C 12 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
A 61 K	31/7088	A 61 K 31/7088		4 B 0 6 3
A 61 K	39/395	A 61 K 39/395	E	4 B 0 6 4
A 61 K	45/00	A 61 K 39/395	T	4 B 0 6 5
A 61 K	48/00	A 61 K 45/00		4 C 0 8 4
審査請求 未請求		予備審査請求 有	(全 112 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-502947 (P2004-502947)	(71) 出願人	504333972 メディミューン、インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成15年5月12日 (2003.5.12)		アメリカ合衆国 20878 メリーラン
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月7日 (2005.1.7)		ド州、ゲイサーズバード、ワン メディミ
(86) 國際出願番号	PCT/US2003/015044		ューン ウェイ
(87) 國際公開番号	W02003/094859	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(87) 國際公開日	平成15年11月20日 (2003.11.20)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	60/379,322	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成14年5月10日 (2002.5.10)	(72) 発明者	キンチ、マイケル、エス. アメリカ合衆国 20882 メリーラン
(33) 優先権主張国	米国(US)		ド州、レイトンズヴィル、フーヴァー フ
(31) 優先権主張番号	60/418,213		アーム ドライブ 19627
(32) 優先日	平成14年10月14日 (2002.10.14)		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/460,507		
(32) 優先日	平成15年4月3日 (2003.4.3)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

(54) 【発明の名称】 E p h A 2 モノクローナル抗体およびその使用法

(57) 【要約】

この発明は、癌、特に転移癌の治療、管理、または予防のために設計した方法および組成物に関する。一実施形態では、この発明の方法は、EphA2と結合しEphA2に作用し、それによってEphA2リン酸化を増大しEphA2レベルを低下させる、有効量の抗体の投与を含む。他の実施形態では、この発明の方法は、EphA2と結合し、癌細胞の軟寒天中でのコロニー形成を阻害し、三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワーク形成を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/またはK_{off}が低く、それによって腫瘍細胞増殖および/または転移を阻害する、有効量の抗体の投与を含む。この発明はまた、1種もしくは複数のこの発明のEphA2抗体を単独でまたは1種もしくは複数の癌治療に有用な他の薬剤と組み合わせて含む医薬組成物を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

治療を必要とする患者の癌を治療する方法であって、前記患者に、EphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体であるEphA2抗体を治療有効量投与することを含む方法。

【請求項 2】

前記投与が、未治療癌細胞におけるEphA2リン酸化のレベルに比して癌細胞におけるEphA2リン酸化を増大させる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記投与が、未治療癌細胞におけるEphA2発現のレベルに比して癌細胞におけるEphA2発現を低減させる、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記EphA2抗体が、軟寒天中でのコロニー形成あるいは三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワーク形成を阻害する、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記EphA2抗体が、存在している、軟寒天中でのコロニー形成または基底膜もしくは細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワーク形成を低減させる、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記低減が、アポトーシスまたはネクローシスによって起こる、請求項5に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記EphA2抗体が、細胞-細胞接觸していない細胞で発現した場合にEphA2と結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記EphA2抗体が、そのリガンドと安定に相互作用することができないEphA2と結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記EphA2抗体が、そのリガンドと結合していないEphA2と結合する、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記EphA2抗体が、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記癌が上皮細胞起源である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記癌が、前記癌細胞の組織型を有する非癌細胞に比してEphA2を過剰発現する細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 13】

前記癌が、皮膚、肺、大腸、乳房、前立腺、膀胱または腎臓の癌であり、あるいは腎細胞癌または黒色腫である、請求項1に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記癌が転移癌である、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

前記EphA2抗体がモノクローナル抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 16】

前記EphA2抗体が、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152である、請求項1に記載の方法。

【請求項 17】

前記EphA2抗体が、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152とEphA2結合について競合する、請求項1に記載の方法。 50

【請求項 18】

前記EphA2抗体がヒト化である、請求項1に記載の方法。

【請求項 19】

前記EphA2抗体が、ヒト化したEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152である、請求項1に記載の方法。

【請求項 20】

前記EphA2抗体がヒト抗体である、請求項1に記載の方法。

【請求項 21】

EphA2抗体ではない抗癌治療の投与を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 22】

前記追加の癌治療が、化学療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法、ホルモン療法、および手術からなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記生物学的療法が、細胞-フィブロネクチン結合またはフィブロネクチン発現を低減させる薬剤を投与することを含む、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

治療有効量のアゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体であるEphA2抗体；および製薬上許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 25】

前記EphA2抗体が、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152である、請求項24の医薬組成物。

【請求項 26】

前記EphA2抗体がEphA2との結合について、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152と競合する、請求項24の医薬組成物。

【請求項 27】

前記EphA2抗体がモノクローナル抗体である、請求項24の医薬組成物。

【請求項 28】

前記EphA2抗体がヒト化である、請求項24の医薬組成物。

【請求項 29】

前記EphA2抗体がヒト抗体である、請求項24の医薬組成物。

【請求項 30】

前記EphA2抗体が、ヒト化したEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152である、請求項24の医薬組成物。

【請求項 31】

EphA2抗体ではない抗癌剤を含む、請求項24の医薬組成物。

【請求項 32】

前記抗癌剤が、化学療法薬、放射線療法薬、ホルモン治療薬、生物学的治療薬、または免疫治療薬である、請求項31に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

その結合がEphA2の少なくとも1種の活性に作用する、EphA2と特異的に結合する単離抗体。

【請求項 34】

前記EphA2の活性がEphA2リン酸化またはEphA2分解である、請求項33に記載の単離抗体。

【請求項 35】

その結合が癌細胞表現型を阻害する、EphA2と特異的に結合する単離抗体。

【請求項 36】

前記結合が、癌細胞の軟寒天中でのコロニー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中の管状ネットワーク形成を阻害する、請求項35に記載の単離抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 37】

前記結合が、癌細胞の軟寒天中のコロニー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中の管状ネットワーク形成を低減させる、請求項35に記載の単離抗体。

【請求項 38】

前記低減が、癌細胞のネクローシスまたはアポトーシスによって引き起こされる、請求項37に記載の単離抗体。

【請求項 39】

その結合が、EphA2が細胞-細胞接触していないまたはエフリンA1リガンドと結合していない場合にのみ起こる、EphA2と特異的に結合する単離抗体。

10

【請求項 40】

その結合が $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する、EphA2と特異的に結合する単離抗体。

【請求項 41】

K_{off} 速度が 10^{-1} s^{-1} 未満である、請求項40に記載の単離抗体。

【請求項 42】

モノクローナル抗体である、請求項33、35、39、または40のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 43】

前記抗体がヒト化である、請求項33、35、39、または40のいずれか一項に記載の単離抗体。

20

【請求項 44】

前記抗体がヒト抗体である、請求項33、35、39、または40のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 45】

前記抗体が誘導体である、請求項33、35、39、または40のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 46】

誘導体ではない抗体と比較した場合に *in vivo*半減期が増大している、請求項45に記載の単離抗体。

30

【請求項 47】

Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B210.248、またはEph099B-233.152である抗体。

【請求項 48】

請求項33、35、39、40、または47のいずれか一項に記載の抗体を産生する細胞系。

【請求項 49】

受託番号PTA-4572、PTA-4573、またはPTA-4574を有するアメリカン・タイプ・カルチャ-・コレクションに寄託されているハイブリドーマによって産生される抗体。

【請求項 50】

受託番号PTA-4572、PTA-4573、またはPTA-4574を有するアメリカン・タイプ・カルチャ-・コレクションに寄託されているハイブリドーマ。

40

【請求項 51】

配列番号1のアミノ酸配列を含む可変軽鎖および配列番号5のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含むEphA2抗体。

【請求項 52】

配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖および配列番号21のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む抗体。

【請求項 53】

EphA2と免疫特異的に結合する、配列番号2のアミノ酸配列を含むVL CDR1;配列番号3のアミノ酸配列を含むVL CDR2;配列番号4のアミノ酸配列を含むVL CDR3;配列番号6のアミノ酸配列を含むVH CDR1;配列番号7のアミノ酸配列を含むVH CDR2;および配列番号8のアミノ

50

酸配列を含むVH CDR3を含むEphA2抗体。

【請求項 5 4】

EphA2と免疫特異的に結合する、配列番号18のアミノ酸配列を含むVL CDR1;配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR2;配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR3;配列番号22のアミノ酸配列を含むVH CDR1;配列番号23のアミノ酸配列を含むVH CDR2;および配列番号24のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含むEphA2抗体。

【請求項 5 5】

EphA2と免疫特異的に結合する、1種または複数のCDRにある1、2、3、4、または5つの変異を有する請求項53または54に記載のEphA2抗体。

【請求項 5 6】

ヒト重鎖フレームワーク領域およびヒト軽鎖フレームワーク領域を含む請求項53または54に記載のEphA2抗体。

【請求項 5 7】

EphA2と免疫特異的に結合する、前記フレームワーク領域にある1、2、3、4、または5つの変異を有する請求項56に記載のEphA2抗体。

【請求項 5 8】

定常領域を含む請求項53または54に記載のEphA2抗体。

【請求項 5 9】

定常領域を含む請求項56に記載のEphA2抗体。

【請求項 6 0】

前記定常領域がヒトである、請求項58に記載のEphA2抗体。

【請求項 6 1】

前記定常領域がヒトである、請求項59に記載のEphA2抗体。

【請求項 6 2】

請求項53または54に記載のEphA2抗体の軽鎖可変ドメインまたは重鎖可変ドメインをコードするスクレオチド配列を含む単離核酸。

【請求項 6 3】

請求項62の核酸を含むベクター。

【請求項 6 4】

請求項63のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 6 5】

EphA2アゴニスト抗体を同定する方法であって、

a) EphA2を発現する細胞と、抗体-エピトープ結合に適した条件下でEphA2と特異的に結合する抗体とを接触させ；および

b) 前記細胞中のEphA2のホスホチロシン含有量を決定することを含み、

前記抗体と接触していないEphA2発現細胞に対する前記細胞中のEphA2のホスホチロシン含有量の増大の検出により、前記抗体がEphA2アゴニスト抗体であることを示す方法。

【請求項 6 6】

EphA2アゴニスト抗体を同定する方法であって、

a) EphA2を発現する細胞と、抗体-エピトープ結合に適した条件下でEphA2と特異的に結合する抗体とを接触させ；および

b) 前記細胞中のEphA2タンパク質の発現レベルを決定することを含み、

前記抗体と接触していないEphA2発現細胞に対する前記細胞中のEphA2タンパク質の発現レベルの低下の検出により、前記抗体がEphA2アゴニスト抗体であることを示す方法。

【請求項 6 7】

癌細胞表現型を阻害するEphA2抗体を同定する方法であって、

a) 軟寒天または三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中で培養したEphA2を発現する細胞と、抗体-エピトープ結合に適した条件下でEphA2と特異的に結合する抗体とを

10

20

30

40

50

接触させ；および

b)前記細胞の軟寒天でのコロニー形成または前記三次元基底膜もしくは細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の能力を決定することを含み、

前記抗体と接触していないEphA2発現細胞に対する前記細胞のコロニーまたは管状ネットワーク形成能力の低減の検出により、前記抗体が癌細胞表現型を阻害するEphA2抗体であることを示す方法。

【請求項 6 8】

癌細胞表現型を有する癌細胞を死滅させるEphA2抗体を同定する方法であって、

a)軟寒天中でコロニー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中で管状ネットワークを形成したEphA2を発現する癌細胞と、抗体-エピトープ結合に適した条件下でEphA2と特異的に結合する抗体とを接触させ；および

b)前記コロニーまたは管状ネットワークの低減を決定することを含み、

前記抗体と接触していないEphA2発現細胞のコロニーまたは管状ネットワークに対する前記コロニーまたは管状ネットワークの低減の検出により、前記抗体が癌細胞表現型を有する癌細胞を死滅させるEphA2抗体であることを示す方法。

【請求項 6 9】

癌細胞上に露出したEphA2エピトープと優先的に結合するEphA2抗体を同定する方法であって、

a)第1のグループの細胞が非癌細胞であり第2のグループの細胞が癌細胞である、EphA2を発現する2つのグループの細胞と接触させ；および

b)前記抗体のEphA2との結合能力を決定することを含み、

前記第1のグループの細胞ではなく前記第2のグループの細胞における抗体結合の検出により、前記抗体が癌細胞上に露出したEphA2エピトープと優先的に結合するEphA2抗体であることを示す方法。

【請求項 7 0】

前記決定に免疫蛍光顕微鏡検査法またはフロー・サイトメトリーを使用する、請求項69に記載の方法。

【請求項 7 1】

治療を必要とする患者の癌を治療する方法であって、前記患者に治療有効量のEphA2アンチセンス核酸分子を投与することを含む方法。

【請求項 7 2】

前記アンチセンス分子が配列番号49、またはその断片を含む、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

治療を必要とする患者の第1の治療に完全または部分的に不応性の癌を治療する方法であって、前記患者に治療有効量のEphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体であるEphA2抗体を投与することを含む第2の治療を適用することを含む方法。

【請求項 7 4】

前記第1の治療が、化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、または放射線療法である、請求項73に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記ホルモン療法がタモキシフェン投与を含む、請求項74に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記第2の治療が、化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、または放射線療法の投与を含む、請求項73に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記第1の治療を前記第2の治療と同時に投与する、請求項73に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 8】

治療を必要とする患者の非癌過剰増殖性細胞疾患または障害を治療する方法であって、前記患者に治療有効量のEphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体であるEphA2抗体を投与することを含む方法。

【請求項 7 9】

前記投与が、未治療非癌過剰増殖性細胞におけるEphA2リン酸化のレベルに比して非癌過剰増殖性細胞におけるEphA2リン酸化を増大させる、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記投与が、未治療非癌過剰増殖性細胞におけるEphA2発現のレベルに比して非癌過剰増殖性細胞におけるEphA2発現を低減させる、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記非癌過剰増殖性細胞が上皮細胞である、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記患者が、同じ組織型を有する非癌非過剰増殖性細胞に比してEphA2を過剰発現する非癌過剰増殖性細胞を有する、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記非癌過剰増殖性細胞疾患または障害が、喘息、乾癐、炎症性腸疾患、平滑筋再狭窄、内皮再狭窄、クローン病、または慢性閉塞性肺疾患である、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記EphA2抗体がモノクローナル抗体である、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記EphA2抗体が、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152である、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記EphA2抗体が、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152とEphA2結合について競合する、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記EphA2抗体がヒト化である、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記EphA2抗体が、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152である、請求項78に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記EphA2抗体がヒト抗体である、請求項78に記載の方法。

【請求項 9 0】

癌にかかっていることが分かっている、または疑わしい患者の癌のための療法の有効性を診断、予知またはモニターする方法であって、

a)前記患者の細胞と、EphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または抗体-EphA2結合に適した条件下で $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体であるEphA2抗体とを接触させ；また

b)前記細胞とのEphA2抗体結合を測定する

ことを含み、

対照よりも高いEphA2抗体結合レベルの検出により、患者が癌にかかっていることを示す方法。

【請求項 9 1】

前記細胞が、全血、痰、尿、血清または腫瘍細胞組織の細針吸引液由来である、請求項90に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記細胞が、前記患者由來の凍結もしくは固定組織または細胞である、請求項90に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 3】

前記検出が、前記患者における前記EphA2抗体結合の画像化を含む、請求項90に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記患者が転移癌を有する、請求項90に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記EphA2抗体が露出EphA2エピトープ抗体である、請求項90に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれている2002年5月10日出願の米国特許仮出願第60/379,322号、2002年10月14日出願の米国特許仮出願第60/418,213号、および2003年4月3日出願の米国特許仮出願第60/460,507号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】**1. 発明の分野**

本発明は、過剰増殖性細胞疾患、特に癌の治療、管理、または予防のために設計した方法および組成物に関する。本発明の方法は、EphA2アゴニストであり、癌細胞表現型(軟寒天中でのコロニー形成あるいはマトリゲル(登録商標；MATRIGEL)などの三次元基底膜または細胞外膜調製物中の管状ネットワーク形成など)を示し、非癌細胞に比して癌細胞上で選択的に露出または増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する、EphA2に特異的な有効量の1種または複数の抗体、好ましくはモノクローナル抗体の投与を含む。本発明はまた、1種もしくは複数の本発明のモノクローナル抗体を単独でまたは1種もしくは複数の癌治療に有用な他の薬剤と併せて含む医薬組成物を提供する。治療上有用なEphA2特異的抗体のための診断法およびスクリーニング法も提供されている。

【背景技術】**【0 0 0 3】****2. 発明の背景****癌**

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

【0 0 0 4】

毎年120万人以上のアメリカ人が癌を発症している。癌は、アメリカ合衆国では死因の第2位であり、現在の傾向が続いた場合、癌が2010年には死因の第1位になることが予想されている。アメリカ合衆国の男性では、肺および前立腺癌が癌の死因の第1位である。アメリカ合衆国の女性では、肺および乳癌が癌の死因の第1位である。アメリカ合衆国の2人に1人の男性は、彼の人生のある時点で癌と診断されることになる。アメリカ合衆国の3人に1人の女性は、彼女の人生のある時点で癌と診断されることになる。

【0 0 0 5】

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

【0 0 0 6】**転移**

最も生命にかかわる癌の形態は、腫瘍細胞の集団が体内の遠くのかつ異なる部位でコロ

10

20

30

40

50

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

【0007】

10

癌細胞シグナル伝達

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

20

【0008】

EphA2

30

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

40

【0009】

癌治療

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

50

vivoにおける腫瘍細胞挙動を確実に予測するものではない。

【0010】

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

10

【0011】

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

20

【0012】

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

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

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

40

【課題を解決するための手段】

【0014】

50

3. 発明の概要

EphA2は多くの悪性癌で過剰発現され、機能的に改変される。EphA2は腫瘍性タンパク質であり、癌細胞に転移能力を与えるのに十分である。EphA2はまた、他の過剰増殖細胞と関連しており、細胞過剰増殖によって引き起こされる疾患に関与している。悪性細胞上で過剰発現したEphA2は、リガンド結合に依存しないキナーゼ活性を示す。本発明者らは、EphA2レベルの低下により細胞の増殖および/または転移挙動が減少し得ることを発見した。特に、本発明者らは、驚くべきことに、EphA2に作用(agonize)する、すなわち、EphA2シグナル伝達を誘発する抗体は、実際にEphA2発現を低減させ、腫瘍細胞増殖および/または転移を阻害することを発見した。任意の作用のメカニズムに制約されることはないが、アゴニスト抗体は、EphA2自己リン酸化を誘導することによって過剰増殖または悪性細胞挙動を抑制でき、それによってその後のEphA2分解が引き起こされて発現がダウンレギュレートされる。したがって、一実施形態では、本発明のEphA2抗体は、EphA2シグナル伝達に作用し、EphA2のリン酸化を増大させる(「EphA2アゴニスト抗体」)。

【0015】

さらに、癌細胞は、非癌細胞のものと異なる表現型形質、例えば、軟寒天などの三次元基質中でのコロニー形成あるいは三次元基底膜またはマトリゲル(商標)などの細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワークまたは網様マトリックスの形成を示す。非癌細胞は、軟寒天中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中では異なる球様構造を形成する。したがって、本発明はまた、EphA2と特異的に結合し、軟寒天中のコロニー形成あるいは三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成などの1種または複数の癌細胞表現型を阻害する抗体を提供する(「癌細胞表現型阻害性EphA2抗体」)。こうした癌細胞表現型阻害性EphA2抗体に癌細胞を露出すると、これらの基質中でコロニー形成または管状ネットワーク形成する細胞の能力が抑制あるいは低減される。さらに、ある実施形態では、既に樹立した癌細胞コロニーにこうした癌細胞表現型阻害性EphA2抗体を加えると、存在している癌細胞コロニーの低減または除去が引き起こされる、すなわち、例えばネクローシスまたはアポトーシスによって過剰増殖および/または転移細胞の死滅がもたらされる。

【0016】

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

【0017】

本発明者らはまた、極めて低い K_{off} 速度でEphA2と結合する抗体がEphA2発現の低減および/またはEphA2分解の誘導に特に有効であり、それによって腫瘍細胞増殖および/または転移ならびに/または過剰増殖性細胞の増殖が阻害されることも発見した。したがって、本発明は、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合し、好ましくはEphA2アゴニストである抗

10

20

30

40

50

体をさらに提供する。

【0018】

本発明は、EphA2と結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出もしくは増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する抗体、好ましくはモノクローナル抗体のスクリーニングならびに同定を提供する。特に、本発明の抗体は、EphA2の細胞外ドメインと結合し、好ましくはEphA2シグナル伝達およびEphA2自己リン酸化を誘発し、癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する。

【0019】

一実施形態では、本発明の抗体は、表6に記載したものである。好ましい実施形態では、本発明の抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、およびEph099B-233.152である。より好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。最も好ましい実施形態では、本発明の抗体は、ヒト化Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、およびEph099B-233.152である。

【0020】

したがって、本発明は、EphA2と特異的に結合し作用(agonize)し、癌細胞表現型(軟寒天中のコロニー形成あるいはマトリゲル(商標)などの三次元基底膜または細胞外膜調製物中の管状ネットワーク形成など)を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出もしくは増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する1種または複数の抗体を投与することを含む、被験者のEphA2の過剰発現に関連する疾患、特に癌、特に転移癌を予防、治療または管理するために設計した医薬組成物ならびに予防および治療レジメン(regimen)に関する。好ましい実施形態では、EphA2抗体は、軟寒天中で既に形成しているコロニーのサイズを縮小させ、かつ/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中の管状ネットワーク形成の規模を低減させる。一実施形態では、癌は、上皮細胞起源である。別の実施形態では、癌は、皮膚、肺、大腸、前立腺、乳房、膀胱、または膵臓の癌であり、あるいは腎細胞癌または黒色腫である。好ましい実施形態では、予防、治療、または管理すべき癌中の癌細胞は、EphA2を過剰発現する。好ましい実施形態では、細胞-細胞接触の減少、細胞下局在の改変、またはリガンドに対するEphA2量の増大の結果として、EphA2にはリガンドと結合していないものもある。好ましい実施形態では、本発明の方法は、腫瘍の転移を予防、治療、または管理するのに使用する。本発明の抗体は、1種または複数の他の癌療法と併せて投与することができる。特に、本発明は、被験者の癌を予防、治療、または管理する方法であって、前記被験者に、本発明のEphA2抗体の投与以外の、治療もしくは予防有効量の1種もしくは複数の化学療法、ホルモン療法、生物学的療法/免疫療法および/または放射線療法の適用と併せて、あるいは手術と併せて、治療もしくは予防有効量の1種もしくは複数の本発明のEphA2抗体を投与することを含む方法を提供する。

【0021】

他の実施形態では、本発明のEphA2抗体は、それだけには限らないが、喘息、慢性閉塞性肺疾患、再狭窄(平滑筋および/または内皮)、乾癐など細胞過剰増殖と関連している非癌疾患または障害を治療、予防および/または管理するのに使用する。好ましい実施形態では、過剰増殖性細胞は、上皮のものである。好ましい実施形態では、過剰増殖性細胞は、EphA2を過剰発現する。好ましい実施形態では、細胞-細胞接触の減少、細胞下局在の改変、またはEphA2リガンドに対するEphA2量の増大の結果として、EphA2にはリガンドと結合していないものもある。

【0022】

本発明の方法および組成物は、未治療の患者だけでなく、それだけには限らないが、化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、放射線療法、および/または手術を含めた現在の標準的かつ実験的な癌療法に対して部分的または完全に不応性である患者の治療にも有用であり、同様にこうした治療の有効性を改善するためにも有用である。特に、EphA2発現

10

20

30

40

50

は、サイトカインIL-6のレベル増大に関係しており、それは化学療法およびホルモン療法などの異なる治療レジメンに対する癌細胞耐性の発生に関連している。さらに、EphA2過剰発現は、エストロゲン受容体活性の必要性を覆し、それによって乳癌細胞のタモキシフェン耐性に寄与し得る。したがって、好ましい実施形態では、本発明は、本発明のEphA2抗体の投与を含むもの以外の治療に対して不応性または非応答性であることが分かっているまたはそうであり得る癌を治療または予防するための治療および予防法を提供する。特定の実施形態では、1種または複数の本発明のEphA2抗体は、非EphA2系治療、特にタモキシフェン治療または耐性がIL-6レベルの増大に関連する治療に対して不応性または非応答性である患者に投与して、その患者を反応性または応答性にする。その後、患者が既に不応性または非応答性であった治療を、治療効果と共に施すことができる。

10

【0023】

さらに、本発明は、本発明のEphA2抗体についてのスクリーニング法を提供する。特に、抗体を、通常の免疫手法を用いてEphA2、特にEphA2の細胞外ドメインとの結合についてスクリーニングすることができる。一実施形態では、アゴニストEphA2抗体を同定するために、EphA2抗体を、EphA2シグナル伝達、例えば、EphA2リン酸化の増大および/またはEphA2の分解を誘発する能力についてスクリーニングすることができる。

20

【0024】

別の実施形態では、抗体を阻害する癌細胞表現型を同定するために、抗EphA2抗体を、癌細胞の軟寒天中でのコロニー形成の抑制もしくは低減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中での管状ネットワーク形成の低減もしくは阻害の能力について、あるいは癌表現型の低減を検出する任意の他の方法、例えば、細胞増殖の接触阻害の増大(例えば、単層細胞培養におけるコロニー形成の減少)を検出する任意のアッセイでスクリーニングすることができる。好ましい実施形態では、抗体を、軟寒天中で存在するコロニーのサイズの低減あるいは三次元基底膜または細胞外マトリックス調製物中の規模(extent)または管状マトリックス形成の低減、特に細胞(特に癌細胞、より具体的には転移癌細胞だが他の過剰増殖性細胞も含む)ネクローシスまたはアポトーシスの誘導の能力についてスクリーニングする。さらに、抗体を、他の抗癌剤、例えば、ホルモン性、化学療法的、生物学的または他の抗癌剤の存在下で、軟寒天中でのコロニー形成および/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中の管状ネットワーク形成を阻害または低減するそれらの能力についてスクリーニングすることができる。

30

【0025】

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

40

【0026】

別の実施形態では、当技術分野でよく知られている抗体結合カイネティック・アッセイ(例えば、BIACORE(商標)アッセイなどの表面プラズモン共鳴系アッセイ)を用いて抗体をスクリーニングして、 K_{off} 速度が $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満の抗体を同定する。

【0027】

他の実施形態では、本発明は、例えば限定する目的ではないが、EphA2に特異的なアンチセンス核酸、EphA2発現のRNA干渉を媒介する二本鎖EphA2 RNA、抗EphA2リボザイムなど、EphA2タンパク質レベルを低減させる本発明のEphA2抗体以外の治療薬、ならびに他のEp

50

hA2阻害剤、例えばEphA2の小分子阻害剤を投与することによって癌を治療、予防、または管理する方法を提供する。

【0028】

本発明者らは、EphA2発現の増大がフィブロネクチン発現の増大と相関関係があることも発見した。さらに、高レベルの外来性フィブロネクチンにより、軟寒天中でコロニーを形成する細胞の能力が増大するが、細胞-フィブロネクチン結合の特異的な阻害剤により、軟寒天での腫瘍由来癌細胞のコロニー形成が減少する。したがって、フィブロネクチンは、異なる環境での腫瘍細胞コロニー形成、例えば、遠位転移の形成および増殖を適応させるように思われる。したがって、特定の実施形態では、本発明は、単独でまたは本発明のEphA2抗体と併せて、細胞-フィブロネクチン結合および/またはフィブロネクチン発現を抑制する薬剤を投与することによって癌、特に転移性疾患を治療、予防、または管理する方法を提供する。

【0029】

本発明は、本発明のEphA2抗体を用いてEphA2系またはEphA2系ではない癌治療の有効性を評価する診断法をさらに提供する。一般に、EphA2発現の増大は、ますます侵襲性および転移性の癌に関連している。したがって、特定の治療によるEphA2発現の低減は、その治療が癌の侵襲性および/または転移能力を低減させることを示唆する。本発明の診断法は、癌の経過または癌治療の結果を予知または予測するために使用することができる。特定の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化および位置決めする方法ならびに原発腫瘍部位から遠位の組織および体液、例えば、全血、痰、尿、血清、細針吸引液(すなわち、生検)を用いて診断および予測する方法(ならびに原発腫瘍の組織および体液を用いる方法)を提供する。他の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化および位置決めする方法ならびにin vivoにおける診断および予測方法を提供する。こうした実施形態では、本発明の抗体、好ましくは露出EphA2エピトープ抗体を用いて原発転移性腫瘍を検出する。本発明の抗体は、凍結もしくは固定した細胞の免疫組織化学分析または組織アッセイに使用することもできる。さらに、本発明の抗体および診断法は、非癌過剰増殖性疾患(特にEphA2過剰発現に関連する)、例えばそれだけには限らないが、喘息、乾癐、再狭窄、慢性閉塞性肺疾患などの療法(EphA2系療法であろうと非EphA2系療法であろうと)を診断、予知またはモニターするのに使用することもできる。

【0030】

別の実施形態では、本発明の医薬組成物または診断試薬を含むキットを提供する。

【0031】

3.1 定義

本明細書では、「アゴニスト」という用語は、別の分子の活性、活性化または機能を増大させるタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、抗体断片、大分子、または小分子(10kD未満)を含む任意の化合物を意味する。EpbA2アゴニストは、EphA2タンパク質のリン酸化および分解の増大を引き起こす。EphA2に作用(agonize)するEphA2抗体は、癌細胞表現型(例えば、軟寒天中のコロニー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中の管状ネットワーク形成)も阻害するかもしれないししないかもしれない、非癌細胞に対して癌細胞中で露出したEphA2エピトープと優先的に結合するかもしれないししないかもしれない、K_{off}速度が低いかもしれないし低くないかもしれない。

【0032】

本明細書では、「EphA2と免疫特異的に結合する抗体またはその断片」という用語は、EphA2ポリペプチドまたはEphA2ポリペプチドの断片と特異的に結合し、他の非EphA2ポリペプチドと特異的に結合しない抗体またはその断片を意味する。EphA2ポリペプチドまたはその断片と免疫特異的に結合する抗体または断片は、他の抗原と非特異的に交差反応しないことが好ましい(例えば、適切なイムノアッセイで結合が非EphA2タンパク質、例えばBSAと競合できない)。EphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体または断片は、例えば、イムノアッセイまたは当業者に周知の他の技法によって同定することができる。本発明の抗体には、それだけには限らないが、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え產生抗

10

20

30

40

50

体、細胞内発現抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、単鎖Fv(scFv)(二重特異性scFvを含む)、単鎖抗体Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、および抗イディオタイプ(抗Id)抗体、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合断片がある。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活性部分、すなわち、EphA2抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位(例えば、1種または複数の抗EphA2抗体の相補性決定領域(CDR))を含む分子がある。EphA2ポリペプチドまたはその断片と免疫特異的に結合するアゴニスト抗体またはその断片は、優先的にEphA2に作用(agonize)し、他の活性に著しく作用しないことが好ましい。

【0033】

10

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

【0034】

20

本明細書では、「癌細胞表現型阻害」という表現は、癌細胞の軟寒天中のコロニー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中の管状ネットワーク形成を抑制もしくは低減する化合物の能力あるいは癌細胞表現型の低減を検出する任意の他の方法、例えば、細胞増殖の接触阻害の増大(例えば、単層細胞培養におけるコロニー形成の減少)を検出するアッセイを意味する。癌細胞表現型阻害化合物は、軟寒天中の樹立した癌細胞コロニー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中の管状ネットワーク形成の範囲に加えたとき、コロニーの低減または除去も引き起こし得る。癌細胞表現型を阻害するEphA2抗体は、EphA2にも作用するかもしれないししないかもしれない、 K_{off} 速度が低いかもしれないし低くないかもしれない。

