

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5311060号
(P5311060)

(45) 発行日 平成25年10月9日 (2013. 10. 9)

(24) 登録日 平成25年7月12日 (2013. 7. 12)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 E

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 28 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2009-552761 (P2009-552761)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月10日 (2008. 3. 10)
 (65) 公表番号 特表2010-520290 (P2010-520290A)
 (43) 公表日 平成22年6月10日 (2010. 6. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/003149
 (87) 国際公開番号 W02008/112192
 (87) 国際公開日 平成20年9月18日 (2008. 9. 18)
 審査請求日 平成23年3月7日 (2011. 3. 7)
 (31) 優先権主張番号 60/893, 848
 (32) 優先日 平成19年3月8日 (2007. 3. 8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506249211
 カロバイオス ファーマシューティカルズ
 インコーポレイティッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
 ス サンフランシスコ イースト グラン
 ド アベニュー 260
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固形腫瘍の治療のためのE p h A 3抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

EphA3をクラスター化する抗EphA3抗体を含む、腫瘍血管系においてEphA3を発現する固形腫瘍の増殖を阻害するための薬学的組成物であって、該抗体が細胞毒性癌治療薬に共有結合しない、前記薬学的組成物。

【請求項 2】

固形腫瘍がEphA3を発現する腫瘍細胞を25%未満有する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 3】

固形腫瘍がEphA3を発現する腫瘍細胞を10%未満有する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 4】

抗EphA3抗体がEphA3を活性化する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

チューブリン集合を阻害する治療薬と組み合わせて投与される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

チューブリン集合を阻害する治療薬を抗EphA3抗体による治療後に投与する、請求項5記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

該抗体が約0.1 mg/kg未満の用量で投与される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

10

20

EphA3をクラスター化し、かつ活性化する単量体の非凝集型抗EphA3抗体を含む、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

抗EphA3抗体を含む、腫瘍血管系においてEphA3を発現するが腫瘍細胞の表面において検出可能なEphA3を発現しない固形腫瘍の増殖を阻害するための薬学的組成物。

【請求項 10】

抗EphA3抗体がEphA3をクラスター化する、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

抗EphA3抗体がEphA3をクラスター化し、かつ活性化する、請求項9記載の薬学的組成物

。

10

【請求項 12】

抗EphA3抗体が治療薬に共有結合している、請求項9記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

エフリンリガンド結合の存在下または非存在下において、抗EphA3抗体がEphA3に結合する、請求項1または9記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

抗EphA3抗体がEphA3結合においてmAb IIIA4と競合する、請求項1-13のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

抗EphA3抗体が組換え抗体またはキメラ抗体である、請求項1-14のいずれか一項記載の薬学的組成物。

20

【請求項 16】

抗EphA3抗体がヒト抗体である、請求項1-15のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

抗EphA3抗体がモノクローナル抗体である、請求項1-16のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 18】

血管内皮細胞の表面上に存在するEphA3をクラスター化する多価抗EphA3抗体を含む、請求項1または9記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

抗EphA3抗体が、Fab、Fab'、またはFvである抗体断片を含む、請求項18記載の薬学的組成物。

30

【請求項 20】

抗EphA3抗体がヒトFc領域を含む、請求項1-19のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

抗EphA3抗体が活性アイソタイプを有する、請求項1-20のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

抗EphA3抗体が活性ヒト 1または 3アイソタイプを含む、請求項20または21記載の薬学的組成物。

40

【請求項 23】

フコシル化EphA3抗体を含む、請求項20、21または22記載の薬学的組成物。

【請求項 24】

抗EphA3抗体が、表1によるV_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3を含む、請求項1-23のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 25】

V_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3がmAb IIIA4に由来する、請求項24記載の薬学的組成物。

【請求項 26】

抗EphA3抗体が、表1に示すV_H領域のCDR配列から選択されるCDRH1、CDRH2、およびCDRH3

50

；ならびに表1に示すV_L領域のCDR配列から選択されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む、請求項1-23のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 27】

抗EphA3抗体が、mAb 111A4のV_H領域およびV_L領域のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項26に記載の薬学的組成物。

【請求項 28】

抗EphA3抗体がmAb 111A4のV_H領域およびV_L領域を含む、請求項27に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2007年3月8日に提出した米国特許仮出願第60/893,848号の恩典を主張し、この出願は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Eph受容体チロシンキナーゼ(Eph)は、チロシン残基においてタンパク質をリン酸化するキナーゼである受容体チロシンキナーゼ(RTK)の大きな群に属する。Ephおよびそれらの膜結合型エフリンリガンド(エフリン)は、細胞の位置決めおよび組織の組織化を制御する(非特許文献1 / Poliakov, et al., Dev Cell 7:465-80, 2004)。他の受容体チロシンキナーゼとは対照的に、Eph受容体の活性化は、リガンド結合および二量体化を必要とするばかりでなく、予め形成されたリガンドオリゴマーを必要とする。したがって、Eph受容体のチロシンリン酸化は、クラスター形成型または膜結合型のエフリンリガンドの提示を必要とする(非特許文献2 / Davis et al., Science 266:816-819, 1994)。機能的でかつ生化学的なEph応答は、より高度なリガンドオリゴマー形成状態で起こる(非特許文献3 / Stein et al., Genes Dev 12:667-678, 1998)。

20

【0003】

数あるパターン形成機能の中でも特に、種々のEphおよびエフリンは、血管発生において役割を果たすことが示されている。EphB4およびエフリン-B2をノックアウトすると、毛細血管床から血管へ再構築する能力が欠如し(非特許文献1 / Poliakov, et al., 前記)、胚性致死となる。ある種のEph受容体およびエフリンの持続的発現は、成体の新たに形成される微小血管においても認められている(非特許文献4 / Brantley-Sieders, et al., Curr Pharm Des 10:3431-42, 2004; 非特許文献5 / Adams, J Anat 202:105-12, 2003)。

30

【0004】

成体において、ある種のエフリンおよびそれらの受容体が調節解除されて再出現することが、腫瘍の浸潤、転移、および新血管新生に寄与することも認められている(非特許文献6 / Nakamoto, et al., Microsc Res Tech 59:58-67, 2002; 非特許文献4 / Brantley-Sieders, et al., 前記)。さらに、ある種のEphファミリーメンバーが、種々のヒト腫瘍に由来する腫瘍細胞において過剰発現されることも見出された(非特許文献4 / Brantley-Sieders, D. et al., 前記; 非特許文献7 / Marme, Ann Hematol 81 Suppl 2:S66, 2002; 非特許文献8 / Booth, et al., Nat Med 8:1360-1, 2002)。

40

【0005】

ドミナントネガティブな可溶性EphA2またはA3タンパク質は、インビトロにおいてエフリン誘導性の内皮細胞機能に及ぼす効果、ならびにインビボにおいて腫瘍の血管新生および進行に及ぼす効果を示した(非特許文献9 / Brantley, et al. Oncogene 21:7011-26, 2002; 非特許文献10 / Cheng, et al. Neoplasia 5:445-56, 2003; 非特許文献11 / Dobrzanski, et al. Cancer Res 64:910-9, 2004)。しかしながら、エフリン-AファミリーメンバーのEph A受容体に対する特異性が欠如しているため、これらの研究は、EphA3自体が、腫瘍組織または正常組織の血管内皮において役割を果たすかどうかを示してはいない。

50

【 0 0 0 6 】

要約すると、本発明より前には、EphA3が、腫瘍血管系に存在する内皮細胞において発現されるという証拠はなかった。実際に、EphA3ノックアウトマウスにおいて血管系の異常は報告されていない(例えば、非特許文献 1 2 /Vaidya et al. Mol. Cell. Biol. 23:8092-8098, 2003を参照されたい)。したがって、ある種のEph受容体およびエフリンが、血管新生ならびに腫瘍の形成および進行において役割を果たすと関係づけられているものの、腫瘍内皮細胞におけるEphA3発現を標的とする特異的療法は存在しなかった。したがって本発明は、新たな治療標的および腫瘍を治療する方法を提供する。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

10

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Poliakov, et al., Dev Cell 7:465-80, 2004

【 非特許文献 2 】 Davis et al., Science 266:816-819, 1994

【 非特許文献 3 】 Stein et al., Genes Dev 12:667-678, 1998

【 非特許文献 4 】 Brantley-Sieders, et al., Curr Pharm Des 10:3431-42, 2004

【 非特許文献 5 】 Adams, J Anat 202:105-12, 2003

【 非特許文献 6 】 Nakamoto, et al., Microsc Res Tech 59:58-67, 2002

【 非特許文献 7 】 Marme, Ann Hematol 81 Suppl 2:S66, 2002

【 非特許文献 8 】 Booth, et al., Nat Med 8:1360-1, 2002

【 非特許文献 9 】 Brantley, et al. Oncogene 21:7011-26, 2002

20

【 非特許文献 1 0 】 Cheng, et al. Neoplasia 5:445-56, 2003

【 非特許文献 1 1 】 Dobrzanski, et al. Cancer Res 64:910-9, 2004

【 非特許文献 1 2 】 Vaidya et al. Mol. Cell. Biol. 23:8092-8098, 2003

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

発明の概要

本発明は、EphA3が固形腫瘍の血管系において発現されるという発見に基づく。したがって、1つの局面において、本発明は、抗EphA3抗体を投与する段階を含む、腫瘍細胞においてEphA3を発現しない固形腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの態様において、抗EphA3抗体は、EphA3を発現する細胞、特に腫瘍の血管系の内皮細胞の表面上で、例えばFc受容体結合を介してEphA3をクラスター化する。いくつかの態様において、EphA3抗体は、天然リガンドがEphA3に結合している場合でさえも、EphA3を活性化する。

30

【 0 0 0 9 】

本発明はまた、固形腫瘍を有する個体に、：a) 例えばFc受容体結合を介してEphA3をクラスター化する抗EphA3抗体、およびb) 癌治療薬を投与する段階を含む、腫瘍増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの態様において、癌治療薬はチューブリン集合を破壊する。治療薬は抗EphA3抗体と同時に投与することもできるし、または抗EphA3抗体による治療後に投与することもできる。いくつかの態様において、治療薬は抗EphA3抗体に共有結合している。他の態様において、治療薬は、EphA3抗体に結合していない別の分子である。いくつかの態様において、抗EphA3抗体は、EphA3結合においてモノクローナル抗体111A4(mAb 111A4)と競合し、EphA3をクラスター化する。いくつかの態様において、抗体はEphA3を活性化する。

40

【 0 0 1 0 】

別の局面において、本発明は、活性ヒトアイソタイプを有する抗EphA3抗体を含む組成物であって、該抗体が例えばFc受容体結合を介してEphA3をクラスター化する組成物を提供する。1つの態様において、抗EphA3抗体は、EphA3に対する結合においてmAb 111A4と競合する。いくつかの態様において、抗体はEphA3に対する結合においてmAb 111A4と競合し、エフリン、例えばエフリン-A5のEphA3に対する結合を阻止しない。別の態様において、抗体はEphA3に結合し、EphA3をクラスター化するが、EphA3に対する結合においてmAb 111A4と競合しない。いくつかの態様において、抗体はEphA3を活性化する。本発明の組成物

50

はまた、腫瘍増殖を阻害する別の薬剤、例えばチューブリン集合を阻害する薬剤を含み得る。

【 0 0 1 1 】

本発明の方法および/または組成物において使用するための抗EphA3抗体は、組換え抗体またはキメラ抗体であってよい。別の態様において、抗体はヒト抗体、例えばヒューマニア(humaneer)化抗体またはヒト化抗体である。さらなる態様において、抗体はポリクローナル抗体である。または、抗体はモノクローナル抗体であってもよい。さらなる態様において、抗体は、Fab、Fab'、またはFvである抗体断片を含む多価抗体である。別の態様において、抗体は、免疫エフェクター細胞上のFc受容体に結合する活性ヒトアイソタイプ、例えばIgG1、IgG3、IgM、IgA、またはIgEを有する。したがって、いくつかの態様において、抗体は、ヒト重鎖定常領域、例えばIgG1またはIgG3 領域を含む。いくつかの態様において、抗体は化学的に架橋されたIgGであってよい。

10

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、本発明の方法および/または組成物において使用するための抗体は、mAb 111A4のV_H領域およびV_L領域を含む。他の態様において、抗体は、mAb 111A4のV_H領域およびV_L領域のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。さらなる態様において、抗体は、mAb 111A4のV_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3を含む。いくつかの態様において、抗体は、表1による重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3、ならびに表1による軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。さらなる態様において、抗体は表1による重鎖のCDR3および表1による軽鎖のCDR3を含む。

20

【 0 0 1 3 】

本発明はさらに、単量体の非凝集型抗体調製物を投与することによって、固形腫瘍(腫瘍細胞がEphA3を発現するか発現しないかは問わない)の増殖を阻害する方法であって、該抗体がEphA3をクラスター化し得る方法を提供する。このような抗体は、例えば活性アイソタイプを有し、例えばヒトIgG1またはIgG3 領域を有する。いくつかの態様において、抗体はEphA3を活性化する。抗体は組換え抗体またはキメラ抗体であってよい。別の態様において、抗体はヒト抗体、例えばヒューマニア化抗体またはヒト化抗体である。いくつかの態様において、抗体は、多価型であるFab、Fab'、またはFv、例えばトリFabである。いくつかの態様において、本発明の方法および/または組成物において使用するための抗体は、mAb 111A4のV_H領域およびV_L領域を含む。他の態様において、抗体は、mAb 111A4のV_H領域およびV_L領域のCDR1、CDR2、およびCDR3；または表1による重鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3、ならびに表1による軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。さらなる態様において、抗体は、mAb 111A4のV_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3を含む。さらなる態様において、抗体は表1による重鎖のCDR3および表1による軽鎖のCDR3を含む。

30

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様において、本発明は、抗体が放射性金属または毒素などの治療薬に結合していないという条件で、例えばFc受容体結合を介して、腫瘍血管内皮細胞上に存在するEphA3をクラスター化するEphA3に対する抗体を投与することによって、固形腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの態様において、抗体はEphA3を活性化する。

