

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5349320号
(P5349320)

(45) 発行日 平成25年11月20日(2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月30日(2013.8.30)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 39/395	(2006.01)
A 61 K 31/675	(2006.01)
A 61 K 31/704	(2006.01)
A 61 P 35/00	(2006.01)
A 61 P 43/00	(2006.01)
A 61 K	39/395
A 61 K	31/675
A 61 K	31/704
A 61 P	35/00
A 61 P	43/00

請求項の数 8 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-535610 (P2009-535610)
(86) (22) 出願日	平成19年11月2日 (2007.11.2)
(65) 公表番号	特表2010-508369 (P2010-508369A)
(43) 公表日	平成22年3月18日 (2010.3.18)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2007/009533
(87) 國際公開番号	W02008/052798
(87) 國際公開日	平成20年5月8日 (2008.5.8)
審査請求日	平成22年11月1日 (2010.11.1)
(31) 優先権主張番号	06022946.5
(32) 優先日	平成18年11月3日 (2006.11.3)
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者	390040420 マックス-プランク-ゲゼルシャフト・ツ ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ ヤフテン・エー・ファオ Max-Planck-Gesellsc haft zur Foerderung der Wissenschaften e. V. ドイツ80539ミュンヘン、ホーフガル テンシュトラーゼ8番
(74) 代理人	100114890 弁理士 アインゼル・フェリックス=ライ ンハルト
(74) 代理人	100099483 弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F G F R 4 は化学療法薬剤に対する応答において癌細胞の抵抗性を促進する

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

過剰増殖疾病の予防、緩和又は/及び治療のための医薬品の製造のための、F G F R 4 阻害剤の、ドキソルビシン又はシクロホスファミドと組み合わせた使用であって、前記 F G F R 4 阻害剤が少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する F G F R 4 抗体（断片）である、使用。

【請求項 2】

過剰増殖疾病が、癌、例えば腎臓、膀胱、脳、食道、胃、脾臓、小腸、結腸、胸、肺、肝臓、脾臓、甲状腺、下垂体、副腎、卵巣、頸部、精巣、前立腺の癌、グリオーマ、メラノーマ、又は/及び白血病から選択される、請求項 1 記載の使用。

10

【請求項 3】

過剰増殖疾病が、少なくとも部分的に治療抵抗性である、請求項 1 又は 2 記載の使用。

【請求項 4】

過剰増殖疾病に対するドキソルビシン又はシクロホスファミドの効力を増加させるための医薬品の製造のための F G F R 4 阻害剤の使用であって、前記 F G F R 4 阻害剤が少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する F G F R 4 抗体（断片）である、使用。

【請求項 5】

過剰増殖疾病的ドキソルビシン又はシクロホスファミドに対する感受性を増加させるための医薬品の製造のための F G F R 4 阻害剤の使用であって、前記 F G F R 4 阻害剤は、少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する F G F R 4 抗体（断片）である、使用。

20

【請求項 6】

活性成分として、

(a) F G F R 4 阻害剤、及び

(b) ドキソルビシン又はシクロホスファミド、

を、場合により、医薬的に許容可能なキャリヤー、希釈剤又は / 及び助剤と一緒に含有し、前記 F G F R 4 阻害剤は、少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する F G F R 4 抗体（断片）である、医薬組成物又はキット。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する F G F R 4 抗体（断片）である F G F R 4 阻害剤を使用する、ドキソルビシン又はシクロホスファミドで処理した癌細胞のアポトーシス感受性を増加させるための *in vitro* 方法。 10

【請求項 8】

少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有する F G F R 4 抗体（断片）である F G F R 4 阻害剤からなる、ドキソルビシン又はシクロホスファミドで処理した癌細胞のアポトーシス感受性を増加させるための剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****発明の詳細な説明**

本発明は、過剰増殖疾病、例えば癌、例えば化学療法抵抗性の癌の予防、緩和又は / 及び治療のための、治療的手段又は / 及び剤との共投与のための纖維芽細胞増殖因子受容体 4 (F G R F 4) 阻害剤に関する。更に、本発明は、診断的手段に関し、その際、 F G F R 4 遺伝子の発現状態又は / 及び多形が、過剰増殖疾病、例えば癌に苦しむ患者において決定される。この決定の結果に基づいて、そして治療すべき疾病の状態に基づいて、治療的なプロトコルが開発されてよい。本発明のまた別の主題は、スクリーニング方法である。 20

【0002】

WO 99/37299は、 F G F R 突然変異体により引き起こされる F G F R 機能亢進に関連した疾病、特に癌の治療及び / 又は予防のための F G F R 4 阻害剤の使用を開示する。 F G F R 4 阻害の治療的な効果は、 F G F R 4 - A r g 3 8 8 変異体の増加した活性により引き起こされる腫瘍細胞の移入及び侵入の阻害に基づく。この文献の内容は、参照により本願に取り込まれる。 30