30

【0035】

30

本明細書では、「誘導体」という用語は、アミノ酸残基置換、欠失または付加(すなわち、変異)の導入によって改変された、EphA2ポリペプチドのアミノ酸配列、EphA2ポリペプチドの断片、EphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体、またはEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体断片を含むポリペプチドを意味する。いくつかの実施形態では、抗体誘導体またはその断片は、1種または複数のCDRにおいてアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む。抗体誘導体は、非誘導体抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有するかもしれない。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異させた)。本明細書では、「誘導体」という用語はまた、すなわち、ポリペプチドへの任意のタイプの分子の共有結合によって改変されたEphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、EphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体、またはEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体断片を意味する。例えば、限定する目的ではないが、EphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片は、例えば、グリコシリ化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合などによって改変することができる。EphA2ポリペプチドの誘導体、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片は、それだけには限らないが、特異的な化学切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む当業者に周知の技法を用いて化学修飾によって改変することができる。さらに、EphA2ポリペプチドの誘導体、EphA2ポリペプチドの断片、抗

40

50

体、または抗体断片には、1種または複数の非古典的アミノ酸が含まれていてよい。一実施形態では、ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載のEphA2ポリペプチド、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、もしくは抗体断片と類似したまたは同一の機能をもっている。別の実施形態では、EphA2ポリペプチドの誘導体、EphA2ポリペプチドの断片、抗体、または抗体断片は、未改变ポリペプチドと比較すると、改变された活性を有する。例えば、誘導体抗体またはその断片は、そのエピトープとよりしっかりと結合し、あるいはタンパク質分解に対しより耐性があり得る。

【0036】

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

【0037】

本明細書に記載の「断片」には、EphA2ポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5個の連続アミノ酸残基、少なくとも10個の連続アミノ酸残基、少なくとも15個の連続アミノ酸残基、少なくとも20個の連続アミノ酸残基、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、少なくとも40個の連続アミノ酸残基、少なくとも50個の連続アミノ酸残基、少なくとも60個の連続アミノ残基、少なくとも70個の連続アミノ酸残基、少なくとも80個の連続アミノ酸残基、少なくとも90個の連続アミノ酸残基、少なくとも100個の連続アミノ酸残基、少なくとも125個の連続アミノ酸残基、少なくとも150個の連続アミノ酸残基、少なくとも175個の連続アミノ酸残基、少なくとも200個の連続アミノ酸残基、もしくは少なくとも250個の連続アミノ酸残基のアミノ酸配列またはEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体を含むペプチドまたはポリペプチドがある。抗体断片はエピトープ結合断片であることが好ましい。

【0038】

本明細書では、「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有するキメラ抗体である非ヒト(例えば、ネズミ)抗体の形態を意味する。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基を、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト靈長類などの非ヒト種(ドナー抗体)由来の超可変領域残基と置き換えたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基を対応する非ヒト残基と置き換える。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体中で見られない残基を含むことができる。これらの改変は、抗体性能をさらに改良するために行う。一般に、ヒト化抗体は、すべてまたは実質的にすべての超可変領域が非ヒト免疫グロブリンのものと対応し、すべてまたは実質的にすべてのFRがヒト免疫グロブリン配列のものである、実質的にすべての少なくとも1種、通常2種の可変ドメインを含むはずである。ヒト化抗体は、場合によっては、免疫グロブリン定常領域(Fc)、通常アミノ酸残基置換、欠失または付加(すなわち、変異)の導入によって改変されたEphA2ポリペプチドと免疫特異的に結合するヒト免疫グロブリンのものの一部分も含むはずである。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は誘導体である。このようなヒト化抗体は、1種もしくは複数の非ヒトCDRにおけるアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有するかもしれない。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異させた)。ヒト化抗体のさらなる詳細については、欧州特許EP 239,400、EP 592,106、およびEP 519,596;国際公開WO 91/09967およびWO 93/17105;米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、第5,565,332号、第5,585,089号、第5,766,886号、および第6,407,213号;ならびにPadlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5): 50

489-498; Studnicka et al.,
 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25; Caldas et al., 2000, Protein Eng. 13:353-60; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84; Roguska et al., 1996, Protein Eng. 9:895-904; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s; Couto et al., 1995, Cancer Res. 55:1717-22; Sandhu, 1994, Gene 150:409-10; Pedersen et al., 1994, J. Mol. Biol. 235:959-73; Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988, Nature 332:323-329; および Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596を参照のこと。

【0039】

10

本明細書では、「超可変領域」という用語は、抗原結合に対し反応性の抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基24~34(L1)、50~56(L2)および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメインの31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))および/または「超可変ループ」由来の残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメインの26~32(H1)、53~55(H2)および96~101(H3); Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917)を含む。Eph099B208.261およびEph099B-233.152のCDR残基を表1に記載する。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書で定義した超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

20

【0040】

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

30

【0041】

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

40

【0042】

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

【0043】

本明細書では、「非応答性/不応性」という表現は、患者が追加の有効な療法を必要とするほどその療法がこれらの患者を治療するのに臨床的に十分ではない、例えば療法の影響を受けないままである、化学療法、放射線療法、手術、ホルモン療法および/または生物学的療法/免疫療法などの1種または複数の現在利用可能な療法(例えば、癌療法)、特に特定の癌に対する標準的な治療レジメンで治療した患者の状態を説明するのに使用する。

50

この表現は、療法に応答するが、さらに副作用に苦しみ、再発し、耐性を生じるなどといった患者についても記載することができる。様々な実施形態では、「非応答性/不応性」は、癌細胞の少なくともある顕著な部分が死滅またはそれらの細胞分裂が停止していないことを表す。このような関係において「不応性」の当技術分野で許容されている意味を用いて、癌細胞が「非応答性/不応性」かどうかの決定は、癌細胞に対する治療の有効性をアッセイするための当技術分野で周知の任意の方法によって *in vivo* または *in vitro* で行うことができる。様々な実施形態では、癌は「非応答性/不応性」であり、その場合、癌細胞数は、治療中に著しく減少せず、あるいは増加している。

【0044】

本明細書では、「増強」という用語は、その通常のまたは承認された用量での治療薬の有効性の改善を意味する。10

【0045】

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

【0046】

本明細書では、「予防薬」という用語は、EphA2過剰発現および/または細胞過剰増殖性疾患、特に癌に関連する疾患または障害の発症、再発または転移の予防に使用できる任意の薬剤を意味する。ある実施形態では、「予防薬」という用語は、EphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体(例えば、Eph099B102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれか)を意味する。他のある実施形態では、「予防薬」という用語は、癌化学療法剤、放射線療法、ホルモン療法、生物学的療法(例えば、免疫療法)、および/または本発明のEphA2抗体を意味する。他の実施形態では、2種以上の予防薬を併用して投与することができる。20

【0047】

本明細書では、「予防有効量」は、細胞過剰増殖性疾患、好ましくは癌の発症、再発または転移の予防をもたらすのに十分な予防薬の量を意味する。予防有効量は、それだけには限らないが、過剰増殖性疾患の素因がある、例えば、遺伝的に癌の素因がある、または以前発癌物質に曝露したものを含む過剰増殖性疾患、特に癌の発症、再発または転移を予防するのに十分な予防薬の量を意味することもできる。予防有効量はまた、過剰増殖性疾患の予防において予防的利益をもたらす予防薬の量を意味することもできる。さらに、本発明の予防薬に対する予防有効量は、過剰増殖性疾患の予防において予防的利益をもたらす予防薬単独、または他の薬剤と併せた量を表す。本発明のEphA2抗体の量と関連して使用する場合、この用語は、全予防法を改善し、あるいは別の予防薬との相乗効果の予防有効性を高める量を含むことができる。30

【0048】

本明細書では、「プロトコル」には、投与スケジュールおよび投与レジメンが含まれる。40

【0049】

本明細書では、「副作用」という表現は、予防または治療薬の望ましくない有害な作用を含む。有害な作用は、常に望ましくないが、望ましくない作用は必ずしも有害ではない。予防または治療薬による有害な作用は、有害または不快または危険であるかもしれない。化学療法による副作用には、それだけには限らないが初期および後期形成下痢および膨満などの胃腸毒性、恶心、嘔吐、摂食障害、白血球減少、貧血、好中球減少、無力症、腹部痙攣、発熱、疼痛、体重減少、脱水症、脱毛症、呼吸困難、不眠症、眩暈、粘膜炎、口内乾燥、および腎不全、ならびに便秘、神経および筋肉作用、腎臓および膀胱への一時的または永久的な損傷、流感様症状、体液貯留、および一時的または永久的な不妊症があるが、それだけには限定されない。放射線療法による副作用には、疲労、口内乾燥、および食欲減少があるが、それだけには限定されない。生物学的療法/免疫療法による副作用に50

は、投与部位の発疹または腫張、発熱、悪寒および疲労などの流感様症状、消化管問題およびアレルギー反応があるが、それだけには限定されない。ホルモン療法による副作用には、恶心、受精能力問題、うつ病、食欲減少、眼の問題、頭痛、および体重変動があるが、それだけには限定されない。患者が通常経験する別の望ましくない作用は非常に多く、当技術分野で周知である。それらの多くはPhysicians' Desk Reference(56th ed., 2002)に記載されている。

【0050】

本明細書では、「単鎖Fv」または「scFv」という用語は、單一ポリペプチド鎖中に存在する抗体のVHおよびVLドメインを含む抗体断片を意味する。一般に、Fvポリペプチドは、抗原結合するのに望ましい構造をscFvが形成することを可能にするVHおよびVLドメインの間のポリペプチドリンクをさらに含む。scFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. SpringerVerlag, New York, pp. 269-315(1994)を参照のこと。特定の実施形態では、scFvは、二重特異性scFvおよびヒト化scFvを含む。

【0051】

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

【0052】

本明細書では、「治療する」、「治療している」および「治療」という用語は、1種または複数の治療薬の投与によってもたらされる疾患もしくは障害の症状の根絶、軽減または回復、特に原発性、局所性もしくは転移癌組織の根絶、除去、改変、または制御を表す。ある実施形態では、こうした用語は、このような疾患にかかっている被験者への1種もしくは複数の治療薬の投与によってもたらされる癌の転移の最小化または遅延を意味する。

【0053】

本明細書では、「治療薬」という用語は、EphA2の過剰発現および/または細胞過剰増殖性疾患もしくは障害、特に癌に関連する疾患または障害の予防、治療、または管理に使用できる任意の薬剤を意味する。ある実施形態では、「治療薬」という用語は、EphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体(例えば、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれか)を意味する。他のある実施形態では、「治療薬」という用語は、癌化学療法剤、放射線療法、ホルモン療法、生物学的療法/免疫療法、および/または本発明のEphA2抗体を意味する。他の実施形態では、2種以上の治療薬を併せて投与することができる。

【0054】

本明細書では、「治療有効量」は、EphA2過剰発現および/または細胞過剰増殖性疾患に関連する疾患または障害を治療または管理するのに十分な治療薬の量、好ましくは原発性、局所性もしくは転移癌組織を破壊、改変、制御または除去するのに十分な量を意味する。治療有効量は、過剰増殖性疾患の発症の遅延または最小化、例えば、癌の転移の遅延または最小化に十分な治療薬の量を意味することができる。治療有効量はまた、癌の治療または管理において治療的利益をもたらす治療薬の量を意味することもできる。さらに、本発明の治療薬に対する治療有効量は、過剰増殖性疾患または癌の治療または管理において治療的利益をもたらす治療薬単独、または他の療法と併せた量を表す。本発明のEphA2抗体の量と関連して使用する場合、この用語は、全療法を改善し、望ましくない作用を軽減または回避し、あるいは別の治療薬との相乗効果の治療有効性を高める量を含むことができる。

【0055】

4. 図面の簡単な説明

10

20

30

40

50

(後記参照のこと。)

【発明を実施するための最良の形態】

【0056】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、癌細胞中でのEphA2発現レベルを低下させることによってEphA2モノクローナル抗体が癌細胞増殖および侵襲性を阻害できるという本発明者らの発見に部分的に基づいている。EphA2活性の低減によって、悪性癌細胞増殖が選択的に阻害される。特に、こうしたEphA2レベルの低下は、EphA2アゴニスト・モノクローナル抗体を用いて達成することができる。任意の作用のメカニズムによって制約されるものではないが、この細胞増殖および/または転移の阻害は、EphA2シグナル伝達を刺激(すなわち、アゴナイズ(agonize))することによって達成され、それによってEphA2リン酸化が引き起こされ、EphA2の分解がもたらされる。癌細胞増殖は、EphA2レベルの低下、したがって、リガンドと無関係のEphA2シグナル伝達の低減によって低減される。EphA2活性の低減は、EphA2癌細胞表現型阻害抗体または非癌細胞ではなく癌細胞上に露出したEphA2エピトープと優先的に結合する抗体を用いて達成することもできる。さらに、低 K_{off} (例えば、 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 未満)でEphA2と結合する抗体もEphA2レベルを低下させることができる。

10

【0057】

したがって、本発明は、EphA2の過剰発現および/または細胞過剰増殖性疾患および障害に関連する疾患および障害の治療、阻害、および管理をもたらす方法および組成物に関する。本発明の特定の態様は、癌細胞増殖および浸潤、特にEphA2を過剰発現する癌細胞を阻害する化合物を含む方法ならびに組成物に関する。本発明はさらに、上皮細胞起源の癌、特に乳房、肺、皮膚、前立腺、膀胱、および膵臓のヒト癌、ならびに腎細胞癌および黒色腫の転移を治療、阻害、または管理するための方法および組成物に関する。本発明のさらなる組成物および方法には、本発明のEphA2抗体と併せて他のタイプの有効成分が含まれる。他の実施形態では、本発明の方法を、細胞過剰増殖に関連する他の疾患または障害、例えばそれだけには限らないが喘息、乾癇、再狭窄、COPDなどを治療、予防または管理するのに使用する。

20

【0058】

本発明はまた、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、および生物学的療法など現在のまたは標準的な癌治療に対して部分的または完全に不応性になる癌または他の過剰増殖性細胞障害または疾患を治療、阻害および管理するための方法に関する。

30

【0059】

本発明は、本発明のEphA2抗体、特に露出EphA2エピトープ抗体を用いてEphA2系または非EphA2系の癌治療の有効性を評価する診断法をさらに提供する。本発明の診断法は、癌進行を予知または予測するのに使用することもできる。特定の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化および位置決め(localizing)する方法ならびに原発腫瘍部位から遠位の組織および体液を用いて診断および予測する方法(ならびに原発腫瘍の組織および体液を用いる方法)を提供する。他の実施形態では、本発明の診断法は、転移を画像化および位置決めする方法ならびにin vivoにおける診断および予測方法を提供する。

40

【0060】

別の実施形態では、本発明は、細胞の軟寒天中でのコロニー形成ならびに/またはマトリゲル(商標)などの三次元基底膜および細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成を低減する能力についてのスクリーニング剤による抗癌剤、特に抗転移癌剤についてのスクリーニング法を提供する。好ましい実施形態では、本発明は、生存細胞の軟寒天中でのコロニー形成および/または三次元基底膜中の管状ネットワーク形成の範囲を低減する能力についてのアッセイによる過剰増殖性疾患および障害を治療および予防するための薬剤についてのスクリーニング法を提供する。本発明者らは、細胞の軟寒天中でのコロニー形成および/またはマトリゲル(商標)中の管状ネットワーク形成の阻害は、転移抑制活性のはるかに優れた指標であり、標準的な細胞培養アッセイによって同定されないはずである潜在的な転移抑制剤を同定できることを発見した。

50

【 0 0 6 1 】

5.1 抗体

上記で論じたように、本発明は、EphA2シグナル伝達(「EphA2アゴニスト抗体」)に免疫特異的に結合し作用(agonize)し;癌細胞表現型を阻害、例えば、軟寒天中でのコロニー形成または三次元基底膜もしくはマトリゲル(商標)などの細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成を阻害し(「癌細胞表現型阻害抗体」);非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出または増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し(「露出EphA2エピトープ抗体」);かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体(好ましくはモノクローナル抗体)またはその断片の投与を含む。一実施形態では、抗体は、EphA2の細胞外ドメインと結合し、好ましくは、さらにEphA2に作用(agonize)し、例えば、EphA2リン酸化を増大させ、好ましくは、EphA2分解を引き起こす。別の実施形態では、抗体は、EphA2の細胞外ドメインと結合し、好ましくは、さらに阻害し、さらにより好ましくは軟寒天中でのコロニー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中の管状ネットワーク形成の範囲を低減させる(例えば、ネクローシスおよびアポトーシスなどの細胞死滅メカニズムによって)。他の実施形態では、抗体は、ホルモン、生物学的、化学療法剤または他の薬剤などの別の抗癌剤の存在下で癌細胞表現型を阻害または低減させる。別の実施形態では、抗体は、癌細胞では露出しているが、非癌細胞では封入されているエピトープでEphA2の細胞外ドメインと結合する。特定の実施形態では、抗体はEA2ではない。別の実施形態では、抗体は、好ましくは $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、より好ましくは $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2の細胞外ドメインと結合する。他の実施形態では、抗体は、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-3} s^{-1} 未満、 $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-4} s^{-1} 未満、 $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-5} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-6} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-7} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-8} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-9} s^{-1} 未満、または 10^{-10} s^{-1} 未満の K_{off} でEphA2と結合する。

【 0 0 6 2 】

より好ましい実施形態では、抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかである。別の実施形態では、例えばELISAまたは任意の他の適切なイムノアッセイによってアッセイしたように、抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかと結合したエピトープと結合し、かつ/またはEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかとEphA2結合について競合する。他の実施形態では、本発明の抗体は、EphA2シグナル伝達と免疫特異的に結合し作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出または増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有し、またEphA2リガンド、例えばエフリンA1と結合について競合するかもしれないししないかもしれない。

【 0 0 6 3 】

Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、およびEph099B-210.248を產生するハイブリドーマは、特許手続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の下で2002年8月7日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108)に寄託されており、それぞれ受託番号PTA-4572、PTA-4573、およびPTA-4574が指定され、参照により組み込まれている。Eph099B-233.152を產生するハイブリドーマは、特許手続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の下で2003年5月12日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108)に寄託されており、受託番号_が指定され、参照により組み込まれている。Eph099B-208.261およびEph099B-233.152のVLおよびVHのアミノ酸および核酸配列を、図19A~19Dに示す。Eph099B-208.261およびEph099B-233.152 CDRの配列を、表1に示す。最も好ましい実施形態では、抗体は、ヒトであり、またはヒト化されている。

【 0 0 6 4 】

本発明の抗体には、それだけには限らないが、モノクローナル抗体、合成抗体、組換え

10

20

30

40

50

產生抗体、細胞内発現抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、単鎖Fv(scFv)(二重特異性scFvを含む)、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、および上記のいずれかのエピトープ結合断片がある。特に、本発明の方法で使用する抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫活性部分、すなわち、EphA2と免疫特異的に結合し、EphA2のアゴニストであり、癌細胞表現型を阻害または低減し、非癌細胞ではなく癌細胞上で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗原結合部位を含有する分子を含む。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ってよい。

10

【0065】

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

20

【0066】

本発明の方法に使用する抗体は、単一特異性、二重特異性、三重特異性またはより多い多重特異性であってよい。多重特異性抗体は、EphA2ポリペプチドの異なるエピトープと免疫特異的に結合でき、あるいはEphA2ポリペプチドならびに異種ポリペプチドまたは固体支持物質などの異種エピトープの両方と免疫特異的に結合することができる。例えば、国際公開WO 93/17715、WO 92/08802、WO 91/00360、およびWO 92/05793; Tutt, et al., 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 Kostelnik et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553を参照のこと。

30

【0067】

特定の実施形態では、本発明の方法で使用する抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれか、あるいはその抗原結合断片(例えば、前記の本発明の抗体の1種または複数の相補性決定領域(CDR); 例えば、表1を参照のこと)である。別の実施形態では、本発明の方法で使用するアゴニスト抗体は、例えばELISAアッセイで、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかと同じエピトープと結合し、またはEphA2との結合についてEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかと競合する。

30

【0068】

本発明はまた、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を含み、前記抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152または表6に記載の抗体のいずれかのVH CDRのうちのいずれか1種のアミノ酸配列を有するVH CDRを含む。本発明はまた、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体の使用を含み、前記抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152または表6に記載の抗体のいずれかのVL CDRのうちのいずれか1種のアミノ酸配列を有するVL CDRを含む。本発明はまた、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体の使用を含み、前記抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152または表6に記載の抗体のいずれかの1種または複数のVH CDRおよび1種または複数のVL CDRを含

40

50

【 0 0 6 9 】

一実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号2のアミノ酸配列を有するVL CDR1を含む。別の実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号2のアミノ酸配列を有するVL CDR1を含む。別の実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む。別の実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を有するVH CDR1および配列番号4のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。

(0 0 7 0)

別の実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合し EphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出した EphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または 3×10^{-3} s⁻¹未満のK_{off}で EphA2と結合する抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を有する VH CDR1およ

エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合する抗体は、配列番号24のアミノ酸配列を有するVH CDR3および配列番号19のアミノ酸配列を有するVL CDR2を含む。別の実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、癌細胞に露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合する抗体は、配列番号24のアミノ酸配列を有するVH CDR3および配列番号20のアミノ酸配列を有するVL CDR3を含む。

【0075】

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

【0076】

本発明はまた、当業者に周知のフレームワーク領域を含む本発明の抗体またはその断片を提供する。本発明の抗体またはその断片がヒトまたはヒト化であることが好ましい。特定の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれか(または任意の他のEphA2アゴニスト抗体もしくはEphA2癌細胞表現型阻害抗体もしくは $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合するEphA2抗体)由来の1種または複数のCDRを含み、EphA2と結合し、好ましくはEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合する。

【0077】

本発明は、ラクダ化單一ドメイン抗体を含む單一ドメイン抗体を含む(例えば、その全体が参照により本明細書に取り込まれるMuyldermands et al., 2001, Trends Biochem. Sci. 26:230; Nuttall et al., 2000, Cur. Pharm. Biotech. 1:253; Reichmann and Muyldermands, 1999, J. Immunol. Meth. 231:25;国際公開WO 94/04678およびWO 94/25591;米国特許第6,005,079号を参照のこと)。一実施形態では、本発明は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれか(または任意の他のEphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、もしくは $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合するEphA2抗体)のVHドメインのいずれかのアミノ酸配列を有する2つのVHドメインを含む單一ドメイン抗体を單一ドメイン抗体が形成されるような改変を伴って提供する。別の実施形態では、本発明はまた、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれか(または任意の他のEphA2アゴニスト抗体、EphA2癌細胞表現型阻害抗体、露出EphA2エピトープ抗体、もしくは $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合するEphA2抗体)の1種または複数のVH CDRを含む2つのVHドメインを含む單一ドメイン抗体を提供する。

【0078】

本発明の方法はまた、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて15日以上、好ましくは20日以上、25日以上、30日以上、35日以上、40日以上、45日以上、2ヶ月以上、3ヶ月以上、4ヶ月以上、または5ヶ月以上の半減期(例えば、血清半減期)を有する抗体またはその断片の使用を含む。哺乳動物、好ましくはヒトにおける本発明の抗体またはその断片の半減期が増大すると、哺乳動物において前記抗体または抗体断片の血清価がより高くなり、したがって、前記抗体もしくは抗体断片の投与頻度が減り、かつ/または投与すべき前記抗体もしくは抗体断片の濃度が下がる。in vivo半減期が増大した抗体またはその断片は、当業者に周知の技法によって生成することができる。例えば、in vivo半減期が増大した抗体またはその断片は、FcドメインとFcRn受容体との相互作用に関与するものと認められるアミノ酸残基を改変(例えば、置換、欠失または付加)することによって生成することができ

10

20

30

40

50

る(例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる国際公開WO 97/34631およびWO 02/060919を参照のこと)。in vivo半減期が増大した抗体またはその断片は、前記抗体または抗体断片に高分子量ポリエチレングリコール(PEG)などのポリマー分子を結合することによって生成することができる。PEGは、PEGと前記抗体もしくは抗体断片のNもしくはC末端との部位特異的結合によってまたはリジン残基上に存在するイブシロン-アミノ基を介して、多機能リンカーを用いてまたは用いないで前記抗体もしくは抗体断片と結合させることができる。生物学的活性の最小損失をもたらす直鎖状または分枝状ポリマー誘導体化を使用することになる。結合の度合いは、SDS-PAGEおよび質量分析によって密接にモニターして、PEG分子と抗体との正常な結合を確実にする。未反応PEGは、例えば、サイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーによって抗体-PEG結合体から分離することができる。

【0079】

本発明はまた、可変領域に変異(例えば、1種または複数のアミノ酸置換)があるEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかの一方または両方の可変ドメインのアミノ酸配列を含む抗体または抗体断片の使用を含む。これらの抗体の変異が、それらが免疫特異的に結合する特定の抗原に対する抗体の結合力および/または親和性を維持しているまたは高めることができ。当業者に周知の標準的な技法(例えば、イムノアッセイ)を使用して、特定の抗原に対する抗体の親和性をアッセイすることができる。

【0080】

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

【0081】

本発明はまた、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を含み、前記抗体または抗体断片は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかの可変軽鎖および/または重鎖のアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一である可変軽鎖および/または可変重鎖のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号1または17と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一である可変軽鎖のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号5または21と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一である可変重鎖のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号1または17と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一である可変軽鎖および配列番号5または21と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、

10

20

30

40

50

とも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一である可変重鎖のアミノ酸配列を含む。

【0082】

本発明はさらに、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を含み、前記抗体または抗体断片は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかの1種もしくは複数のCDRのアミノ酸配列と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一である1種もしくは複数のCDRのアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号2、3、または4と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一であるCDRのアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号18、19、または20と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一であるCDRのアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号6、7、または8と少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%同一であるCDRのアミノ酸配列を含む。別の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号22、23、または24と比較してアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む1種または複数のCDRのアミノ酸配列を含む。アミノ酸残基置換、欠失または付加を含む1種または複数のCDRを含む抗体は、アミノ酸残基置換、欠失または付加を含まない1種または複数のCDRを含む抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有することが可能である。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異されている)。

【0083】

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

【0084】

本発明はさらに、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を含み、前記抗体または抗体断片は、配列番号2、3、4、6、7、8、18、19、20、22、23、または24と比較してアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む1種または複数のCDRのアミノ酸配列を含む。アミノ酸残基置換、欠失または付加を含む1種または複数のCDRを含む抗体は、アミノ酸残基置換、欠失または付加を含まない1種または複数のCDRを含む抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有することが可能である。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異されている)。

【0085】

本発明はまた、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出もしくは増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体または抗体断片の使用を含み、その場合、前記抗体または抗体断片は、ストリンジェント条件下でEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかのヌクレオチド配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる。一実施形態では、本発明は、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上

で選択的に露出もしくは増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を提供し、前記抗体または抗体断片は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかの可変軽鎖のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた可変軽鎖を含む。好ましい実施形態では、本発明は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号9または25のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた可変軽鎖を含む抗体または断片を提供する。別の実施形態では、本発明は、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出もしくは増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を提供し、前記抗体または抗体断片は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかの可変重鎖のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた可変重鎖を含む。好ましい実施形態では、本発明は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号13または29のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた可変重鎖を含む抗体またはその断片を提供する。他の実施形態では、本発明の抗体または抗体断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号9または25のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた可変軽鎖および配列番号13または29のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた可変重鎖を含む。

10

20

30

40

【0086】

別の実施形態では、本発明は、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を提供し、前記抗体または抗体断片は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれかの1種もしくは複数のCDRのヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされた1種もしくは複数のCDRを含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体または断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号10、11、または12のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされたCDRを含む。別的好ましい実施形態では、本発明の抗体または断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号14、15、または16のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされたCDRを含む。別的好ましい実施形態では、本発明の抗体または断片は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号30、31、または32のヌクレオチド配列とストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされたCDRを含む。

40

50

【0087】

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

50

ohn Wiley and Sons, Inc., NYの6.3.1~6.3.6および2.10.3頁を参照のこと)。

【0088】

本発明はさらに、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、かつ/または癌細胞表現型を阻害し、癌細胞で露出したEphA2エピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合する抗体またはその断片を含み、前記抗体または抗体断片は、配列番号10、11、12、14、15、16、26、27、28、30、31、または32と比較して核酸残基の置換、欠失または付加を含む1種または複数のCDRのヌクレオチド配列によってコードされた1種または複数のCDRを含む。核酸残基の置換、欠失または付加を含む1種または複数のCDRを含む抗体は、核酸残基の置換、欠失または付加を含まない1種または複数のCDRを含む抗体と比較した場合、実質的に同じ結合、より良い結合、またはより悪い結合を有することが可能である。特定の実施形態では、CDRの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14もしくは15個の核酸残基が置換、欠失または付加されている(すなわち、変異されている)。核酸置換は、変異CDRのアミノ酸配列を変えてよいし変えなくてよい。

10

20

30

40

【表1】

抗体	V鎖	CDR	配列番号 (アミノ酸)	配列番号 (核酸)	ATCC 受託番号
Eph099B-208.261					PTA-4573
	VL		1	9	
		VL1	2	10	
		VL2	3	11	
		VL3	4	12	
	VH		5	13	
		VH1	6	14	
		VH2	7	15	
		VH3	8	16	
Eph099B-233.152					
	VL		17	25	
		VL1	18	26	
		VL2	19	27	
		VL3	20	28	
	VH		21	29	
		VH1	22	30	
		VH2	23	31	
		VH3	24	32	
EA2					PTA-4380
	VL		33	41	
		VL1	34	42	
		VL2	35	43	
		VL3	36	44	
	VH		37	45	
		VH1	38	46	
		VH2	39	47	
		VH3	40	48	

【0089】

50

5.1.1 抗体結合体

本発明は、異種物質と組換え融合または化学結合(共有結合も非共有結合も含む)して融合タンパク質を生成した抗体またはその断片の使用を含む。異種物質は、ポリペプチド(またはその部分、好ましくは少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90もしくは少なくとも100アミノ酸のポリペプチド)、核酸、小分子(1000ダルトン未満)、または無機もしくは有機化合物であってよい。融合は必ずしも直接的でなくてもよいが、リンカー配列を介して起こり得る。異種物質と融合または結合した抗体は、*in vivo*で使用して、当技術分野で周知の方法を用いて障害の進行を検出、治療、管理、またはモニターすることができる。例えば、その全体が参照により組み込まれる、国際公開WO 93/21232;EP 439,095;Naramura et al., 1994, Immunol. Lett. 39:91~99;米国特許第5,474,981号;Gillies et al., 1992, PNAS 89:1428-1432;およびFell et al., 1991, J. Immunol. 146:2446~2452を参照のこと。いくつかの実施形態では、検出、治療、管理、またはモニターすべき障害は、EphA2を過剰発現する悪性癌である。他の実施形態では、検出、治療、管理、またはモニターすべき障害は、EphA2を過剰発現する細胞に関連する前癌性症状である。特定の実施形態では、前癌性症状は、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維囊胞症、または化合物母斑である。

10

20

30

40

50

【0090】

本発明はさらに、抗体断片と融合または結合した異種物質を含む組成物を含む。例えば、異種ポリペプチドは、Fab断片、Fd断片、Fv断片、F(ab)₂断片、もしくはその部分と融合または結合していてよい。ポリペプチドを抗体部分と融合または結合させる方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号、および第5,112,946;EP 307,434;EP 367,166;国際公開WO 96/04388およびWO 91/06570;Ashkenazi et al., 1991, PNAS 88:10535~10539;Zhang et al., 1995, J. Immunol. 154:5590~5600;およびVil et al., 1992, PNAS 89:11337~11341を参照のこと(前記参考文献は、その全体が参照により組み込まれている)。