【 0 0 1 5 】

いくつかの態様において、本発明は、化学的に架橋されたEphA3に対する抗体を投与することによって、固形腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。

40

【 0 0 1 6 】

別の局面において、本発明は、腫瘍細胞の表面上のタンパク質を標的とする治療計画と比較してより少ない用量の抗体を投与する段階を含む、固形腫瘍を治療する方法を提供する。本方法は、腫瘍血管系内皮細胞上に存在するEphA3受容体を標的とする。したがって、約1.0 mg/kg未満、好ましくは約0.5 mg/kg未満、または0.1 mg/kg未満の用量の抗体を投与して、腫瘍の増殖を阻害することができる。このような抗体は、EphA3に結合しこれをクラスター化する、本明細書に記載する本発明の任意の抗体であってよい。いくつかの態様において、抗体はEphA3を活性化する。

50

【0017】

本発明はまた、EphA3に特異的に結合し、EphA3受容体をクラスター化するEphA3結合剤、例えば多価型の骨格タンパク質または抗体を投与することによって、腫瘍増殖を阻害する方法を提供する。典型的な態様において、抗体などのEphA3結合剤によって誘導されるクラスター化は、天然リガンド、例えばエフリン-A5などのエフリンがEphA3に結合している場合でさえも、起こり得る。結合剤は、EphA3に結合する多価型の骨格タンパク質であってよい。いくつかの態様において、EphA3結合剤は、EphA3に対する結合においてmAb 11IA4と競合する。腫瘍への抗EphA3結合剤の投与は、抗EphA3抗体の使用によって例証される。しかしながら、本明細書に記載する方法は、他の抗EphA3結合剤にも用いることができる。

10

【0018】

本発明のEphA3結合剤、例えばEphA3受容体をクラスター化するEphA3抗体はまた、新血管形成を伴う他の疾患の治療に使用することもできる。例えば、本明細書に記載するEphA3抗体は、加齢性黄斑変性症またはその他の眼内新生血管症候群などの網膜血管疾患の治療に使用することができる。したがって、本明細書に記載するEphA3剤で治療することができる他の非生物状態には、関節リウマチ、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、および未熟児網膜症を含むその他の増殖性網膜症、水晶体後線維増殖症、新生血管緑内障、加齢性黄斑変性症、甲状腺過形成(グレーブス病を含む)、血管腫、角膜およびその他の組織移植、子癰前症、ならびに慢性炎症が含まれる。

20

[請求項1001]

EphA3をクラスター化する抗EphA3抗体を対象に投与する段階を含む、腫瘍細胞においてEphA3を発現しない固形腫瘍の増殖を阻害する方法。

[請求項1002]

対象に、

a) EphA3をクラスター化する抗EphA3抗体；および

b) 癌治療薬

を投与する段階を含む、固形腫瘍の増殖を阻害する方法。

[請求項1003]

治療薬がチューブリン集合を阻害する、請求項1002記載の方法。

[請求項1004]

治療薬を抗EphA3抗体と同時に投与する、請求項1002または請求項1003記載の方法。

30

[請求項1005]

治療薬を抗EphA3抗体による治療後に投与する、請求項1002または請求項1003記載の方法。

[請求項1006]

治療薬が抗EphA3抗体に共有結合している、請求項1002、1003、1004、または1005のいずれか一項記載の方法。

[請求項1007]

EphA3をクラスター化する抗EphA3抗体を対象に投与する段階を含む、固形腫瘍の増殖を阻害する方法であって、該抗体を約0.1 mg/kg未満の用量で投与する方法。

40

[請求項1008]

EphA3をクラスター化する単量体の非凝集型抗EphA3抗体を対象に投与する段階を含む、固形腫瘍の増殖を阻害する方法。

[請求項1009]

抗EphA3抗体を対象に投与する段階を含む、腫瘍細胞においてEphA3を発現しない固形腫瘍の増殖を阻害する方法。

[請求項1010]

エフリンリガンド結合の存在下または非存在下において、抗EphA3抗体がEphA3に結合する、請求項1009記載の方法。

[請求項1011]

50

抗EphA3抗体がEphA3結合においてmAb IIIA4と競合する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1012]

抗EphA3抗体が組換え抗体またはキメラ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1013]

抗EphA3抗体がヒト抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1014]

抗EphA3抗体がEphA3を活性化する、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1015]

抗EphA3抗体がモノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1016]

抗EphA3抗体が、Fab、Fab'、またはFvである抗体断片を含む多価抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1017]

抗EphA3抗体がヒトFc領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1018]

抗EphA3抗体が活性ヒト 1または 3アイソタイプを含む、請求項1017記載の方法。

[請求項1019]

抗EphA3抗体が、表1によるV_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1020]

V_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3がmAb IIIA4に由来する、請求項1019記載の方法。

[請求項1021]

抗EphA3抗体が、表1に示すV_H領域のCDR配列から選択されるCDRH1、CDRH2、およびCDRH3；ならびに表1に示すV_L領域のCDR配列から選択されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1022]

抗EphA3抗体が、mAb IIIA4のV_H領域およびV_L領域のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1023]

抗EphA3抗体がmAb IIIA4のV_H領域およびV_L領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1024]

活性アイソタイプを有する単量体抗EphA3抗体を含む組成物であって、該抗体が血管内皮細胞の表面上に存在するEphA3をクラスター化する組成物。

[請求項1025]

抗EphA3抗体が、EphA3に対する結合においてmAb IIIA4と競合する、請求項1024記載の組成物。

[請求項1026]

抗EphA3抗体が組換え抗体またはキメラ抗体である、請求項1024または1025記載の組成物。

[請求項1027]

抗EphA3抗体がEphA3を活性化する、請求項1024～1026のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1028]

抗EphA3抗体が活性ヒト重鎖定常 1または 3アイソタイプを含む、請求項1024～1027のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1029]

抗EphA3抗体がヒト抗体である、請求項1024～1028のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1030]

10

20

30

40

50

抗EphA3抗体がモノクローナル抗体である、請求項1024～1029のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1031]

抗EphA3抗体が、表1によるV_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3を含む、請求項1024～1030のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1032]

抗EphA3抗体が、表1に示すV_H領域のCDR配列から選択されるCDRH1、CDRH2、およびCDRH3；ならびに表1に示すV_L領域のCDR配列から選択されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む、請求項1024～1031のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1033]

V_H領域のCDR3およびV_L領域のCDR3がmAb I I I A4に由来する、請求項1024～1032のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1034]

抗EphA3抗体が、mAb I I I A4のV_H領域およびV_L領域のCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1033記載の組成物

[請求項1035]

抗EphA3抗体がmAb I I I A4のV_H領域およびV_L領域を含む、請求項1024～1034のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1036]

チューブリン集合を阻害する薬剤をさらに含む、請求項1024～1035のいずれか一項記載の組成物。

[請求項1037]

血管内皮細胞の表面上に存在するEphA3をクラスター化する多価抗EphA3抗体を含む組成物。

[請求項1038]

抗EphA3抗体が、EphA3に対する結合においてmAb I I I A4と競合する、請求項1037記載の組成物。

[請求項1039]

抗EphA3抗体がEphA3を活性化する、請求項1037または1038記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 9 】

【図 1】 (a) ヒト悪性黒色腫切片における、または(b) フローサイトメトリーを用いた様々な内皮細胞株の解析による、および(c) 親HEK293T細胞もしくはEphA3過剰発現HEK293T細胞、SK-Mel黒色腫細胞、TEC-28腎臓腫瘍内皮細胞、脳微小血管内皮細胞(b-MVEC)、または子宮筋層MVEC(m-MVEC)のIP/ウェスタンブロット解析による、EphA3モノクローナル抗体 I I I A4(mAb I I I A4)を用いたEphA3の検出を示す。

【図 2】 子宮内膜内皮細胞におけるEphA3の発現が、長期組織培養中に消失することを示す。(a) 図4の免疫細胞化学的解析によって検出された種々の細胞表面マーカーおよびEphA3の発現を、フローサイトメトリーによって調べた。比較のためにEphA3/HEK-293T細胞のEphA3発現プロファイルを示す。(b) 表示のような子宮内膜由来MVECの連続継代物(P4～P9)における、EphA3発現のIP/ウェスタンブロット解析。 I I I A4-セファロースを用いて全細胞溶解物からEphA3を免疫沈降させ、ウェスタンブロットを抗EphA3ポリクローナル抗体でプロービングした。

【図 3】 定量的リアルタイムPCRによるEphA3 mRNA発現レベルの推定を示す。様々な子宮内膜組織試料から単離されたmMVECから、全mRNAを抽出した。 -アクチンのレベルを内部参照として平行して決定し、HEK293T細胞由来のmRNAをEphA3発現の陽性対照とし、 -アクチンとEphA3のmRNAレベルの比として表した。3つの独立した試料による平均値およびSDを示す。

【図 4】 ヒト22RV1前立腺癌細胞におけるEphA3の発現を示す。(a) mAb I I I A4および検出用のフルオレセイン結合抗マウス抗体を用いて、フローサイトメトリーによってEphA3発

10

20

30

40

50

現を調べた。(b) 全細胞溶解物のIP/ウェスタンブロット解析により、EphA3発現のレベルを推定し、EphA3/HEK293T細胞における発現と比較した。平行試料において、予めクラスター化したエフリン-A5 Fcまたはch-111A4によって細胞を刺激した後のEphA3チロシンリン酸化を、ウェスタンブロット解析用の抗PY EphA3ポリクローナル抗体を用いて評価した。(c) 22RV1細胞をフィブロネクチン被覆スライドガラス上で培養し、表示の通りにエフリン-A5 Fcの存在下または非存在下において、Alexa⁵⁴⁶ 111A4と共にインキュベートした。固定して透過処理した細胞のアクチン細胞骨格を、Alexa⁴⁸⁸ ファロイジンで染色した。

【図5】抗EphA3抗体が、インビボにおいてEphA3抗原陰性腫瘍異種移植片の増殖を阻害することを示す。ヒトDU-145前立腺癌細胞を有するヌードマウスを、キメラ111A4抗体(10 mg/kg; i.p.)または媒体対照で、6週間にわたって週に2回処置した。a) 処置後50日目までの平均腫瘍体積(副尺つきのノギスを用いて決定)。b) 処置後50日目の解剖時における腫瘍重量(平均値 + 標準偏差)。

10

【図6】抗EphA3抗体が、インビボにおいてEphA3抗原陽性腫瘍異種移植片の増殖を阻害することを示す。ヒトLNCaP前立腺癌細胞を有するヌードマウスを、キメラ111A4抗体(10 mg/kg; i.p.)または媒体対照で、6週間にわたって週に2回処置した。a) 処置後22日目までの平均腫瘍体積(副尺つきのノギスを用いて決定)。b) 処置後25日目の解剖時における腫瘍重量(平均値 + 標準偏差)。

【発明を実施するための形態】

【0020】

発明の詳細な説明

20

定義

本明細書で使用する「固形腫瘍」とは、組織の異常な腫瘍を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であってよい。本発明の方法および組成物を用いて治療することができる固形腫瘍は、新血管形成を特徴とする。腫瘍血管系(微小血管系とも称される)は、内皮細胞の迅速な増殖、壁構造の不良、血漿タンパク質に対する透過性の増加、および要求に応答して血流を増加させる能力の限界を特徴とする。腫瘍血管系によって、腫瘍塊の腫瘍細胞は、正常細胞と比較して増殖利点を獲得することが可能となる。固形腫瘍は、それを形成する細胞の型にちなんで命名される。固形腫瘍の例は、肉腫、癌腫(上皮腫瘍)、黒色腫、および神経膠芽腫である。

【0021】

30

本発明との関連における「腫瘍の増殖を阻害すること」とは、腫瘍増殖を遅延させること、および/または腫瘍サイズを減少させることを指す。したがって「腫瘍の増殖を阻害すること」には、腫瘍細胞を死滅させること、および腫瘍細胞の増殖を遅延または停止させることが含まれる。

【0022】

本明細書で使用する「腫瘍細胞」という用語は、新生物細胞を指す。本用語は、良性および悪性である癌細胞を含む。新生物形質転換は、腫瘍細胞の由来元の細胞型に対する腫瘍細胞の表現型変化を伴う。この変化には、接触阻害の喪失、形態変化、および異常増殖が含まれ得る(Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (3rd edition, 1994)を参照されたい)。本発明との関連において、「腫瘍細胞」は腫瘍の血管系の細胞を意味しない。

40

【0023】

本明細書で使用する「腫瘍血管系内皮細胞」とは、腫瘍の血管系に存在する内皮細胞である。

【0024】

本明細書で使用する「EphA3」は、Eph受容体A3を指す。この受容体は、「ヒト胚キナーゼ」、「hek」、「eph様チロシンキナーゼ1」、「etk1」、または「tyro4」とも称されている。EphA3は、タンパク質-チロシンキナーゼファミリーのエフリン受容体サブファミリーに属する。EPHおよびEPH関連受容体は、発生事象の媒介に関連づけられている。EPHサブファミリーの受容体は、典型的に、単一のキナーゼドメイン、ならびにCysリッチドメ

50

インおよび2つのフィブロネクチンIII型反復を含む細胞外ドメインを有する。エフリン受容体は、それらの細胞外ドメイン配列の類似性、ならびにエフリン-Aおよびエフリン-Bリガンドとの結合に関するそれらの親和性に基づいて、2つの群に分類される。EphA3はエフリン-Aリガンドと結合する。EphA3の核酸配列およびタンパク質配列は公知である。例示的なヒトEphA3アミノ酸配列は、アクセッション番号(EAW68857)に基づいて入手可能である。

【0025】

本発明において、EphA3の「活性化」は、EphA3のリン酸化、および典型的に細胞の円形化を引き起こす。

【0026】

本明細書で使用するEphA3の「クラスター化」または「架橋」とは、細胞表面上でのEphA3分子の架橋を指す。クラスター化は、一般的に、EphA3のリン酸化を引き起こす活性シグナル伝達複合体を形成する。「クラスター化」は、典型的に、EphA3活性化の特徴である。

【0027】

活性アイソタイプを有する抗体の調製物に関連して本明細書で使用する「非凝集型」という用語は、凝集型の、すなわち単量体を超える形態の抗体を約5%未満、いくつかの態様においては約2%未満または1%未満有す調製物を指す。