【0091】

例えば、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、もしくは表6に記載の抗体のいずれか(または任意の他のEphA2アゴニスト抗体もしくはEphA2癌細胞表現型阻害抗体もしくは露出EphA2エピトープ抗体もしくは $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満のK_{off}でEphA2と結合するEphA2抗体)の別の融合タンパク質は、遺伝子・シャフリング、モチーフ・シャフリング、エキソン・シャフリング、および/またはコドン・シャフリング(総称して「DNAシャフリング」と呼ばれる)の技法によって生成することができる。DNAシャフリングは、本発明の抗体またはその断片(例えば、親和性がより高く解離率がより低い抗体またはその断片)の活性を変えるために使用することができる。一般に、米国特許第5,605,793号;第5,811,238号;第5,830,721号;第5,834,252号;および第5,837,458号、およびPatten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8:724-33;Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16:76;Hansson, et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265;およびLorenzo and Blasco, 1998, BioTechniques 24:308を参照のこと(これらのそれぞれの特許および刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている)。抗体もしくはその断片、またはコードした抗体もしくはその断片は、エラー・プローンPCR、ランダム・ヌクレオチド挿入または他の方法によるランダム変異誘発にかけてから組換えを行うことによって改変することができる。抗体または抗体断片をコードした、EphA2と免疫特異的に結合するポリヌクレオチドの1種または複数の部分は、1種または複数の異種物質の1種または複数の成分、モチーフ、切片、部分、ドメイン、断片などと組換えることができる。

【0092】

一実施形態では、本発明の抗体またはその断片もしくは変異体は、ペプチドなどのマークー配列と結合させて、精製を容易にする。好ましい実施形態では、マークー・アミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)で得られるタグなどのヘキサヒスチジン・ペプチドであり、その多くが市販されてい

る。Gentz et al., 1989, PNAS 86:821に記載のように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の好都合な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチド・タグには、それだけには限らないが、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープ(Wilson et al., 1984, Cell 37:767)に相当する赤血球凝集素「HA」タグおよび「フラグ」タグがある。

【0093】

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

【0094】

こうした診断および検出は、それだけには限らないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ベータ・ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼなどの様々な酵素;それだけには限らないが、ストレプトアビシン/ビオチンおよびアビシン/ビオチンなどの補欠分子族;それだけには限らないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアヌ酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンなどの蛍光物質;それだけには限らないが、ルミノールなどの発光物質;それだけには限らないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンなどの生物発光物質;それだけには限らないが、ビスマス(²¹³Bi)、炭素(¹⁴C)、クロム(⁵¹Cr)、コバルト(⁵⁷Co)、フッ素(¹⁸F)、ガドリニウム(¹⁵³Gd、¹⁵⁹Gd)、ガリウム(⁶⁸Ga、⁶⁷Ga)、ゲルマニウム(⁶⁸Ge)、ホルミウム(¹⁶⁶Ho)、インジウム(¹¹⁵In、¹¹³In、¹¹²In、¹¹¹In)、ヨウ素(¹³¹I、¹²⁵I、¹²³I、¹²¹I)、ランタン(¹⁴⁰La)、ルテチウム(¹⁷⁷Lu)、マンガン(⁵⁴Mn)、モリブデン(⁹⁹Mo)、パラジウム(¹⁰³Pd)、リン(³²P)、プラセオジム(¹⁴²Pr)、プロメチウム(¹⁴⁹Pm)、レニウム(¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re)、ロジウム(¹⁰⁵Rh)、ルテニウム(⁹⁷Ru)、サマリウム(¹⁵³Sm)、スカンジウム(⁴⁷Sc)、セレン(⁷⁵Se)、ストロンチウム(⁸⁵Sr)、硫黄(³⁵S)、テクネチウム(⁹⁹Tc)、タリウム(²⁰¹Tl)、スズ(¹¹³Sn、¹¹⁷Sn)、トリチウム(³H)、キセノン(¹³³Xe)、イッテルビウム(¹⁶⁹Yb、¹⁷⁵Yb)、イットリウム(⁹⁰Y)、亜鉛(⁶⁵Zn)などの放射性物質;様々な陽電子射出断層撮影法を用いた陽電子放出金属および非放射性常磁性金属イオンを含むが、それだけには限定されない検出可能な物質と抗体をカップリングすることによって実施することができる。

【0095】

他の実施形態では、本発明の抗体またはその断片もしくは変異体は、細胞毒などの治療薬、例えば、細胞増殖抑制もしくは細胞破壊物質、治療薬または放射性金属イオン、例えばアルファ放射体と結合している。細胞毒または細胞毒性物質には、細胞に有害な任意の物質がある。例には、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、マイトイシン、エトポシド、テノボシド(tenoposide)、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、エピルビシン、およびシクロホスファミドおよびその類似体または同族体がある。治療薬には、それだけには限らないが、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキセート、6-メルカブトプリン、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、メクロレタミン、チオエパ(thioepa)クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(CCNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド(cyclothosphamide)、ブルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトイシンC、およびシスジクロロジアミニ白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサ

10

20

30

40

50

イクリン(例えば、ダウノルビシン(以前はダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン(AMC))、および有糸分裂阻害剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン)がある。

【0096】

他の実施形態では、本発明の抗体またはその断片もしくは変異体は、所与の生物学的応答を改変する治療薬または薬物部分と結合している。治療薬または薬物部分は、従来の化学的治療薬に限られるとみなすべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性をもっているタンパク質またはポリペプチドであってよい。こうしたタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナスト外毒素、コレラ毒、またはジフテリア毒などの毒素、腫瘍壞死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノゲンアクチベーターなどのタンパク質、アポトーシス剤、例えば、TNF- α 、TNF- β 、AIM I(国際公開WO 97/33899を参照のこと)、AIM II(国際公開WO 97/34911を参照のこと)、Fasリガンド(Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 153:1567)、およびVEG1(国際公開WO 99/23105を参照のこと)、血栓剤または抗血管形成剤、例えば、アンギオスタチンまたはエンドスタチン;あるいは、例えば、リンフォカイン(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('Gx'))などの生物学的応答改変剤が含まれていてよい。

10

20

30

40

50

【0097】

他の実施形態では、本発明の抗体またはその断片もしくは変異体は、放射性物質または放射性金属イオンと結合するのに有用な大環状キレート剤などの治療薬と結合している(放射性物質の例として上記を参照のこと)。ある実施形態では、大環状キレート剤は、リンカー分子を介して抗体と結合できる1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)である。こうしたリンカー分子は、当技術分野で一般に周知であり、それらの全体がそれぞれ参考により組み込まれる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に記載されている。

【0098】

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

【0099】

治療部分を抗体と結合させる技法はよく知られている。この部分は、それだけには限らないが、アルデヒド/シッフ結合、スルフヒドリル結合、酸不安定性結合、cis-アコニチル(aconityl)結合、ヒドロゾン結合、酵素分解性結合を含む当技術分野で周知の任意の方法によって抗体と結合させることができる(一般にGarnett, 2002, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171-216を参照のこと)。治療部分を抗体と結合させる別の技法はよく知られており、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243~56(Alan R. Liss, Inc. 1985);Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(第2版)、Robinsonら(編)、623~53(Marcel Dekker, Inc. 1987);Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review」、Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475~506(1985);「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303~16(Academic Press 1985)、およびThorpeら、1982、Immunol. Rev. 62:119~58を参照のこと。抗体をポリペプチド部分と融合または結合させる方法は、当技術分野で周知である。例えば、米国特許第5336603号、第5622929号

、第5359046号、第5349053号、第5447851号、および第5112946号;EP 307434;EP 367166;国際公開WO 96/04388およびWO 91/06570;Ashkenaziら、1991、PNAS 88:10535~10539;Zhangら、1995、J. Immunol. 154:5590~5600;およびVilら、1992、PNAS 89:11337~11341を参照のこと。抗体の部分への融合は、必ずしも直接的でなくてもよいが、リンカー配列によって起こり得る。こうしたリンカー分子は、当技術分野で一般に周知であり、その全体が参考によりそれぞれ本明細書に組み込まれる、Denardoら、1998、Clin Cancer Res. 4:2483~90;Petersonら、1999、Bioconjug. Chem. 10:553;Zimmermanら、1999、Nucl. Med. Biol. 26:943~50;Garnett、2002、Adv. Drug Deliv. Rev. 53:171~216に記載されている。

【0100】

10

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

【0101】

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

【0102】

20

5.1.2 抗体を生成する方法

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

【0103】

30

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

【0104】

40

ハイブリドーマ技術を用いた特異的抗体を生成およびスクリーニングする方法は、通常のものであり、当技術分野でよく知られている。簡単に言えば、マウスはEphA2(完全長タンパク質またはそのドメイン、例えば、細胞外ドメインもしくはリガンド結合ドメイン)を用いて免疫でき、免疫応答が検出、例えば、マウス血清におけるEphA2への抗体特異性が検出された後、マウス脾臓を回収し、脾細胞を単離する。次いで、よく知られている技法で脾細胞を任意の適当な骨髄腫細胞、例えばATCCから入手可能な細胞系SP20由来の細胞と融合させる。ハイブリドーマを選択し、限定希釀によってクローン化する。次いで、ハイブリドーマ・クローンを当技術分野で周知の方法によって本発明のポリペプチドと結合可能な抗体を分泌する細胞についてアッセイする。高レベルの抗体を一般に含む腹水は、陽性ハイブリドーマ・クローンを用いて免疫したマウスによって生成され得る。

【0105】

50

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

ドーマ・クローンについてスクリーニングする。

【0106】

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

【0107】

ファージ・ディスプレイ法では、機能抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列をもつファージ粒子の表面上にディスプレイされている。特に、VHおよびVLドメインをコードするDNA配列は、動物cDNAライブラリー(例えば、リンパ組織のヒトまたはネズミcDNAライブラリー)から増幅されている。VHおよびVLドメインをコードするDNAをscFvリンクカーと一緒にPCRによって組換え、ファージミド・ベクター(例えば、p CANTAB 6またはpComb 3 HSS)中に挿入する。このベクターを大腸菌(*E. coli*)中で電気穿孔し、大腸菌をヘルパー・ファージに感染させる。これらの方法で使用するファージは、通常fdおよびM13を含む糸状ファージであり、そのVHおよびVLドメインは、ファージ遺伝子IIIと遺伝子VIIIのいずれかと通常組換え融合させる。所定のEpbA2エピトープと結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原、例えば、標識した抗原または固体表面もしくはビーズに結合したもしくは捕捉された抗原を用いて選択または同定することができる。本発明の抗体を作製するのに使用できるファージ・ディスプレイ法の例には、その全体がそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる、Brinkmanら、1995、J. Immunol. Methods 182: 41~50; Amesら、1995、J. Immunol. Methods 184:177; Kettleboroughら、1994、Eur. J. Immunol. 24:952~958; Persicら、1997、Gene 187:9; Burtonら、1994、Advances in Immunology 57:191~280; 国際出願PCT/GB91/01134; 国際公開WO 90/02809、WO 91/10737、WO 92/01047、WO 92/18619、WO 93/1 1236、WO 95/15982、WO 95/20401、およびWO 97/13844; ならびに米国特許第5698426号、第5223409号、第5403484号、第5580717号、第5427908号、第5750753号、第5821047号、第5571698号、第5427908号、第5516637号、第5780225号、第5658727号、第5733743号および第5969108号に記載されているものがある。

【0108】

ファージは、EphA2結合、特にEphA2の細胞外ドメインとの結合についてスクリーニングすることができる。EphA2活性(例えば、EphA2リン酸化の増大、EphA2レベルの低下)または癌細胞表現型阻害活性に作用すること(例えば、軟寒天中のコロニー形成または三次元基底膜もしくはマトリゲル(商標)などの細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の低減)、あるいは非癌細胞ではなく癌細胞上に露出したEphA2エピトープと優先的に結合すること(例えば、細胞-細胞接觸しているリガンドと結合しているEphA2との結合が弱いが、リガンドと結合していないまたは細胞-細胞接觸していないEphA2との結合が十分である)についてもスクリーニングすることができる。

【0109】

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

【0110】

全抗体を生成するためには、VHまたはVLヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するためのフランкиング配列を含むPCRプライマーを使用して、scFvクローンのVH

10

20

20

30

40

50

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

10

【0111】

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

20

【0112】

ヒト抗体は、機能的内因性免疫グロブリンを発現することができないがヒト免疫グロブ
リン遺伝子を発現できる遺伝子導入マウスを用いて生成することもできる。例えば、ヒト
重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体は、マウス胚幹細胞中にランダムにまたは相
同組換えによって導入することができる。あるいは、ヒト可変領域、定常領域、および多
様性領域は、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えてマウス胚性幹細胞に導入することができる。
マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによって別々にまたはヒト
免疫グロブリン座位の導入と同時に非機能的にすることができる。特に、J_H領域のホモ接
合性欠失は、内因性抗体生成を防止する。改変した胚性幹細胞を増やし、胚盤胞に微量注
入してキメラ・マウスを生成する。次いで、キメラ・マウスを繁殖させて、ヒト抗体を発
現するホモ接合性子孫を生成する。遺伝子導入マウスを、選択した抗原、例えば、本発明
のポリペプチドのすべてまたは一部分を用いて通常の方法で免疫する。抗原に対するモノ
クローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を用いて、免疫したトランスジェニックマ
ウスから得ることができる。トランスジェニックマウスがヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化中に改変し、続いてクラス・スイッチングおよび体細胞変異を受ける。し
たがって、このような技術を用いることによって、治療上有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE
抗体を生成することが可能である。ヒト抗体を生成するためのこの技術の概要については
、LonbergおよびHuszar(1995、Int. Rev. Immunol. 13:65~93)を参考のこと。ヒト抗体
およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのこの技術およびこうした抗体を生成する
ためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、それらの全体が本明細書によって組
み込まれる国際公開WO 98/24893、WO 96/34096、およびWO 96/33735;ならびに米国特許第
5413923号、第5625126号、第5633425号、第5569825号、第5661016号、第5545806号、第58
14318号、および第5939598を参考のこと。さらに、Abgenix, Inc.(米国カリフォルニア州
Freemont)およびMedarex(米国ニュージャージー州Princeto
n)などの会社は、上記のものと類似の技術を用いて選択した抗原に対するヒト抗体の提供
に携わることができる。

30

【0113】

キメラ抗体は、非ヒト抗体由来の可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する
抗体など、抗体の異なる部分が、異なる免疫グロブリン分子由来である分子である。キメ
ラ抗体を生成する方法は、当技術分野で周知である。例えば、それらの全体が参照により
本明細書に組み込まれる、Morrison、1985、Science 229:1202; Orla、1986、BioTechniqu
50

es 4:214; Gilliesら、1989、J. Immunol. Methods 125:191～202; および米国特許第63114
15号、第5807715号、第4816567号、および第4816397号を参照のこと。非ヒト種由来の1種
または複数のCDRおよびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を含むキメラ
抗体は、例えば、CDR移植(EP 239400; 国際公開WO 91/09967; および米国特許第5225539号
、第5530101号、および第5585089号)、張り合わせ(veneering)または再表面化(resurfacing)
(EP 592106; EP 519596; 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(米国特許第5565332号)を含む、当技術分野で周知の様々な技術を用
いて生成することができる。一実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的
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、Eph099B-233.152のVL CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、または3個
のVL CDRを含む。特定の実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合
し、配列番号2、3、4、18、19、または20のアミノ酸配列を有するVL CDRを含む。別の
実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合し、ヒトフレームワー
ク領域内にEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.1
52のVH CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する1、2、または3個のVH CDRを含む。特定の
実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号6、7、8、
22、23、または24のアミノ酸配列を有するVH CDRを含む。好ましい実施形態では、本発明
のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合し、ヒトフレームワーク領域内に、Eph099B-1
02.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、またはEph099B-233.152のVL CDRのいずれ
かのアミノ酸配列を有する1、2、または3個のVL CDRを含み、さらにEph099B-102.147、Ep
h099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152のVH CDRのいずれかのアミノ酸配列
を有する1、2、または3個のVH CDRを含む。特定の好ましい実施形態では、本発明のキメ
ラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号2、3、4、18、19、または20のアミノ酸
配列を有するVL CDRを含み、さらに配列番号6、7、8、22、23、または24のアミノ酸配列
を有するVH CDRを含む。より好ましい実施形態では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免
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、Eph099B-233.152のVL CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する3個のVL
CDRおよびEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152のVH
CDRのいずれかのアミノ酸配列を有する3個のVH CDRを含む。さらにより好ましい実施形態
では、本発明のキメラ抗体は、EphA2と免疫特異的に結合し、配列番号2、3、4、18、19、
または20からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVL CDRを含み、さらに配列番号
6、7、8、22、23、または24からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するVH CDRを含
む。

【0114】

多くの場合、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体の対応す
る残基と置換して抗原結合を改変、好ましくは改善することになる。これらのフレームワー
ク置換は、当技術分野でよく知られている方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワー
ク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相関関係のモデリングならびに特定
部位における異常フレームワーク残基を同定するための配列比較を行うことによって確
認する。(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第55850
89号; およびRiechmannら、1988、Nature 332:323を参照のこと。)

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合可能で、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的
に有するフレームワーク領域および非ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有す
るCDRを含む抗体またはその変異体またはその断片である。ヒト化抗体は、すべてまたは
実質的にすべてのCDR領域が非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のものと対応
し、すべてまたは実質的にすべてのフレームワーク領域がヒト免疫グロブリン・コンセン
サス配列のものである、実質的にすべての少なくとも1種、通常2種の可変ドメインを含む
。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、通常ヒト免疫グ
ロブリンのものを含むことが好ましい。通常、抗体は、軽鎖ならびに少なくとも重鎖の可

10

20

30

40

50

変ドメインの両方を含むはずである。抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、およびCH4領域も含むことができる。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含む任意のクラスの免疫グロブリン、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄を含む任意のアイソタイプから選択することができる。通常、定常ドメインは、ヒト化抗体が細胞障害活性を示すことが望ましい補体結合定常ドメインであり、クラスが通常IgG₁である。こうした細胞障害活性が望ましくない場合、定常ドメインはIgG₂クラスであり得る。ヒト化抗体は、2種以上のクラスまたはアイソタイプの配列を含むことができ、特定の定常ドメインを選択して所望のエフェクター機能を最適化することは、当技術分野の通常の技術の範囲内である。
 ヒト化抗体のフレームワークおよびCDR領域は、その部位におけるCDRまたはフレームワーク残基がコンセンサスまたは移入抗体に対応しないように、親配列と正確に対応していないなくてよく、例えば、ドナーCDRまたはコンセンサス・フレームワークは、少なくとも一残基の置換、挿入または欠失によって変異誘発していくよい。しかし、こうした変異は、広範囲にはならない。通常、ヒト化抗体残基の少なくとも75%、より頻繁には90%、最も好ましくは95%より多くが親フレームワーク領域(FR)およびCDR配列のものと対応することになる。ヒト化抗体は、それだけには限らないが、CDR移植(欧州特許EP 239400;国際公開WO 91/09967;および米国特許第5225539号、第5530101号、および第5585089号)、張り合わせまたは再表面化(欧州特許EP 592106およびEP 519596;Padlan、1991、Molecular Immunology 28(4/5):489~498;Studnickaら、1994、Protein Engineering 7(6):805~814;およびRoguskaら、1994、PNAS 91:969~973)、鎖シャフリング(米国特許第5565332号)を含む、当技術分野で周知の様々な技術ならびに例えば、米国特許第6407213号、第5766886号、第5585089号、国際公開WO 9317105、Tanら、2002、J. Immunol. 169:1119~25、Caldasら、2000、Protein Eng. 13:353~60、Moreaら、2000、Methods 20:267~79、Bacaら、1997、J. Biol. Chem. 272:10678~84、Roguskaら、1996、Protein Eng. 9:895~904、Coutoら、1995、Cancer Res. 55(23 Supp):5973~5977、Coutoら、1995、Cancer Res. 55:1717~22、Sandhu、1994、Gene 150:409~10、Pedersenら、1994、J. Mol. Biol. 235:959~73、Jonesら、1986、Nature 321:522~525、Riechmannら、1988、Nature 332:323、およびPresta、1992、Curr. Op. Struct. Biol. 2:593~596に開示されている技術を用いて生成することができる。多くの場合、フレームワーク領域中のフレームワーク残基は、CDRドナー抗体の対応する残基と置換して、抗原結合を改変、好ましくは改善することになる。これらのフレームワーク置換は、当技術分野でよく知られている方法、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基の相関関係のモデリングならびに特定部位における異常フレームワーク残基を同定するための配列比較を行うことによって確認する。(例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Queenら、米国特許第5585089号;およびRiechmannら、1988、Nature 332:323を参照のこと。)
 さらに、本発明の抗体を利用して、当業者によく知られている技術を用いて抗イディオタイプ抗体を生成することができる。(例えば、Greenspan & Bona、1989、FASEB J. 7:437~444;およびNissinoff、1991、J. Immunol. 147:2429~2438を参照のこと)。本発明は、本発明の抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの使用を用いる方法を提供する。

【0115】

5.1.3 抗体をコードするポリヌクレオチド

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

【0116】

このポリヌクレオチドは、当技術分野で周知の任意の方法によって、得ることができ、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を同定することができる。抗体のアミノ酸配列は周知であるので、当技術分野でよく知られている方法を用いてこれらの抗体をコードするヌクレオチド配列を同定することができ、すなわち、特定のアミノ酸をコードすることが知られているヌクレオチド・コドンは、本発明の抗体またはその断片をコードする核酸を生

10

20

30

40

50

成するような方法で構築されている。抗体をコードするこのようなポリヌクレオチドは、化学合成したオリゴヌクレオチドから構築されてもよく(例えば、Kutmeierら、1994、Bio Techniques 17:242に記載のように)、簡単に言えば、それは、抗体をコードする配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、アニーリングおよびそれらのオリゴヌクレオチドの連結、次いで連結したオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を伴う。

【0117】

あるいは、抗体をコードするポリヌクレオチドは、適当な供給源由来の核酸から生成することができる。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが入手できないが、抗体分子の配列が周知の場合(例えば、図19を参照のこと)、免疫グロブリンをコードする核酸は、配列の3'および5'末端にハイブリダイズできる合成プライマーを用いたPCR増幅、または例えば、その抗体をコードするcDNAライブラリー由来のcDNAクローンを同定するために特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを用いたクローニングによって適当な供給源(例えば、本発明の抗体を発現するように選択したハイブリドーマ細胞など、抗体を発現する任意の組織または細胞から生成した抗体cDNAライブラリー、もしくはcDNAライブラリー、または単離した核酸、好ましくはポリア+RNA、例えば、ATCCにPTA-4572、PTA-4573、およびPTA-4574として寄託されたクローン)から化学合成または得ることができる。次いで、PCRによって生成した増幅核酸は、当技術分野でよく知られている任意の方法を用いて複製可能なクローニング・ベクターにクローン化することができる。

【0118】

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

【0119】

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

【0120】

5.1.4 抗体の組換え発現

本発明の抗体、その誘導体、類似体または断片(例えば、本発明の抗体の重鎖もしくは軽鎖またはその一部分または本発明の单鎖抗体)の組換え発現には、抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築が必要である。本発明の抗体分子または抗体の重鎖もしくは軽鎖、またはその部分(好ましくは、ただし必ずではないが、重鎖または軽鎖可変ドメインを含む)をコードするポリヌクレオチドを得た後、当技術分野でよく知られている技術を用いて組換えDNA技術によって抗体分子を生成するためのベクターを生成することができる。したがって、ヌクレオチド配列をコードする抗体を含むポリヌクレオチドを発現することによってタンパク質を調製する方法を本明細書に記載する。当業者に

10

20

30

40

50

よく知られている方法は、抗体コード配列ならびに適切な転写および翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築するのに使用することができる。これらの方には、例えば *in vitro* 組換えDNA技術、合成技術、および *in vivo* 遺伝子組換えがある。したがって、本発明は、プロモーターに作動可能に結合した本発明の抗体分子、抗体の重鎖または軽鎖、抗体またはその一部の重鎖または軽鎖可変ドメイン、重鎖または軽鎖CDRをコードする又クレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。こうしたベクターには、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列があり(例えば、国際公開WO 86/05807およびWO 89/01036;ならびに米国特許第5122464号を参照のこと)、全重鎖、全軽鎖、または全重鎖と軽鎖の両方を発現させるために、抗体の可変ドメインをこのようなベクター中に挿入することができる。

10

【0121】

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

【0122】

様々な宿主-発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現するのに利用することができる(例えば、米国特許第5807715号を参照のこと)。こうした宿主-発現ベクター系は、それによって所定のコード配列を生成し、続いて精製できるベヒクルを表すが、適切なヌクレオチド・コード配列で形質転換またはトランスフェクトしたとき、本発明の抗体分子を *in situ* で発現する細胞も表す。これらには、それだけには限らないが、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌(例えば、大腸菌および枯草菌(*B. subtilis*))などの微生物;抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母(例えば、サッカロミセスおよびピチア(*Saccharomyces, Pichia*));抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、パキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系;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;タバコ・モザイクウイルス、TMV)に感染したまたは抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換した植物細胞系;あるいは哺乳動物細胞のゲノム(例えば、メタロチオネイン・プロモーター)または哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモーター;牛痘ウイルス7.5Kプロモーター)由來のプロモーターを含む組換え発現構築体を含む哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、NSO、および3T3細胞)がある。特に組換え抗体分子全体の発現のための、好ましくは大腸菌(*Escherichia coli*)などの細菌細胞、より好ましくは真核細胞を組換え抗体分子の発現に使用する。例えば、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞は、ヒト・サイトメガロウイルス由來の主要中間初期遺伝子プロモーター・エレメントなどのベクターと共に、抗体の有効な発現系である(Foeckingら、1986、Gene 45:101;およびCockettら、1990、BioTechnology 8:2)。特定の実施形態では、EphA2と免疫特異的に結合しEphA2に作用(agonize)し、癌細胞表現型を阻害し、非癌細胞ではなく癌細胞上で選択的に露出もしくは

20

増大したEphA2上のエピトープと優先的に結合し、かつ/または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} を有する抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成プロモーター、誘導プロモーターまたは組織特異的プロモーターによって調節される。

30

【0123】

細菌系では、いくつかの発現ベクターは、発現される抗体分子を対象とした使用に応じて有利に選択することができる。例えば、抗体分子の医薬組成物を生成するために多量のこのようなタンパク質を生成すべき場合、容易に精製される高レベルの融合タンパク質生成物の発現を誘導するベクターが望ましいはずである。こうしたベクターには、それだけ

40

50

には限らないが、融合タンパク質が生成されるように抗体コード配列がlac Zコード領域とフレームを合わせてベクター中に個々に連結され得る大腸菌発現ベクターpUR278(Rutheら、1983、EMBO 12:1791);pINベクター(Inouye & Inouye、1985、Nucleic Acids Res. 13:3101～3109;Van Heeke & Schuster、1989、J. Biol. Chem. 24:5503～5509);などがある。pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として外来タンパク質を発現することもできる。一般に、こうした融合タンパク質は可溶性であり、マトリックス・グルタチオン-アガロース・ビーズへの吸着および結合と、それに続く遊離グルタチオンの存在下での溶出によって溶解した細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、クローン化した標的遺伝子生成物がGST部分から放出されるように、トロンビンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0124】

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

【0125】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルス系発現系を利用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、所定の抗体コード配列をアデノウイルス転写/翻訳調節複合体、例えば、後期プロモーターおよびトリパティトリーダー配列と連結することができる。次いで、このキメラ遺伝子を、in vitroまたはin vivo組換えによってアデノウイルス・ゲノムに挿入することができる。ウイルス・ゲノムの非必須領域(例えば、領域E1またはE3)への挿入によって、感染宿主中で生存および抗体分子を発現可能な組換えウイルスが得られるはずである(例えば、Logan & Shenk、1984、PNAS 81:355～359を参照のこと)。挿入した抗体コード配列の効率的な翻訳には特定の開始シグナルも必要であるかもしれない。これらのシグナルには、ATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。さらに、全挿入断片を確実に翻訳するために、開始コドンは所望のコード配列の読み枠と一緒にフェーズになければならない。これらの外来性翻訳調節シグナルおよび開始コドンの起源は様々であってよく、天然でも合成でもよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含めることによって高めることができる(例えば、Bittnerら、1987、Methods in Enzymol. 153:516～544を参照のこと)。

【0126】

さらに、挿入配列の発現を調節し、あるいは望ましい特定の方法で遺伝子産物を改変および切断する宿主細胞株を選択することができる。タンパク質生成物のこうした改変(例えば、グリコシル化)およびプロセシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能に関して重要であるかもしれない。異なる宿主細胞は、翻訳後プロセシングならびにタンパク質および遺伝子産物の改変のための特徴ならびに特異的なメカニズムを有する。適切な細胞系または宿主系を選択して、発現した外来タンパク質の正確な改変およびプロセシングを保証する。このために、転写一次産物の正しいプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化、およびリン酸化のための細胞機構をもつ真核宿主細胞を使用することができる。こうした哺乳動物宿主細胞には、それだけには限らないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、NS1およびT47D、NS0(任意の免疫グロブリン鎖を内因的に生成しないマウス骨髄腫細胞系)、CRL7030およびHs78Bst細胞がある。

【0127】

組換えタンパク質の長期高収率産生には、安定な発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞系を操作することができる。ウイルス起源の複製を含む発現ベクターを用いるよりも、宿主細胞は、適切な発現調節エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など)、および選択マークターによって制御したDNAを用いて形質転換することができる。外来DNAの導入に続いて、操作した細胞を富化培地の中で1～2日間増殖させ、次いで選択培地に切り換えることができる

10

20

30

40

50

。組換えプラスミドの選択マーカーは、選択への耐性を与え、細胞のそれらの染色体中へのプラスミドの安定した組み込み、ならびに細胞系にクローニングおよび増殖できる細胞巣を形成するための生長を可能にする。この方法は、抗体分子を発現する細胞系を操作するのに使用すると有利であり得る。こうした操作した細胞系は、抗体分子と直接または間接的に相互作用する組成物のスクリーニングおよび評価に特に有用であり得る。

【0128】

それだけには限らないが、単純疱疹ウイルス・チミジン・キナーゼ(Wiglerら、1977、Cell 11:223)、グルタミン合成酵素、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybaska & Szybalski、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:202)を含むいくつかの選択系を使用でき、アデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、1980、Cell 22:8-17)遺伝子をそれぞれtk-、gs-、hprt-またはaprt-細胞に使用することができます。さらに、代謝拮抗剤耐性を、以下の遺伝子:メトトレキセートへの耐性を与えるdhfr(Wiglerら、1980、PNAS 77:357; O'Hareら、1981、PNAS 78:1527);マイコフェノール酸への耐性を与えるgpt(Mulligan & Berg、1981、PNAS 78:2072);アミノグリコシドG-418への耐性を与えるneo(WuおよびWu、1991、Biotherapy 3:87; Tolstoshev、1993、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573; Mulligan、1993、Science 260:926;ならびにMorganおよびAnderson、1993、Ann. Rev. Biochem. 62:191; May、1993、TIB TECH 11:155~);およびハイグロマイシンへの耐性を与えるhygro(Santerreら、1984、Gene 30:147)の選択のベースとして使用することができる。組換えDNA技術の当技術分野で一般に周知の方法は、所望の組換えクローニングを選択するのに通常適用でき、こうした方法は、例えば、それらの全体が本明細書に参照により組み込まれる、Ausubelら(編)、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley & Sons、NY(1993); Kriegler、*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*、Stockton Press、NY(1990);ならびに第12および13章、Dracopoliら(編)、*Current Protocols in Human Genetics*、John Wiley & Sons、NY(1994); Colberre-Garapinら、1981、J. Mol. Biol. 150:1に記載されている。

【0129】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大させることができる(概説については、BebbingtonおよびHentschel、*The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*、第3巻(Academic Press、New York、1987)を参照のこと)。抗体を発現するベクター系のマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害物質のレベルの増大により、マーカー遺伝子のコピー数が増大することになる。増幅領域は抗体遺伝子と関連しているので、抗体の产生も増大することになる(Crouseら、1983、Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0130】

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

【0131】

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

10

20

30

40

50

【0132】

5.2 予防/治療法

本発明は、1種もしくは複数のEphA2アゴニスト抗体またはEphA2癌細胞表現型阻害抗体または露出EphA2エピトープ抗体または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合するEphA2抗体、好ましくは1種もしくは複数のモノクローナル(または単一抗体種のいくつかの供給源由来の抗体)EphA2アゴニスト抗体またはEphA2癌細胞表現型阻害抗体または露出EphA2エピトープ抗体または $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満の K_{off} でEphA2と結合するEphA2抗体を投与することを含む、被験者のEphA2の過剰発現および/または細胞過剰増殖性障害、好ましくは癌に関連する疾患または障害を治療、予防、または管理する方法を含む。特定の実施形態では、治療、予防、または管理すべき障害は、悪性癌である。別の特定の実施形態では、治療、予防、または管理すべき障害は、EphA2を過剰発現する細胞に関連する前癌性症状である。より具体的な実施形態では、前癌性症状は、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維囊胞症、または化合物母斑(compound nevi)である。

【0133】

一実施形態では、本発明の抗体は、EphA2過剰発現、過剰増殖性障害、および/または癌に関連する疾患または障害の治療、予防または管理に有用な1種もしくは複数の他の治療薬と併せて投与することができる。ある実施形態では、1種または複数の本発明のEphA2抗体を癌の治療に有用な1種または複数の他の治療薬と一緒に哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。「同時に」という用語は、正確に同時の予防または治療薬の投与に限らず、むしろ本発明のEphA2抗体およびその他の薬剤を、本発明の抗体がその他の薬剤と一緒に作用(agonize)して、それらをその他の方法で投与した場合よりも利益が増大し得るように順番に、かつ時間間隔内で被験者に投与することを表す。例えば、各予防または治療薬は、同時にまたは異なる時点に任意の順序で順次投与でき、しかし、同時に投与しない場合、所望の治療または予防効果が得られるように、それらを十分に近い時間で投与すべきである。各治療薬は、任意の適切な形態で、かつ任意の適当な経路によって個別に投与することができる。他の実施形態では、本発明のEphA2抗体は、手術前、手術と同時または手術後に投与する。手術によって局在化した腫瘍が完全に除去され、あるいは大きな腫瘍のサイズが減少することが好ましい。手術は、予防手段として、または疼痛を緩和するために行うこともできる。

【0134】

好ましい実施形態では、1種または複数の本発明のEphA2抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかからなる。より好ましい実施形態では、抗体は、ヒト化されたEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかからなる。他の実施形態では、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかと比較して活性、結合能力などが増大した、例えば、特に可変ドメインでの1種もしくは複数のアミノ酸置換によるEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかの変異体を生成する。

【0135】

別の特定の実施形態では、本発明の治療および予防法は、それだけには限らないが、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(下記第5.4節を参照のこと)のEphA2発現の阻害物質または小分子阻害物質もしくはEphA2活性のアゴニストなどのEphA2抗体以外のEphA2活性のアゴニストの投与を含む。

【0136】

様々な実施形態では、予防または治療薬は、1時間未満おいて、約1時間おいて、約1時間～約2時間おいて、約2時間～約3時間おいて、約3時間～約4時間おいて、約4時間～約5時間おいて、約5時間～約6時間おいて、約6時間～約7時間おいて、約7時間～約8時間おいて、約8時間～約9時間おいて、約9時間～約10時間おいて、約10時間～約11時間おいて、約11時間～約12時間おいて、24時間以下おいて、または48時間以下おいて投与する。好ま

10

20

30

40

50

しい実施形態では、同じ患者の来診中に2種以上の成分を投与する。

【0137】

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

【0138】

5.2.1 患者集団

本発明は、治療または予防有効量の1種または複数の本発明のEphA2抗体をそれを必要とする被験者に投与することによって、EphA2過剰発現および/または過剰増殖性細胞疾患、特に癌に関連する疾患または障害を治療、予防、および管理する方法を提供する。別の実施形態では、本発明のEphA2抗体は、1種または複数の他の治療薬と併せて投与することができる。被験者は、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および霊長類(例えば、カニクイザルなどのサル、およびヒト)などの哺乳動物であることが好みしい。好みしい実施形態では、被験者はヒトである。

【0139】

本発明に含まれる方法によって治療できる癌の具体例には、それだけには限らないが、EphA2を過剰発現する癌がある。他の実施形態では、癌は、上皮起源である。こうした癌の例は、肺、大腸、前立腺、乳房、および皮膚の癌である。他の癌には、膀胱および膵臓の癌ならびに腎細胞癌および黒色腫がある。別の癌は、限定するものではなく例として以下の第5.2.1.1節に記載する。特定の実施形態では、本発明の方法は、原発腫瘍からの転移を治療および/または予防するのに使用することができる。

【0140】

本発明の方法および組成物は、癌に苦しんでいるまたは苦しむことが予想される、例えば、特定タイプの癌に対する遺伝的素因がある、発癌物質に曝露している、または特定の癌が寛解している被験者/患者に1種または複数の本発明のEphA2抗体を投与することを含む。本明細書では、「癌」は、原発性または転移癌を意味する。こうした患者は、癌を以前に治療していてもよいし、治療していないてもよい。本発明の方法および組成物は、最も重要なまたはその次に重要な癌治療として使用することができる。本発明に含まれているのは、他の癌療法を受けている患者の治療でもあり、本発明の方法および組成物は、これらの他の癌療法の任意有害な作用または不耐性が起こる前に使用することができる。本発明はまた、不応性患者の症状を治療または回復させるために1種または複数の本発明のEphA2抗体を投与する方法を含む。ある実施形態では、癌が療法に不応性であることは、癌細胞の少なくともある重要な部分が死滅していない、またはそれらの細胞分裂が停止していないことを表す。癌細胞が不応性かどうかの決定は、そのような状況で当技術分野で許容されている「不応性」の意味を用いて癌細胞に対する治療の有効性をアッセイする当技術分野で周知の任意の方法によってin vivoまたはin vitroで行うことができる。様々な実施形態では、癌細胞の数が著しく減少していない、または増加している場合、癌は不応性である。本発明はまた、1種または複数のEphA2アゴニスト抗体を投与して癌にかかりやすい患者の癌の発症または再発を予防する方法を含む。モノクローナル抗体は、1種または複数のEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかであることが好みしい。

【0141】

特定の実施形態では、本発明のEphA2抗体、またはEphA2発現を低減させる他の治療薬を投与して、ある種のホルモン、放射線および化学療法薬に対する癌細胞の耐性または感受性の低減を変え、それによって癌細胞を1種または複数のこれらの薬剤で再感作し、次いでそれを転移の予防を含めて癌を治療または管理するために投与する(または投与し続ける)ことができる。特定の実施形態では、本発明のEphA2抗体を、化学療法およびホルモン

10

20

30

40

50

療法などの異なる治療レジメンに耐性がある癌細胞の発生に関連があるサイトカインIL-6のレベルが増大した患者に投与する。別の特定の実施形態では、本発明のEphA2抗体を、タモキシフェン(tamoxifen)治療への応答性が低減したまたは不応性の乳癌に苦しんでいる患者に投与する。別の特定の実施形態では、本発明のEphA2抗体を、化学療法およびホルモン療法などの異なる治療レジメンに耐性がある癌細胞の発生に関連があるサイトカインIL-6のレベルが増大した患者に投与する。

【0142】

他の実施形態では、本発明は、1種または複数の本発明のEphA2抗体を任意の他の治療と併せてあるいは他の治療に対して不応性であることが証明された、これらの治療をもはや行っていない、患者に投与することによって、患者の癌を治療する方法を提供する。EphA2抗体は、1種または複数のEph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に記載の抗体のいずれかであることが好ましい。ある実施形態では、本発明の方法によって治療している患者は、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、または生物学的療法/免疫療法で既に治療している患者である。これらのうち、患者は不応性患者であり、既存の癌療法を用いた治療にもかかわらず癌にかかっているものである。他の実施形態では、患者は治療を受け、疾患活性がなく、1種または複数の本発明のアゴニスト抗体を投与して癌の再発を予防する。

【0143】

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

【0144】

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

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

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

10

20

30

40

50

者には、癌療法の不在下で1種または複数のアゴニスト・モノクローナル抗体を投与する。

【0148】

他の実施形態では、EphA2を過剰発現する細胞に関連する前癌性症状にかかっている患者には、本発明の抗体を投与して、障害を治療し、それが悪性癌に進行する可能性を減らすことができる。特定の実施形態では、前癌性症状は、高度前立腺上皮内新生(PIN)、乳房の線維腺腫、線維囊胞症、または化合物母斑である。

【0149】

さらに他の実施形態では、本発明は、それだけには限らないが、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、再狭窄(平滑筋および/または内皮)、乾癬などを含む非癌過剰増殖性細胞障害、特にEphA2の過剰発現に関連するものを治療、予防および管理する方法を提供する。これらの方法は、例えば、本発明のEphA2抗体、ならびにEphA2発現を阻害する薬剤の投与、併用療法、特定の治療に不応性の患者への投与などによって癌の治療、予防および管理するための上記のものに類似した方法を含む。

【0150】

5.2.1.1 癌

本発明の方法および組成物によって治療、予防、または管理できる癌および関連障害には、それだけには限らないが、上皮細胞起源の癌がある。こうした癌の例には、それだけには限らないが、急性白血病、急性リンパ性白血病、骨髄芽球性、前骨髄性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病の白血病および骨髄異形成症候群などの急性骨髄性白血病などの白血病;それだけには限らないが、慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ性白血病、有毛細胞性白血病などの慢性白血病;真性多血症;それだけには限らないが、ホジキン病、非ホジキン病などのリンパ腫;それだけには限らないが、くすぶり型(smoldering)多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞性白血病、孤立性形質細胞腫および髓外形質細胞腫などの多発性骨髄腫;ワルデンストレームマクログロブリン血症;未決定有意性の單一クローン性高ガンマグロブリン血症;良性單一クローン性高ガンマグロブリン血症;重鎖疾患;それだけには限らないが、骨肉腫(bone sarcoma)、骨肉腫(osteosarcoma)、軟骨肉腫、ユーリング肉腫、悪性巨細胞腫瘍、骨の線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟組織肉腫、血管肉腫(angiosarcoma)(血管肉腫(hemangiosarcoma))、線維肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫などの骨および結合組織肉腫;それだけには限らないが、神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣細胞腫、乏突起神経膠腫、非グリア腫瘍、聴神経腫、頭蓋咽頭腫、髄芽細胞腫、髄膜腫、松果体腫、松果体芽腫、原発性脳リンパ腫などの脳腫瘍;それだけには限らないが、腺管癌、腺癌、小葉(小細胞)癌、分泌管内癌、乳房の髄様癌、乳房の粘液癌、管状乳癌、乳頭状乳癌、バジェット病、および炎症性乳癌を含む乳癌;それだけには限らないが、褐色細胞腫および副腎皮質癌などの副腎癌;それだけには限らないが、乳頭状または濾胞状甲状腺癌、髄様甲状腺癌および未分化甲状腺癌などの甲状腺癌;それだけには限らないが、膵島細胞腺腫、ガストリン産生腫瘍、グルカゴノーマ、ビポーマ、ソマトスタチン分泌腫瘍、およびカルチノイドまたは島細胞腫瘍などの膵臓癌;それだけには限らないが、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症、および尿崩症などの下垂体癌;それだけには限らないが、虹彩黒色腫、脈絡膜黒色腫、および毛様体黒色腫などの目の黒色腫ならびに網膜芽細胞腫などの眼癌;扁平上皮癌、腺癌、および黑色腫などの膣癌;扁平上皮癌、黑色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫、およびバジェット病などの外陰癌;それだけには限らないが、扁平上皮癌、および腺癌などの子宮頸癌;それだけには限らないが、子宮内膜癌および子宮肉腫などの子宮癌;それだけには限らないが、卵巣上皮癌、境界腫瘍、胚細胞腫瘍、および間質性腫瘍などの卵巣癌;それだけには限らないが、扁平上皮癌、腺癌、腺様囊胞癌、粘液性類表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黑色腫、形質細胞腫、疣状癌、および燕麦細胞(小細胞)癌などの食道癌;それだけには限らないが、腺癌、肉芽腫性(ポリープ状)、潰瘍性、表層進展性、拡散進展性、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、および癌肉腫などの胃癌;大腸癌;直腸癌;それだけには限らないが、肝細胞癌および肝芽細胞腫など

10

20

30

40

50

の肝癌；腺癌などの胆囊癌；それだけには限らないが、乳頭状、結節性、および広汎性などの胆管癌；非小細胞肺癌、扁平上皮癌(類表皮癌)、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌などの肺癌；それだけには限らないが、胚腫瘍、精上皮腫、未分化、古典的(典型的)、精母細胞、非精上皮腫、胎児性癌、奇形腫瘍、絨毛癌(卵黃囊腫瘍)などの睾丸癌、それだけには限らないが、前立腺上皮内新形成、腺癌、平滑筋肉腫、および横紋筋肉腫などの前立腺癌；ピーナル・キャンサ(penal cancers)；それだけには限らないが、扁平上皮癌などの口腔癌；基底癌；それだけには限らないが、腺癌、粘液性類表皮癌、および腺様囊胞癌などの唾液腺癌；それだけには限らないが、扁平上皮癌、および疣状などの咽頭癌；それだけには限らないが、基底細胞癌、扁平上皮癌および黒色腫、表層進展性黒色腫、結節性黒色腫、ほくろ悪性黒色腫、末端性ほくろ性黒色腫などの皮膚癌；それだけには限らないが、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌(腎孟および/または子宮)などの腎臓癌；ウィルムス腫瘍；それだけには限らないが、移行上皮癌、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫などの膀胱癌がある。さらに、癌には、粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽腫、上皮癌、囊胞腺癌、気管支癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌および乳頭腺癌がある(こうした障害の概説については、Fishmanら、1985、Medicine、第2版、J.B. Lippincott Co.、PhiladelphiaおよびMurphyら、1997、Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery、Viking Penguin、Penguin Books U.S.A., Inc.、アメリカ合衆国を参照のこと)。

10

20

【0151】

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

30

40

【0152】

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

【0153】

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

【0154】

5.2.1.2. 乳癌の治療

特定の実施形態では、乳癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らな

50

いが、ドキソルビシン、エピルビシン、ドキソルビシンとシクロホスファミドの合剤(AC)、シクロホスファミド、ドキソルビシンおよび5-フルオロウラシルの合剤(CAF)、シクロホスファミド、エピルビシンと5-フルオロウラシルの合剤(CEF)、ハーセプチン、タモキシフェン、タモキシフェンと細胞毒化学療法の組合せ、タキサン(ドセタキセルおよびパクリタキセルなど)を含む有効量の乳癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。他の実施形態では、本発明の抗体は、ノード(node)陽性の局在性乳癌のアジュvant治療のためにタキサンと標準的なドキソルビシンおよびシクロホスファミドと一緒に投与することができる。

【0155】

特定の実施形態では、前癌性乳房の線維腺腫または線維囊胞症にかかっている患者には、本発明のEphA2抗体を投与して、障害を治療し、それが悪性癌に進行する可能性を減らす。別の特定の実施形態では、治療、特にホルモン療法、より具体的にはタモキシフェン療法に不応性の患者には、本発明のEphA2抗体を投与して、癌を治療し、かつ/または患者を非不応性または応答性にする。

【0156】

5.2.1.3. 大腸癌の治療

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

【0157】

5.2.1.4. 前立腺癌の治療

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

【0158】

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

【0159】

5.2.1.5. 黒色腫の治療

特定の実施形態では、黒色腫にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、ダカルバジン(DTIC)、カルムスチン(BCNU)およびロムスチン(CCNU)などのニトロソ尿素、ピンカ・アルカロイド、白金化合物、およびタキサンを含む適度の単一薬剤活性をもつ薬剤、ダートマス・レジメン(シスプラチン、BCNU、およびDTIC)、インターフェロン(IFN-A)、ならびにインターロイキン-2(IL-2)を含む有効量の黒色腫治療に有用な1

10

20

30

40

50

種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。特定の実施形態では、有効量の1種または複数の本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体を、メルファラン(L-PAM)を伴い、腫瘍壞死因子(TNF-)を伴うまたは伴わない局所高温四肢灌流(ILP)と併せて多発性脳転移、骨転移、および脊髄圧迫にかかっている患者に投与して、症状軽減および放射線療法による腫瘍の若干の収縮を果たすことができる。

【0160】

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

【0161】

5.2.1.6. 卵巣癌の治療

10

特定の実施形態では、卵巣癌にかかっている患者に有効量の1種または複数の本発明のモノクローナル抗体を投与する。別の実施形態では、本発明の抗体は、それだけには限らないが、P³²療法などの腹膜内放射線療法、全腹部および骨盤放射線療法、シスプラチン、パクリタキセル(タキソール)またはドセタキセル(タキソテール)およびシスプラチンまたはカルボプラチニンの合剤、シクロホスファミドとシスプラチニンの合剤、シクロホスファミドとカルボプラチニンの合剤、5-FUとロイコボリンの合剤、エトポシド、リポソーマル・ドキソルビシン、ゲムシタビンまたはトポテカンを含む有効量の卵巣癌治療に有用な1種または複数の他の薬剤と併せて投与することができる。白金不応性疾患にかかっている患者のために有効量の1種または複数の本発明のアゴニスト・モノクローナル抗体をタキソール投与と併せて投与することも意図している。含まれているのは、白金不応性の疾患にかかっている患者におけるイホスファミド、シスプラチニン系併用レジメンの失敗後のサルベージ化学療法としてのヘキサメチルメラミン(HIIM)、ならびに腫瘍上の細胞質エストロゲン受容体が検出可能レベルである患者におけるタモキシフェンの投与を含む、不応性卵巣癌にかかっている患者の治療である。

20

【0162】

5.2.1.7. 肺癌の治療

30

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

30

【0163】

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

40

【0164】

5.2.2 他の予防/治療薬

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

50

)、または合成分子ライブラリーに由来するものでもよい。

【 0 1 6 5 】

具体的な一実施形態では、本発明の方法は、本発明の抗体の投与を、それだけには限らないが、ABL、ACK、AFK、AKT(例えばAKT-1、AKT-2、およびAKT-3)、ALK、AMP-PK、ATM、Aurora1、Aurora2、bARK1、bArk2、BLK、BMX、BTK、CAK、Camキナーゼ、CDC2、CDK、CK、COT、CTD、DNA-PK、EGF-R、ErbB-1、ErbB-2、ErbB-3、ErbB-4、ERK(例えばERK1、ERK2、ERK3、ERK4、ERK5、ERK6、ERK7)、ERT-PK、FAK、FGR(例えばFGF1R、FGF2R)、FLT(例えばFLT-1、FLT-2、FLT-3、FLT-4)、FRK、FYN、GSK(例えばGSK1、GSK2、GSK3-、GSK3-、GSK4、GSK5)、G-タンパク質結合受容体キナーゼ(GRK)、HCK、HER2、HK1、JAK(例えばJAM、JAK2、JAK3、JAK4)、JNK(例えばJNK1、JNK2、JNK3)、KDR、KIT、IGF-1受容体、IKK-1、IKK-2、INSR(インシュリン受容体)、IRAK1、IRAK2、IRK、ITK、LCK、LOY、LYN、MAPK、MAPKAPK-1、MAPKAPK-2、MEK、MET、MFPK、MHCK、MLCK、MLK3、NEU、NIK、PDGF受容体、PDGF受容体、PHK、PI-3キナーゼ、PKA、PKB、PKC、PKG、PRKI、PYK2、p38キナーゼ、p135tyk2、p34cdc2、p42cdc2、p42mapk、p44mpk、RAF、RET、RIP、RIP-2、RK、RON、RSキナーゼ、SRC、SYK、S6K、TAK1、TEC、TIM、TIE2、TRKA、TXK、TYK2、UL13、VEGFRI、VEGFR2、YES、YRK、ZAP-70、およびこれらのキナーゼのすべてのサブタイプ(例えばHardie and Hanks (1995)The Protein Kinase Facts Book, I and II, Academic Press, San Diego, Califを参照のこと)などのキナーゼの阻害剤である、1種または複数の予防/治療薬の投与と併用することを含む。好ましい実施形態では、本発明の抗体の投与を、Eph受容体キナーゼ(例えばEphA2、EphA4)の阻害剤である1種または複数の予防/治療薬の投与と併用する。最も好ましい一実施形態では、本発明の抗体の投与を、EphA2の阻害剤である1種または複数の予防/治療薬の投与と併用する。

【 0 1 6 6 】

別の具体的な一実施形態では、本発明の方法は、本発明の抗体の投与を、それだけには限らないが、アンギオスタチン(プラスミノゲン断片);抗血管新生アンチトロンビンIII;アンギオザイム(Angiozyme);ABT-627;Bay 12-9566;ベネフィン;ベバシズマブ;BMS-275291;軟骨由来阻害剤(CDI);CAI;CD59補体断片;CEP-7055;Col 3;コンプレタスタチンA-4;エンドスタチン(コラーゲンXVIII断片);フィプロネクチン断片;Gro-;ハロフジノン;ヘパリナーゼ;ヘパリン六糖類断片;HMV833;ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG);IM-862;インターフェロン / / ;インターフェロンで誘発されるタンパク質(IP-10);インターロイキン12;クリングル5(プラスミノゲン断片);マリマstatt;メタロプロテイナーゼ阻害剤(TIMP);2-メトキシエストラジオール;MMI 270(CGS 27023A);MoAb IMC-1C11;ネオバスター;NM-3;パンゼム;PI-88;胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤;プラスミノゲン活性化剤阻害剤;血小板因子-4(PF4);ブリノマstatt;プロラクチン16kD断片;プロリフェリン(Proliferin)系タンパク質(PRIP);PTK 787/ZK 222594;レチノイド;ソリマstatt(Solimastat);スクアラミン;SS 3304;SU 5416;SU 6668;SU 11248;テトラヒドロコルチゾール-S;テトラチオモリブデン酸塩;サリドマイド;トロンボスponジン-1(TSP-1);TNP-470;形質転換成長因子-(TGF-);バスクロスタチン(Vasculostatin);バソスタチン(Vasostatin)(カルレチクリン断片);ZD6126;ZD6474;ファメシリ(famesyl)トランスフェラーゼ阻害剤(FTI);およびビスフォスフォネートなどの血管新生阻害剤である、1種または複数の予防/治療薬の投与と併用することを含む。

【 0 1 6 7 】

別の具体的な一実施形態では、本発明の方法は、本発明の抗体の投与を、それだけには限らないが、アシビシン(acivicin)、アクラルビシン、塩酸アコダゾール(acodazole)、アクロニン、アドゼレシン、アルデスロイキン、アルトレタミン、アムボマイシン(ambomycin)、酢酸アメタントロン(ametantrone)、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アンスラマイシン、アスピラギナーゼ、アスペルリン(asperlin)、アザシチジン(azacitidine)、アゼテパ(azetepa)、アゾトマイシン(azotomycin)、バチマstatt、ベンゾデパ(benzodepa)、ビカルタミド、塩酸ビサントレン、ジメシリ酸ビスナフィド(bisnafide)、ビゼレシン、硫酸ブレオマイシン、ブレキナール・ナトリウム、プロピリミ

10

20

30

40

50

ン、ブスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カラセミド(caracemide)、カーベタイマー、カルボプラチン、カルムスチン、塩酸カルビシン(carubicin)、カルゼレシン(carzelesin)、セデフィンゴル(cedefingol)、クロラムプシル、シロレマイシン(cirolemycin)、シスプラチン、クラドリピン、メシル酸クリスタノール(crisnatol)、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、塩酸ダウノルビシン、デカルバジン(decarbazine)、デシタбин(decitabine)、デキソマプラチン(dexormaplatin)、デザグアニン(dezaguanine)、メシル酸デザグアニン(dezaguanine)、ジアジコン、ドセタキセル、ドキソルビシン、塩酸ドキシリビシン、ドロロキシフェン、クエン酸ドロロキシフェン、プロピオニ酸ドロモスタノロン、デュアゾマイシン(duazomycin)、エダトレキセト(edatrexate)、塩酸エフロルニチン、エルサミトルシン(elsamitracin)、エンロプラチン(enloplatin)、エンプロメート(enpromate)、エピプロピジン(epipropidine)、塩酸エピルビシン、エルブルゾロール(erbulozole)、塩酸エソルビシン(esorubicin)、エストラムスチン、リン酸エストラムスチン・ナトリウム、エタニダゾール、エトポシド、リン酸エトポシド、エトブリニド(etoprine)、塩酸ファドロゾール、ファザラビン(fazarabine)、フェンレチニド(fenretinide)、フロクスウリジン、リン酸フルダラビン、フルオロウラシル、フルロシタビン(flurocitabine)、ホスキドン(fosquidone)、ホストリエシン・ナトリウム、ゲムシタビン、塩酸ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、塩酸イダルビシン、イホスファミド、イルモホシン(ilmofosine)、インターロイキン2(組換えインターロイキン2、またはrIL2を含む)、インターフェロン-2a、インターフェロン-2b、インターフェロン-n1、インターフェロン-n3、インターフェロン-Ia、インターフェロン-Ib、イプロプラチン、塩酸イリノテカン、酢酸ランレオチド、レトロゾール、酢酸ロイプロリド、塩酸リアロゾール、ロメトレキソール(lometrexol)・ナトリウム、ロムスチン、塩酸ロソキサントロン(Iosoxantrone)、マソプロコール(masoprocol)、メイタンシン、塩酸メクロレタミン、酢酸メゲストロール、酢酸メレンゲストロール、メルファラン、メノガリル、メルカブトプリン、メトトレキサート、メトトレキサレート・ナトリウム、メトプリニン、メツレデパ(meturedopa)、ミチンドミド(mitindomide)、マイトカルシン(mitocarcin)、マイトクロミン(mitocromin)、マイトギリニン(mitogillin)、マイトマルシン(mitomalcin)、マイトイマイシン、マイトスパー(mitosper)、マイトテイン(mitotane)、塩酸ミトキサントロン、ミコフェノール酸、ニトロソ尿素、ノコダゾール、ノガラマイシン、オルマプラチン(ormaplatin)、オキシスラン(oxisuran)、パクリタクセル、ペガスパルガーゼ(pegasparase)、ペリオマイシン(peliomycin)、ペントアムスチン(pentamustine)、硫酸ペブロマイシン、ペルホスファミド(perfosfamide)、ピポブロマン、ピポスルファン(piposulfan)、塩酸ピロキサントロン(piroxantrone)、プリカマイシン、プロメスタン(plomestane)、ポルフィマー・ナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン(prednimustine)、塩酸プロカルバジン、ピューロマイシン、塩酸ピューロマイシン、ピラゾフリン(pyrazofurin)、リボプリン(riboprine)、ログレチミド(rogletimide)、サфинゴル(safingol)、塩酸サфинゴル(safingol)、セムスチン、シムトラゼン(simtrazene)、スバルフォセート・ナトリウム、スバルソマイシン、塩酸スピロゲルマニウム、スピロムスチン(spiromustine)、スピロプラチン(spiroplatin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌール(sulofenur)、タリソマイシン、テコガラン・ナトリウム、テガフル、塩酸テロキサントロン(teloxantrone)、テモボルフィン、テニポシド、テロキシロン(teroxirone)、テストラクトン、チアミプリン(thiamiprime)、チオグアニン、チオテパ、チアゾフリン(tiazofurin)、チラバザミン、クエン酸トレミフェン、酢酸トレストロン(trestolone)、リン酸トリシリビン(triciribine)、トリメトレキセート、グルクロン酸トリメトレキセート、トリプトレリン、塩酸チュプロゾール(tubulozole)、ウラシル・マスター、ウレデパ(uredepa)、バブレオチド(vapreotide)、ベルテポルフィン、硫酸ビンプラスチン、硫酸ビンクリスチン、ビンデシン、硫酸ビンデシン、硫酸ビネビジン(vinepidine)、硫酸ビングリシネート(vinglycinate)、硫酸ビンロイロシン(vinleurosine)、酒石酸ビノレルビン、硫酸ビンロシジン(vinrosidine)、硫酸ビンゾリジン(vinzolidine)、ボロゾール(vorozole)、ゼニプラチン(zeniplatin)、ジノスタチン、塩酸ゾルビシンなどの抗
10
20
30
40
50

癌剤である、1種または複数の予防/治療薬の投与と併用することを含む。他の抗癌剤には、それだけには限らないが、20-エピ-1,25ジヒドロキシビタミンD3、5-エチニルウラシル、アビラテロン(abiraterone)、アクラルビシン、アシリフルベン、アデシペノール(adecopenol)、アドゼレシン、アルデスロイキン、ALL-TKアンタゴニスト、アルトレタミン、アンバムスチン(ambamustine)、アミドクス(amidox)、アミフォスチン、アミノレブリン酸、アムルビシン、アムサクリン、アナグレリド、アナストロゾール、アンドログラホライド、血管新生阻害剤、アンタゴニストD、アンタゴニストG、アンタレリクス(antarelix)、抗背側化形態形成タンパク質1、抗アンドロゲン、抗エストロゲン、抗新生物薬、グリシン酸アフィジコリン、アポトーシス遺伝子調節剤、アポトーシス調節剤、アプリン酸、ara-CDP-DL-PTBA、アルギニン・デアミナーゼ、アスラクリン(asulacrine)、アタメスタン、アトリムスチン、アキシナスタチン(axinastatin)1、アキシナスタチン(axinastatin)2、アキシナスタチン(axinastatin)3、アザセトロン、アザトキシン(azatoxin)、アザチロシン、バッカチンIII誘導体、バラノール(balanol)、バチマstattt、BCR/ABLアンタゴニスト、ベンゾクロリン、ベンゾイルスタウロスボリン、-ラクタム誘導体、-アレチン(alethine)、-クラミシンB、ベツリン酸、bFGF阻害剤、ビカルタミド、ビサントレン、ビスマジリジニルスペルミン、ビスナファイド(bisnafide)、ビストラテン(bistratene)A、ビゼレシン、ブレフレート(breflate)、プロピリミン、ブドチタン(budotitane)、ブチオニン・スルホキシイミン、カルシポトリオール、カルフォスチンC、カンプトセシン誘導体、カナリア痘IL-2、カペシタビン、カルボキサミド-アミノ-トリアゾール、カルボキシアミドトリアゾール、CaRest M3、CARN 700、軟骨由来阻害剤、カルゼレシン(carzelisin)、カゼイン・キナーゼ阻害剤(ICOS)、カスタノスペルミン、セクロピンB、セトロリクス、クロロキノキサリン・スルホンアミド、シカプロスト、*cis*-ポルフィリン、クラドリビン、クロミフェン類似体、クロトリマゾール、コリスマイシン(collismycin)A、コリスマイシン(collismycin)B、コンプレタスタチンA4、コンプレタスタチン類似体、コナゲニン、クラムベスシジン(crambescidin)816、クリスタノール(crisnatol)、クリプロファイシン(cryptophycin)8、クリプロファイシン(cryptophycin)A誘導体、クラシン(curacin)A、シクロペンタンスラキノン、シクロプラタム、サイペマイシン(cypemycin)、シタラビンオクホスファート、細胞溶解因子、サイトスタチン(cytostatin)、ダクリキシマブ(daclizimab)、デシタビン(decitabine)、デヒドロジデムニンB、デスロレリン、デキサメタゾン、デキシホスファミド、デクスラゾキサン、デクスベラパミル、ジアジコン、ジデムニンB、ジドクス(didox)、ジエチルノルスペルミン、ジヒドロ-5-アザシチジン、ジヒドロタキソール、ジオキサマイシン(dioxamycin)、ジフェニル・スピロムスチン(spiromustine)、ドセタキセル、ドコサノール、ドラセトロン、ドキシフルリジン、ドロロキシフェン、ドロナビノール、デュオカルマイシンSA、エブセレン、エコムスチン(ecomustine)、エデルホシン(edelfosine)、エドレコロマブ、エフロルニチン、エレメン、エミテフル、エピルビシン、エプリステリド、エストラムスチン類似体、エストロゲン・アゴニスト、エストロゲン・アンタゴニスト、エタニダゾール、リン酸エトポシド、エキセメスタン、ファドロゾール、ファザラビン(fazarabine)、フェンレチナイド、フィルグラスチム、フィナステライド、フラボピリドール、フレゼラスチン(flezelastine)、フルアステロン、フルダラビン、塩酸フルオロダウノルニシン(fluorodaunorubicin)、フォルフェニメクス(forfenimex)、フォルメスタン、フォストリエシン、フォテムスチン、ガドリニウム・テキサフィリン、硝酸ガリウム、ガロシタビン、ガニレリックス、ゲラチナーゼ阻害剤、ゲムシタビン、グルタチオン阻害剤、ヘプルスファム(hepsulfam)、ヘレグリン、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ヒペリシン、イバンドロン酸、イダルビシン、イドキシフェン、イドラマントン(idramantone)、イルモホシン(ilmofosine)、イロマstattt(ilomastat)、イミダゾアクリドン、イミキモド、免疫刺激ペプチド、インシュリン様成長因子-1受容体阻害剤、インターフェロン・アゴニスト、インターフェロン、インターロイキン、イオベングアン(iobenguane)、ヨードドキソルビシン(iododoxorubicin)、イポメアノール(ipomeanol)、イロプラクト(iroplact)、イルソグラジン、イソベンガゾール(isobengazole)、イソホモハリコンドリン(isohomohalicondrin)B、イタセトロン、ジャスプラ