【0028】

本明細書で使用する「単量体」抗体とは、抗原結合部位を2つ有する二価抗体を指す。

【0029】

本明細書で使用する「多価」抗体または「多価」結合剤とは、抗原結合部位を3つ以上有する抗体またはタンパク質を指す。

【0030】

本明細書で使用する「腫瘍細胞においてEphA3を発現しない固形腫瘍」とは、腫瘍細胞においてEphA3を発現する細胞を約25%未満有する固形腫瘍を指す。いくつかの態様において、固形腫瘍は、腫瘍細胞においてEphA3を発現する細胞を約15%未満、または10%未満、または5%未満有する。さらなる態様において、EphA3を発現しない腫瘍細胞とは、例えば免疫組織化学的検査により検出して、検出可能なEphA3発現をほとんどまたは全く有さない腫瘍細胞を指す。「検出可能なEphA3発現がほとんどない」とは、EphA3を発現しない対照細胞によるバックグラウンドの2倍未満の発現量を指す。

【0031】

本発明において、「EphA3抗体」または「抗EphA3抗体」は互換的に用いられ、EphA3に結合する抗体を指す。いくつかの態様において、抗体は、例えばFc受容体結合を介してEphA3をクラスター化する。本用語は、エフリンリガンド(例えば、エフリン-A5)結合の存在下においてEphA3に結合する抗体、およびリガンド結合部位に結合する抗体を包含する。

【0032】

「エフリンリガンドの結合の存在下においてEphA3に結合するEphA3抗体」とは、エフリン-A5などのエフリンリガンドのEphA3に対する結合を有意に妨げない抗体を指す。EphA3およびエフリンリガンド、例えばエフリン-A5を含む結合反応物中にそのような抗体が存在すると、EphA3に対するエフリンリガンド結合は約30%未満、典型的には20%または10%未満減少する。

【0033】

「mAb IIIA4」という用語は、EphA3をアフィニティー単離するために、元々LK63ヒト急性プレB白血病細胞に対して産生されたモノクローナル抗体IIIA4を指す(Boyd, et al. J Biol Chem 267:3262-3267, 1992)。mAb IIIA4は、天然EphA3球状エフリン結合ドメインに結合する(例えば、Smith, et al., J. Biol. Chem 279:9522-9531, 2004)。これは、アクセッション番号91061920の下で、欧州動物細胞培養収集機関(European Collection of Animal Cell Cultures)に寄託されている(例えば、欧州特許第EP0590030号を参照されたい)。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用する「活性アイソタイプを有する抗体」とは、免疫エフェクター細胞上に存在するFc受容体に結合するヒトFc領域を有する抗体を指す。「活性アイソタイプ」には、IgG1、IgG3、IgM、IgA、およびIgEが含まれる。本用語は、Fcエフェクター機能を調節する変異、またはそのように調節する糖組成および/もしくはグリコシル化レベルに対する変化などの修飾を含むヒトFc領域を有する抗体を包含する。

【 0 0 3 5 】

「Fc領域」とは、第1定常領域免疫グロブリンドメインを除いた抗体の定常領域を指す。したがって、Fcとは、IgA、IgD、およびIgGの最後の2つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにIgEおよびIgMの最後の3つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにこれらのドメインの可動性ヒンジN末端を指す。IgAおよびIgMの場合、FcはJ鎖を含み得る。IgGの場合、Fcは免疫グロブリンドメインC₂およびC₃、ならびにC₁とC₂との間のヒンジを含む。Fc領域の境界は変化し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常、そのカルボキシル末端に残基C226またはP230を含むよう規定され、その際、番号付けはKabatらによるEU指数(1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service、バージニア州、スプリングフィールド)に従うことが、当技術分野において理解されている。「Fc領域」という用語は、単離体としてのこの領域を指す場合もあれば、または抗体もしくは抗体断片との関連におけるこの領域を指す場合もある。「Fc領域」は、Fc領域の天然の対立遺伝子変種、およびエフェクター機能を調節する修飾を含む。Fc領域はまた、生物学的機能に変化をもたらさない変種も含む。例えば、生物学的機能を実質的に喪失させることなく、免疫グロブリンのFc領域のN末端またはC末端から1つまたは複数のアミノ酸を欠失させることができる。このような変種は、活性に最小の影響を及ぼすように、当技術分野で公知の一般規則に基づいて選択することができる(例えば、Bowie, et al., Science 247:306-1310, 1990を参照されたい)。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用する「抗体」とは、結合タンパク質として機能的に定義され、かつ抗体を産生する動物の免疫グロブリンコード遺伝子のフレームワーク領域に由来すると当業者によって認識されるアミノ酸配列を含むとして構造的に定義されるタンパク質である。抗体は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされる1つまたは複数のポリペプチドからなり得る。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、 α 、 β 、 γ 、 δ 、および μ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は κ または λ のいずれかに分類される。重鎖は μ 、 γ 、 α 、または δ に分類され、これらはそれぞれ免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを規定する。

【 0 0 3 7 】

典型的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は、四量体を含むことが知られている。各四量体は2つの同じポリペプチド鎖対からなり、各対は1本の「軽」鎖(約25 kD)および1本の「重」鎖(約50~70 kD)を有する。各鎖のN末端は、主に抗原認識を担う約100~110またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を規定する。可変軽鎖(V_L)および可変重鎖(V_H)という用語は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖を指す。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、結合特異性を保持する抗体断片も含む。例えば、いくつかの十分に特徴づけられた抗体断片が存在する。したがって、例えば、ペプシンはヒンジ領域内のジスルフィド結合の下方で抗体を消化して、それ自体ジスルフィド結合によってVH-CH1に結合している軽鎖であるFabの二量体、F(ab)'₂を生じる。F(ab)'₂を穏和な条件下で還元してヒンジ領域内のジスルフィド結合を切断し、それによりF(ab)'₂二量体からFab'単量体に変換することができる。Fab'単量体は、本質的にヒンジ領域の部分に伴うFabである(他の抗体断片のより詳細な説明については、Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)を参照されたい)。無傷の抗体の消化に関して様々な抗体断片が規定されるが、当業者は、化学的にまたは組換えDNA方法論を用

10

20

30

40

50

いることによりそのような断片を新規に合成できることを理解するであろう。したがって、本明細書で使用する抗体という用語はまた、全抗体の修飾によって生じるか、または組換えDNA方法論を用いて合成される抗体断片を含む。

【0039】

抗体には、可変重鎖領域と可変軽鎖領域が共に結合して(直接またはペプチドリンカーを介して)、連続したポリペプチドを形成する一本鎖Fv抗体(sFvまたはscFv)のような一本鎖抗体(単一のポリペプチド鎖として存在する抗体)を含む、 V_H - V_L 二量体が含まれる。一本鎖Fv抗体は、直接結合しているか、またはペプチドコードリンカーによって結合している V_H コード配列および V_L コード配列を含む核酸から発現され得る、共有結合した V_H - V_L である(例えば、Huston, et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988)。 V_H と V_L は単一ポリペプチド鎖として互いに結合しているが、 V_H ドメインおよび V_L ドメインは非共有結合によって会合する。または、抗体は別の断片であってもよい。他の断片もまた、例えば組換え技法を用いて、可溶性タンパク質として、またはディスプレイ法から得られる断片として作製することができる。抗体には、二抗体(diantibody)およびミニ抗体も含まれ得る。本発明の抗体は、ラクダ科動物に由来する抗体のような重鎖二量体も含まれる。本発明の目的のために、抗体は、内皮細胞の表面上に存在するEphA3をクラスター化し得る形態で使用する。したがっていくつかの態様において、抗体は、活性アイソタイプを有する単量体型である。他の態様において、抗体は、EphA3を架橋し得る多価型、例えば三価または四価型である。

【0040】

本明細書で使用する「V領域」とは、B細胞分化の際の重鎖および軽鎖のV領域遺伝子の再編成の結果としてVセグメントに付加されるセグメントであるCDR3およびフレームワーク4を含めた、フレームワーク1、CDR1、フレームワーク2、CDR2、およびフレームワーク3のセグメントを含む抗体可変領域ドメインを指す。

【0041】

本明細書で使用する「相補性決定領域(CDR)」とは、軽鎖および重鎖の可変領域によって確立される4つの「フレームワーク」領域を中断する、各鎖における3つの超可変領域を指す。CDRは主に、抗原のエピトープに対する結合を担う。各鎖のCDRは典型的に、N末端から順に番号付けしてCDR1、CDR2、およびCDR3と称され、典型的に、特定のCDRが位置する鎖によっても特定される。したがって、 V_H CDR3はそれが見出される抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、 V_L CDR1はそれが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインに由来するCDR1である。

【0042】

異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域は、構成成分である軽鎖および重鎖のフレームワーク領域が組み合わさったものであり、三次元空間にCDRを配置し、整列させるように働く。

【0043】

CDRおよびフレームワーク領域のアミノ酸配列は、例えば、Kabat, Chothia, international ImMunoGeneTics database(IMGt)、およびAbM(例えば、Johnson et al., 前記; Chothia & Lesk, 1987, Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901-917; Chothia C. et al., 1989, Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature 342, 877-883; Chothia C. et al., 1992, structural repertoire of the human VH segments J. Mol. Biol. 227, 799-817; Al-Lazikani et al., J.Mol.Biol 1997, 273(4)を参照されたい)といった当技術分野で周知の種々の定義を用いて決定することができる。抗原結合部位の定義は、以下の文献にも記載されている: Ruiz et al., IMGt, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res., 28, 219-221 (2000); およびLefranc, M.-P. IMGt, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res. Jan 1;29(1):207-9 (2001); MacCallum et al, Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography, J. Mol. Biol., 262 (5), 732-745 (1996); およびMartin et al, Proc. Natl Acad.

Sci. USA, 86, 9268-9272 (1989); Martin, et al, Methods Enzymol., 203, 121-153, (1991); Pedersen et al, Immunomethods, 1, 126, (1992); および Rees et al, In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction. Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

【0044】

「エピトープ」または「抗原決定基」とは、抗体が結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、連続したアミノ酸から、またはタンパク質の三次折りたたみによって隣接した非連続アミノ酸から形成され得る。連続したアミノ酸から形成されるエピトープは典型的に、変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次折りたたみによって形成されたエピトープは典型的に、変性溶媒による処理で失われる。エピトープは典型的に、独特の空間的高次構造中に少なくとも3アミノ酸、より一般的には少なくとも5または8~10アミノ酸を含む。エピトープの空間的高次構造を決定する方法には、例えば、x線結晶解析および2次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996)を参照されたい。

【0045】

本明細書で使用する「キメラ抗体」とは、(a) 定常領域またはその一部が改変、置換、または交換され、その結果として抗原結合部位(可変領域)が、異なるもしくは改変されたクラス、エフェクター機能、および/もしくは種の定常領域、または例えば酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬物等といったキメラ抗体に新たな特性を付与する完全に異なる分子に結合しているか；または(b) 可変領域またはその一部が、異なるもしくは改変された抗原特異性を有する可変領域もしくはその一部で；または別の種由来もしくは別の抗体クラスもしくはサブクラス由来の対応する配列で改変、置換、または交換された免疫グロブリン分子を指す。

【0046】

本明細書で使用する「ヒト化抗体」とは、レシピエントヒト抗体のCDRがドナー非ヒト抗体由来のCDRによって置換された免疫グロブリン分子を指す。ヒト化抗体はまた、フレームワーク配列内にドナー起源の残基を含み得る。ヒト化抗体はまた、ヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部を含み得る。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、移入されたCDRまたはフレームワーク配列にも見出されない残基を含む場合がある。ヒト化は、「超ヒト化(superhumanizing)」抗体(Tan et al., J. Immunol. 169: 1119, 2002)および「表面再処理(resurfacing)」(例えば、Staelens et al., Mol. Immunol. 43: 1243, 2006; および Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 969, 1994)などの技法を含む、当技術分野で公知の方法(例えば、Jones et al., Nature 321:522-525; 1986; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536, 1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992; 米国特許第4,816,567号)を用いて行うことができる。

【0047】

本発明との関連における「ヒューマニア化」抗体とは、参照抗体の結合特異性を有する操作されたヒト抗体を指す。本用語は、参照抗体に由来する最小配列を含む免疫グロブリン分子を指す。典型的に抗体は、参照抗体の重鎖のCDR3領域による結合特異性決定基(BSD)をコードするDNA配列をヒトV_Hセグメント配列に結合し、参照抗体由来の軽鎖のCDR3 BSDをコードするDNA配列をヒトV_Lセグメント配列に結合することによって「ヒューマニア化」する。ヒューマニア化する方法は、米国特許出願公開第20050255552号および米国特許出願公開第20060134098号に提供されている。

【0048】

本明細書で使用する「ヒト」抗体は、ヒト化抗体およびヒューマニア化抗体、ならびに公知の技法を用いて得られるヒトモノクローナル抗体を包含する。

【0049】

核酸の部分に関して使用する場合の「異種の」という用語は、核酸が、天然では相互にこれと同じ関係で通常見出されない2つまたはそれ以上のサブ配列を含むことを示す。例

10

20

30

40

50

えば、このような核酸は典型的に組換えにより作製され、例えば新たな機能的核酸を創出するように配置された無関係の遺伝子由来の2つまたはそれ以上の配列を有する。同様に、異種タンパク質とは、天然では相互にこれと同じ関係で見出されない2つまたはそれ以上のサブ配列を指す。

【0050】

例えば細胞、または核酸、タンパク質、もしくはベクターに関して使用する場合の「組換え体」という用語は、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが異種核酸もしくは異種タンパク質の導入または天然核酸もしくは天然タンパク質の変更により改変されていること、または細胞がそのように改変された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組換え細胞は天然(非組換え)型の細胞内に見出されない遺伝子を発現するか、または天然遺伝子を発現するがこれが別の方法で異常に発現される、低発現される、もしくは全く発現されない。本明細書における「組換え核酸」という用語は、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いて、一般的に核酸の操作により最初にインビトロで形成された、天然に通常見出されない形態の核酸を意味する。このようにして、異なる配列の機能的な連結が達成される。したがって、通常は結合していないDNA分子を連結することによってインビトロで形成された線状形態の単離核酸または発現ベクターはいずれも、本発明の目的に関して組換え体とみなされる。組換え核酸を作製し、宿主細胞または生物体に再導入すると、これは非組換え的に、すなわちインビトロ操作ではなく宿主細胞のインビボ細胞機構を用いて複製する。しかし、このような核酸は、組換えにより作製されると続いて非組換え的に複製するが、それでもなお本発明の目的に関して組換え体とみなされることが理解される。同様に、「組換えタンパク質」とは、組換え技法を用いて、すなわち上記の組換え核酸の発現を通して作製されたタンパク質である。

【0051】

タンパク質またはペプチドに言及する場合の、抗体に「特異的に(または選択的に)結合する」または「～と特異的に(または選択的に)免疫反応性である」という語句は、細胞抽出物などのタンパク質の不均一な集団における、該タンパク質の存在を決定する結合反応を指す。したがって、指定の免疫測定条件下において、特定の抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10~100倍超、特定のタンパク質配列に結合する。

【0052】

本明細書において使用する「癌治療薬」とは、癌患者に治療有効用量で投与した場合に、疾患および疾患に伴う合併症の症状を治癒するか、または少なくとも部分的に停止させる薬剤を指す。

【0053】

2つまたはそれ以上のポリペプチド(または核酸)配列との関連における「同一の」またはパーセント「同一性」という用語は、以下に記載する初期設定パラメータでBLASTもしくはBLAST 2.0配列比較アルゴリズムを用いて、または手動アライメントおよび目視検査により測定した場合に(例えば、NCBIウェブサイトを参照されたい)、同一であるかまたは特定の割合のアミノ酸残基(またはヌクレオチド)が同一である(すなわち、比較領域または指定領域にわたって最大限の一致を得るために比較およびアライメントした場合の、特定領域にわたる約60%の同一性、好ましくは70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性)2つまたはそれ以上の配列またはサブ配列、例えば抗体配列を指す。そのような配列は、その時「実質的に同一である」と称される。「実質的に同一である」配列には、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列、ならびに天然の、例えば多型または対立遺伝子変種、および人為的変種もまた含まれる。以下に記載するように、好ましいアルゴリズムはギャップ等について説明し得る。好ましくは、タンパク質配列同一性は、少なくとも約25アミノ酸長の領域にわたり、またはより好ましくは50~100アミノ酸長の領域にわたり、またはタンパク質の全長にわたり存在する。

【0054】

本明細書で使用する「比較領域」には、2つの配列を最適にアライメントした後に、同じ数の連続位置の参照配列に対して1つの配列を比較することができる、典型的に20～600、一般的には約50～約200、より一般的には約100～約150からなる群より選択される数の連続位置のうちの1つのセグメントに対する言及が含まれる。比較のための配列のアライメント方法は、当技術分野で周知である。比較のための配列の最適なアライメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所的相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)の類似性検索方法により、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行(Wisconsin Genetics Software Package中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr., Madison, WI)により、または手動アライメントおよび目視検査(例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)を参照されたい)によって行うことができる。

【0055】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの好ましい例には、Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977)、およびAltschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されているBLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムが含まれる。本発明の核酸およびタンパク質のパーセント配列同一性を決定するには、BLASTおよびBLAST 2.0を本明細書に記載されるパラメータで使用する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列用)は、初期設定としてワード長(W) 11、期待値(E) 10、M=5、N=-4、および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列に関して、BLASTPプログラムでは、初期設定としてワード長3、および期待値(E) 10、およびBLOSUM62スコア行列(Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)を参照されたい)アライメント(B) 50、期待値(E) 10、M=5、N=-4、ならびに両鎖の比較を使用する。

【0056】

2つのポリペプチドが実質的に同一であることの指標は、第1ポリペプチドが、第2ポリペプチドに対して産生された抗体と免疫学的に交差反応することである。したがって、例えば2つのペプチドが保存的置換によってのみ異なる場合、ポリペプチドは典型的に第2ポリペプチドと実質的に同一である。

【0057】

「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」という用語は、その天然状態において見出される通常それに付随する成分を実質的にまたは本質的に含まない物質を指す。純度および均一性は典型的に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技法を用いて決定する。調製物中に存在する主な種であるタンパク質は、実質的に精製されている。いくつかの態様における「精製された」という用語は、タンパク質が電気泳動ゲルで本質的に1本のバンドを生じることを表す。好ましくは、これは、タンパク質が少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、最も好ましくは少なくとも99%純粋であることを意味する。

【0058】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。この用語は、天然アミノ酸ポリマー、修飾残基を含むもの、および非天然アミノ酸ポリマーばかりでなく、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的な化学模倣体であるアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0059】

「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、ならびに後に修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、例えば、炭素に水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基が結合してい

る、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。このような類似体は、修飾されたR基(例えば、ノルロイシン)または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然アミノ酸と同じ基本化学構造を保持する。アミノ酸模倣体とは、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様に機能する化合物を指す。

【0060】

アミノ酸は、本明細書中では、IUPAC-IUB生化学命名委員会により推奨されている一般に知られている3文字記号または1文字記号により参照され得る。ヌクレオチドも同様に、一般に是認されている1文字コードにより参照され得る。

【0061】

「保存的修飾変種」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関する保存的修飾変種とは、同一または本質的に同一であるアミノ酸配列をコードする核酸を指すが、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一のまたは関連する配列、例えば天然の連続した配列を指す。遺伝暗号の縮重により、数多くの機能的に同一である核酸が大部分のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによりアラニンが指定されるすべての位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、コドンを記載の対応するコドンの別のものに変更することができる。このような核酸の変化は「サイレント変化」であり、これは保存的修飾変種の1種である。ポリペプチドをコードする本明細書内のすべての核酸配列は、核酸のサイレント変化も表す。当業者は、特定の状況において、核酸内の各コドン(通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUGおよび通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く)を修飾して、機能的に同一である分子を得ることができることを認識するであろう。したがって、多くの場合、発現産物に関して記載された配列では、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変化が暗に意味されるが、実際のプローブ配列に関してはそのようなことはない。

【0062】

アミノ酸配列に関して、コードされる配列内の単一アミノ酸またはほんの小数のアミノ酸を変化、付加、または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失、または付加が、その変化によって化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換を生じる場合に「保存的修飾変種」であることを、当業者は認識するであろう。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野で周知である。このような保存的修飾変種は、本発明の多型変種、種間相同体、および対立遺伝子に付加されるものであり、これらを排除するものではない。典型的な相互の保存的置換：1) アラニン(A)、グリシン(G)；2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4) アルギニン(R)、リジン(K)；5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7) セリン(S)、スレオニン(T)；および8) システイン(C)、メチオニン(M)(例えば、Creighton, Proteins (1984)を参照されたい)。

【0063】

序論

本発明は、固形腫瘍を有する患者に抗EphA3抗体を投与することによって、腫瘍増殖を阻害する方法に関する。本発明は、EphA3が固形腫瘍の血管系の内皮細胞において発現され、EphA3を発現する腫瘍細胞の非存在下でさえ、腫瘍の増殖を阻害するための標的として用いることができるという発見に一部基づく。したがって、本発明において、投与された抗EphA3抗体は腫瘍血管系に結合する。

【0064】

本発明の方法は、EphA3をクラスター化する抗EphA3抗体を投与する段階を含む。いくつかの態様において、そのような抗体はEphA3チロシンキナーゼ活性を活性化する。理論によって縛られることはないが、これは、米国特許出願第20060140957号に記載されているように、細胞骨格の再編成および細胞円形化を引き起こすシグナル伝達をもたらす。

【 0 0 6 5 】

いくつかの態様において、本発明において用いるための抗EphA3抗体は、エフリン、例えばエフリン-A5に対するEphA3の結合を阻止せず、エフリン受容体をクラスター化することができる。いくつかの態様において、抗体は、EphA3に対する結合においてMab 111A4と競合する。このような抗体は、Mab 111A4と同じエピトープに結合する場合が多い。さらなる態様において、抗体は、重鎖定常ドメインが、免疫エフェクター細胞上に存在するFc受容体に結合し得る活性アイソタイプを有する。

【 0 0 6 6 】

本明細書に記載する抗EphA3抗体は、血管系においてEphA3を発現することに加えて、腫瘍細胞の表面上にEphA3を発現する腫瘍を治療するために用いることもできる。

10

【 0 0 6 7 】

抗EphA3抗体

種々の抗EphA3抗体を本発明の方法において用いることができる。このような抗体はEphA3に結合し、この受容体をクラスター化する。いくつかの態様において、抗体はEphA3を活性化する。本発明の抗EphA3抗体は、EphA3タンパク質もしくは断片に対して産生させることができ、または組換えにより作製することもできる。数多くの技法を用いて、抗体結合特異性を決定することができる。例えば、抗体の特異的免疫反応性を決定するために使用できる免疫測定法の形式および条件の記載については、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照されたい。

【 0 0 6 8 】

20

いくつかの態様において、抗EphA3抗体はポリクローナル抗体である。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に公知である(例えば、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory manual* (1988); *Methods in Immunology*)。ポリクローナル抗体は、免疫剤および必要に応じてアジュバントを1回または複数回注射することによって、哺乳動物において産生させることができる。免疫剤には、EphA3受容体タンパク質またはその断片が含まれる。

【 0 0 6 9 】

いくつかの態様において、抗EphA3抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、Kohler & Milstein, *Nature* 256:495 (1975)によって記載されているようなハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法では、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するまたは産生し得るリンパ球を誘発するために、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物に典型的に免疫剤を免疫化する。または、リンパ球をインビトロで免疫化してもよい。

30

【 0 0 7 0 】

ヒトモノクローナル抗体は、ファージディスプレイライブラリー(Hoogenboom & Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991))を含む、当技術分野で公知の種々の技法を用いて作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の調製には、ColeらおよびBoernerらの技法も利用できる(Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77 (1985)、およびBoerner et al., *J. Immunol.* 147(1):86-95 (1991))。同様に、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活化されているトランスジェニック動物、例えばマウスにヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって、ヒト抗体を作製することもできる。抗原投与するとヒト抗体の産生が認められるが、これは、遺伝子再編成、構築、および抗体レパートリーを含め、すべての点でヒトにおいて見られるものとよく似ている。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;第5,661,016号、および以下の科学論文: Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)に記載されている。

40

【 0 0 7 1 】

50

いくつかの態様において、抗EphA3抗体はキメラまたはヒト化モノクローナル抗体である。前記の通り、ヒト化型の抗体は、ヒト抗体のCDRが、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種のCDRによって置換されているキメラ免疫グロブリンである。

【0072】

本発明において使用する抗体は多くの形式であってよい。いくつかの態様において、抗体は、Fc領域、例えばヒトFc領域を含み得る。例えば、このような抗体には、EphA3と結合し、かつ活性アイソタイプを有するIgG抗体が含まれる。いくつかの態様において、抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、または単ドメイン抗体(「dAb」)などの、抗体の活性(すなわち、EphA3をクラスター化し得る)断片または誘導体であってよい。本発明において使用することができる抗体のその他の例示的な態様には、活性化ナノボディまたは活性化ラクダ科動物抗体が含まれる。このような抗体はさらに、当業者に周知の方法によって組換えにより操作することができる。上記の通り、このような抗体は公知の技法を用いて作製することができる。当業者によって理解される通り、いくつかの態様では、抗体が一価であり得る形式、例えばFvまたはFab形式である場合、該抗体は三価または四価抗体などの多価抗体として使用する。例えば、三価Fabを使用することができる。多価抗体を作製する方法は公知である(例えば、King et al., Cancer Res. 54:6176-6185, 1994を参照されたい)。さらに、F(ab')₂断片などの二価断片を使用する場合、このような断片は、細胞の表面上のEphA3受容体をクラスター化し得る形式であり、例えば二価抗体が、T細胞、マクロファージ、好中球、肥満細胞等の免疫エフェクター細胞上に存在するFc受容体に結合し得る活性Fc領域に連結されているなど、エフェクター分子と相互作用し得る領域が保持されている抗体形式である。

【0073】

多くの態様において、本発明において使用するための抗体は、例えば免疫エフェクター細胞上に存在するFc受容体に結合するといったエフェクター機能を有するFc定常領域を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)；食作用；細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御等が含まれる。このようなエフェクター機能は一般に、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、公知のアッセイ法を用いて評価することができる(例えば、以下に引用する参考文献を参照されたい)。

【0074】

理論によって縛られることはないが、例えばFc受容体と結合し得る活性アイソタイプを有する抗EphA3抗体は、インビボでEphA3を発現している内皮細胞の細胞円形化を誘導して、腫瘍血管系の直接的破壊を引き起こすことができる。内皮細胞の円形化は、血管の環状構造の破壊、および腫瘍内の高静水圧による毛細血管の崩壊を引き起こすと考えられている。

【0075】

活性アイソタイプを有し、マクロファージ、単球、好中球、およびNK細胞などのエフェクター細胞上のFc受容体に結合する抗EphA3抗体はまた、抗体媒介性細胞性細胞傷害(ADCC)による腫瘍血管系の破壊を誘導し得る。

【0076】

Fc領域は、天然IgG1、またはIgG3、IgM、IgA、およびIgEを含むその他の活性アイソタイプに由来し得る。「活性アイソタイプ」には、Fc領域が、Fc受容体に対する結合を増大させるため、またはさもなくば抗体の効力を向上させるための修飾を含む抗体が含まれる。このようなFc定常領域は、Fc受容体に対する結合を増大させる変異、そのように増大させるグリコシル化レベルに対する変化等の修飾を含み得る。Fc領域を修飾する多くの方法が当技術分野で公知である。例えば、米国特許出願公開第20060039904号は、1つまたは複数のFcリガンド(例えば、Fc R、C1q)に対する結合親和性の修飾を含む、エフェクター機能が強化されたFc受容体の変種を記載している。さらに、このようなFc変種は、変化した抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)活性を有す