キノライド、カハラリド(kahalalide)F、三塩酸ラメラリン-N、ランレオチド、レイナマイシン、レノグラスチム、硫酸レンチナン、レプトルスタチン(leptolstatin)、レトロゾール、白血病阻害因子、白血球 インターフェロン、ロイプロリド+エストロゲン+プロゲステロン、ロイプロレリン、レバミゾール、リアロゾール、直鎖ポリアミン類似体、親油性二糖類ペプチド、親油性白金化合物、リッソクリナミド(lissoclinamide)7、ロバプラチン(lobaplatin)、ロンブリシン、ロメトレキソール(lometrexol)、ロニダミン、ロソキサントロン(losoxantrone)、ロバスタチン、ロキソリビン(loxoridine)、ルルトテカン(lurtotecan)、ルテチウム・テキサフィリン、リソフィリン(lysofylline)、溶解ペプチド、メイタンシン、マンノスタチンA、マリマstatt、マソプロコール(masoprolac)、マスピン(maspin)、マトリリシン阻害剤、マトリックス・メタロプロテイナーゼ阻害剤、メノガリル、メルバロン(merbarone)、メテレリン(meterelin)、メチオニナーゼ(methioninase)、メトクロプラミド、MIF阻害剤、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリモスチム、ミスマッチニ重鎖RNA、ミトグアゾン、ミトラクトール(mitolactol)、マイトイシン類似体、ミトナファイド(mitonafide)、マイトイキシン(mitotoxin)線維芽細胞成長因子-サポリン、ミトキサントロン、モファロテン、モルグラモスチム、モノクローナル抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロphin、モノホスホリル脂質A+ミオバクテリウム細胞壁sk、モピダモール(mopidamol)、多剤耐性遺伝子阻害剤、多発腫瘍抑制剤1系治療薬、マスター抗癌薬、マイカペルオキシド(mycaperoxide)B、ミコバクテリウム細胞壁抽出物、ミリアポロン(myriaporone)、N-アセチルジナリン、N-置換ベンズアミド、ナファレリン、ナグレスチップ(nagrestip)、ナロキソン+ペンタゾシン、ナパビン(napavine)、ナフテルピン、ナルトグラスチム、ネダプラチン、ネモル
ビシン(nemorubicin)、ネリドロン酸(neridronic acid)、中性エンドペプチターゼ、ニルタミド、ナイサマイシン(nisamycin)、一酸化窒素調整剤、ニトロキシド抗酸化剤、ニトルリン(nitrullyn)、06-ベンジルグアニン、オクトレオチド、オキセノン(okicenone)、オリゴヌクレオチド、オナブリストン、オンダンセトロン、オラシン、経口サイトカイン誘発剤、オルマプラチン(ormaplatin)、オサテロン、オキサリプラチン、オキザウノマイシン、パクリタキセル、パクリタキセル類似体、パクリタキセル誘導体、パラウアミン(palauamine)、パルミトイリゾキシン、パミドロン酸、パナキシトリオール、パノミフェン、パラバクチン(parabactin)、パゼリップチン(pazelliptine)、ペガスパルガーゼ(pegaspargase)、ペルデシン、ポリ硫酸ペントサンナトリウム、ペントスタチン、ペントロゾール(pentozole)、パーフルブロン、パーホスファミド、ペリリルアルコール、フェナジノマイシン、酢酸フェニル、ホスファターゼ阻害剤、ピシバニル、塩酸ピロカルピン、ピラルビシン、ピリトレキシム(piritrexim)、プラセチン(placetin)A、プラセチン(placetin)B、プラスミノゲン活性化剤阻害剤、白金錯体、白金化合物、白金トリアミン錯体、ポルフィマー・ナトリウム、ポルフィロマイシン、ブレドニゾン、プロピルbis-アクリドン、プロスタグランジンJ2、プロテアソーム阻害剤、タンパク質A系免疫調節剤、タンパク質キナーゼC阻害剤、微細藻、タンパク質チロシン・ホスファターゼ阻害剤、プリン・ヌクレオシド・ホスホリラーゼ阻害剤、ブルプリン、ピラゾロアクリジン、ピリドキシル化ヘモグロビン・ポリオキシエチレン接合体、rafアンタゴニスト、ラルチトレキセド、ラモセトロン、rasファルネシル・タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、ras阻害剤、ras-GAP阻害剤、脱メチル化レテリップチン(retellip
tine)、エチドロン酸レニウムRe 186、リゾキシン、リボザイム、RIIレチンアミド、ログレチミド(rogletimide)、ロヒツカイン(rohitukine)、ロムルチド、ロキニメクス(roquinimex)、ルビギノン(rubiginone)B1、ルボキシル(ruboxyli)、サ芬ゴル(safingol)、サイントピン(saintopin)、SarCNU、サルコフィトールA、サルグラモスチム、Sdi 1ミメティクス、セムスチン、老化由来阻害剤1、センス・オリゴヌクレオチド、シグナル伝達阻害剤、シグナル伝達調整剤、一本鎖抗原結合タンパク質、シゾフィラン、ソブゾキサン、ナトリウム・ボロカブテート、フェニル酢酸ナトリウム、ソルベロール(solverol)、ソマトメジン結合タンパク質、ソネルミン、スバルホシン酸(sparfuside acid)、スピカマイシンD、スピロムスチン(spiromustine)、スプレノペンチン、スponジスタチン1、スクアラ
10
20
30
40
50

ミン、幹細胞阻害剤、幹細胞分裂阻害剤、スチピアミド(stipiamide)、ストロメリシン阻害剤、スルフィノシン(sulfinosine)、超活性血管作用性腸ペプチド・アンタゴニスト、スラジスタ(suradista)、スラミン、スワンソニン、合成グリコサミノグリカン、タリムスチン(tallimustine)、タモキシフェン・メチオジド、タウロムスチン(tauromustine)、タキソール、タザロテン、テコガラン・ナトリウム、テガフル、テルラピリリウム(telurapyrylium)、テロメラーゼ阻害剤、テモポルフィン、テモゾロマイド、テニポシド、テトラクロロデカオキシド、テトラゾミン(tetrazomine)、タリブ拉斯チン(thaliblastine)、サリドマイド、チオコラリン(thiocoraline)、チオグアニン、トロンボポエチン、トロンボポエチン・ミメティク、チマルファシン(thymalfasin)、チモポエチン受容体アゴニスト、チモトリナン(thymotrinan)、甲状腺刺激ホルモン、スズ・エチル・エチオブルプリン、チラバザミン、二塩化チタノセン、トプセンチン(topsentin)、トレミフェン、全能性幹細胞因子、翻訳阻害剤、トレチノイン、トリアセチルウリジン、トリシリビン(triciribine)、トリメトレキセート、トリプトレリン、トロピセトロン、ツロステライド(turosteride)、チロシン・キナーゼ阻害剤、チルホスチン、UBC阻害剤、ウベニメクス、尿生殖洞由来成長阻害因子、ウロキナーゼ受容体アンタゴニスト、バプレオチド(vapreotide)、バリオリン(variolin)B、ベクター系、赤血球遺伝子治療薬、ベラレゾール(velarel)、ベラミン(veramine)、ベルジンス(verdins)、ベルテポルフィン、ビノレルビン、ビンキサルチン(vinxaltine)、バイタクシン、ボロゾール、ザノテロン(zanoterone)、ゼニプラチソ(zeniplatin)、ジラスコルブ(zilascorb)、およびジノスタチン・スチマラマーが含まれる。好みしい追加の抗癌剤は、5-フルオロウラシルおよびロイコボリンである。
。

【 0 1 6 8 】

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

【表2】

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

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

10

20

30

40

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

10

【0171】

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

【0172】

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

【0173】

5.3 本発明の抗体の同定

5.3.1 アゴニスト抗体

本発明の抗体は、好ましくはEphA2受容体に作用し(すなわち、EphA2をリン酸化させ)、このEphA2受容体に免疫特異的に結合することができる。抗体が作用すると、EphA2がリン酸化し、その後で分解する。EphA2のリン酸化、活性、または発現のレベルをアッセイするための当技術分野で周知の方法ならどんな方法でも、候補EphA2抗体をアッセイしてそのアゴニスト活性を測定するために用いることができる(例えば、下記の6.2節を参照のこと)。

【0174】

5.3.2 癌細胞上に露出したEphA2エピトープに優先的に結合する抗体

本発明の抗体は、好ましくは、癌細胞(例えば、EphA2を過剰発現する細胞、および/またはリガンドに結合しない実質的なEphA2を有する細胞)上に露出するが、EphA2がリガンドに結合している1つまたは複数の非癌細胞上には露出しないEphA2エピトープに結合することができる。この実施形態では、本発明の抗体は、非癌細胞上には露出せず、癌細胞上に露出したEphA2エピトープに向けられる(例えば、下記の6.8節を参照のこと)。非癌細胞と癌細胞のEphA2膜分布の違いにより、非癌細胞上には露出しないあるエピトープが癌細胞上に露出する。例えば、通常EphA2はそのリガンド、EphrinA1に結合し、細胞同士が接触する領域に局在する。しかし、癌細胞は一般に、細胞-細胞接触を減少させ、またEphA2をそのリガンドよりも過剰に発現する。したがって、癌細胞では、細胞-細胞接触に局在しない非結合EphA2の量が増大する。一実施形態では、非結合で非局在のEphA2に優先的に結合する抗体自体が、本発明の抗体となる。

20

30

40

【0175】

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

50

に結合する抗体を比較する。露出したEphA2エピトープ抗体は、解離していない非癌細胞にはあまり結合しないが、解離した非癌細胞にはよく結合する。

【0176】

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

【0177】

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

【0178】

5.3.3 癌細胞表現型阻害抗体

本発明の抗体は、好ましくは、例えば軟寒天中での癌細胞コロニー形成、または三次元基底膜調製物中もしくは細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワーク形成を阻害し(好ましくは減少させ)、かつEphA2に免疫特異的に結合することができる。当業者は、候補EphA2抗体の、そのような挙動を阻害する能力をアッセイすることができる(例えば、下記の6.2節を参照のこと)。軟寒天中で懸濁した転移性腫瘍はコロニーを形成するが、良性腫瘍細胞はコロニーを形成しない。軟寒天中のコロニー形成は、Zelinskiら(2001, Cancer Res. 61:2301-6, 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているようにアッセイすることができる。アゴニスト活性についてアッセイすべき抗体を、ボトム寒天溶液およびトップ寒天溶液に含めることができる。転移性腫瘍細胞を軟寒天に懸濁させて、成長させることができる。EphA2癌細胞表現型阻害抗体がコロニー形成を阻害するであろう。

【0179】

癌細胞表現型阻害抗体を同定するために使用できる転移細胞に特異的な別の挙動は、マトリゲル(商標)などの三次元微小環境内の管状ネットワーク形成である。通常、癌細胞は迅速に集合して、マトリゲル(商標)全体に徐々に進入する管状ネットワークになる。EphA2癌細胞表現型阻害抗体の存在下で、癌細胞が集合して、分化した非癌細胞の挙動と類似した球状構造になる。したがって、EphA2癌細胞表現型阻害抗体を、癌細胞の管状ネットワーク形成を阻害するその能力により同定することができる。

【0180】

細胞増殖の接触阻害の増大(例えば、単層細胞培養物中のコロニー形成の減少)を検出する他の任意の方法を用いて、癌細胞表現型阻害抗体を同定してもよい。

【0181】

癌細胞表現型阻害抗体はまた、癌細胞コロニー形成を阻害するだけでなく、既に構築された癌細胞のコロニーに加えた場合、細胞殺滅、例えばネクローシスまたはアポトーシスによりコロニーを減少または除去させることもできる。ネクローシスおよびアポトーシスのアッセイ方法は当技術分野で周知である。

【0182】

5.3.4 K_{off} 速度が低い抗体

本発明のモノクローナル抗体のEphA2またはその断片に対する結合親和性、およびモノクローナル抗体-EphA2相互作用のオフ速度は、競合的結合アッセイにより測定することができる。競合的結合アッセイの一例は、量が増大する非標識EphA2の存在下での、関係するモノクローナル抗体による標識EphA2(例えば、 ^3H または ^{125}I)のインキュベーション、およびこの標識EphA2に結合したこのモノクローナル抗体の検出を含むラジオイムノアッセイである。モノクローナル抗体のEphA2に対する親和性、および結合オフ速度は、スキヤッチャード・プロット分析によるデータから測定することができる。第2のモノクロー

10

20

30

40

50

ナル抗体との競合もまた、ラジオイムノアッセイを用いて測定することができる。この場合、EphA2を、量が増大する第2の非標識モノクローナル抗体の存在下で、標識化合物(例えば、³Hまたは¹²⁵I)に接合したモノクローナル抗体とともにインキュベートする。

【0183】

好みの一実施形態では、EphA2-EphA2の動力学パラメータを特徴付けるため、候補Eph A2抗体を、当技術分野で周知である任意の表面プラズモン共鳴に基づくアッセイを用いてアッセイすることができる。それだけには限らないが、Biacore AB(ウプサラ、スウェーデン)から入手可能であるBIACORE機器;Affinity Sensors(フランクリン、マサチューセッツ州)から入手可能であるIASYS機器;Windsor Scientific Limited(バークス、英国)から入手可能であるIBISシステム、Nippon Laser and Electronics Lab(北海道、日本)から入手可能であるSPR CELLIAシステム、およびテキサス・インスツルメンツ(ダラス、テキサス州)から入手可能であるSPR Detector Spreetaを含む任意の市販のSPR機器を本発明で使用することができる。SPRに基づく技術の総説に関しては、Mullet et al., 2000, Methods 22:77-91;Dong et al., 2002, Review in Mol. Biotech., 82:303-23;Fivash et al., 1998, Current Opinion in Biotechnology 9:97-101;Rich et al., 2000, Current Opinion in Biotechnology 11:54-61を参照のこと。これらはすべてその全体が参考により本明細書に組み込まれる。それに加えて、米国特許第6,373,577号;米国特許第6,289,286号;米国特許第5,322,798号;米国特許第5,341,215号;米国特許第6,268,125号に記載の、タンパク質-タンパク質相互作用の測定用の任意のSPR機器およびSPRに基づく方法が、本発明の方法において意図されている。これらはすべてその全体が参考により本明細書に組み込まれる。10
20

【0184】

簡潔にいえば、SPRに基づくアッセイには、表面上での結合対の一方のメンバーの固定化、および溶液中でのこの一方のメンバーとこの結合対の他方のメンバーとの相互作用が関与する。SPRは、複合体の形成または解離時に起こる、表面近傍の溶媒の屈折率の変化を測定することに基づいて行われる。固定化が起こるこの表面は、SPR技術の中核であるセンサー・チップの表面である。この表面は、金の薄層でコートされたガラス表面からなり、ある分子のこの表面に対する結合を最適化するよう設計された一連の特殊表面の基礎をなす。各種センサー・チップは、特に下記で列挙した各社から市販されており、これらはすべて本発明の方法で使用することができる。センサー・チップの例には、BIAcore AB, Inc.から入手可能であるセンサー・チップ、例えばSensor Chip CM5, SA, NTA, HPAが含まれる。本発明の分子は、それだけには限らないが、アミン基を介した直接共有結合、スルフヒドリル基を介した直接共有結合、アビジンでコートした表面にビオチンを付着させること、炭水化物基にアルデヒドを結合させること、およびヒスチジン・タグをNTAチップに付着させることを含む、当技術分野で周知である任意の固定化方法および化学反応を用いて、センサー・チップの表面に固定化することができる。30

【0185】

より好みの一実施形態では、BIACORE(商標)動力学分析を用いて、モノクローナル抗体のEphA2に対する結合オン速度およびオフ速度を測定する(例えば、下記の6.7節を参照のこと)。BIACORE(商標)動力学分析には、固定化EphA2またはその断片を有するチップの表面に対するモノクローナル抗体の結合、あるいはこの表面からのこの抗体の解離を分析することを含む。40

【0186】

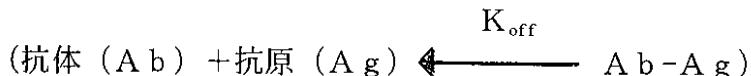
データ・セット全体を集めた後、得られる結合カープのグローバル・フィッティングを、製造者BIAcore, Inc.(ピスカタウェイ、ニュージャージー州)が供給するコンピュータ・アルゴリズムを用いて行う。これらのアルゴリズムは K_{on} および K_{off} を計算し、この K_{on} および K_{off} から見かけ上の平衡結合定数 K_D を、この2つの速度係数(すなわち、 K_{off}/K_{on})の比として推論する。これらのそれぞれの速度定数を誘導するより詳細な処理は、BIAevalution Software Handbook(BIAcore, Inc., ピスカタウェイ、ニュージャージー州)に記載されている。得られたデータの分析には、当技術分野で周知の任意の方法で行うことがで50

きる。得られた動力学データを解釈する様々な方法の総説については、Myszka, 1997, Current Opinion in Biotechnology 8:50-7; Fisher et al., 1994, Current Opinion in Biotechnology 5:389-95; O'Shannessy, 1994, Current Opinion in Biotechnology, 5:65-7; Chaiken et al., 1992, Analytical Biochemistry, 201:197-210; Morton et al., 1995, Analytical Biochemistry 227:176-85; O'Shannessy et al., 1996, Analytical Biochemistry 236:275-83を参照のこと。これらはすべてその全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0187】

本発明は、EphA2に免疫特異的に結合し、好ましくはその K_{off} 速度

【数1】



10

【0188】

が $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、より好ましくは $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満である抗体を含む。他の実施形態では、本発明の抗体は、EphA2に免疫特異的に結合し、その K_{off} が $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-3} s^{-1} 未満、 $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-4} s^{-1} 未満、 $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-5} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-6} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-7} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-8} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-9} s^{-1} 未満、または 10^{-10} s^{-1} 未満である。

20

【0189】

したがって、本発明は、EphA2に結合する抗体、特にEphA2の細胞外ドメインに結合する抗体を、EphA2を発現する細胞、特にEphA2を(同じ細胞の種類の非癌細胞に比べて)過剰発現する癌細胞、好ましくは転移性癌細胞とともにインキュベートし、その後で(アゴニスト抗体について)EphA2のリン酸化および/またはEphA2の分解についてアッセイし、(癌細胞表現型阻害抗体について)軟寒天中でのコロニー形成、または三次元基底膜調製物中もしくは細胞外マトリックス調製物中での管状ネットワーク形成の減少についてアッセイし、あるいは(露出EphA2エピトープ抗体について)例えは免疫蛍光法により、抗体が非癌細胞に比べて癌細胞により結合しているかどうかをアッセイし、それにより本発明のEphA2抗体を同定する方法を提供する。

30

【0190】

5.4 核酸分子

本発明のEphA2抗体に加えて、EphA2に特異的な核酸分子を、EphA2の発現を低下させるために使用し、したがって本発明の方法で使用することもできる。

40

【0191】

5.4.1 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の全部または一部と相補的な分子、例えは二本鎖cDNA分子のコード鎖と相補的な分子またはmRNAと相補的な分子を含む。したがって、アンチセンス核酸は、センス核酸と水素結合し得る。このアンチセンス核酸は、あるコード鎖の全体またはその一部、例えはタンパク質コード領域(もしくは読み取り枠)の全部または一部と相補的であり得る。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得る。これらの非コード領域('5'および3'非翻訳領域')は、このコード領域に隣接し、アミノ酸に翻訳されない5'および3'配列である。一実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、

5'-CCAGCAGTACCGCTTCCTTGCCCTGCGGCCG-3'(配列番号49)である(例えは、下記の6.6節を参照のこと)。

【0192】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドの長さは、例えは5、10、15、20、25、30、35、40

50

、45、または50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当技術分野で周知の手順を用いた化学合成反応および酵素ライゲーション反応により作成することができる。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、分子の生物活性を向上させるように、またはアンチセンス核酸とセンス核酸の間で形成された二重鎖の物理的安定性を向上させるように設計された、天然ヌクレオチドまたは様々に修飾されたヌクレオチドを用いて化学的に合成することができる。例えば、ホスホロチオネ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できる。このアンチセンス核酸を生成するために使用できる修飾ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、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ルメチル)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、¹⁰-D-ガラクトシリケオシン(galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンチルアデニン、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-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、

²⁰-D-マンノシリケオシン(mannosylqueosine)、5'-メトキカルボメチルウラシル、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(v)、ワイプトキソシン、ブソイドウラシル、ケオシン(queosine)、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-オキシ酢酸メチルエステル、オキシ酢酸メチルエステル、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、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向にサブクローニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成することができる(すなわち、この挿入された核酸から転写されたRNAは、関連する標的核酸、すなわちEphA2に対してアンチセンス方向にある)。

【0193】

本発明のアンチセンス核酸分子は通常、被験者に投与されるか、in situで生成され、したがってこれらの分子は、本発明の選択されたペプチドをコードする細胞mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、それに結合し、それにより、例えば転写および/または翻訳を阻害することで発現を阻害する。このハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する通常のヌクレオチド相補性により行うか、あるいは例えば、DNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、二重らせんの主溝に特異的な相互作用を通じて行うことができる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の一例は、ある組織部位への直接注入を含む。あるいは、アンチセンス核酸を選択細胞に標的指向するように修飾し、その後で全身投与することができる。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子を修飾することができ、したがってこれらの分子は、例えばこのアンチセンス核酸分子を、細胞表面の受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結させることにより、選択された細胞表面上に発現される受容体または抗原に特異的に結合する。このアンチセンス核酸分子は、本明細書に記載のベクターを用いて細胞に送達することもできる。このアンチセンス分子の十分な細胞内濃度を実現するには、このアンチセンス核酸分子が強力なpol IIまたはpol IIIプロモータの制御下に置かれているベクター構築物が好ましい。³⁰

【0194】

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り得る。-アノマー核酸分子は、通常の-ユニットとは反対に、鎖が互いに平行に位置する相補DNAを有する特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する(Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6625)。この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 et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:6131)またはキメラRNA-DNA類似体(Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215:327)を含んでいてもよい。

【0195】

5.4.2 リボザイム

10

20

30

40

50

本発明はまた、リボザイムを含む。リボザイムは、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNA分子であり、これらの分子は、それらが相補領域を有するmRNAなどの一本鎖核酸を切断する能力がある。したがって、リボザイム(例えば、Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334:585-591に記載のハンマー・ヘッド・リボザイム)を用いてmRNA転写物を触媒により切断し、それによりmRNAによりコードされたタンパク質の翻訳を阻害することができる。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、Tetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体は、活性部位のヌクレオチド配列が、米国特許第4,987,071号および米国特許第5,116,742号に記載の切断すべきヌクレオチド配列と相補的になるように構築することができる。あるいは、本発明のポリペプチドをコードするmRNAを用いて、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択することもできる。例えば、Bartel and Szostak, 1993, Science 261:1411を参照のこと。

10

20

30

40

50

【0196】

5.4.3 RNA干渉

ある実施形態では、RNA干渉(RNAi)分子を用いてEphA2の発現を低下させる。RNA干渉(RNAi)は、二本鎖RNA(dsRNA)の、それ自身の配列に対応する遺伝子の発現を抑制する能力として定義される。RNAiはまた、転写後遺伝子サイレンシングまたはPTGSとも呼ばれる。通常はある細胞の細胞質でみられる唯一のRNA分子は一本鎖mRNAであるため、この細胞はdsRNAを認識し、dsRNAを21~25塩基対(二重らせん約2回転)を含む断片に切断する。この断片のアンチセンス鎖はセンス鎖から十分に分離され、したがってこのアンチセンス鎖は内因性細胞mRNAの一分子上の相補センス配列とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションは、二本鎖領域中のmRNAの切断の引き金となり、これによって、翻訳されてポリペプチドになるその能力を失わせる。特定の遺伝子に対応するdsRNAを導入することで、特定の組織および/または選択された時間におけるその遺伝子のその細胞自身による発現をノックアウトする。

【0197】

二本鎖(ds)RNAを用いて、それを哺乳動物中での遺伝子発現に干渉させることができる(その全体が参考により本明細書に組み込まれるWianny & Zemicka-Goetz, 2000, Nature Cell Biology 2:70-75)。dsRNAをEphA2の機能を阻害するRNAまたはRNAiとして用いて、EphA2の無発現変異体の表現型と同じ表現型を生成させる(Wianny & Zemicka-Goetz, 2000, Nature Cell Biology 2:70-75)。

【0198】

5.5 治療有用性または予防有用性の特徴付けおよび実証

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

【0199】

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

用な用量を決定することができる。血漿濃度は、例えば高速液体クロマトグラフィーで測定することができる。

【0200】

本発明に従って用いられる治療薬の抗癌活性は、マウスEphA2をヒトEphA2で置き換えたSCIDマウス・モデルまたは遺伝子組換えマウス、ヒト異種移植片を有するヌード・マウス、下記6章に記載の動物モデル、または当技術分野で周知の任意の動物モデル、およびその全体が参照により本明細書に組み込まれるRelevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development(1999, eds. Fiebig and Burger);Contributions to Oncology(1999, Karger);The Nude Mouse in Oncology Research(1991, eds. Boven and Winograd);Anticancer Drug Development Guide(1997 ed. Teicher)に記載の任意の動物モデルなどの、癌研究用の様々な実験動物モデルにより測定することができる。10

【0201】

5.5.1 治療有用性または予防有用性の実証

本発明のプロトコルおよび組成物は、ヒトで使用する前に、所望の治療および予防活性についてin vitroで、その次にin vivoでアッセイすることが好ましい。例えば、ある具体的な治療プロトコールによる投与が適応であるかどうかを決定するのに用いることができるin vitroアッセイには、患者の組織サンプルを培養物中で増殖させ、プロトコルに供するか、そうでなければプロトコルをそれに投与し、このようなプロトコルのこの組織サンプルに対する影響、すなわちEphA2のリン酸化/分解の増大、軟寒天中での増殖および/またはコロニー形成、あるいは三次元基底膜調製物または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の阻害または低下について観察する、in vitro細胞培養アッセイが含まれる。接触細胞の増殖または生存のレベルが低いことは、治療薬が患者の状態を治療するのに有効であることを示す。あるいは、患者からの細胞を培養する代わりに、腫瘍または悪性細胞株の細胞を用いて治療薬および治療方法をスクリーニングすることもできる。当技術分野で標準の多くのアッセイを用いてそのような生存および/または増殖を評価することができる。例えば、細胞増殖は、³H-チミジンの組込みの測定、直接細胞カウント、プロトオノンコジーン(例えば、fos、myc)などの周知の遺伝子の転写活性の変化の検出、または細胞周期マーカーによりアッセイすることができる。細胞生存率は、トリパンブルーによる着色で評価することができる。細胞分化は、形態の変化、EphA2のリン酸化/分解の増大、軟寒天中での増殖および/またはコロニー形成の減少、三次元基底膜調製物または細胞外マトリックス調製物中の管状ネットワーク形成の減少などに基づいて視覚的に評価することができる。20

【0202】

治療に使用される化合物は、ヒトでアッセイする前に、それだけには限らないが、ラット、マウス、ニワトリ、雌ウシ、サル、ウサギ、ハムスターなどを含む適切な動物モデル系、例えば上述の動物モデルで試験することができる。これらの化合物を次に、適切な臨床試験で使用する。30

【0203】

さらに、当業者に周知のアッセイならどんな方法でも、癌の治療または予防のための本明細書で開示された併用療法の予防および/または治療有用性を評価するために使用することができる。40

【0204】

5.6 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に有用なバルク医薬組成物(例えば、低純度または非滅菌組成物)、および単位剤形の調製に使用することができる医薬組成物(すなわち、被験者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、予防または治療有効量の本明細書で開示された予防および/または治療薬、またはそれらの薬剤の併用、および製薬上許容される担体を含む。本発明の組成物は、予防または治療有効量の1種または複数の本発明のEphA2抗体および製薬上許容される担体を含むか、またはEphA2の発現を減少させる薬剤(例えば、アンチセンス・オリゴヌクレオチド)および製薬上許容され50

る担体を含むことが好ましい。さらなる一実施形態では、本発明の組成物はさらに追加の治療薬、例えば抗癌薬を含む。

【0205】

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

【0206】

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

【0207】

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

【0208】

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

【0209】

具体的な一実施形態では、望ましくは本発明の予防または治療薬を治療が必要な領域に

10

20

30

40

50

局所投与することができる。これは例えば、それだけには限らないが、注射による局所輸液、またはインプラントにより実現することができる。このインプラントは、サイラスティック膜などの膜や纖維を含む多孔質材料、非多孔質材料、またはゼラチン材料からなる。

【0210】

別の一実施形態では、この予防または治療薬は、制御放出系または持続放出系で送達することができる。一実施形態では、ポンプを用いて制御または持続放出を実現することができる(Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参考のこと)。別の一実施形態では、ポリマー材料を用いて本発明の抗体またはその断片の制御または持続放出を実現することができる(例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida(1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball(eds.), Wiley, New York(1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); 米国特許第5,679,377号; 米国特許第5,916,597号; 米国特許第5,912,015号; 米国特許第5,989,463号; 米国特許第5,128,326号; 国際公開W099/15154号およびW099/20253号を参考のこと)。持続放出性製剤中で用いられるポリマーの例は、それだけには限らないが、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコール酸(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコール酸)(PLGA)、ポリオルトエステルが含まれる。好ましい一実施形態では、持続放出性製剤に用いられるポリマーは不活性であり、浸出性不純物を含まず、貯蔵安定性であり、滅菌されており、生分解性である。別の一実施形態では、制御放出系または持続放出系を予防または治療標的の近くに位置させることができ、したがって全身向け用量の一部しか必要としない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138(1984)を参考のこと)。

【0211】

制御放出系についてはLangerの総説で論じられている(1990, Science 249:1527-1533)。当業者に周知の方法ならどんな方法でも、本発明の1種または複数の持続放出性製剤の製造に使用することができる。例えば、米国特許第4,526,938号; 国際公開W091/05548号およびW0 96/20698号; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; and Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760を参考のこと。これらはすべてその全体が参考により本明細書に組み込まれる。