る。その他のFc変種には、Ghetie et al., Nat Biotech. 15:637-40, 1997 ; Duncan et al., Nature 332:563-564, 1988 ; Lund et al., J. Immunol 147:2657-2662, 1991 ; Lund et al., Mol Immunol 29:53-59, 1992 ; Alegre et al., Transplantation 57:1537-1543, 1994 ; Hutchins et al., Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984, 1995 ; Jefferis et al., Immunol Lett. 44:111-117, 1995 ; Lund et al., FASEB J 9:115-119, 1995 ; Jefferis et al., Immunol Lett 54:101-104, 1996 ; Lund et al., J Immunol 157:4963-4969, 1996 ; Armour et al., Eur J Immunol 29:2613-2624, 1999 ; Idusogie et al., J Immunol 164:4178-4184, 2000 ; Reddy et al., J Immunol 164:1925-1933, 2000 ; Xu et al., Cell Immunol 200:16-26, 2000 ; Idusogie et al., J Immunol 166:2571-2575, 2001 ; Shields et al., J Biol Chem 276:6591-6604, 2001 ; Jefferis et al., Immunol Lett 82:57-65, 2002 ; Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002 ; Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010, 2006 ; 米国特許第5,624,821号 ; 第5,885,573号 ; 第5,677,425号 ; 第6,165,745号 ; 第6,277,375号 ; 第5,869,046号 ; 第6,121,022号 ; 第5,624,821号 ; 第5,648,260号 ; 第6,194,551号 ; 第6,737,056号 ; 第6,821,505号 ; 第6,277,375号 ; 第7,335,742号 ; および第7,317,091号 ; ならびにPCT公開WO 94/2935 ; WO 99/58572 ; WO 00/42072 ; WO 02/060919、およびWO 04/029207によって開示されているものが含まれる。

【 0 0 7 7 】

いくつかの態様では、Fc領域のグリコシル化を修飾することができる。例えば、修飾は、例えば抗体配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を変化させることによる非グリコシル化であってよい。このようなアプローチは、米国特許第5,714,350号および第6,350,861号においてさらに詳述されている。また、フコシル残基の量が減少した低フコシル化Fc変種、または二分岐GlcNAc構造が増加したFc変種など、グリコシル化の型が変化したFc領域を作製することもできる。このような糖質修飾は、例えば、グリコシル化機構が変化した宿主細胞内で抗体を発現させることによって達成することができる。酵母および植物を含む、グリコシル化機構が変化した細胞は当技術分野において記載されており、これを宿主細胞として使用し、そこで本発明の組換え抗体を発現させて、グリコシル化が変化した抗体を産生させることができる。グリコシル化を修飾するための技法には、例えば、Uma et al., Nat. Biotechnol 17:176-180, 1999 ; Davies, et al., Biotechnol. Bioeng. 74:288-294, 2001 ; Shields et al., J Biol Chem 277:26733-26740, 2002 ; Shinkawa et al., J Biol Chem 278:3466-3473, 2003 ; Niwa et al. Clin. Cancer Res. 10:6248-6255, 2004 ; Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002 ; Kanda et al., Glycobiology 17:104-118, 2006 ; 米国特許第6,602,684号 ; 第6,946,292号 ; および第7,214,775号 ; 米国特許出願公開第20070248600号 ; 第20070178551号 ; 第20080060092号 ; 第20060253928号 ; PCT公開WO 00/61739 ; WO 01/292246 ; WO 02/31114 ; およびWO 02/30954 ; ならびにPotillegent(商標)技術(Biowa, Inc. ニュージャージー州、プリンストン) ; およびGlycoMAb(商標)グリコシル化操作技術(GLYCART biotechnology AG、スイス、チューリッヒ)に開示されているものが含まれる。

【 0 0 7 8 】

本発明のいくつかの態様では、例えば抗体が反復投与に適するように、抗体をさらに操作して免疫原性を低減させる。免疫原性が低減した抗体を作製する方法には、ヒト化およびヒューマニ化手順、ならびに例えば1つまたは複数のフレームワーク領域において抗体をさら操作して、T細胞エпитープを除去する脱免疫化などの改変技法が含まれる。

【 0 0 7 9 】

いくつかの態様において、抗体はヒューマニ化抗体である。ヒューマニ化抗体は、参照抗体の重鎖のCDR3領域による結合特異性決定基(BSD)をコードするDNA配列をヒトV_Hセグメント配列に結合し、参照抗体由来の軽鎖のCDR3 BSDをコードするDNA配列をヒトV_Lセグメント配列に結合することによって得られる、参照抗体の結合特異性を有する操作されたヒト抗体である。ヒューマニ化の方法は、米国特許出願公開第20050255552号および米国特許出願公開第20060134098号に提供されている。

【 0 0 8 0 】

抗体をさらに脱免疫化して、抗体のV領域から1つまたは複数の予測T細胞エピトープを除去することができる。このような手順は、例えばWO 00/34317に記載されている。

【0081】

いくつかの態様において、可変領域はヒトV遺伝子配列からなる。例えば、可変領域配列は、ヒト生殖系列V遺伝子配列と少なくとも80%の同一性、または少なくとも85%もしくは少なくとも90%の同一性を有し得る。

【0082】

本発明において使用する抗体は、ヒト定常領域を含み得る。軽鎖の定常領域は、ヒトまたは 定常領域であってよい。重鎖定常領域は多くの場合、 鎖定常領域、例えば -1または -3定常領域である。

【0083】

例えば抗体が断片であるいくつかの態様では、例えばインビボでの半減期の延長をもたらすために、ポリエチレングリコール(ペグ化)または血清アルブミンなどの別の分子に抗体を結合させることができる。抗体断片のペグ化の例は、Knight et al., Plateles 15:409, 2004(アブシキシマブについて); Pedley et al., Br. J. Cancer 70:1126, 1994(抗CEA抗体について); およびChapman et al., Nature Biotech. 17:780, 1999に提供されている。

【0084】

抗体特異性

本発明において使用するための抗体はEphA3に結合し、これは典型的にEphA3のクラスター化をもたらす。本発明との使用に適した例示的な抗体は、mAb IIIA4である。この抗体は、天然EphA3球状エフリン結合ドメインに結合する(Smith, et al., J. Biol. Chem. 279:9522-9531, 2004; およびVearing et al., Cancer Res. 65:6745-6754, 2005)。EphA3表面に対する高親和性mAb IIIA4結合は、EphA3とのエフリン-A5相互作用の全体的な親和性にほとんど影響を及ぼさない。

【0085】

いくつかの態様では、EphA3に対する結合においてmAb IIIA4と競合するか、またはmAb IIIA4と同じエピトープと結合するモノクローナル抗体を使用する。いくつかの競合結合アッセイ法のいずれかを用いて、同じ抗原に対する結合における2つの抗体間の競合を測定することができる。例えば、この目的にサンドイッチELISAアッセイ法を用いることができる。例示的なアッセイ法では、ウェルの表面を被覆するために捕獲抗体を使用することによって、ELISAを行う。次に、飽和濃度未満のタグ化抗原を捕獲表面に添加する。このタンパク質は、特異的な抗体:抗原相互作用を介して抗体に結合する。洗浄後、検出可能部分に結合している第2抗体をELISAに添加する。この抗体が捕獲抗体と同じ抗原上の部位に結合するか、またはその部位への結合を妨げるのであれば、この部位はもはや結合に利用できないため、この抗体は標的タンパク質に結合することができない。しかしながら、この第2抗体が抗原上の異なる部位を認識するのであれば、この抗体は結合することができる。結合は、結合している検出可能な標識の量を定量することによって検出することができる。バックグラウンドは、単一の抗体を捕獲抗体および検出抗体の両方として用いることによって規定され、最大シグナルは、抗原特異的抗体で捕獲し、抗原上のタグに対する抗体で検出することによって確立することができる。参照としてバックグラウンドおよび最大シグナルを用いることによって、抗体を対様式で評価して、特異性を決定することができる。特定の抗体が別の抗体と同じエピトープを認識する能力は、典型的にこのような競合アッセイ法によって決定される。

【0086】

上記のアッセイ法のいずれかを用いて、第1抗体の存在下で、抗原に対する第2抗体の結合が少なくとも30%、通常少なくとも約40%、50%、60%、または75%、多くの場合少なくとも約90%減少する場合に、第1抗体は第2抗体の結合を競合的に阻害するとみなされる。

【0087】

結合親和性

いくつかの態様において、本発明との使用に適した抗体は、ヒトEphA3に対して高親和性結合を有する。本発明の目的のため、抗体の解離定数(K_D)が<約10 nM、例えば約5 nM、または約2 nM、または約1 nM、またはそれ未満である場合に、抗体と抗原との間に高親和性結合が存在する。当業者に周知のように、表面プラズモン共鳴アッセイ法、飽和アッセイ法、またはELISAもしくはRIAなどの免疫測定法などの種々の方法を用いて、抗体のその標的抗原に対する結合親和性を決定することができる。結合親和性を決定するための例示的な方法は、Krinner et al., (2007) Mol. Immunol. Feb;44(5):916-25. (Epub 2006 May 11)に記載されているように、CM5センサーチップを使用するBIAcore(商標) 2000装置(Biacore AB、ドイツ、フライブルク)での表面プラズモン共鳴解析によるものである。

【0088】

抗EphA3抗体は、EphA3の任意の領域に結合し得る。多くの場合、抗体はEphA3をクラスター化する。EphA3をクラスター化する抗体は、IgG1、IgG3、IgM、IgA、またはIgEなどの活性ヒトアイソタイプを有する。EphA3をクラスター化する抗体は、架橋またはさもなくば多量体化して多価抗体を形成する単量体の形態を含む多価であってもよく、すなわち本発明との関連においては、3つ以上の抗原結合部位を有し得る。いくつかの態様において、抗EphA3抗体はEphA3を活性化する。

【0089】

いくつかの態様では、本発明において使用する抗体は、EphA3に対する結合においてEphA3リガンドと競合しないが、他の態様では、本発明において使用するためのEphA3抗体は、エフリン、例えばエフリン-A5などのEphA3リガンドのEphA3に対する結合と競合し得る。EphA3に対する結合においてリガンドと競合する抗体は、上記の技法を用いて同定することができ、この場合、競合解析には、もう一方の抗体の代わりにエフリン-A5などのエフリンリガンドを使用する。

【0090】

例示的な態様において、抗EphA3抗体はmAb 111A4の V_L 領域および V_H 領域を含む。他の態様において、抗EphA3抗体はmAb 111A4のCDR1、2、および3を含む。いくつかの態様において、抗EphA3抗体はmAb 111A4のCDR3を含む。表1は、mAb 111A4と同じエピトープに結合する抗体のCDR配列(Kabatの番号付けに従って規定される)を提供する。EphA3抗原に対する親和性はELISAによって決定した。したがって本発明の抗体はまた、表1に示す重鎖および/または軽鎖のCDRを有し得る。

【0091】

(表1)

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	親和性 (nM)
111A4	SYWIN	DIYPGSGNTNYDEKFKR	SGYYEDFDS	2.5
FA3AM-H12A	TYWIS	DIYPGSGNTNYDEKFQG	SGYYEEFDS	3.2
K3D	TYWIS	DIYPGSGNTNYDEKFEG	SGYYEEFDS	25

抗体	CDRL1	CDRL2	CDRL3	親和性 (nM)
111A4	RASQEISGYLG	AASTLDS	VQYANYPYT	2.5
FA3AM-H12A	RASQGIISYLA	AASSLQS	VQYANYPYT	3.2
K3D	RASQGIISYLA	AASSLQS	VQYMNYPYT	25

【0092】

非抗体EphA3結合剤

EphA3に結合し、EphA3受容体を架橋する他のタンパク質を、固形腫瘍を有する患者に投与することもできる。いくつかの態様において、固形腫瘍は、腫瘍細胞の表面上にEphA3を発現しないが、血管系においてEphA3を発現する。このようなタンパク質には、可溶性エフリンA5-Fcタンパク質が含まれる。

【0093】

その他のEphA3結合剤には、EphA3と結合する骨格タンパク質が含まれる。したがって、EphA3結合剤は、抗体と類似の様式で抗原を標的とし、これに結合する「抗体模倣体」であってよい。抗体模倣体を使用する場合、模倣体の形態は、それがEphA3をクラスター化するものである。例えば、抗体模倣体は多価形式で使用する。

【0094】

ある種の抗体模倣体は、抗体の可変領域のための代替タンパク質フレームワークとして、非免疫グロブリンタンパク質骨格を使用する。例えば、Ku et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:6552-6556, 1995)は、シトクロムb562のループのうちの2つを無作為化し、ウシ血清アルブミンに対する結合について選択した、シトクロムb562に基づく抗体の代替物を開示している。個々の変異体は、抗BSA抗体と同様にBSAと選択的に結合することが見出された。

10

【0095】

米国特許第6,818,418号および第7,115,396号は、フィブロネクチンまたはフィブロネクチン様タンパク質骨格および少なくとも1つの可変ループを特色とする抗体模倣体を開示している。Adnectinとして知られるこれらのフィブロネクチンベースの抗体模倣体は、任意の標的化リガンドに対する高い親和性および特異性を含め、天然抗体または改変抗体と同じ特徴の多くを示す。これらのフィブロネクチンベースの抗体模倣体の構造は、IgG重鎖の可変領域の構造と類似している。したがって、これらの模倣体は、天然抗体と性質および親和性が類似している抗原結合特性を示す。さらに、これらのフィブロネクチンベースの抗体模倣体は、抗体および抗体断片を上回るある種の利点を示す。例えば、これらの抗体模倣体は、天然折りたたみの安定性をジスルフィド結合に依存せず、よって通常では抗体を分解する条件下で安定している。加えて、これらのフィブロネクチンベースの抗体模倣体の構造はIgG重鎖の構造と類似しているため、インビボにおける抗体の親和性成熟の過程に類似したループの無作為化およびシャフリングの過程をインビトロで利用することができる。

20

【0096】

Beste et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:1898-1903, 1999)は、リポカリン骨格に基づく抗体模倣体(Anticalin(登録商標))を開示している。リポカリンは、パレルとタンパク質の末端における4つの超可変ループから構成される。ループがランダム突然変異誘発に供され、例えばフルオレセインとの結合について選択された。変種3つがフルオレセインとの特異的結合を示し、変種1つが抗フルオレセイン抗体と類似の結合を示した。さらなる解析から、無作為化の位置はすべて異なることが明らかになり、Anticalin(登録商標)が抗体の代替物として使用するのに適していることが示された。したがって、Anticalin(登録商標)は典型的に160~180残基の小さな一本鎖ペプチドであり、生成コストの削減、貯蔵安定性の増加、および免疫学的反応の低下を含め、抗体を上回るいくつかの利点を提供する。

30

【0097】

米国特許第5,770,380号は、カリックスアレーンの強固な非ペプチド有機骨格を、結合部位として用いる複数の可変ペプチドループと付着させて使用する合成抗体模倣体を開示している。ペプチドループはすべて、互いに、カリックスアレーンの幾何学的に同じ側から突出している。この幾何学的高次構造のために、すべてのループが結合に利用でき、リガンドに対する結合親和性が増加する。しかし、他の抗体模倣体と比較して、カリックスアレーンベースの抗体模倣体は全くペプチドだけからなるわけではなく、したがってプロテアーゼ酵素による攻撃に強い。この骨格は純粋にペプチド、DNA、またはRNAからなるわけではなく、この抗体模倣体が極端な環境条件において比較的安定であり、寿命が長いことを意味している。さらに、カリックスアレーンベースの抗体模倣体は比較的小さいため、免疫原性反応を生じる可能性が低い。

40

【0098】

Murali et al. (Cell Mol Biol 49:209-216, 2003)は、抗体を縮小してより小さなペプチド模倣体にする方法論を記載しており、この模倣体は「抗体様結合ペプチド模倣体」(A

50

BiP)と命名され、これもまた抗体の代替物として有用であり得る。

【0099】

WO 00/60070は、CTL4A様 サンドイッチ構造を有するポリペプチド鎖を開示している。このペプチド骨格は、 スtrandを6つ~9つ含み、ポリペプチド ループのうちの2つまたはそれ以上が、抗原結合断片などの他の分子に対する結合ドメインを構成する。骨格の基本設計はヒト起源のものであり、したがって免疫応答を誘導するリスクが低くなる。

サンドイッチ骨格は、この分子が第2の非免疫グロブリンジスルフィド架橋を含むために、標準的な抗体と比較した場合に、インビボにおいて、向上した安定性および薬物動態学的特性を有し得る。抗原結合ドメインを単一ペプチド鎖の逆末端に位置づけることができるため、 サンドイッチにより二重特異性単量体分子の設計も容易になる。

10

【0100】

非免疫グロブリンタンパク質フレームワークに加えて、RNA分子および非天然オリゴマーを含む化合物においても抗体特性が模倣されている(例えば、プロテアーゼ阻害剤、ベンゾジアゼピン、プリン誘導体、および ターン模倣体)。したがって、非抗体EphA3結合剤にはこのような化合物も含まれ得る。

【0101】

いくつかの態様において、本発明において使用するEphA3結合剤は、EphA3に対する結合においてmAb 111A4と競合する。このような結合剤は、本明細書に記載する例示的な競合アッセイ法などの公知のアッセイ法を用いて同定することができる。

【0102】

抗EphA3結合剤は、それらが内皮細胞の表面上に存在するEphA3受容体を架橋するように、多価形態で使用する。

20

【0103】

腫瘍の治療

本発明の方法は、腫瘍増殖を阻害するために、腫瘍を有する患者に抗EphA3抗体を投与する段階を含む。本明細書に記載する組成物および方法を用いて治療することができる固形腫瘍には、乳房、肺、結腸、胃、肝臓、腎臓、卵巣、および前立腺の固形腫瘍が含まれる。いくつかの態様において、腫瘍は腫瘍細胞においてEphA3を発現しないが、腫瘍血管系においてEphA3を発現する。他の態様において、腫瘍は腫瘍細胞および腫瘍血管系においてEphA3を発現する。本発明に従って治療することができる腫瘍には、乳癌、肺癌、前立腺癌、胃癌、食道癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巣癌、外陰部癌、腎癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮内膜増殖症、子宮内膜症、絨毛癌、頭頸部癌、上咽頭癌、咽頭癌、肝芽腫、カポジ肉腫、黒色腫、皮膚癌、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、脾癌、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、神経膠芽腫、神経鞘腫、乏突起神経膠腫、髄芽腫、神経芽細胞腫、線維肉腫を含む肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、平滑筋肉腫、尿路癌、甲状腺癌、ウィルムス腫瘍、脳腫瘍、腎細胞癌、母斑症状を伴う異常な血管増殖、および浮腫(脳腫瘍を伴うものなど)が含まれる。

30

【0104】

いくつかの態様では、本発明の方法を、腫瘍細胞においてEphA3を発現しない腫瘍の治療に使用する。腫瘍細胞におけるEphA3の発現は、当業者に周知の方法によって決定することができる。多くの場合、発現は、例えば免疫組織化学的解析などの技法において抗体を用いて、発現されたEphA3タンパク質の量を測定することによって評価する。他の態様では、例えば定量的PCRを用いて、mRNAレベルを評価することができる。例えば、発現レベルがバックグラウンド発現の約2倍またはそれ未満である場合のような、ほとんど検出不可能な発現は、腫瘍細胞がEphA3を発現していないことを示す。

40

【0105】

様々な薬物送達系において使用するために、組成物を製剤化することができる。適切な製剤化のために、生理的に許容される1つまたは複数の賦形剤または担体もまた、組成物中に含めることができる。本発明において使用するのに適した製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)

50

に見出される。薬物送達の方法の簡潔な総説については、Langer, Science s249: 1527-1533 (1990)を参照されたい。

【0106】

本発明の方法において使用するための抗EphA3抗体は、注射用滅菌等張水溶液など、患者への注射に適した溶液として提供する。許容される担体に、抗EphA3抗体を適切な濃度で溶解または懸濁する。いくつかの態様において、担体は水性であり、例えば水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水等である。組成物は、pH調製剤および緩衝剤、浸透圧調整剤等のような、おおよそその生理的状态に必要とされる補助的な薬学的物質を含み得る。

【0107】

本発明の薬学的組成物は、疾患または疾患およびその合併症の症状を少なくとも部分的に停止させるのに十分な量で、腫瘍を有する患者に投与する。これを達成するのに適した量を「治療有効用量」と定義する。治療有効用量は、治療に対する患者の反応をモニターすることにより決定する。治療有効用量を示す典型的な基準は、疾患に応じて当技術分野で公知である。例えば、増殖の遅延は、腫瘍サイズの増大がないことによって示され得る。

10

【0108】

抗EphA3抗体の用量は、患者に効果的な治療を提供するように選択され、約0.1 mg/kg体重～約25 mg/kg体重の範囲、または約1 mg～約2 g/患者の範囲である。用量は多くの場合、約0.5 mg/kgもしくは約1 mg/kg～約10 mg/kg、またはおおよそ約50 mg～約1000 mg/患者の範囲である。いくつかの態様において、抗体は、約0.1 mg/kg体重未満の量、例えば約20 mg/患者もしくはそれ未満の量で投与する。用量は、抗体の薬物動態(例えば、循環中の抗体の半減期)および薬力学的反応(例えば、抗体の治療効果の持続)に応じて、1日に1回～3ヵ月ごとに1回の範囲であり得る適切な頻度で繰り返すことができる。インビボ半減期が約7日～約25日である抗体または修飾抗体断片のいくつかの態様では、抗体の投薬を1週間に1回～3ヵ月ごとに1回繰り返す。他の態様では、抗体を1ヵ月に約1回投与する。

20

【0109】

有効な投与量は、年齢、体重、性別、投与経路等の他の要因を含め、疾患の重症度および患者の健康の全般的状態に依存する。患者により必要とされかつ許容される投与量および頻度に応じて、抗EphA3抗体の単回投与または複数回投与を施与することができる。いずれにしても、本方法は、腫瘍を効果的に治療するために十分量の抗EphA3抗体を提供する。

30

【0110】

EphA3の架橋を誘導する抗EphA3抗体またはその他の抗EphA3結合剤は、腫瘍細胞増殖を阻害するための1つまたは複数の付加的な細胞毒性薬と併用することができる。細胞毒性薬とは、細胞増殖を阻害する化合物である。このような化合物は細胞死を引き起こす場合もあれば、または引き起こさない場合もある。抗EphA3結合剤と併用して投与することができる細胞毒性薬には、抗体、例えばHer2/neu抗体、VEGF抗体のような腫瘍血管形成を標的とする他の抗体などの化合物；L-アスパラギナーゼ、インターロイキン、インターフェロン、アロマターゼ阻害剤、抗エストロゲン、抗アンドロゲン、副腎皮質ステロイド、ゴナドレリン作動薬、トポイソメラーゼ1および2阻害剤、微小管活性剤、アルキル化剤、ニトロソ尿素、抗悪性腫瘍性代謝拮抗薬、白金含有化合物、脂質またはプロテインキナーゼ標的薬、プロテインまたは脂質ホスファターゼ標的薬、抗血管新生薬、抗アポトーシス経路阻害剤、アポトーシス経路作動薬、テロメラーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、メタロプロテインナーゼ阻害剤、およびアミノペプチダーゼ阻害剤などの薬剤が含まれる。このような薬剤の例には、これらに限定されないが、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、カルムスチン、エストラムチン、ロムシチン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、ゲニステイン、タキソール、ゲムシタビン、シタラビン、フルダラビン、ブスルファン、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、エピルビシン、エソルビシン、デトルビシン、パクリタキセルおよびドセタキセルなどのタキサン、エトポシド、ビ

40

50

ンブラスチンおよびピンクリスチン、ビノレルビンなどのピンカアルカロイド、アムサクリン、トレチノイン、ダカルバジン(DTIC)、アクチノマイシン、メイタンシノール、リファマイシン、ストレプトバリン、カルミノマイシン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、マイトマイシン、カンプトテシン、ボルテゾミブ、テモゾロミド、コンブレタスタチン、コンブレタスタチンA-2、コンブレタスタチンA-4、カリチアマイシン、ロイプロリド、およびペガスパルガーゼ、フルオロデオキシウリジン、プトラフル(ptorafur)、5'-デオキシフルオロウリジン、カペシタビン、タモキシフェン、トレメフィン(toremefine)、トルムデックス(tolmudex)、チミタック(thymitaq)、フルタミド、フルオキシメステロン、ピカルタミド、フィナステリド、トリオキシフェン、酢酸リユープロエリン(leuproelin)、エストラムスチン、ドロロキシフェン、酢酸メゲステロール、アミノグルテチミド、テストラクトン、マイトマイシンA、B、およびC、ミトラマイシン、アントラマイシン、ポルフィロマイシン、カルボプラチン、オキサリプラチン、テトラプラチン、白金-DAC H、オルマプラチン、サリドマイド、レナリドマイド、テロメスタチン、ポドフィロトキシン、エピポドフィロトキシン、テニポシド、アミノプテリン、メトプテリン、6-メルカプトプリン、チオグアニン、アザツツオプリン(azattuoprine)、アロプリノール、クラドリピン、フルダラビン、ペントスタチン、2-クロロアデノシン、デオキシシチジン、シトシンアラビノシド、シタラビン、アザシチジン、5-アザシトシン、ゲンシタビン(gencitabine)、5-アザシトシン-アラビノシド、ロイロシン、ロイロシジン、ビンデシン、エチレンイミン、ならびにメチルメラミンが含まれる。

10

【0111】

20

例えばEphA3を発現しない固形腫瘍に抗EphA3抗体を投与する場合のいくつかの態様では、細胞毒性癌治療組成物を抗体に結合させることができる。このような細胞毒性薬の例には、放射性金属および毒素が含まれる。

【0112】

いくつかの態様では、抗EphA3結合剤を別の細胞毒性組成物と共に投与するが、この場合、抗EphA3結合剤の投与により、他の細胞毒性化合物の腫瘍内への侵入が促進される。例えば、血管内皮細胞上に存在するEphA3を架橋する抗EphA3抗体は、細胞の円形化、および腫瘍血管系の「漏出性」を引き起こし得る。このような血管系の破壊により、他の薬剤がより容易に腫瘍に透過することが可能となる。したがって、例えば、他の抗体を含むポリペプチド、種々のリポソーム組成物等のような大きな化学療法薬は、内皮細胞の表面上に存在するEphA3受容体を架橋し得る抗EphA3結合剤と併用して投与した場合に、より効果的である。

30

【0113】

いくつかの態様において、付加的な治療薬は、GTPまたはATPによって調節される細胞過程を阻害する薬剤、例えばチューブリン集合阻害剤である。付加的な治療薬は、例えばチューブリン阻害剤であってよい。チューブリン阻害剤の例には、これらに限定されないが、インダノシン、インダンロリン(indanrorine)、ビンシスチン(vincistine)、ピンブラスチン、ビノレロイン(vinoreloine)、コンプレスタチンA、およびコリヒン(colichine)が含まれる。癌治療に通常用いられる他の治療薬もまた、本発明の方法と共に使用することができる。

40

【0114】

これらの付加的な治療薬の1つまたは複数を、併用療法として患者に投与することができる。または、付加的な治療薬で患者を順次治療することもできる。いくつかの態様において、付加的な治療薬は、抗EphA3抗体に結合または連結させることができる。

【0115】

本発明は、EphA3に対する結合においてmAb IIIA4と競合する抗EphA3抗体を投与することによって、腫瘍を有する患者を治療する方法を提供する。いくつかの態様において、抗EphA3抗体は、これらに限定されないが、静脈内、皮下、筋肉内、または腹腔内経路を含む任意の適切な経路を介した注射または注入によって投与する。いくつかの態様では、抗EphA3抗体を注射用生理食塩水溶液に希釈してから、患者に投与する。抗体は、例えば、1

50

5分～2時間という時間をかけて静脈内注入により投与する。さらなる他の態様において、投与手順は、皮下注射、筋肉内注射、または直接腫瘍内注射による。

【0116】

以下の実施例は説明のためのみに提供するものであって、限定のために提供するものではない。当業者は、本質的に同様の結果を得るために変更または修正することができる、重要ではない種々のパラメータを容易に理解するであろう。