【0212】

5.6.1 遺伝子治療

具体的な一実施形態では、EphA2の発現を低下させる核酸(例えば、EphA2アンチセンス核酸またはEphA2 dsRNA)を投与して、遺伝子治療により癌を治療、予防、または管理する。遺伝子治療とは、発現したかまたは発現可能な核酸を被験者に投与することで行われる療法を指す。本発明のこの実施形態では、アンチセンス核酸が生成され、予防または治療効果を媒介する。

【0213】

当技術分野で利用可能な遺伝子治療の方法ならどんな方法でも、本発明に従って使用することができる。以下、典型的な方法を説明する。

【0214】

遺伝子治療の方法の総説については、Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12

10

20

30

40

50

:488; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191; May, 1993, *TIBTECH* 11:155を参照のこと。使用できる組換えDNA技術に関する当技術分野で周知の方法は、Ausubel et al.(eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY(1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY(1990)に記載されている。

【0215】

好みの一態様では、本発明の組成物はEphA2の発現を減少させるEphA2核酸を含み、この核酸は、適切な宿主中で核酸を発現する発現ベクターの一部をなす。具体的には、このような核酸はプロモーター、好みくは非相同的なプロモーターを有し、このプロモーターは誘発性または構成的であり、任意選択で組織特異的である。別の特定の一実施形態では、EphA2の発現を低下させる核酸および他の任意の所望の配列がゲノムの所望の部位で相同的組換えをプロモートする領域に隣接している核酸分子を使用し、それによりEphA2の発現を低下させる核酸の染色体内発現を実現する(Koller and Smithies, 1989, *PNAS* 86:8932; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435)。

【0216】

この核酸の対象への送達は、対象を核酸または核酸送達ベクターに直接露出させることにより直接的に行うこともでき、細胞を最初に *in vitro* で核酸により形質転換させ、次にそれを対象に移植することにより間接的に行うこともできる。これらの2つのアプローチはそれぞれ、*in vivo* 遺伝子治療および *ex vivo* 遺伝子治療として知られている。具体的な一実施形態では、核酸配列を直接 *in vivo* 投与する。これは、当技術分野で周知の数多くの方法、例えば、これらの核酸配列を適切な核酸表現ベクターの一部として構築し、このベクターを投与することで、これらの核酸配列を細胞間に所在させること、例えば、欠陥のあるもしくは弱毒性のレトロウイルスまたは他のウイルス・ベクターを用いた感染(米国特許第4,980,286号)、裸のDNAの直接注射、微粒子照射(例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont)、脂質、細胞表面受容体、またはトランスフェクション剤を使ったコーティング、リポソーム、微粒子、またはマイクロカプセル中への封入、これらの核酸配列を核に入り込むことが知られているペプチドと一緒に投与すること、このベクターを受容体を介したエンドサイトシスを受けるリガンドと一緒に投与すること(例えば、Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429を参照。受容体を特異的に発現するタイプの細胞を標的とするために用いることができる)などにより実現することができる。別の実施形態では、リガンドがエンドソームを分裂させるための膜融合ウイルス・ペプチドを含む核酸-リガンド複合体を形成し、これにより核酸がリソソーム分解を起こすことを防ぐ。別の実施形態では、ある具体的な受容体を標的とすることで、核酸を細胞特異的な取り込みおよび発現のために *in vivo* で標的に送り込むことができる(例えば、国際公開WO 92/06180号; WO 92/22635号; WO92/20316号; WO93/14188号, WO 93/20221号を参照のこと)。あるいは、相同組換えにより、核酸を細胞内に導入して、発現のため宿主細胞DNAに組み込むことができる(Koller and Smithies, 1989, *PNAS* 86:8932; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435)。

【0217】

具体的な一実施形態では、EphA2の発現を減少させる核酸配列を含むウイルス・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(Miller et al., 1993, *Mol. Enzymol.* 217:581を参照のこと)。これらのレトロウイルス・ベクターには、ウイルス・ゲノムを正確に封入し、宿主細胞DNAに組み込むために必要な成分が含まれる。遺伝子治療で用いられるべき核酸配列を、1つまたは複数のベクターにクローニングして、核酸の被験者への送達を円滑に進める。レトロウイルス・ベクターに関する詳細は、Boesen et al., 1994, *Biotherapy* 6:291-302に見られるが、ここではレトロウイルス・ベクターを用いて *mdr 1* 遺伝子を造血幹細胞に送達して、この幹細胞の化学療法に対する耐性を高めることが述べられている。遺伝子治療におけるレトロウイルス・ベクターの使用を例示する他の参考文献は、Clowes et al., 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Klein et

10

20

30

40

50

al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:1 29-141; Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics Devel. 3:110-114である。

【0218】

遺伝子治療で使用することができる他のウイルス・ベクターは、アデノウイルスである。アデノウイルスは、遺伝子を呼吸器上皮に送達するための特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは呼吸器上皮に感染し、そこで軽度の疾患を引き起こす。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという利点がある。Kozarsky and 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提供している。Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10は、アデノウイルス・ベクターを用いてアカゲザルの呼吸器上皮に遺伝子が送達されることを実証した。アデノウイルスの他の使用例は、Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225; 国際公開W094/12649号; Wang et al., 1995, Gene Therapy 2:775にみられる。好ましい一実施形態では、アデノウイルス・ベクターを使用する。

【0219】

アデノ関連ウイルス(AAV)を遺伝子治療に用いることも提案されている(Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; 米国特許第5,436,146号)。

【0220】

遺伝子治療への別のアプローチには、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウムを介した形質移入、ウイルス感染などの方法により、組織培養物中の細胞に遺伝子を導入することが含まれる。通常、この導入方法は、細胞に選択可能なマーカーを導入することを含む。次に、この細胞を選択下に置き、導入された遺伝子を取り込み発現する細胞を分離する。次に、これらの細胞を対象に送達する。

【0221】

この実施形態では、核酸をその細胞に投与してから、得られる組換え細胞を *in vivo* 投与する。このような導入は、それだけには限らないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、核酸配列を含むウイルス・ベクターまたはバクテリオファージ・ベクターによる感染、細胞融合、染色体を介した遺伝子導入、微小核体(すなわち、ミクロセル)を介した遺伝子導入、スフェロプラスト融合などを含む当技術分野で公知の任意の方法により行うことができる。当技術分野では外来遺伝子を細胞に導入するための多くの技術が知られており(例えば、Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618を参照のこと)、受容体の必要な発達的機能および生理的機能が損なわれない限り、本発明に従って使用することができる。この技法は、核酸の細胞への安定した導入を提供するものであり、したがって核酸は細胞により発現可能であり、好ましくはその細胞子孫による遺伝および発現が可能である。

【0222】

得られる組換え細胞は、当技術分野で周知の様々な方法により、被験者に送達することができる。使用が想定される細胞の量は所望の効果、患者の状態などに依存し、当業者が決定することができる。

【0223】

5.6.2 製剤

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

【0224】

すなわち、本発明のEphA2アゴニスト抗体または他の抗EphA2薬剤(例えば、アンチセンス核酸もしくは他の核酸)ならびにその製薬上許容される塩および溶媒和化合物は、(口もしくは鼻を通じた)吸入もしくは注入による投与、経口投与、非経口投与、または(口腔内投与、経膣投与、経直腸投与、舌下投与などの)粘膜投与向けに調製することができる。

10

20

30

40

50

好ましい一実施形態では、局所または全身非経口投与を使用する。

【0225】

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

【0226】

経口投与用製剤を適切に調製して、有効化合物を制御放出させることができる。

【0227】

頬側投与では、これらの組成物は、通常の方法で調製される錠剤またはトローチ剤の形をとることができる。

【0228】

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

【0229】

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

【0230】

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

【0231】

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

【0232】

10

20

30

40

50

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

【0233】

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

【0234】

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

【0235】

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

【0236】

これらの化合物は、所望であれば、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得る包装またはディスペンサ装置に入れて提供することができる。この包装、例えばブリスター包装は、金属やプラスチック箔を含んでいてもよい。この包装またはディスペンサ装置には投与用の説明書を添付してもよい。

【0237】

5.6.3 用量

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

【0238】

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

【0239】

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

【0240】

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

【0241】

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

10

20

30

40

50

【 0 2 4 2 】

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

【 0 2 4 3 】**5.7 キット**

本発明は、本発明のモノクローナル抗体を充填した1つまたは複数の容器を含む薬剤包装またはキットを提供する。さらに、癌の治療に有用な1種または複数の他の予防または治療薬をこの薬剤包装またはキットに含めることもできる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の1種または複数の成分を充填した1つまたは複数の容器を含む薬剤包装またはキットも提供する。このような(1つまたは複数の)容器には任意選択で、薬剤または生物学的製剤の製造、使用、または販売を規制する政府当局が定めた形式の、ヒト投与向けの製造、使用、または販売に関する当局の承認を受けたことを反映する注意書きが付いている。

【 0 2 4 4 】

本発明は、上記方法で使用することができるキットを提供する。一実施形態では、キットは本発明の1種または複数のモノクローナル担体を含む。他の一実施形態では、キットは1つまたは複数の容器中に癌の治療に有用な1種または複数の他の予防または治療薬を含む。本発明のモノクローナル抗体は、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248、Eph099B-233.152、または表6に示す抗体のいずれかであることが好ましい。ある実施形態では、他の予防または治療薬は化学療法薬である。他の実施形態では、この予防または治療薬は生物学的療法薬またはホルモン療法薬である。

【 実施例 】**【 0 2 4 5 】****6. 実施例****6.1 モノクローナル抗体の調製****免疫および細胞融合**

EphA2細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を、EphA2-Fc融合タンパク質を用いて生成した。この融合タンパク質は、これの分泌を促進するためにヒト免疫グロブリンに結合させたヒトEphA2細胞外ドメインからなった。

【 0 2 4 6 】

EphA2-Fcを5μg含むTiterMaxアジュバント(総体積100μl)を、2群(Balb/cマウス(A群)またはSJLマウス(B群))のマウス各5匹の左中足部に、0日目および7日目に注射した。EphA2-Fcを10μg含むPBS(総体積100μl)をマウスの左中足部に、12日目および14日目に注射した。15日目に膝窩リンパ節および鼠径リンパ節細胞を左足および鼠径部から取り出し、P3XBC1-2-13細胞と体細胞融合(PEG使用)させた。

【 0 2 4 7 】

抗体Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248およびEph099B-233.152をそれぞれ産生するハイブリドーマを、免疫SJLマウスのリンパ節融合細胞から単離した。

【 0 2 4 8 】**抗体スクリーニング**

大量培養ハイブリドーマの上清のEphA2に対する免疫反応性を、標準的な分子生物学的手法(ELISAイムノアッセイ法など)を用いてスクリーニングした(表6、第4列)。さらにEphA2モノクローナル抗体の1つ(EA2:ATCC受託番号PTA-4380。米国特許出願第_号、名称「EphA2アゴニスト・モノクローナル抗体とその使用法」、2003年5月12日出願、代理人事件整理番号10271-107-999を参照)のEphA2への結合を阻害する能力について、上清をスクリーニングした。簡単に説明すると、標識EA2がEphA2-Fcに結合する能力を、非標識EA2もしくは非標識Eph099B-208.261の存在下で競合ELISA法によりアッセイした(図1)。加える非標識抗体の濃度の増加に伴い、どちらの抗体もEphA2-Fcに結合する標識EA2量を減少させることができた。また他の多くの抗体もEA2のEphA2-Fcへの結合を阻止することができた(表6

10

20

30

40

50

、第3列)。

【0249】

6.2 EphA2モノクローナル抗体は腫瘍細胞の転移性を減少させる

6.2.1 EphA2のリン酸化と分解

EphA2抗体は、MDA-MB-231細胞内のEphA2のチロシンリン酸化および分解を促進した。EphA2アゴニスト抗体もしくは対照の存在下で、MDA-MB-231単層細胞を37℃でインキュベートした。次にEphA2特異的抗体(D7:Upstate Biologicals社、Lake Placid、NYより購入;アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Tissue Collection)に2000年12月8日寄託;ATCC番号PTA2755)を用いて細胞懸濁液を免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、リン酸化チロシン特異的抗体(PY20もしくは4G10:Upstate Biologicals社、Lake Placid NY、より購入)を用いてウエスタン・プロット分析を行った。Eph099B-208.261とEA2(図2A~2B)およびEph099B-233.152(図4A)はEphA2のリン酸化を増加させた。ローディング対照として、メンブレンを一部剥がし免疫沈降法で使用したEphA2特異的抗体(D7)で再精査した(図2C~2D)。また、Eph099B-102.147ならびにEph099B-210.248を含む本発明の他のEphA2抗体も、EphA2のリン酸化を増大させることができた(表6、第5列)(データ示さず)。

10

【0250】

EphA2アゴニスト抗体存在下で、MDA-MB-231単層細胞を37℃でインキュベートした。次に細胞懸濁液をSDS-PAGEにより分離し、EphA2特異的抗体(D7)を用いてウエスタン・プロット分析を行った。Eph099B-208.261とEA2(図3A~3B)およびEph099B-233.152(図4B)はEphA2タンパク質レベルを減少させた。ローディング対照として、メンブレンを一部剥がし-カテニン特異的抗体で再精査した(図3C~3G)。また、Eph099B-102.147ならびにEph099B-210.248を含む本発明の他のEphA2抗体も、抗体での処理の4時間後、および/または24時間後にも、EphA2のタンパク質レベルを減少させることができた(表6、第6~7列)(データ示さず)。EphA2の発現が減少したのは、アゴニスト抗体が結合したことによるEphA2タンパク質の分解に応じ、mRNAの発現レベルが減少したことが一部原因である(データ示さず)。

20

【0251】

ウエスタン・プロット分析および免疫沈降法は既報(Zantekら、1999、Cell Growth Diff. 10:629~638頁;この文献全体を参照して本明細書に援用する)に従い行った。簡単に説明すると、単層細胞の界面活性剤抽出物を1%のTriton X-100(Sigma社、St.Louis、MO)を含むTris緩衝生理食塩水に抽出した。タンパク質濃度を測定(BioRad社、Hercules、CA)した後、1.5mgの細胞溶解液を免疫沈降し、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース(PROTRAN(商標):Schleicher and Schuell社、Keene、NH)に転写した。高感度化学発光(ECL)法(Pierce社、Rockford、IL)および放射線撮影法(X-OMAT:Kodak社、Rochester、NY)により抗体の結合を検出した。

30

【0252】

6.2.2 軟寒天内での増殖

本発明の抗体が軟寒天内で癌細胞の形成を阻害する能力を、Zelinskiら(2001、Cancer Res. 61:2301~2306頁)に従いアッセイした。簡単に説明すると、精製した抗体もしくは対照液(PBS)の存在下で、細胞を軟寒天内に37℃で7日間懸濁させた。抗体は懸濁時に底部と上部両方の寒天液に投与した。Olympus社製40x対物レンズ装着倒立型位相差顕微鏡CK-3を用い、コロニー形成を顕微鏡下でスコアした。少なくとも3個の細胞を含む細胞群を陽性とスコアした。Eph099B-208.261とEA2は共に軟寒天内でのコロニー増殖を阻害した(図5)。また、Eph099B-102.147ならびにEph099B-210.248を含む本発明の他の抗体も、軟寒天内でのコロニー増殖を阻害することができる(表6、第9列)(データ示さず)。

40

【0253】

本発明の抗体が軟寒天内で既に形成されている癌細胞コロニーを排除する能力をアッセイした。抗体を軟寒天内での増殖3日目まで癌細胞に加えなかつこと以外、アッセイ方法は上記のものと同様である。本発明の抗体には、軟寒天内の癌細胞コロニーの増殖を低

50

速化もしくは減少させることができるものがある一方、Eph099B-102.147、Eph099B-208.261、Eph099B-210.248ならびにEph099B-233.152などのように、既に軟寒天内で増殖している癌細胞を殺すことができるものもある(表6、第10列)(データ示さず)。

【0254】

6.2.3 MATRIGEL(商標)内での管状ネットワークの形成

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

【0255】

6.2.4 In vivoでの増殖

本発明の抗体がin vivoでの腫瘍癌細胞の増殖を阻害する能力をアッセイした。Eph099B-233.152はin vivoでの腫瘍細胞の増殖を阻害し、担癌マウスの生存期間を延長させることができる。簡単に説明すると、 5×10^6 個のMDA-MB-231乳癌細胞を無胸腺マウスに皮下移植した。腫瘍が平均で体積 100mm^3 に増殖した後、マウスに6mg/mlのEph099B-233.152もしくは対照PBSを3週間にわたり週2回腹腔内投与した。腫瘍増殖を評価し、腫瘍体積を初期腫瘍体積(100mm^3)で割った比として表した。30日後、Eph099B-233.152を投与したマウスは、PBSを投与したマウスより腫瘍が小さかった(図6A)。腫瘍増殖は腫瘍の体積が 1000mm^3 に達するまで続けられた。マウスの生存率を、処置後それぞれの日に生存しているマウスの割合をスコアして評価した。調べた各時点で、Eph099B-233.152投与群のマウスがより大きい割合で生存した(図6B)。36日までに対照群のマウスはすべて死亡したのに対し、Eph099B-233.152混合マウスは70%が死亡しただけであった。

【0256】

またEA2およびEph099B-208.261もin vivoでの腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。 5×10^6 個のMDA-MB-231乳癌細胞を正位に(orthotopically)もしくは皮下に、 5×10^6 個のA549肺癌細胞を皮下に、それぞれ無胸腺マウスへ移植した。この腫瘍が平均で体積 100mm^3 に増殖した後、マウスに6mg/kgのEphA2アゴニスト抗体もしくは陰性対照(PBSもしくは1A7抗体)を3週間にわたり週2回腹腔内投与した。実験動物は通例最後の処置から最低2週間後または腫瘍が 2000mm^3 を超えた時点で屠殺した。腫瘍増殖を評価し、腫瘍体積を初期腫瘍体積(100mm^3)で割った比として、または総体積として表した。正位移植されたMDA-MB-231細胞の増殖は、EA2により阻害された(図7A)。皮下移植されたMDA-MB-231細胞の増殖は、EA2、Eph099B-208.261およびEph099B-233.152により阻害された(図7B～7D)。皮下移植されたA549細胞の増殖は、EA2もしくはEph099B-208.261により阻害された(図7C)。

【0257】

6.3 乳癌細胞におけるエストロゲン依存性

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

【0258】

EphA2過剰発現は悪性増殖を増加させた(図8A～8B)。増殖は次のようにアッセイした。MCF-7^{n/o}(対照細胞)もしくはMCF-7^{EphA2}細胞を96ウェルプレートに播種した。アラマーブルー(Biosource International社、Camarillo、CA)を製造者の指示に従い用いて細胞増殖

10

20

30

40

50

を測定した。既報(Zelinskiら、2001、Cancer Res.61:2301～2306頁)に従い軟寒天内でコロニーを形成し、少なくとも3個の細胞を含む細胞群を陽性と定義し顕微鏡下でスコアした。このデータはそれぞれの試料について別々の10箇所の強拡大顕微鏡視野の平均を表し、また少なくとも3回の別々の実験を代表するものである。誤差棒は少なくとも3回の異なる実験の平均の標準誤差を表し、Microsoft Excelソフトウェアを用いて求めた。

【0259】

MCF-7対照細胞は軟寒天にコロニーを形成することがほとんどできなかったが(1視野当たり平均0.1コロニー)、MCF-7^{EphA2}細胞はより大きいまたより数多くのコロニーを形成し(1視野当たり4.7コロニー;P<0.01)、それらは少なくとも3週間持続した(図8A、データ示さず)。軟寒天ではコロニー形成が増加したが、単層培養においてはMCF-7^{EphA2}細胞の増殖は対応する対照と相違はなく(図8B)、これはEphA2の増殖促進活性は、足場非依存性の(悪性)細胞増殖をモデルとする実験条件を用い最も顕著だったことを示している。

【0260】

軟寒天でのコロニー形成の増加と一致し、正位移植されたMCF-7^{EphA2}細胞はより大きいまたより早く増殖する腫瘍をin vivoで形成した。生後6週目～8週目の無胸腺(nu/nu)マウスをHarlan Sprague Dawley(Indianapolis、IN)より購入した。必要な場合、エストラジオール放出制御ペレット(0.72mgの17-エストラジオール、60日処方)を滅菌した14ゲージの外套針を通して腫瘍移植の24時間前に皮下注入し、60日間を超えて継続する実験については、60日毎にペレットを交換した。1×10⁶個のMCF-7^{neo}もしくはMCF-7^{EphA2}細胞を直接視覚化しながら乳房脂肪部に注入した。必要な場合、タモキシフェン(1mg)を経口胃管栄養法により週6日投与した。

【0261】

補充エストロゲン(17-エストラジオール、Sigma社より購入)の存在下で、MCF-7^{EphA2}細胞は対応する対照と比較して腫瘍の体積が2倍の増加を示した(図9A)。切除の時点においてより血管および局所浸潤的である点で、EphA2過剰発現腫瘍は対照腫瘍と表現型が異なった(データ示さず)。これらの腫瘍がEphA2を発現したことを確認するため、切除した腫瘍の細胞全体の溶解液についてEphA2特異的抗体を用いてウエスタン・プロット分析を行った(図9B)。次いで同等量の試料のローディングを検証するため、メンブレンを一部剥がし-カテニン抗体で再精査した。EphA2の相対量は、初期細胞(移植前)より腫瘍試料において高く、腫瘍がEphA2レベルの高い細胞から生じたことを示している。In vitroとin vivoのモデルでの知見を比較して、EphA2過剰発現はより攻撃的な表現型を生むことが示される。

【0262】

平行実験を外来性エストロゲンの非存在下で行った。エストロゲンを実験的に欠乏させると、対照細胞とMCF-7^{EphA2}細胞間で細胞の挙動の相違が増した。MCF-7^{EphA2}細胞は対応する対照細胞よりもより効率的に軟寒天でコロニーを形成し続けたが(図10A)、この細胞は外来性エストロゲンの非存在下では増殖しなかった(図10B)。これに対して、対照細胞が単層で増殖するには補充エストロゲンが必要であった(図10B)。またMCF-7^{EphA2}細胞は、補充エストロゲン非存在下で腫瘍形成能を保持した。対照MCF-7細胞が触知できる腫瘍を形成することは稀であったが、MCF-7^{EphA2}細胞は12週間以上持続する腫瘍を形成した(図10C、データ示さず)。このように、in vitroとin vivoのアッセイシステムは共に、EphA2過剰発現は外来性エストロゲンの必要性を減少させることを確認している。

【0263】

MCF-7^{EphA2}細胞のタモキシフェンに対する感受性を測定した。タモキシフェン(4-ヒドロキシタモキシフェンをSigma社より購入)は対照MCF-7細胞の軟寒天でのコロニー形成を少なくとも60%減少させた。タモキシフェンのMCF-7^{EphA2}細胞に対する阻害作用はより低かった(25%の阻害、図11A)。特に、過剰量のエストラジオールはタモキシフェンの阻害効果を上回ったが、これはこの知見の特異性にさらに根拠を与えるものである(図11A)。同様に、MCF-7^{EphA2}細胞の腫瘍形成能は対照(MCF-7^{neo})細胞と比較してタモキシフェンに対してより感受性が低かった(図11B)。

10

20

30

40

50

【0264】

タモキシフェン感受性はしばしばエストロゲン受容体発現と関連しているため、MCF-7^{EphA2}におけるエストロゲン受容体の発現と活性をアッセイした。ウエスタン・プロット分析により、対照細胞およびMCF-7^{EphA2}細胞のER およびER が同程度のレベルであることが明らかになった(図12A~12B)(ER およびER 抗体はChemicon社、Temecula、CAより購入した)。さらに、対照細胞およびMCF-7^{EphA2}細胞において同程度のレベルのエストロゲン受容体活性が検知され、またこの酵素活性はタモキシフェンに対して感受性を保っていた(図12B~12F)。エストロゲン受容体活性をERE-TK-CATベクター(これはERE単体をコード化する。Indiana大学医学部Naksharti博士からの寛大な贈り物)を用い、無刺激状態において、およびエストラジオール(10^{-8} M)刺激ならびにタモキシフェン(10^{-6} M)阻害後に測定した。フェノールレッド不含で活性炭処理した血清を入れたプレートで細胞を2日間培養し、リン酸カルシウム法を用いERE-TK-CAT(5 μg)を用いてトランスフェクトした。-ガラクトシダーゼ発現ベクターであるRSV/-ガラクトシダーゼ(2 μg、Naksharti博士から寄贈)を対照としてコトランスフェクトした。適当な薬剤を選んで含ませた新鮮な培地をトランスフェクト24時間後に加えた。細胞を24時間後に回収し、CAT活性を既報(Nakshartiら、1997、Mol.Cell.Biol.17:3629~3639頁)に従い評価した。これらの結果は、MCF-7^{EphA2}細胞でエストロゲン受容体が発現されタモキシフェンに対し感受性を保つことを示しており、したがってMCF-7^{EphA2}のエストロゲンへの依存性を減少させる欠損は、エストロゲンシグナル伝達の下流に存在することを示している。

10

20

30

【0265】

EphA2発現レベルを減少させた増殖MCF-7^{EphA2}細胞を軟寒天内でアッセイした。EphA2モノクローナル抗体EA2は、EphA2の活性化とそれに続く分解を誘発した。EphA2発現レベルの減少がEA2処置後2時間以内に認められ、EphA2はそれに続く少なくとも24時間は検出されないままであった(図13A)。対照MCF-7細胞の軟寒天内でのコロニー形成はタモキシフェンに対し感受性があり(図13C)、EA2がこの応答性をさらに変えることはなかった(この細胞は内在性EphA2を欠いているため)。タモキシフェンに対し、このMCF-7^{EphA2}細胞(タモキシフェンにより25%阻害)は、対応する対照(タモキシフェンにより75%阻害)と比較して、より感受性が低かった。EA2は軟寒天内でのコロニー形成を減少(19%)させたが、EA2とタモキシフェンの組合せはより劇的に(80%を超える)軟寒天内でのコロニー形成を減少させた。このように、EA2での処置は対照MCF-7細胞と同程度の表現型を回復させた。EphA2を標的とした抗体は乳癌細胞のタモキシフェンに対する感受性を再び高めさせることができることを、この知見は示唆している。

40

【0266】

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

【0267】

6.4 前立腺上皮内新生物でのEphA2発現

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

50

【0268】

ホルマリン固定した根治的前立腺全摘出試料切片の5 μm厚連續切片を、免疫蛍光染色に

50

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

10

【0269】

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

20

【0270】

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

30

【0271】

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

40

【0272】

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

【表3】

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

^a染色強度のパーセントは正常細胞と比較して統計学的に低かったことを示す。ウイルコクソンランクテスト(Wilcoxon paired signed rank test)を用いて測定した。P値=0.0001。
10

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

【表4】

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

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

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

【表5】

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

10

20

30

40

【0273】

6.5 転移性乳癌患者の処置

転移性乳癌患者で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した。癌患者は現在タキソールとタキソテールによる治療を受けている。現在治療を受けている患者はその処方による治療を継続することが許されている。

【0274】

患者に本発明のモノクローナル抗体を1回静脈投与し、次いで、12週間にわたり同量の静脈投与を毎週繰り返し、4週間後から患者を分析する。本発明のモノクローナル抗体投与の安全性ならびに疾患活性の変化の可能性を、静脈投与を行う26週間にわたり評価する

50

。種々の群の患者に同様に投与しました評価するが、1mg/kg、2mg/kg、4mg/kgおよび8mg/kgの投与量を投与する。

【0275】

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

【0276】

変化を腫瘍増殖の進行により測定または判定する。

【0277】

6.6 EphA2アンチセンス・オリゴヌクレオチド使用下でのEphA2レベルの減少

EphA2活性化と関係なく腫瘍細胞内のEphA2発現レベルを減少させる、アンチセンス・オリゴヌクレオチドに基づいた手法を開発した。EphA2タンパク質レベルを減少させるために、MDA-MB-23乳癌細胞をホスホロチオエート修飾アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いて一過的にトランスフェクトした。このオリゴヌクレオチドは、GenBankの配列評価法を用いてEphA2にユニークであることが判明した配列に対応する(5'-CCAGCAGTACCGCTTCCTT GCCCTGCGGCCG-3';配列番号49)。逆アンチセンス・オリゴヌクレオチド(5'-GCCGCGTCCCGTT CCTTCACCATGACGACC-3';配列番号50)を対照とした。Lipofectamine PLUS Reagent(Life Technologies社)を製造者手順書に従い使用し当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時間後に細胞を分割した。半分の細胞は軟寒天に播種し、残りの細胞は抽出しウエスタン・プロット分析を行った。

10

20

30

40

【0278】

ウエスタン・プロット分析と免疫沈降は既報(Zantekら、1999、Cell Growth Diff. 10: 629~638頁)に従い行った。簡単に説明すると、単層細胞の界面活性剤抽出物を1%のTriton X-100(Sigma社、St.Louis、MO)を含むTris緩衝生理食塩水に抽出した。タンパク質濃度を測定(BioRad社、Hercules、CA)した後、1.5mgの細胞溶解液を免疫沈降し、SDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロース(PROTRAN(商標)、Schleicher and Schuell社、Keene、NH)に転写した。EphA2特異的抗体(D7、Upstate Biological社、Lake Placid、NYより購入)を用いEphA2を検出した。試料のローディング対照のため、メンブレンを剥がしパキシリン抗体(North Carolina大学Burridge博士からの贈り物)で再精査した。高感度化学発光(ECL)法(Pierce社、Rockford、IL)および放射線撮影法(X-OMAT;Kodak社、Rochester、NY)により抗体の結合を検出した。

【0279】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドはMDA-MB-231細胞でのEphA2発現を選択的に減少させたが、逆アンチセンス・オリゴヌクレオチド対照(IAS)は減少させなかつたことをウエスタン・プロット分析により確認した(図14A~14B)。

【0280】

MDA-MB-231細胞を軟寒天内に懸濁させた。既報(Zelinskiら、2001、Cancer Res.61:2301~2306頁、この文献全体を参照して本明細書に援用する)に従い軟寒天内でコロニーを形成した。抗体もしくは対照液(PBS)は底部と上部両方の寒天液に加えた。Olympus社製40x対物レンズ装着倒立型位相差顕微鏡CK-3を使用し、コロニー形成を顕微鏡下でスコアした。少なくとも3個の細胞を含む細胞群を陽性とスコアした。1強拡大視野当たりの平均コロニー数を示す。各実験において別々の10箇所の強拡大顕微鏡視野を平均した。またここに示す結果は少なくとも3回の別々の実験を代表するものである。

【0281】

EphA2アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、対応する対照と比較して軟寒天コロニー形成を少なくとも60%減少させた(図14C)。EphA2抗体とEphA2アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いての一致した結果は、したがってEphA2発現レベルの減少が腫瘍細胞増殖を減少させるに十分であることを示している。

【0282】

6.7 EphA2抗体の動力学的分析

50

表面プラズモン共鳴に基づいたBIACORE(商標)アッセイを用い、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に存在するIgGを測定に使用した。 K_{off} 速度がおよそ $3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ より小さい抗体は、遅い K_{off} 速度である。 K_{off} 速度がおよそ $8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 以下の抗体は、たいへん遅い K_{off} 速度である。 K_{off} 速度がおよそ $9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 以下の抗体は、極めて遅い K_{off} 速度である。

【 0 2 8 3 】

EphA2の固定化

EphA2-FcをCM5センサーチップに標準アミン(NHS/EDCの1:1混合液70 μl)カップリング反応を用い固定化した。簡単に説明すると、400nMのEphA2-Fc溶液(10mM NaOAc、pH4)を活性化したセンサー表面に1000-1100RUの密度で注入した。続いて、使われない活性化工ステルを1MのEt-NH2を70 μl注入し「キャップ」をした。同様に、活性化されまた「キャップ」をされた、タンパク質を加えない表面を同じセンサーチップ上に用意し、対照表面とした。