【0117】

実施例

実施例1 腫瘍内の内皮細胞におけるEphA3の検出

最近になって、 α -EphA3モノクローナル抗体(mAb) IIIA4の効果的な腫瘍標的特性がインビボで確認された(Vearing, et al., Cancer Res 65:6745-54, 2005)。この抗体を用いた、ヒトの肺腫瘍および脳腫瘍ならびに黒色腫の新鮮凍結切片におけるEphA3の次なる発現解析から、予測された腫瘍細胞の染色に加えて、内皮特異的表面抗原CD31およびCD105についても陽性である腫瘍血管における明確なIIIA4反応性が明らかになった(図1a)。

10

【0118】

他の黒色腫切片のさらに詳しい検査からも、「血管模倣チャネル」を連想させるEphA3陽性構造が示された(Hendrix, et al., Nat Rev Cancer 3:411-21, 2003)。内皮EphA3発現を評価するために、種々の初代のおよび確立されたヒト内皮細胞株をmAb IIIA4でスクリーニングした。腫瘍切片の免疫組織化学的解析と一致して、EphA3はフローサイトメトリおよびウェスタンブロットにより、子宮筋層微小血管内皮細胞(m-MVEC)(Gargett, et al., Hum Reprod 15:293-301, 2000)では検出されたが、成体脳(b-)MVEC(図2)および臍帯静脈内皮細胞(UVEC)(Boyd, et al. J Biol Chem 267:3262-3267, 1992)では検出されず、発現が、新たに発生した微小血管系および腫瘍微小血管系に限定され得ることが示唆された。

20

【0119】

血管発生におけるEphA3の役割はこれまで記載されていなかったため、これは、EphA3が成体の新血管新生、血管模倣(Hendrix, et al., Nat Rev Cancer 3:411-21, 2003; Ogawa, et al. Oncogene 19:6043-6052, 2000; Brantley-Sieders, et al. J Cell Sci 117:2037-49, 2004)、および腫瘍血管系の形成に関与するという最初の指摘である。

【0120】

30

実施例2 正常血管系および腫瘍血管系におけるEphA3発現パターン

腫瘍切片におけるEphA3発現

例証した内皮IIIA4染色パターンの特異性を評価するために、実験設定に抗原競合を含めることによって解析を拡張した。

【0121】

ヒト黒色腫切片を、60倍モル過剰の組換え体、CHO細胞産生可溶性EphA3細胞外ドメインの存在下において、mAb IIIA4で染色した。過剰なEphA3の存在下において、血管構造/血管の強力なIIIA4染色はバックグラウンドレベルまで低下し、EphA3に対するmAb IIIA4染色プロファイルの特異性が確認された(図2a)。

【0122】

40

ヒト微小血管内皮細胞におけるEphA3発現の確認

正常ヒト微小血管内皮細胞(hMVEC、図2を参照されたい)におけるEphA3発現を確認し、微小血管構築におけるEphA3発現の潜在的機能を同定するために、いくつかの戦略を開発して、機能解析において使用するためのEphA3陽性細胞を子宮内膜組織から単離した。

【0123】

ヒト子宮内膜は、筋肉でできた子宮筋層を覆い、厚い血管支質によって支持された多くの管状腺を形成する単層円柱上皮からなる。機能的に、これは2層に細分される：(1) 各月経周期中に剥がれ落ちて再生する一時的組織の厚い表面層である「機能層」、および(2) 機能層の再増殖中に細胞源として働く持続組織である、永久的な間質組織および子宮腺の深端部からなる「基底層」。

50

【0124】

周期の3段階のうちの1つである増殖期では、子宮筋層から生じるらせん状細動脈が、子宮内膜の長さ及び伸長し、その後の分泌期中に生じる子宮内膜の複雑な血管ネットワークを形成する。

【0125】

異なる月経期による全子宮内膜/子宮筋層切片のIHAによる免疫組織化学的染色から、特に、機能層が脱落した後の活発な組織再生の領域である子宮内膜/子宮筋層接合部の、らせん状細動脈の内皮細胞および平滑筋細胞における、分泌期初期の強力なEphA3発現が明らかになった。分泌期初期のこのEphA3発現パターンは、異なる患者に由来する全子宮内膜切片において確認された。平行した試料中に競合阻害剤として過剰なEphA3外ドメインを含めると、染色パターンはバックグラウンドまで消失し、EphA3に対する染色の特異性が確認された。

10

【0126】

実施例3 新鮮なヒト子宮内膜からのEphA3陽性細胞の単離

初期血管の形成に関与するEphA3陽性細胞の供給源として、子宮摘出術を受けた患者から組織試料を得た。「Mylteni」磁気アフィニティービーズ細胞単離システム(MACS)を用いて、子宮内膜および下層の子宮筋層の~1 mmから調製した単一細胞懸濁液から、EphA3発現細胞を単離した。フィブロネクチン被覆スライドガラス上で培養した単離細胞を、ヒツジ-EphA3抗体で免疫細胞化学的に染色したところ、形態が周皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞と似ている細胞におけるEphA3発現が示唆された。

20

【0127】

内皮細胞を同定するためのCD105およびBer-Ep4、平滑筋細胞のための平滑筋アクチン、ならびに間質細胞のためのCD90およびPDGF受容体-(PDGFR-)に対する抗体を使用することにより、一連の分子マーカーを用いて、EphA3⁺細胞のプールにおいてこれらの異なる細胞型を検証した。免疫組織化学的染色から予測される通り、EphA3陽性細胞の単離されたプールは、血管の構築に関与するいくつかの細胞型から構成されている。PDGFR-の存在は、血管周囲の間葉系細胞、周皮細胞、およびSMCにおけるその発現が、剪断応力を含む種々の条件下において、内皮細胞由来PDGFによって上方制御されることが知られているため、興味深い(Risau, Nature 386:671-674, 1997)。組織培養で拡大した後の単離された細胞集団のフローサイトメトリーを用いて、免疫組織化学的検査によって同定した分子マーカーの発現を確認した(図2a)。興味深いことに、この段階では、EphA3の発現はもはや検出されなかった。抗EphA3免疫沈降(IP)/ウェスタンブロット解析による、子宮内膜組織試料に由来する内皮細胞の連続継代物の解析から、EphA3発現が3回の組織培養継代後に消失したことが確認された(図2b)。

30

【0128】

-アクチンmRNAを内部対照ハウスキーピング遺伝子として、およびHEK293T細胞をEphA3発現の陽性対照として用いる、mRNA発現レベルを検出するための定量的リアルタイムPCRによって、異なる組織試料においてEphA3発現をさらに確認した。図3aに示したデータから、異なる試料型における検出可能なEphA3発現が明らかになる。組織切片における見かけ上の一過性発現パターン、および組織培養中のEphA3発現の消失から、発現が細胞集団の局所環境によって調節を受けることが示唆される。

40

【0129】

潜在的誘発因子の1つである低酸素について調べるために、EphA3陽性細胞を、インビトロにおける化学的誘導低酸素の十分に確立された方法であるCoCl₂で処理した。実際に、この処理によりEphA3 mRNAが顕著に増加した(図3b)。

【0130】

実施例4 正常血管系および腫瘍血管系におけるEphA3機能EphA3陽性子宮内膜細胞の機能解析

血管形成時のEphA3の潜在的な細胞位置決め機能を調べるために、Mylteni磁気ビーズを連続して使用して、EphA3陽性および陰性細胞、ならびにCD34陽性および陰性細胞を精製

50

した。生体用色素で精製細胞を標識することにより、インサイチューで増殖因子低減マトリゲルにおいて、血管様構造形成中の細胞の移動および位置をモニターすることが可能になった。蛍光標識した二重陽性または陰性細胞集団を、同じ組織試料による混合されたEphA3陽性または陰性細胞集団に添加することにより、インビトロにおいて、血管構造の形成時のEphA3機能の評価が可能になった。多光子蛍光顕微鏡によって、24時間培養後のマトリゲルブロックを解析したところ、特にEphA3陽性細胞を含む試料において、蛍光細胞によって縁取られた特有の三次元構造が明らかになった。マトリゲルブロックのOTC凍結切片のより詳細な免疫組織化学的解析から、広範に分岐した血管構造の形成にEphA3陽性細胞の存在が必要であることが示唆される。

【0131】

全体としてこの解析から、血管構築過程におけるEphA3の細胞を位置決めする役割の概念が支持され、おそらくこれは、内皮細胞、平滑筋細胞、および血管周囲の間葉系細胞を含む、血管形成に関与する異なる細胞型間の接触の形成を促進するものと思われる。

【0132】

実施例5 腫瘍血管系のEphA3発現およびIIIA4標的化を明らかにする、EphA3陽性異種移植片腫瘍のIIIA4標的化の生体内画像化

上記の実験から示される固形腫瘍の腫瘍血管系におけるEphA3の発現および血管構築におけるEphA3の役割を考慮して、抗新血管新生試薬としてのmAb IIIA4 -EphA3の治療可能性を調べた。これらの研究には、ヌードマウスにおいて血管形成された転移性異種移植片を生じることが知られている22RV1前立腺癌細胞株を使用した。Q-PCR(表示せず)、ウェ

【0133】

さらに、Alexa⁴⁸⁸標識mAb IIIA4およびエフリン-A5 Fcの組み合わせによる刺激により(Vearing, et al., Cancer Res 65:6745-54, 2005)、中程度のEphA3活性化、しかし受容体/アゴニスト複合体の迅速かつ明白な内部移行が生じた(図4b/c)。加えて、予めクラスター化したマウス/ヒトキメラIIIA4もまた、これらの細胞において顕著なEphA3活性化(リン酸化)を誘発したことが確認された。EphA3/HEK293T異種移植片(Vearing, et al., Cancer Res 65:6745-54, 2005)または22RV1異種移植片から調製した切片の、汎特異的ローダミン-RCAレクチン(内皮細胞に結合)(Hunter, et al., Mol Cancer 5:5, 2006)およびAlexa⁴⁸⁸標識マウス/ヒトキメラIIIA4(ch-IIIA4)による同時染色から、内皮細胞の一部におけるEphA3の発現が明らかになった。22RV1腫瘍異種移植片を有するマウスの生体内画像解析を用いて、EphA3陽性の細胞および血管に対するAlexa⁴⁸⁸-IIIA4の結合を可視化した。

【0134】

実質的な数の腫瘍血管を示す抗体結合蛍光から、IIIA4抗体が腫瘍血管を標的とすることが実証された。内皮細胞に結合する汎特異的ローダミン-RCAレクチンまたはイソレクチンIB4-Alexa⁵⁹⁴(Hunter, et al., Mol Cancer 5:5, 2006)で血管系を次に灌流したところ、明確な一部の血管のみがAlexa⁴⁸⁸-IIIA4で標識されたことが確認された。(生体内画像化後の)これらのマウス異種移植片由来の凍結22RV1切片の免疫蛍光解析から、解析した細胞のかなりの割合において、IIIA4染色とRCA-レクチン染色が共局在することが確認された。モノクローナル抗体IIIA4は、比較的不活性な(マウスIgG1)アイソタイプを有する抗体である。

【0135】

対照的に、活性(ヒトIgG1)アイソタイプを有するキメラIIIA4抗体は、マウス血液細胞上およびヒト血液細胞上のFc受容体に結合する。キメラIIIA4をAlexa⁴⁸⁸標識量子ドット(Invitrogen)に結合させ、22RV1腫瘍異種移植片を有するマウスに注射した場合、腫瘍血管系の有意な破壊が認められた。生体内画像化および凍結腫瘍切片の次なる免疫蛍光解析の両方によって、抗体-量子ドット複合体の腫瘍塊への分散が検出されたが、マウスIIIA4との量子ドット複合体は血管内に保持された。

【0136】

10

20

30

40

50

実施例6 インビトロにおけるEphA3のFc受容体媒介性架橋

細胞に結合している抗EphA3抗体を架橋すると、腫瘍新血管系を破壊できる機構である、細胞円形化が生じ得る。

【0137】

インビトロにおいてEphA3媒介性の細胞円形化の条件を確立するために、ヒトLiBR黒色腫細胞(ATCC)を $0.1 \mu\text{g/ml}$ キメラIIIA4で処理し、 CO_2 と共に 37°C で10分間インキュベートした。細胞を洗浄して非結合の抗体を除去し、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ のポリクローナルウサギ抗ヒトIgG抗体を添加して、細胞結合型のcIIIA4の架橋を誘導した。 CO_2 と共に 37°C で30分間インキュベートした後、細胞は、架橋抗体なしでcIIIA4で処理した紡錘形の細胞と比較して円形形態を示した。

【0138】

細胞結合型の抗EphA3抗体の架橋は、EphA3陽性標的細胞を、 $0.05 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ 抗EphA3抗体、およびFc受容体を発現しているヒト末梢血単核細胞(PBMC)と共に培養することによって達成することもできる。この目的のために、ヘパリン処理血液または軟膜(Stanford Blood Center、カリフォルニア州、パロアルト)をカルシウムおよびマグネシウム不含PBSで希釈してから、Ficoll-Paque(GE Healthcare)密度細胞分離材上に重層した。希釈血液試料 35 ml を、 50 ml 遠心管中のFicoll-paque 15 ml 上に注意深く重層した。重層した血液試料を、Allegra 6R遠心機(Beckman Coulter)で、ブレーキをかけずに 2150 RPM で30分間遠心分離した。 10 ml ピペットを用いて、界面で回収したPBMCを別の 50 ml 遠心管に移し、低速(1000 RPM)にてPBSで4回洗浄した。トリパンブルー染色で細胞を計数し、アッセイに使用した。 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベーター中、LiBr腫瘍標的細胞(2×10^4 個/ウェル)を24ウェル組織培養プレート(Costar, Corning Inc.)において培養液中で 37°C で24時間培養し、培地で1度洗浄し、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ の抗EphA3抗体と共に氷上で30分間インキュベートした。細胞を培地で2回洗浄して、非結合抗体および死細胞を除去した。本アッセイにおいて、PBMCを(抗体を架橋するための)エフェクター細胞として使用した。 $1:1$ (エフェクター細胞 $40,000$ 個)または $10:1$ (エフェクター細胞 $400,000$ 個)の割合でエフェクター細胞を標的細胞に添加し、 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベーター中、 37°C で $10 \sim 30$ 分間インキュベートした。顕微鏡下で標的細胞の円形化を評価した。10分間のインキュベーション後に、エフェクター:標的比 $10:1$ の抗EphA3処理細胞において、有意なPBMC依存的な細胞円形化が認められ、30分後には顕著な細胞円形化が認められた。