【 0 2 8 4 】

結合実験

EphA2-Fcおよび対照の両表面上に各EphA2ハイブリドーマ上清を250 μl注入し、結合反応を記録した。この上清は希釈せずに使用した。各上清の注入に続き、解離過程のデータを最低10分間収集した。精製したEphA2モノクローナル抗体EA2を調製し、陽性対照(250 μlの培養液につき1 μg、5 μgおよび25 μg)として用いた。EphA2に結合しない陰性対照モノクローナル抗体も5 μg/250 μl培養液で調製した。両表面への培養液の対照注入も行った。各結合過程の後、1分間の1M NaCl-50mM NaOHのパルス(注入)1回により、EphA2-Fc表面を再生した。

【 0 2 8 5 】

データ評価

結合データは、ダブルレファレンス(double-referencing)として知られる技法で、人工ノイズ(プランク培養液注入)と非特異的結合(対照表面)と共に差し引くことにより補正した。したがって、重ね合わせたセンサーグラムは「正味」の結合曲線を表している。Eph099B-208.261およびEph099B-233.152(表6参照)はEA2より遅い K_{off} 速度である(図15)。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} 速度である(表6第8列)(データ示さず)。

【 0 2 8 6 】

ここに記したEphA2モノクローナル抗体の特性を、表6にまとめて示す。

10

20

30

【表6】

クローン	サブクローン	特異性	EphA2 リン酸化	EphA2 4時間	EphA2分解 24時間	解離速度	軟寒天内コロ ニー形成阻害	軟寒天内コロ ニー排除
A群								
101		有	検出せず	中	検出せず	たいへん遅い	検出せず	検出せず
102		有	検出せず	低～中	検出せず	たいへん遅い	検出せず	検出せず
201		有	検出せず	無	検出せず	遅い	検出せず	検出せず
B-Group								
101	検出せず	有	弱	中	無	検出せず	強	検出せず
102		有	有	強	強	極めて遅い	強	中～強
103		有	弱	強	強	検出せず	中～強	検出せず
108	検出せず	有	検出せず	低～中	検出せず	検出せず	強	検出せず
201		有	検出せず	無	検出せず	たいへん遅い	強	低
203		有	有	検出せず	低～中	検出せず	検出せず	検出せず
204		有	有	強	強	検出せず	強	中
208		有	有	強	強	検出せず	無	中
103			検出せず	強	強	検出せず	強	強
108			検出せず	強	強	検出せず	検出せず	検出せず
117			検出せず	強	強	検出せず	検出せず	たいへん強い
177			検出せず	強	強	検出せず	検出せず	検出せず
205			検出せず	強	無	検出せず	検出せず	検出せず
222			検出せず	強	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず

	234			検出せず	強	検出せず	中	検出せず	検出せず	検出せず
	235			検出せず	強	検出せず	中	検出せず	検出せず	検出せず
	238			検出せず	低	検出せず	中	検出せず	検出せず	検出せず
209	検出せず	有	有	検出せず	無	検出せず	強	強	強	強
210	有	有	有	検出せず	無	検出せず	中	強	強	中
211	無	有	有	検出せず	低	検出せず	中	強	強	検出せず
219	有	有	有	検出せず	無	検出せず	極めて遅い	強	強	たいへん強い
220	有	有	有	検出せず	無	検出せず	極めて遅い	強	強	たいへん強い
221	有	有	有	検出せず	無	検出せず	極めて遅い	強	強	たいへん強い
223	有	有	有	強	強	中	遅い	無	無	中
229	有	有	有	検出せず	無	検出せず	たいへん遅い	強	強	検出せず
230	有	有	有	検出せず	無	検出せず	たいへん遅い	強	強	検出せず
231	有	有	有	弱	強	無	たいへん遅い	強	強	中
233	有	有	有	弱	強	強	たいへん遅い	無	強	中
301	無	有	有	検出せず	無	検出せず	たいへん遅い	強	強	無
302	無	有	有	検出せず	低	検出せず	検出せず	強	強	検出せず
307	無	有	有	弱	中	無	遅い	強	強	検出せず
308	無	有	有	検出せず	低	検出せず	検出せず	強	強	検出せず
309	有	有	有	検出せず	無	検出せず	極めて遅い	強	強	たいへん強い
310	検出せず	有	有	検出せず	無	検出せず	検出せず	強	強	検出せず
311	有	有	有	検出せず	低	検出せず	たいへん遅い	強	強	検出せず
312	無	有	有	検出せず	低～中	検出せず	検出せず	強	強	検出せず
313	有	有	有	検出せず	低	検出せず	たいへん遅い	強	強	検出せず
314	有	有	有	検出せず	低	検出せず	極めて遅い	強	強	中
315	有	有	有	検出せず	低	検出せず	極めて遅い	強	強	中
316	有	有	有	検出せず	無	検出せず	たいへん遅い	強	強	検出せず

317		有	有	検出せず	無	検出せず	遅い	強	検出せず
401		無	有	検出せず	無	検出せず	検出せず	強	検出せず
402		検出せず	有	検出せず	低	検出せず	検出せず	強	検出せず
404		検出せず	有	有	中	無	検出せず	検出せず	検出せず
406		無	有	検出せず	無	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
407		無	有	検出せず	無	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
408		無	有	検出せず	無	検出せず	遅い	検出せず	検出せず
409		検出せず	有	検出せず	無	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
410		無	有	強	中	無	速い	検出せず	検出せず

6.8 EphA2抗体のエピトープ分析

EphA2抗体のエピトープを特徴づけた。非形質転換MCF-10A細胞もしくは形質転換したMDA-MB-231細胞を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のEph099B-233.152もしくはEA2と共に4℃で30分間インキュベートし、その後3%のホルマリン溶液で固定化し、発蛍光団結合抗マウスIgGを用いて免疫標識した。EA2は形質転換細胞上のEphA2に優先的に結合する(図16D)。これに対してEph099B-233.152は、形質転換および非形質転換の両細胞で発現されたEphA2のどちらにも結合する(図16A～16B)。非形質転換MCF-10A細胞を4mMのEGTAで20分間処理すると、細胞を解離した。EA2はEGTAの処理で解離した細胞上のEphA2に結合したが、未処理の細胞には結合しなかった(図17A～17B)。

【0288】

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

【0289】

マイクロタイタープレートを $10\text{mg}/\text{ml}$ のEphrinA1-Fcを用い4℃で一晩コーティングした。EphA2細胞外ドメインをヒトIgG₁定常領域(EphA2-Fc)に結合させたものからなる融合タンパク質を、固定化EphrinA1-Fcとインキュベートして結合させた。ビオチン化EphrinA1-Fc、EA2もしくはEph099B-233.152をEphA2-EphrinA1-Fc複合体とインキュベートし、結合量を測定した。EphA2-EphrinA1-Fc複合体にさらに結合したEphrinA1-Fcはわずかであったが、これに対して、かなりのレベルのEA2とEph099B-233.152がEphA2-EphrinA1-Fc複合体に結合した(図18A)。

【0290】

EphA2-EphrinA1-Fc複合体を上記のように調製した。次にビオチン化EA2($10\mu\text{g}/\text{ml}$)をこの複合体と30分間インキュベートした。非標識の競合物質を示されている量でEphA2-EphrinA1-Fc-EA2複合体とインキュベートした。非標識EA2は濃度 $100\text{ng}/\text{ml}$ 以上で標識EA2を置換することができた。非標識Eph099B-233.152および非標識EphrinA1-Fcは標識EA2を置換する能力において同程度であった(図18B)。

【0291】

7. 均等物

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

【0292】

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

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS

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

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT :

Further deposits are identified on an additional sheet

Name of depositary institution
American Type Culture Collection

Address of depositary institution (including postal code and country)

10
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20110-2209
US

Date of deposit : August 7, 2002 Accession Number : PTA-4572

B. ADDITIONAL INDICATIONS : (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet**C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE :** (if the indications are not all designated States)**D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS :** (leave blank if not applicable)

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

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


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

was

(Authorized Officer)

Form PCT/RO/134 (January 1981)

10

20

30

International Application No: PCT/ /

Form PCT/RO/134 (cont.)

American Type Culture Collection

10801 University Blvd.,
Manassas, VA 20110-2209
US

<u>Accession No.</u>	<u>Date of Deposit</u>	
PTA-4573	August 7, 2002	10
PTA-4574	August 7, 2002	
PTA-	May 12, 2003	

【図面の簡単な説明】**【0 2 9 3】**

【図1】Eph099B-208.261は、競合ELISAアッセイにおいてEphA2と結合に関してEA2と競合し得る。標識EA2モノクローナル抗体のEphA2Fcに結合する能力は、非標識モノクローナル抗体EA2またはEph099B-208.261のいずれかの存在下で競合ELISAによりアッセイした。このアッセイで用いた非標識抗体と標識抗体の比をX軸上に示す。EA2を菱形で示し、Eph099B-208.261を正方形で示す。

【図2】EphA2抗体は、MDA-MB-231細胞中でのEphA2チロシンのリン酸化を促進する。MDA-MB-231細胞の単層を、単一用量が5 μg/mlのEph099B-208.261(A、C)またはEA2(B、D)の存在下で、指示された時間の間、37℃でインキュベートした。次に、細胞可溶化物をEphA2に特異的な抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、ホスホチロシンに特異的な抗体を使うウエスタン・プロット分析にかけた(A、B)。これらのメンブレンを一部剥がし、ローディング対照としての免疫沈降に用いたEphA2に特異的な抗体で再精査した(C、D)。

【図3】EphA2抗体は、MDA-MB-231細胞中でのEphA2の分解を促進する。MDA-MB-231細胞の単層を、単一用量が5 μg/mlのEph099B-208.261(A、C)またはEA2(B、D)の存在下で、指示された時間の間、37℃でインキュベートした。次に、細胞可溶化物をSDS-PAGEにより分離し、EphA2に特異的な抗体を使うウエスタン・プロット分析にかけた(A、B)。これらのメンブレンを一部剥がし、ローディング対照としてのβ-カテニンに特異的な抗体で再精査した(C、D)。

【図4】EphA2 Eph099B-233.152抗体は、MDA-MB-231細胞中でのEphA2チロシンのリン酸化とEphA2の分解を促進する。MDA-MB-231細胞の単層を、単一用量が5 μg/mlのEph099B-233.152の存在下、37℃でインキュベートした。次に、細胞可溶化物をD7(EphA2に特異的な抗体)で免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、(A)ホスホチロシンに特異的な抗体または(B)EphA2に特異的な抗体を使うウエスタン・プロット分析にかけた。

【図5】EphA2抗体は、軟寒天中での悪性腫瘍細胞の増殖を阻害する。単一用量が5 μg/mlの精製EphA2抗体Eph099B-208.261(黒色バー)、EA2(白色バー)、または陰性対照抗体1A7(灰色バー)を、悪性MDA-MB-231腫瘍細胞を用いて、軟寒天中で指示された時間の間、37℃でインキュベートした。結果は高倍率視野(HPF)当たりのコロニーとして報告される。

【図6 A】EphA2 Eph099B-233.152抗体は、in vivoで腫瘍細胞の増殖を阻害する。MDA-MB-231細胞を胸腺欠損マウスに皮下移植した。この腫瘍が成長して平均体積が100mm³になった後、マウスの腹腔内に6mg/mlのEph099B-233.152またはPBS対照を週2回、3週間投与した。(A)腫瘍増殖:腫瘍増殖を評価し、腫瘍体積と当初の腫瘍体積(100mm³)の比として表した。対照マウスを円で示し、Eph099B-233.152で治療したマウスを正方形で示す。矢印はEph099B-233.152またはPBSの投与時間を示す。

【図6 B】EphA2 Eph099B-233.152抗体は、in vivoで腫瘍細胞の増殖を阻害する。MDA-MB-231細胞を胸腺欠損マウスに皮下移植した。この腫瘍が成長して平均体積が100mm³になっ

た後、マウスの腹腔内に6mg/mlのEph099B-233.152またはPBS対照を週2回、3週間投与した。(B)生存率:腫瘍体積が1,000mm³に達するまで腫瘍増殖を進行させた。治療後毎日、生存マウスの割合を記録することでマウスの生存率を評価した。対照マウスを灰色で示し、Eph099B-233.152で治療したマウスを黒色で示す。

【図7 A - C】EphA2抗体、すなわちEA2、Eph099B-208.261、およびEph099B-233.152は、in vivoで腫瘍細胞の増殖を阻害する。MDA-MB-231乳癌細胞を胸腺欠損マウスの(A)正位に(orthotopically)または(B)皮下に移植した。(C)A549肺癌細胞を胸腺欠損マウスに皮下移植した。この腫瘍が成長して平均体積が100mm³になった後、マウスの腹腔内に6mg/kgの指示された抗体または陰性対照(PBSまたは1A7抗体)を週2回、3週間投与した。腫瘍増殖を評価し、腫瘍体積と当初の腫瘍体積(100mm³)の比として表した。
10

【図7 D】EphA2抗体、すなわちEA2、Eph099B-208.261、およびEph099B-233.152は、in vivoで腫瘍細胞の増殖を阻害する。(D)MDA-MB-231乳癌細胞を胸腺欠損マウスに皮下移植した。この腫瘍が成長して平均体積が100mm³になった後、マウスの腹腔内に6mg/kgの指示された抗体または陰性対照(PBSまたは1A7抗体)を週2回、3週間投与した。犠牲後に総腫瘍体積を測定した。負の対象は黒色、EA2は白色、Eph099B-208.261は濃灰色、Eph099B-233.152は薄灰色である。

【図8】EphA2の過剰発現により、悪性細胞の増殖が選択的に増大する。(A) 1×10^5 個の対照細胞(白色バー)またはMCF-7^{EphA2}細胞(黒色バー)を、1mg/mlの17-エストラジオールの存在下で軟寒天中に14日間懸濁させ、その後顕微鏡で評価した。EphA2を形質移入した細胞が形成したコロニーの数(47コロニー/高倍率視野(HPF))は、対応する対照が形成したコロニーの数(1コロニー/HPF; P<0.01)よりも多い。(B)単層増殖アッセイでは、対照細胞(白色の円)の成長とMCF-7^{EphA2}細胞(黒色の正方形)の成長を識別できなかった。
20

【図9 A】EphA2の過剰発現により、腫瘍化の可能性が増大する。(A) 1×10^6 個の対照細胞(白色バー)またはMCF-7^{EphA2}細胞(黒色バー)を、胸腺欠損マウスの乳房の脂肪パッド(1群当たりマウス20匹)に、追加のエストロジエン(1μMの17-エストラジオール)の存在下で移植した。MCF-7^{EphA2}細胞が形成した腫瘍は、対応する対照が形成した腫瘍より大幅に大きかった(P=0.027)。

【図9 B】EphA2の過剰発現により、腫瘍化の可能性が増大する。(B)入力(input)細胞および切除された腫瘍(T)から分離されたタンパク質可溶化物を等量で、EphA2抗体(D7)を使ったウエスタン・プロット分析で評価した。これらのメンブレンを一部剥がし、ローディング对照としての-カテニンに特異的な抗体で再精査した。
30

【図10】EphA2の過剰発現により、エストロジエンへの依存性が低下する。(A) 1×10^5 個の対照細胞(白色バー)またはMCF-7^{EphA2}細胞(黒色バー)を、外来エストロジエンの非存在下で軟寒天中に懸濁させ、その14日後にコロニー形成を顕微鏡で評価した。MCF-7^{EphA2}(黒色の正方形)細胞の単層増殖(B)および腫瘍化の可能性(C)は、追加のエストロジエンの非存在下で対応する対照(白色の円)に比べて増大した(それぞれP<0.01およびP<0.004)。

【図11】EphA2の過剰発現により、タモキシフェンに対する感受性が低下する。(A) 1×10^5 個のMCF-7またはMCF-7^{EphA2}細胞を、1μMのタモキシフェン(TAM)および1μMの17-エストラジオールの存在下で軟寒天中に懸濁させ、その14日後にコロニー形成を顕微鏡で評価した。(B)MCF-7細胞(円)またはMCF-7^{EphA2}細胞(正方形)を、乳房の脂肪パッド(1群当たりマウス15匹)に、追加のエストロジエンの存在下で移植した。タモキシフェン治療を移植の17日後に開始した。タモキシフェンで治療した動物(黒色の円および正方形)と生理食塩水で治療した動物(白色の円および正方形)の腫瘍体積を指定された時間に測定した。タモキシフェンのMCF-7^{EphA2}を阻害する効果が対照細胞を阻害する効果に比べて小さいことに留意されたい(P=0.01)。
40

【図12 A - D】エストロジエン受容体はMCF-7^{EphA2}細胞中で発現されるが、その機能は変化している。(A)ER および(B)ER のレベルを、MCF-7^{neo}対照細胞およびMCF-7^{EphA2}細胞中で、EphA2に特異的な抗体(D7)を使ったウエスタン・プロット分析により評価した。(C, D)これらのメンブレンを一部剥がし、ローディング対照としての-カテニンに特異的な抗体で再精査した。
50

【図12E】エストロジエン受容体はMCF-7^{EphA2}細胞中で発現されるが、その機能は変化している。(E)エストロジエン受容体の活性をCATレポーター系を用いて測定し、対照細胞とMCF-7^{EphA2}細胞のエストロジエン受容体の活性が同程度であることを明らかにした。3つの実験の平均結果を(図12F)にグラフ化する。E2はエストロジエン治療を示す。TAMはタモキシフェン治療を示す。転換率(%)は、CAT酵素により非アセチル化基質(非AC)からアセチル化基質(AC)に転換した基質の量を示す。

【図12F】エストロジエン受容体はMCF-7^{EphA2}細胞中で発現されるが、その機能は変化している。(F)エストロジエン受容体の活性をCATレポーター系を用いて測定し、対照細胞とMCF-7^{EphA2}細胞のエストロジエン受容体の活性が同程度であることを明らかにした。3つの実験の平均結果を(F)にグラフ化する。E2はエストロジエン治療を示す。TAMはタモキシフェン治療を示す。転換率(%)は、CAT酵素により非アセチル化基質(非AC)からアセチル化基質(AC)に転換した基質の量を示す。

【図13A-B】EphA2アゴニスト抗体EA2により、腫瘍増殖が低下する。(A)MCF-7^{EphA2}細胞を3μg/mlのEA2の存在下で指示された時間のあいだインキュベートし、その後サンプル抽出し、EphA2に特異的な抗体(D7)を使ったウエスタン・プロット分析を行った。(B)これらのメンブレンを一部剥がし、ローディング対照としての-カテニンに特異的な抗体で再精査した。

【図13C】EphA2アゴニスト抗体EA2により、腫瘍増殖が低下する。(C)1×10⁵個の対照細胞またはMCF-7^{EphA2}細胞を、タモキシフェン(TAM、1μM)およびEphA2アゴニスト抗体(EA2、10μg/ml)の存在または非存在下で軟寒天中に懸濁させた。EA2によりMCF-7^{EphA2}細胞のタモキシフェンに対する感受性が増大したことに留意されたい。

【図14A-B】EphA2タンパク質のレベルが低下することにより、軟寒天の腫瘍細胞のコロニー化が十分に低下する。MDA-MB-231細胞の単層に、2μg/mlの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を37℃で24時間形質移入した。(A、B)細胞可溶化物全体をEphA2に特異的なD7抗体でウエスタン・プロット分析することにより、アンチセンス・オリゴヌクレオチドの形質移入によりEphA2のタンパク質レベルが低下することが確認される(A)。これらのメンブレンを一部剥がし、ローディング対照としてのパキシリン抗体で再精査した(B)。分子量基準の相対移動度をパネルAおよびBの左側に示す。

【図14C】EphA2タンパク質のレベルが低下することにより、軟寒天の腫瘍細胞のコロニー化が十分に低下する。MDA-MB-231細胞の単層に、2μg/mlの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を37℃で24時間形質移入した。(C)上に詳述したアンチセンス・オリゴヌクレオチドで治療したMDA MB-231細胞単層を軟寒天中で7日間懸濁し、その後コロニー形成を顕微鏡で分析した。EphA2アンチセンス・オリゴヌクレオチドの方が、逆アンチセンス対照よりも、MDA-MB-231細胞によるコロニー形成を損なう程度が著しく大きかったことに留意されたい(P<0.002)。結果は高倍率視野(HPF)当たりのコロニーとして報告される。

【図15】EphA2モノクローナル抗体の動力学分析を行う。BIACORE(商標)(表面プラズモン共鳴に基づく)アッセイを用いて、固定化EphA2-Fcに結合するEphA2モノクローナル抗体の動力学をアッセイした。Eph099B-208.261は実線で示し、Eph099B-233.152は点線で示し、EA2は破線で示し、負の対象は正方形で示す。

【図16】EphA2 EA2抗体は癌細胞に優先的に結合する。非形質転換MCF-10A(A、C)または形質転換MDA MB-231(B、D)細胞を10μg/mlの(A、B)Eph099B-233.152または(C、D)EA2で4℃でインキュベートし、その後発蛍光団結合抗マウスIgGで固定し、免疫標識した。

【図17】EphA2 EA2抗体は、細胞-細胞接触を低下させることにより露出するEphA2エピトープに優先的に結合する。(A、B)非形質転換MCF-10A細胞を、EGTAによる治療前(A)または治療後(B)に、EA2で4℃で標識し、その後発蛍光団結合抗マウスIgGで固定し、免疫標識した。(C、D)非形質転換MCF-10A(C)または形質転換MDA-MB-231(D)細胞を、EGTAによる治療前(グラフ中部)または治療後(グラフ上部)にEA2で標識した。対照細胞を第2の抗体単独でインキュベートした(グラフ下部)。EA2-EphA2結合の量をフロー・サイトメトリーで測定した。

10

20

30

40

50

【図18】EphA2 EA2エピトープは、Eph099B-233.152エピトープおよびリガンド結合部位とは異なる。(A)EphA2-F_cを固定化エフリンA1-F_cと一緒にインキュベートし、それに結合させた。標識エフリンA1-F_c(黒色)、EA2(白色)、またはEph099B-233.152(灰色)をEphA2-エフリンA1-F_c複合体と一緒にインキュベートし、結合量を測定した。(B)EphA2-F_cを固定化エフリンA1-F_cと一緒にインキュベートし、それに結合させた。次に、標識EA2をEphA2-エフリンA1複合体と一緒にインキュベートした。非標識の競合物質を指定された量のEphA2-エフリンA1-EA2複合体と一緒にインキュベートした。競合者はエフリンA1-F_c(黒色)、EA2(白色)、またはEph099B-233.152(灰色)であった。

【図19A】EphA2抗体のVLおよびVHの配列。Eph099B-208.261のアミノ酸および核酸配列:(A)VL(それぞれ配列番号1および9)。CDRの配列を示す。
10

【図19B】EphA2抗体のVLおよびVHの配列。Eph099B-208.261のアミノ酸および核酸配列:(B)VH(それぞれ配列番号5および13)。CDRの配列を示す。

【図19C】EphA2抗体のVLおよびVHの配列。Eph099B-233.152アミノ酸および核酸配列:(C)VL(それぞれ配列番号17および25)。CDRの配列を示す。

【図19D】EphA2抗体のVLおよびVHの配列。Eph099B-233.152アミノ酸および核酸配列:(D)VH(それぞれ配列番号21および29)。CDRの配列を示す。

【図19E】EphA2抗体のVLおよびVHの配列。EA2のアミノ酸および核酸配列:(E)VL(それぞれ配列番号33および41)。CDRの配列を示す。

【図19F】EphA2抗体のVLおよびVHの配列。EA2のアミノ酸および核酸配列:(F)VH(それぞれ配列番号37および45)。CDRの配列を示す。
20

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MedImmune, Inc.
Kinch, Michael
Carles-Kinch, Kelly
Kiener, Peter
Langermann, Solomon

<120> EphA2 Monoclonal Antibodies and Methods of Use Thereof

<130> 10271-097-228

<140>

<150> 60/379,322
<151> 2002-05-10

<150> 60/418,213
<151> 2002-10-14

<150> 60/418,213
<151> 2003-04-03

<160> 48

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105

10

20

30

40

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 3

Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser
1 5

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

<400> 4

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
1 5

20

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Asn Met Val Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Gly Gly Asn Met Val Gly Gly Gly Tyr
1 5

<210> 9
<211> 318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
caaattgttc tcacccagtc tccagcactc atgtctgcat ctccaggggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccaaga 120
tccctccccca aaccctggat ttatctcaca accaacctgg cttctggagt ccctgctcgc 180

10

20

30

40

ttcagtggca gtgggtctgg gaccttac tcttcacaa tcagcagcat ggaggctgaa 240
 gatgtgtcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc cattcacgtt cggctcgaaa 300
 acaaagttgg aaataaga 318

<210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 gccagctcaa gtgttaagtta catgtac 27

10

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 ctcacaacca acctggcttc t 21

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 cagcagtggaa gtagtaaccc attcacg 27

20

<210> 13
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 caggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacttcaacc agctactgga tgcactgggt gaaacaaagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggatg attcatccta atagtggttag tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgttagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcgactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggctt attactgtgc aagaggggt 300
 aacatggtag gggggggcta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

30

<210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 ggctacactt tcaccagcta ctggatgcac 30

40

<210> 15
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
atgattcata ctaatagtgg tagtactaac tacaatgaga agttcaagag c

51

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
agagggggta acatggtagg ggggggctac

30

10

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
20 25 30

20

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
85 90 95

30

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu His
 1 5 10

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Tyr Val Phe Gln Ser Ile Ser
 1 5

10

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu Thr
 1 5

<210> 21
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60

30

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

40

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Met Asn
1 5 10

10

<210> 23
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

20

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser
1 5

<210> 25
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

30

<400> 25
gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga tagcgtcaat 60
ctttcctgca gggccagcca aagtatttagc aacaacctac actggtatca aaaaaaatca 120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gtttccagt ccatctctgg gatcccctcc 180
aggttcagtg gcagtggatc agggacagat ttcaactctca gtatcaacag tgtggagact 240
gaagattttg gaatgtatTTT ctgtcaacag agtaacagct ggccgctcac gttcggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321

40

<210> 26		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 26		
agccaaagta ttagcaacaa cctacac	27	
<210> 27		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 27	10	
tatgttttcc agtccatctc t	21	
<210> 28		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 28		
caacagagta acagctggcc gtcacg	27	
<210> 29		
<211> 360		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		20
<400> 29		
gaggtgaagc tggtgaggc tggaggagc ttggcacgc ctgggggttc tctgagtctc	60	
tcctgtgcag ctctggatt cacctcaact gattactcca tgaactgggt ccgccagcct	120	
ccagggaaagg cacttgagtg gttgggtttt attagaaaaca aagctaatac ttacacaaca	180	
gagtaacgtg catctgtgaa gggtcggttc accatctcca gagataattc ccaaagcatc	240	
ccttatcttc aaatgaatgc cctgagagct gaggacagtg ccacttatta ctgtgtaaaga	300	
tacccttaggt atcatgctat ggactcctgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctccctca	360	
 		30
<210> 30		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 30		
ggattcacct tcactgatta ctccatgaac	30	
<210> 31		
<211> 57		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 31		40

tttatttagaa acaaagctaa tgattacaca acagagtaca gtgcatactgt gaagggt 57

<210> 32
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
tacccttaggt atcatgctat ggactcc 27

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 33

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
65 70 75 80

Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 35
<211> 7
<212> PRT

10

20

30

40

<213> Homo Sapiens

<400> 35

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 36

10

Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 37

<211> 115

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 37

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

20

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

30

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ala
115

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

40

<213> Homo Sapiens

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

<210> 39

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 39

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 40

Glu Ala Ile Phe Thr Tyr
1 5

<210> 41

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

gacatcaaga tgacccagtc tccatcttcc atgttatgcatt ctctaggaga gagagtcaact 60

atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aactatattaa gctggttcca gcagaaacca 120

ggaaaatctc ctaagaccct gatctatcggt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagttat 240

gaagatatgg gaatttattta ttgtctgaaa tatgtatgagt ttccgtacac gttcgagg 300

gggaccaagc tggaaataaaa a 321

<210> 42

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 42

gcgagtcagg acattaataa ctatctaagc

60

120

180

30

240

300

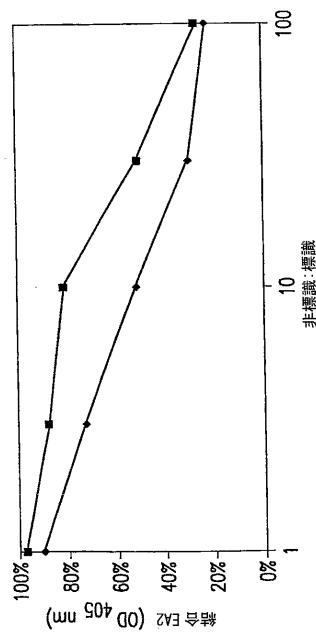
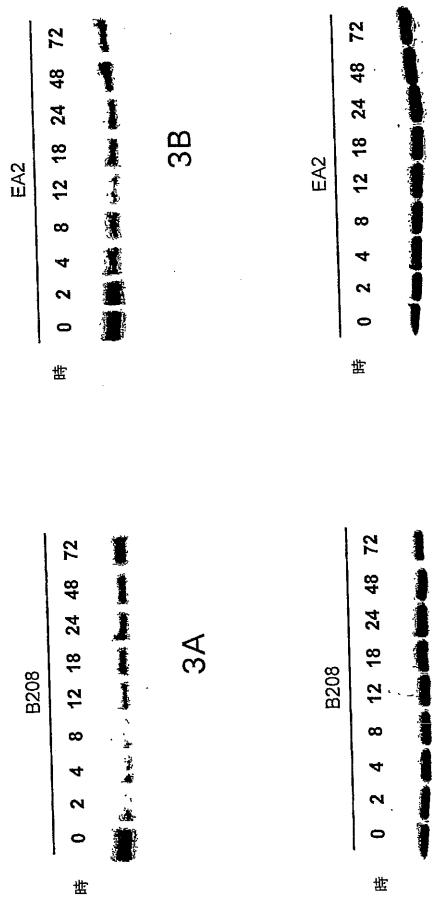
321

30

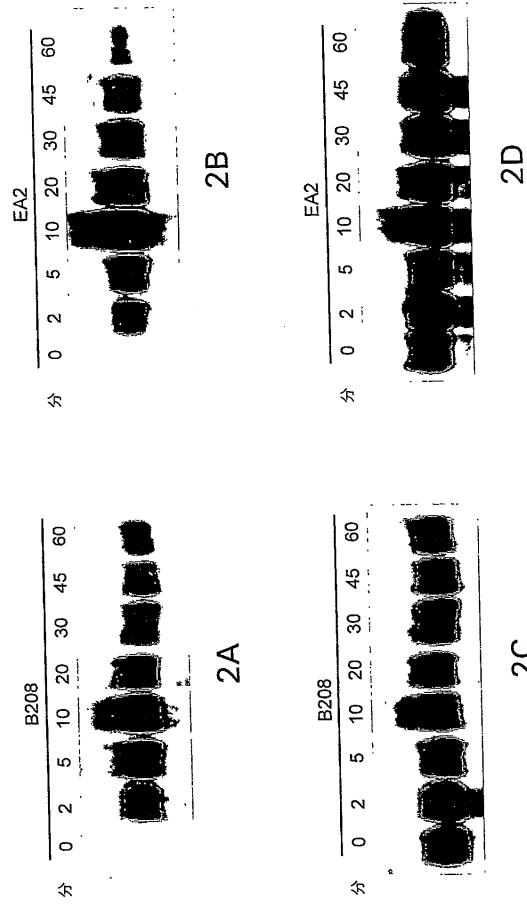
40

<210> 43			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 43			
cgtgcaaaca gattggtaga t		21	
<210> 44			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 44			10
aaatatgatg agtttccgta c		21	
<210> 45			
<211> 345			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 45			
gacgtgaagc tggtgaggc tgggggaggc tttagtgaagc ctggagggtc cctgaaaactc	60		
tcctgtgcag cctctggatt cactttcaigt agctataccca tgtcttgggt tcgccagact	120		
ccoggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtaactta cacctactat	180		
ccagacagtg tgaaggggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240		
ctgcaaataatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgtt attactgtac aagagaagct	300		
atctttactt actggggccca agggactctg gtcactgtct ctgca	345		
<210> 46			
<211> 30			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 46			
ggattcactt tcagtagcta taccatgtct	30		
 			30
<210> 47			
<211> 51			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 47			
accatttagta gtgggtgtac ttacacctac tatccagaca gtgtgaaggg c	51		
<210> 48			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 48			
agagaagcta tctttactta c	21		40

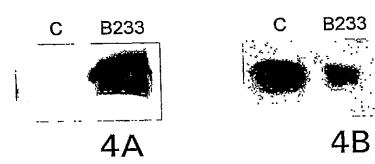
【図1】

3A
3B
3C
3D

【図2】

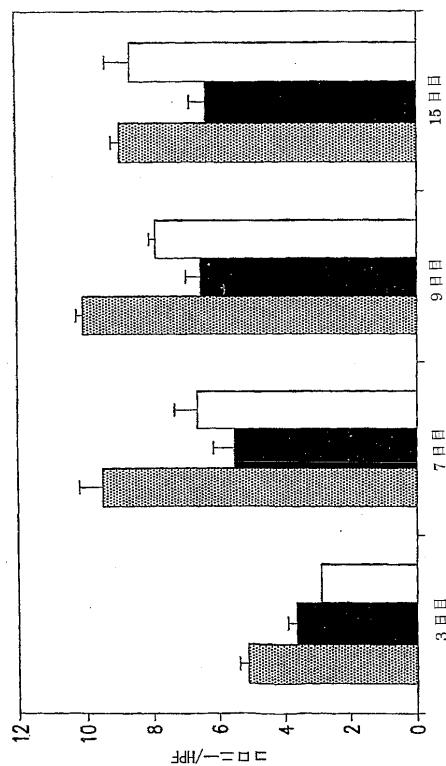
2D
2C
2B
2A

【図4】

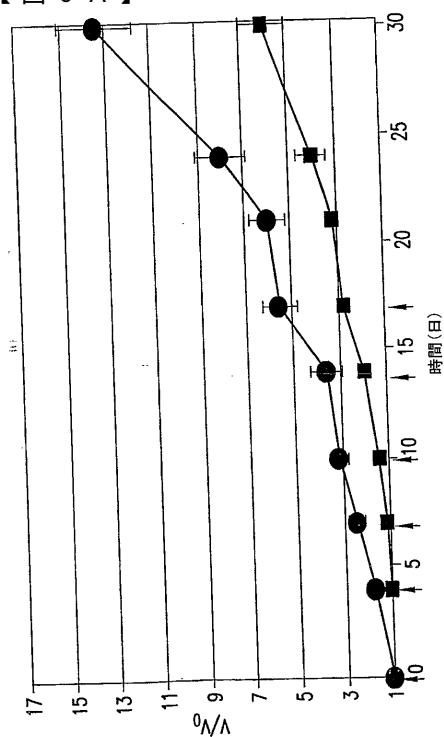


4D

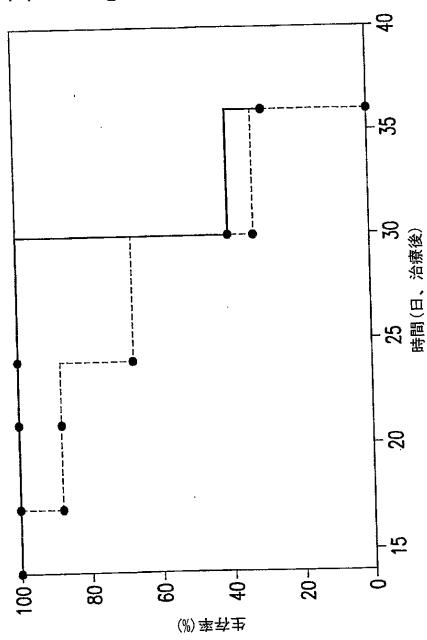
【図5】



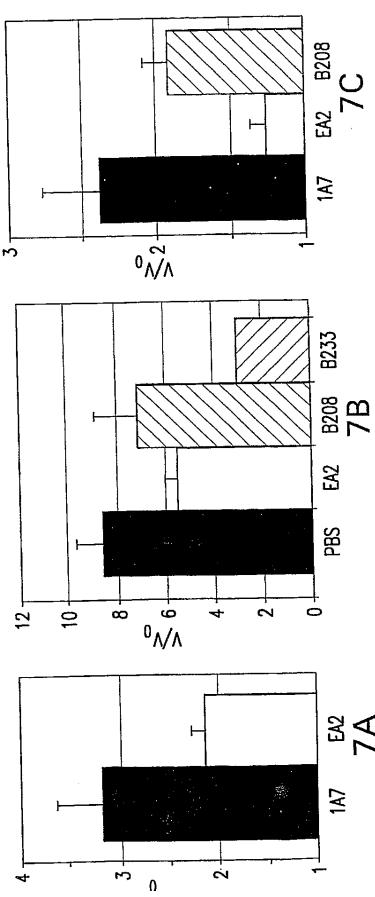
【図6 A】



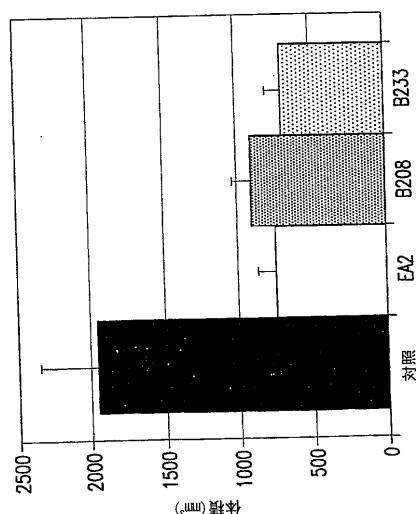
【図6 B】



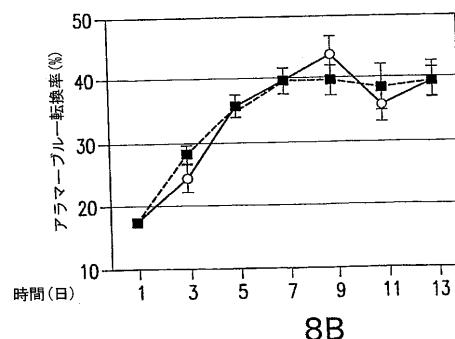
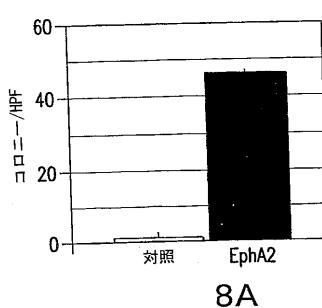
【図7 A - C】



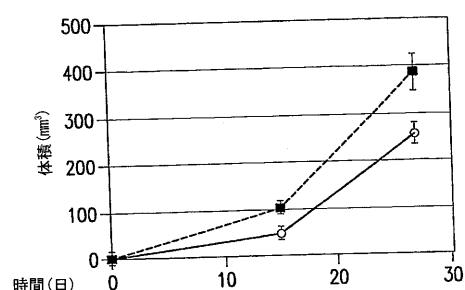
【図7D】



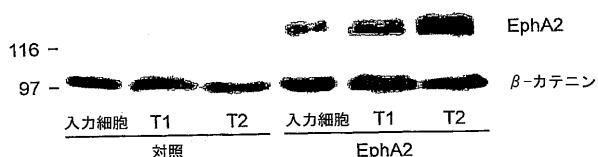
【図8】



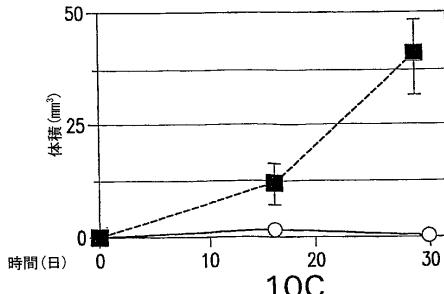
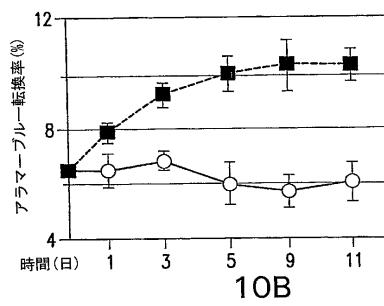
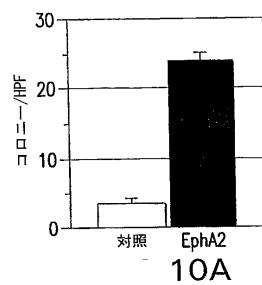
【図9A】



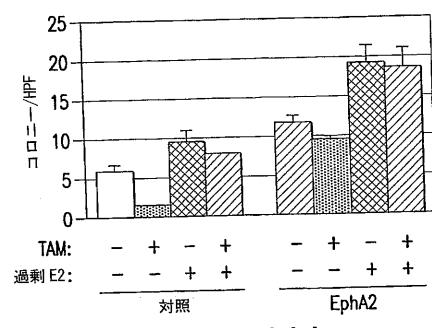
【図9B】



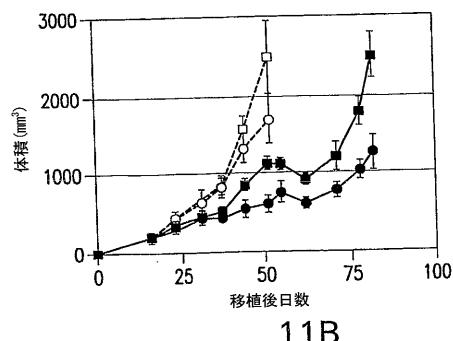
【図10】



【図 1 1】

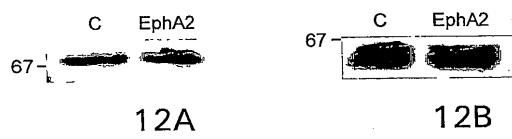


11A

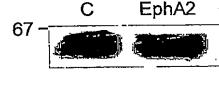


11B

【図 1 2 A - D】



12A



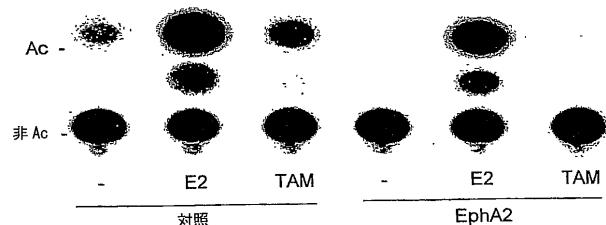
12B

12C

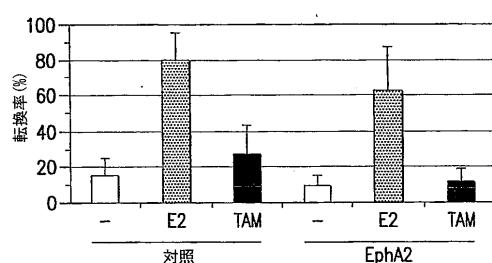


12D

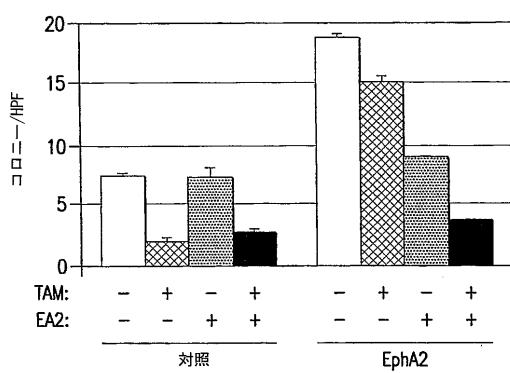
【図 1 2 E】



【図 1 2 F】



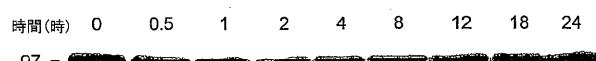
【図 1 3 C】



【図 1 3 A - B】

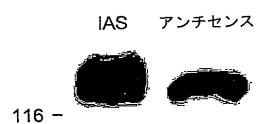


13A



13B

【図 1 4 A - B】

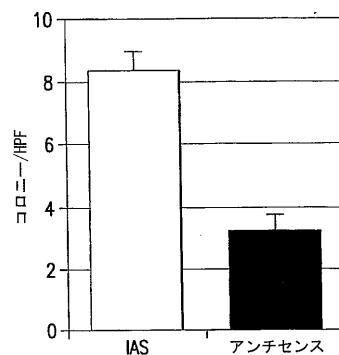


14A

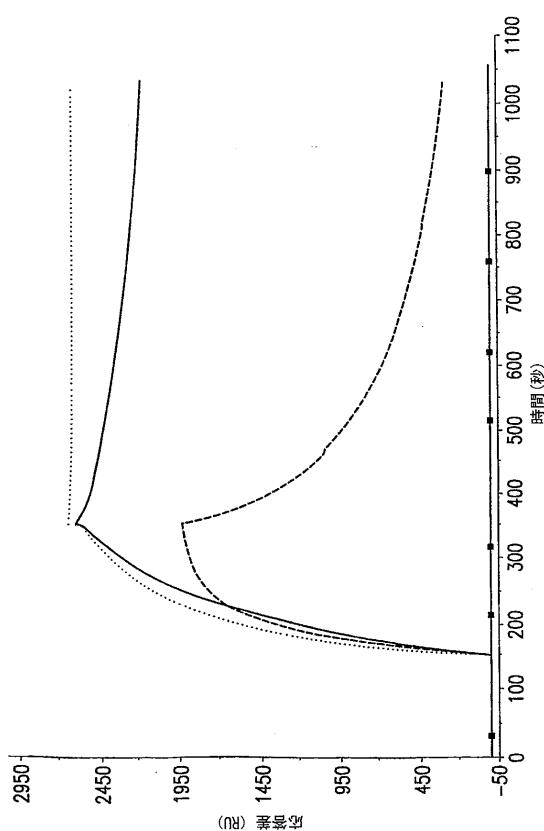


14B

【図 1 4 C】



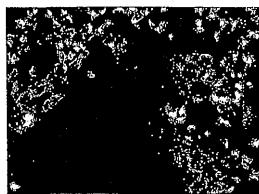
【図 1 5】



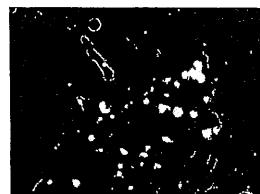
【図 1 6】



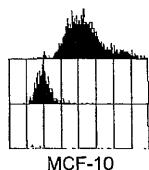
【図17】



17A

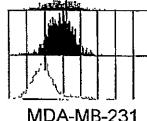


17B



MCF-10

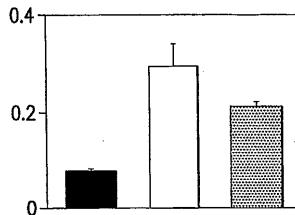
17C



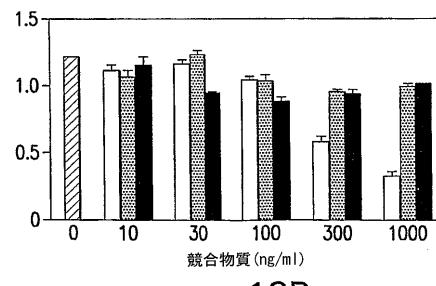
MDA-MB-231

17D

【図18】



18A



18B

【図19A】

208 可変軽鎖

caa att gtt ctc acc cag tct cca gca ctc atg tct gca tct cca ggg
 Gin Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
CDR1
 gag aag gtc acc atg acc tgc agt gcc agc tca agt gta agt tac atg
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
CDR2
 tac tgg tac cag cag aag cca aga tcc tcc ccc aaa ccc tgg att tat
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45
CDR3
 ctc aca acc aac ctg gct tct gga gtc cct gct cgc ttc agt ggc agt
 Leu Thr Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 ggg tct ggg acc tct tac tct ctc aca atc agc agc atg gag gct gaa
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
CDR3
 gat gct gcc act tat tac tgc cag cag tgg agt agt aac cca ttc acg
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
 85 90 95
 ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aga
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
 100 105

【図19B】

208 可変重鎖

48	cag gtc caa ctg cag cag cct ggg gct gag ctg gta aag cct ggg gct Gin Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala 1 5 10 15	48
96	tca gtg aag ttg tcc tgc aag gct tct ggc tac act ttc acc agc tac Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr 20 25 30	96
144	tgg atg cac tgg gtg aaa caa agg cct gga caa ggc ctt gag tgg att Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45	144
192	ggg atg att cat cct aat agt ggt agt act aac tac aat gag aag ttc Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe 50 55 60	192
240	aag agc aag gcc aca ctg act gta gac aaa tcc tcc agc aca gcc tac Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80	240
288	atg cga ctc agc agc ctg aca tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt Met Arg Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95	288
318	gca aga ggg ggt aac atg gta ggg ggg ggc tac tgg ggc caa ggc acc Ala Arg Gly Gly Asn Met Val Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110	336
	act ctc aca gtc tcc tca Thr Leu Thr Val Ser Ser 115	354

【図19C】

233 可変重鎖

gat att gtg cta act cag tct cca gcc acc ctg tct gtg act cca gga
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
CDR1

gat agc gtc aat ctt tcc tgc agg gcc agc caa agt att agc aac aac
 Asp Ser Val Asn Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn
 20 25 30
CDR2

aag tat gtt ttc cag tcc atc tct ggg atc ccc tcc agg ttc agt ggc
 Lys Tyr Val Phe Gin Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
CDR3

agt gga tca ggg aca gat ttc act ctc agt atc aac agt gtg gag act
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80
CDR3

gaa gat ttt gga atg tat ttc tgt caa cag agt aac agc tgg ccg ctc
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Leu
 85 90 95
CDR3

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

【図19D】

233 可変重鎖

48 gag gtg aag ctg gtg gag tct gga gga ggc ttg gta cag cct ggg ggt
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
CDR1

96 tct ctg agt ctc tcc tgt gca gct tct gga ttc acc ttc act gat tac
 Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
CDR1

144 tcc atg aac tgg gtc cgc cag cct cca ggg aag gca ctt gag tgg ttg
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
CDR2

192 ggt ttt att aga aac aaa gct aat gat tac aca aca gag tac agt gca
 Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
 50 55 60
CDR2

240 tct gtg aag ggt cgg ttc acc atc tcc aga gat aat tcc caa agc atc
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80
CDR3

288 ctc tat ctt caa atg aat gcc ctg aga gct gag gag agt gcc act tat
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
 85 90 95
CDR3

321 tac tgt gta aga tac cct agg tat cat gct atg gac tcc tgg ggt caa
 Tyr Cys Val Arg Tyr Pro Arg Tyr His Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
CDR3

360 gga acc tca gtc acc gtc tcc tca
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

【図19E】

EA2 可変重鎖

gac atc aag atg acc cag tct cca tct tcc atg tat gca tct cta gga
 Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
CDR1

gag aga gtc act atc act tgc aag ggc agt cag gag att aat aac tat
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
CDR2

tta agc tgg ttc cag gag aaa cca ggg aaa tct cct aag acc ctg atc
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
CDR2

tat cgt gca aac aga ttg gta gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
CDR3

agt gga tct ggg caa gat tat tct ctc acc atc agc agc ctg gag tat
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
CDR3

gaa gat atg gga att tat tat tgt ctg aaa tat gat gag ttt ccg tac
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Lys Tyr Asp Glu Phe Pro Tyr
 85 90 95
CDR3

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

【図19F】

EA2 可変重鎖

48 gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta aag cct gga ggg
 Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
CDR1

96 tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
CDR1

144 acc atg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag aag agg ctg gag tgg gtc
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
CDR2

192 gca acc att agt agt ggt act tac acc tat cca gac agt gtg
 Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
CDR2

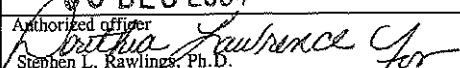
240 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
CDR3

288 ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
CDR3

321 aca aga gaa gct atc ttt act tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act
 Thr Arg Glu Ala Ile Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
CDR3

345 gtc tct gca
 Val Ser Ala
 115

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/15044																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 16/00; A61K 39/395; C07H 21/04; C12N 5/16 US CL : 424/174.1; 530/387.3, 388.15, 388.8; 536/23.5; 435/344 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. : 424/174.1; 530/387.3, 388.15, 388.8; 536/23.5; 435/344																				
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) Please See Continuation Sheet																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US 2001/0031252 A1 (LOW et al.) 18 October 2001 (18.10.2001), see entire document, particularly paragraphs [0021] and [022].</td> <td>1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CARLES-KINCH, K. et al. Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. Cancer Res. 15 May 2002, Vol. 62, No. 10, pages 2480-2487, see entire document.</td> <td>1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ZANTEK, N.D. et al. E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. Cell Growth Differ. September 1999, Vol. 10, No. 9, pages 629-638, see entire document.</td> <td>1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89</td> </tr> <tr> <td>Y,T</td> <td>LU, M. et al. EphA2 overexpression decreases estrogen dependence and tamoxifen sensitivity. Cancer Res. 15 June 2003, Vol. 63, pages 3425-3429, see entire document.</td> <td>1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WALKER-DANIELS, J. et al. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. Molecular Cellular Research. November 2002, Vol. 1, pages 79-87, see entire document.</td> <td>1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	US 2001/0031252 A1 (LOW et al.) 18 October 2001 (18.10.2001), see entire document, particularly paragraphs [0021] and [022].	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89	Y	CARLES-KINCH, K. et al. Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. Cancer Res. 15 May 2002, Vol. 62, No. 10, pages 2480-2487, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89	Y	ZANTEK, N.D. et al. E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. Cell Growth Differ. September 1999, Vol. 10, No. 9, pages 629-638, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89	Y,T	LU, M. et al. EphA2 overexpression decreases estrogen dependence and tamoxifen sensitivity. Cancer Res. 15 June 2003, Vol. 63, pages 3425-3429, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89	Y	WALKER-DANIELS, J. et al. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. Molecular Cellular Research. November 2002, Vol. 1, pages 79-87, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 2001/0031252 A1 (LOW et al.) 18 October 2001 (18.10.2001), see entire document, particularly paragraphs [0021] and [022].	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89																		
Y	CARLES-KINCH, K. et al. Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. Cancer Res. 15 May 2002, Vol. 62, No. 10, pages 2480-2487, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89																		
Y	ZANTEK, N.D. et al. E-cadherin regulates the function of the EphA2 receptor tyrosine kinase. Cell Growth Differ. September 1999, Vol. 10, No. 9, pages 629-638, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89																		
Y,T	LU, M. et al. EphA2 overexpression decreases estrogen dependence and tamoxifen sensitivity. Cancer Res. 15 June 2003, Vol. 63, pages 3425-3429, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89																		
Y	WALKER-DANIELS, J. et al. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. Molecular Cellular Research. November 2002, Vol. 1, pages 79-87, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89																		
<input checked="" 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 "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 01 October 2004 (01.10.2004)	Date of mailing of the international search report 08 DEC 2004																			
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  Stephen L. Rawlings, Ph.D. Telephone No. (703) 308-0196																			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/15044

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,T	PRATT, R.L. et al. Ligand binding up-regulates EphA2 messenger RNA through the mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase pathway. Molecular Cellular Research. December 2003, Vol. 1, pages 1070-1076, see entire document.	1-20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US03/15044

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claim Nos.: 18,21-23,31,32,41 and 77 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 18, 21-23, 31, 32, 41, and 77 have been found unsearchable under Article 17(2)(b) because of defects under Article 17(2)(a).

3. Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: Please See Continuation Sheet

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/15044

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-17, 19, 20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89, drawn to an antibody, a nucleic acid molecule encoding the light or heavy chain of said antibody, a host cell comprising said nucleic acid molecule, a hybridoma or cell line producing said antibody, and a method for treating cancer or a non-cancer hyperproliferative disease or disorder comprising administering to a patient an antibody.

Group II, claim(s) 65, drawn to a method for identifying an EphA2 agonistic antibody comprising determining the phosphotyrosine content of EphA2.

Group III, claim(s) 66, drawn to a method for identifying an EphA2 agonistic antibody comprising determining the expression level of EphA2.

Group IV, claim(s) 67 and 68, drawn to a method for identifying an EphA2 antibody that inhibits a cancer cell phenotype comprising determining the ability of cell to form colonies in soft agar or tubular network formation.

Group V, claim(s) 69 and 70, drawn to a method for identifying an EphA2 antibody that binds an EphA2 epitope exposed on cancer cells comprising determining the ability of an antibody to bind EphA2.

Group VI, claim(s) 71 and 72, drawn to a method for treating cancer comprising administering to a patient an antisense nucleic acid molecule.

Group VII, claim(s) 90-95, drawn to a method for diagnosing, prognosing, or monitoring the efficacy of therapy comprising measuring binding of an antibody.

This application contains claims directed to more than one species of the generic invention. These species are deemed to lack unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

In order for more than one species to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

The species of the invention of group I are as follows: the method, pharmaceutical composition, or antibody of claims 1-17, 19, 20, 24-30, 33-40, 42-46, 48, 55-64, 73-76, and 78-89, wherein the antibody, or humanized version thereof, is selected from the group consisting of (a) Eph099B-102.147, (b) Eph099B-208.261, (c) Eph099B-210.248, and (d) Eph099B-233.152.

The following claim(s) of group I are directed in the alternative to one or more species: 47 and 49-54.

The following claim(s) of group I are generic: 1, 24, 33, 35, 39, 40, 73, and 78.

The inventions listed as Groups I-VII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of group I is administering to a patient an antibody to treat a disease.

The special technical feature of group II is determining the phosphotyrosine content of EphA2 to identify an antibody.

The special technical feature of group III is determining the expression level of EphA2 to identify an antibody.

The special technical feature of group IV is determining the ability of cell to form colonies in soft agar or tubular network formation to identify an antibody.

The special technical feature of group V is determining the ability of an antibody to bind EphA2 to identify an antibody.

The special technical feature of group VI is administering to a patient an antisense nucleic acid molecule to treat cancer.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/15044

The special technical feature of group VII is measuring binding of an antibody to render a diagnosis or prognosis, or to monitor therapeutic effect.

Accordingly, groups I-VII do not share the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept under PCT Rules 13.1 and 13.2.

The species listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, the species lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of species (a) is Eph099B-102.147.

The special technical feature of species (b) is Eph099B-208.261.

The special technical feature of species (c) is Eph099B-210.248.

The special technical feature of species (d) is Eph099B-233.152.

Accordingly, species (a)-(d) do not share the same or corresponding special technical feature so as to form a single general inventive concept under PCT Rules 13.1 and 13.2.

Continuation of Box II Item 4:

1-17, 19, 20, 24-30, 33-40, 42-64, 73-76, and 78-89, to the extent that claims are drawn to species (a), namely Eph099B-102.147, or a humanized version thereof.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, MEDLINE, GENESEQ, GENEMBL, SWISS PROTEIN; ISSUED PATENTS; PUBLISHED APPLICATIONS: EphA2; antibody; agonist; antagonist; inhibitor; cancer; apoptosis

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 9/10	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/06	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/32	A 6 1 P 35/04	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/32	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(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,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,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 カールズ - キンチ , ケリー

アメリカ合衆国 2 0 8 8 2 メリーランド州 , レイトンズヴィル , フーヴァー ファーム ドライブ 1 9 6 2 7

(72)発明者 キーナー , ピーター

アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州 , ポトマック , ゴーキー ドライブ 1 4 0 1 7

(72)発明者 ランガーマン , ソロモン

アメリカ合衆国 2 1 2 1 5 メリーランド州 , バルチモア , クロス カントリー 6 6 0 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA45 CA02 CA09 DA02 EA02 HA17

4B063 QQ08 QQ79 QQ96 QR48 QR77 QS28

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA05 DA14

4B065 AA91X AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 AA19 DA39 MA13 MA17 MA22 MA23 MA24 MA31 MA38

MA41 MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60 MA66 MA67 NA05

NA14 ZA362 ZA592 ZA662 ZA892 ZB112 ZB262 ZB272

4C085 AA13 AA14 AA19 BB01 BB31 BB41 BB43 BB44 CC02 CC22

CC23 GG01 GG08 GG10

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA59 ZA66 ZA89

ZB11 ZB26 ZB27

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	EphA2单克隆抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2005538701A	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2004502947	申请日	2003-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	MEDImmune公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司 , 公司		
[标]发明人	キンチマイケルエス カールズキンチケリー キーナーピーター ランガーマンソロモン		
发明人	キンチ,マイケル,エス. カールズ-キンチ,ケリー キナー,ピーター ランガーマン,ソロモン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/28 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/2866 C07K2317/56 C07K2317/73 C07K2317/75 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/04 C07K16/32 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/53.D C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA45 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/HA17 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS28 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/DA39 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA31 4C084/MA38 4C084/MA41 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA362 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA892 4C084/ZB112 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB01 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA89 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/379322 2002-05-10 US 60/418213 2002-10-14 US 60/460507 2003-04-03 US		
其他公开文献	JP2005538701A5 JP4557714B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及设计用于治疗，控制或预防癌症，特别是转移性癌症的方法和组合物。在一个实施方案中，本发明的方法结合的EphA2上的EphA2的行为，从而提高了EphA2的磷酸化降低的EphA2水平，其包含有效量的抗体的施用。在另一个实施方案中，本发明结

合与EphA2的方法中，抑制癌细胞中的软琼脂集落形成，抑制三维基底膜或胞外基质制剂的管状网络形成，优先结合暴露在癌细胞而不是非癌细胞的EphA2表位，和/或K关低，从而抑制肿瘤细胞生长和/或转移，有效抗体量。本发明还提供一种或多种单独或一种或多种包含结合本发明的多种癌症治疗的EphA2抗体有用的其它药剂的药物组合物。

(P2005-53)

(43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
C 12 N 15/09	C 12 N 15/00	Z NAA 4 B024
A 61 K 31/7088	A 61 K 31/7088	4 B063
A 61 K 39/395	A 61 K 39/395	E 4 B064
A 61 K 45/00	A 61 K 39/395	T 4 B065
A 61 K 48/00	A 61 K 45/00	4 C084
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 112 頁)	最終頁
(21) 出願番号 特願2004-502947 (P2004-502947)	(71) 出願人 504333972	
(86) (22) 出願日 平成15年5月12日 (2003.5.12)		メディミューン、インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日 平成17年1月7日 (2005.1.7)		アメリカ合衆国 20878 メリ
(86) 國際出願番号 PCT/US2003/015044		ド州、ゲイサーズバーグ、ワン メ
(87) 國際公開番号 WO2003/094859		ューン ウェイ
(87) 國際公開日 平成15年11月20日 (2003.11.20)	(74) 代理人 100091096	
(31) 優先権主張番号 60/379,322		弁理士 平木 苞輔
(32) 優先日 平成14年5月10日 (2002.5.10)	(74) 代理人 100096183	
(33) 優先権主張国 米国 (US)		弁理士 石井 貢次
(31) 優先権主張番号 60/418,213	(74) 代理人 100118773	
(32) 優先日 平成14年10月14日 (2002.10.14)		弁理士 藤田 譲
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(72) 発明者 キンチ、マイケル、エス.	
(31) 優先権主張番号 60/460,507		アメリカ合衆国 20882 メリ
(32) 優先日 平成15年4月3日 (2003.4.3)		ド州、レイトンズヴィル、フーヴァー
(33) 優先権主張国 米国 (US)		ーム ドライブ 19627

最終頁 1-9