【0139】

実施例7 腫瘍血管系においてEphA3を発現しているが、腫瘍細胞では発現していないヒト腫瘍異種移植片の増殖の阻害

腫瘍細胞表面上にEphA3を発現しない腫瘍型の例として、ヒト前立腺癌細胞株DU-145(ATCCカタログ番号HTB-81)を選択した。高感度な免疫組織化学的解析から、ヌードマウスにおいて異種移植片腫瘍として増殖したDU-145腫瘍が、腫瘍細胞において検出可能なEphA3抗原を発現しないことが確認された。対照的に、EphA3は、腫瘍塊内の内皮細胞の表面上で検出される。腫瘍血管系に対する抗EphA3抗体の結合が腫瘍の増殖に及ぼす効果をインビボにおいて決定するために、キメラIIIA4抗体を用いてDU-145腫瘍異種移植片を処置した。

【0140】

IIIA4の重鎖V領域のコード配列をヒト $\gamma 1$ 定常領域に融合し、軽鎖V領域コード配列をヒト κ 定常領域配列に融合することによって、キメラIIIA4抗体を作製した。キメラの重鎖および軽鎖を、CHO-S細胞(Invitrogen)においてhCMV-MIEプロモーター-エンハンサーの制御下で発現させ、抗体を、標準的な方法に従ってプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ヒトおよびマウスEphA3に対するcIIIA4抗体の結合を、抗原結合ELISAによって確認した。

【0141】

DU-145細胞を、雄の胸腺欠損ヌード保因マウス(マウス(Mus musculus)株NCR nu/nu; Simonsen Laboratories Inc、カリフォルニア州、ギルロイ)において継代した。次いで、大

10

20

30

40

50

きさ1~5 mm³の腫瘍断片を雄ヌードマウスの上背部に皮下より送達し、腫瘍を形成させた。副尺つきノギスを用いて腫瘍体積を決定し、大きさ40~60 mm³の確立された腫瘍を、試験群に任意に割り当てた(マウス10匹/群)。

【0142】

確立された腫瘍を有するマウスに、キメラIIIA4抗体(10 mg/kg)または媒体対照を、6週間にわたり週に2回腹腔内(i.p.)投与した。試験過程では、ノギスを用いて腫瘍の寸法を週に2回測定し、解剖時には腫瘍重量を記録した。

【0143】

腫瘍増殖速度を図5aに示す。抗EphA3処置動物において、腫瘍増殖の有意な阻害が明白であった。2群間の腫瘍サイズの差は、生存期の11~74日目で統計的に有意であった(スチューデントt検定; $P < 0.05$)。

10

【0144】

個々の動物の解析から、抗体処置動物3匹において完全な腫瘍退縮が起こり、これら3匹の動物では、処置の20日目まで腫瘍が触知できなかったことが示された。これらの腫瘍のうちの2つはその後再増殖したが、1匹の動物は持続的な腫瘍退縮を示し、処置終了後50日目に腫瘍を検出できないままであった。解剖時の組織学的解析から、この動物では検出可能な残存腫瘍は示されなかった。対照的に、媒体対照群の腫瘍はすべて、試験を通して継続した増殖を示した。

【0145】

抗体処置の休止後50日目に切除した腫瘍の平均腫瘍重量を図5bに示す。

20

【0146】

これらの結果から、EphA3に対するキメラIIIA4抗体が、腫瘍血管系においてEphA3を発現している腫瘍の治療に効果的であることが実証される。

【0147】

実施例8 cIIIA4によるEphA3陽性ヒト腫瘍異種移植片の治療

腫瘍細胞表面上にEphA3を発現する腫瘍型の例として、ヒト前立腺癌細胞株LNCaP(ATCCカタログ番号CRL-1740)を選択した。

【0148】

LNCaP細胞を、雄の胸腺欠損ヌード保因マウス(マウス株NCR nu/nu; Simonsen Laboratories Inc、カリフォルニア州、ギルロイ)において継代した。大きさ1~5 mm³の腫瘍断片を雄ヌードマウスの上背部に皮下より送達し、腫瘍を形成させた。大きさ40~60 mm³の確立された腫瘍を有するマウスを試験群に任意に割り当て(マウス10匹/群)、キメラIIIA4抗体(10 mg/kg)または媒体対照を、6週間にわたり週に2回腹腔内(i.p.)投与した。試験過程では、ノギスを用いて腫瘍の寸法を週に2回測定し、解剖時には腫瘍重量を記録した。

30

【0149】

腫瘍増殖速度を図6aに示す。抗EphA3処置動物において、腫瘍増殖の有意な阻害が明白であった。2群間の腫瘍サイズの差は統計的に有意であった(post-hocボンフェローニ検定を用いた反復測定ANOVA)。

【0150】

個々の動物の解析から、抗体処置動物2匹において完全な腫瘍退縮が起こり、これらの動物では、処置の25日目まで腫瘍が触知できなかったことが示された。これら2匹の動物では長期の腫瘍根絶が認められ、処置終了後25日目に腫瘍は検出できないままであった。組織病理診断から、これら2匹の動物では、試験終了時に検出可能な腫瘍が残存していないことが示された。対照的に、媒体対照群の腫瘍はすべて、試験を通して継続した増殖を示した。

40

【0151】

抗体処置の休止後25日目に切除した腫瘍の平均腫瘍重量を図6bに示す。

【0152】

これらの結果から、EphA3に対するキメラIIIA4抗体が、腫瘍細胞および腫瘍血管系においてEphA3を発現している腫瘍の治療に効果的であることが実証された。

50

【 0 1 5 3 】

実施例9. ヒト腫瘍試料におけるEphA3の評価

一連のヒト腫瘍試料において、mAb 111A4を用いて免疫組織化学的検査を行った。8 μ g/mlの抗EphA3抗体を腫瘍試料の凍結切片と共に室温で90分間インキュベートし、結合をVectastain免疫組織化学キットにより明らかにした。表2に示す通り、いくつかの腫瘍型の腫瘍血管系において、実質的なEphA3発現が検出された。

【 0 1 5 4 】

(表2) 腫瘍血管系におけるEphA3の発現

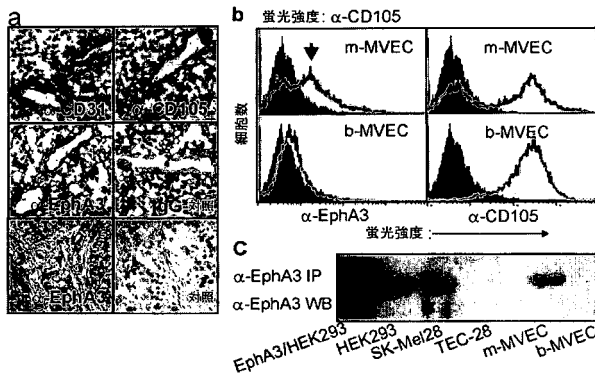
腫瘍	血管染色	陽性試料
腎細胞癌	++	5/5
肺線癌	++	4/5
黒色腫	+++	14/15
多形神経膠芽腫	+++	4/6
胸部：浸潤性乳管癌	+ / ++	5/6

10

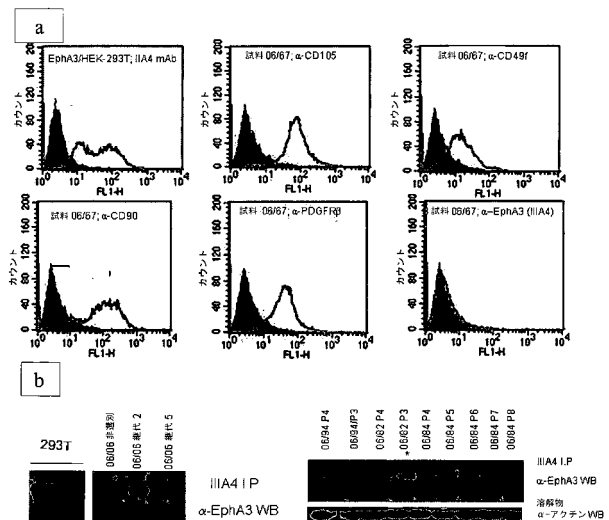
【 0 1 5 5 】

本明細書において引用した出版物、特許出願、アクセッション番号、およびその他の参考文献はすべて、個々の出版物または特許出願が詳細にかつ個別に参照により組み入れられることが示されるがごとく、参照により本明細書に組み入れられる。

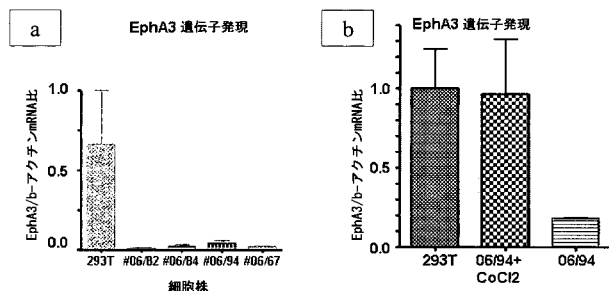
【 図 1 】



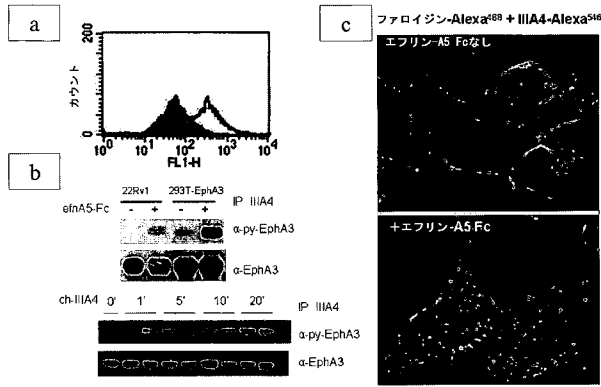
【 図 2 】



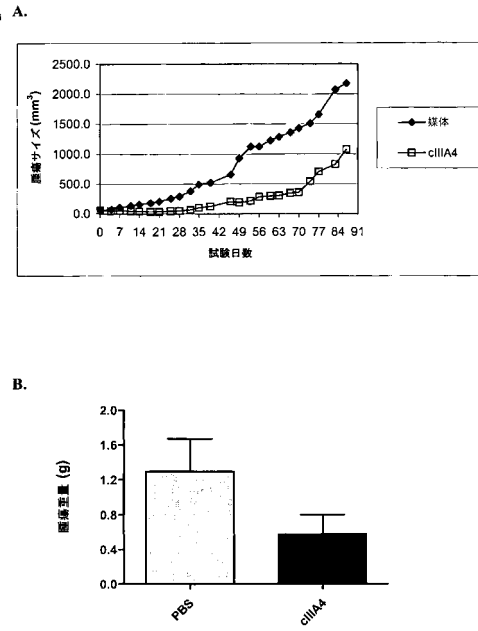
【 図 3 】



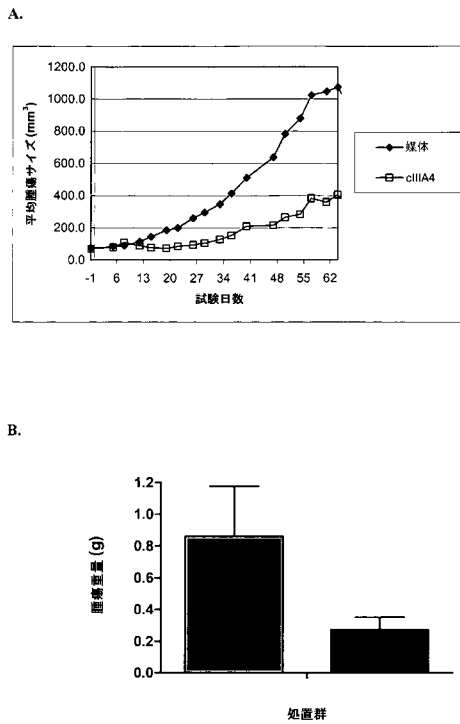
【図 4】



【図 5】



【図 6】



 フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100130845
弁理士 渡邊 伸一
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (73)特許権者 304044531
モナシュ ユニバーシティ
オーストラリア国 ビクトリア クレイトン ウェーリントン ロード
- (73)特許権者 513152104
ラディック インスティテュート フォー キャンサー リサーチ リミテッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニューヨーク サード アベニュー 6 6 6 2 8 階
- (74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
- (72)発明者 ラックマン マルティン
オーストラリア連邦 ビクトリア州 セイント アンドリュース ビーチ パンヤン ストリート
9
- (72)発明者 スコット アンドリュー マーク
オーストラリア連邦 ビクトリア州 キュー イースト ムンロ ストリート 3 7
- (72)発明者 ベッピングトン クリストファー アール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン マテオ アヴィラ ロード 1 3 2
- (72)発明者 ヤーラントン ジェフリー ティー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パーリンガム パルボア アベニュー 1 1 4 8
- (72)発明者 トー キャサリン
オーストラリア連邦 ビクトリア州 ベイズウォーター ノース グリーンヒル ロード 6 6 エ
イ
- (72)発明者 ムローン カメリナ
オーストラリア連邦 ビクトリア州 キングスビル チャーンサイド ストリート 1 0 3

審査官 関 景輔

- (56)参考文献 VEARING,C. et al , Concurrent binding of anti-EphA3 antibody and ephrin-A5 amplifies Ep
hA3 signaling and downstream responses: Potential as EphA3-specific tumor-targeting re
agents , CANCER RESEARCH , 2 0 0 5 年 , Vol.65, No.15 , p.6745-6754
LACKMANN,M. et al , Expression and function in modulating tumor cell-cell contacts iden
tifies EphA3 as candidate cell-surface receptor for tumor targeting strategies , PROCEE
DINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING , 2 0 0 4 年 , Vol.
45 , p.1015

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)