【0003】

WO 03/063893は、過剰増殖疾病的診断、予防及び / 又は治療のための F G F R 4 アゴニストの使用を開示する。 F G F R 4 活性化の治療的な作用は、 F G F R 4 - G l y 3 8 8 変異体の減少した活性により引き起こされる腫瘍細胞の移入及び侵入の阻害に基づく。この文献の内容は、参照により本願に取り込まれる。

【0004】

現在の癌療法の深刻な問題は、癌細胞の 1 種以上の抗ガン剤に対する固有の又は獲得された抵抗性にある（多剤抵抗性、 M D R ）。例えば、分裂する癌細胞は、抵抗性のあるクローンの選択により、特定の抗ガン治療の阻害性の作用に対して抵抗するための能力を獲得してよい。薬剤耐性、多剤耐性、又は / 及び放射線に対する耐性の開発を抑制するための技術水準の戦略は、高用量での化学療法剤又は / 及び放射線の初期投与である。しかしながら、このような高用量治療方式は、深刻な副作用により妨げられ、これはしばしば投与すべき用量を制限する。従って、外科手術によってはアクセスできない癌細胞、特に転移性細胞の完全な撲滅は、達成されることがない。 40

【0005】

本発明の文脈において、 F G F R 4 は意外にも、アポトーシスに対する癌細胞の抵抗性を増加させることにより化学療法剤での治療下で癌細胞の癌細胞生存を促進することが見出された。この作用は、移入 / 侵入の促進からは区別されることができる。アポトーシス 50

シグナルの誘導は、MAPキナーゼカスケードを介して生じ、その一方で移入／侵入シグナルの誘導は、異なる経路を介して生じる。

【0006】

この知見に基づき、FGFR4阻害剤が、癌細胞中でアポトーシス感受性を増加させることができることが実証されたことができた。従って、FGFR4阻害剤が、抗ガン剤又は／及び放射線の治療的効力を促進することができる結論付けられる。従って、抗ガン剤又は／及び放射線の用量は、単独で投与されるよりもむしろFGFR4阻害剤と組み合わせて投与される場合に、特定の治療的効果を達成すべく減少されることがある。抗ガン剤と一緒でのFGFR4阻害剤の共投与は、高用量の治療方式（例えば第1ライン治療）において特に有利であり、とりわけ、この抗ガン剤又は／及び放射線の用量が、不所望な副作用のために制限されるべきである場合である。

10

【0007】

更に、FGFR4発現状態の決定又は／及びFGFR4遺伝子の多形、特に388位での多形の決定は、癌及び他の過剰増殖疾病的治療のための改善された戦略を生じる可能性があることが結論付けられる。

【0008】

本発明の第1の観点は、過剰増殖疾病的予防、緩和又は／及び治療のための医薬品の製造のための、FGFR4阻害剤の、更なる治療的手段又は／及び更なる治療剤と組み合わせた使用に関する。有利には、更なる治療的手段又は／及び剤が、アポトーシス誘発性治療的手段又は／及び剤である。

20

【0009】

「過剰増殖疾病」又は「過剰増殖疾患」は、本願明細書で使用される場合には、任意の新形成、即ち、動物中の組織の任意の異常な新規の成長を含み、これは、成長制御の機能不全又は／及び損失に依存して良い。過剰増殖疾病は、腫瘍疾病及び／又は癌、例えば充実性腫瘍、例えば、癌腫、腺腫及び肉腫又は非充実性腫瘍、例えば白血病を含む。この過剰増殖疾患は、FGFR4過剰発現、即ち、通常組織と比較した増加したFGFR4発現により有利には特徴付けられる。

【0010】

本発明においては、過剰増殖疾病は、有利には、癌、より有利には腎臓、膀胱、脳、食道、胃、肺臓、小腸、結腸、胸、肺、肝臓、脾臓、甲状腺、下垂体、副腎、卵巣、頸部、精巣の癌、前立腺癌、グリオーマ、メラノーマ、又は／及び白血病から選択される過剰増殖疾病である。

30

【0011】

有利な一実施態様において、癌は非転移性癌であり、特に、FGFR4-388Glyアレル又は／及びFGFR4-388Argアレルを有する患者における非転移性癌である。更なる一実施態様において、癌は、転移性癌、特にFGFR4-388Argアレルを有する患者における転移性癌である。

【0012】

非転移性癌の場合には、本発明は、充実性の又は非充実性の癌のアポトーシス感受性を増加させ、かつこのようにして、投与された抗ガン剤及び／又は放射線の効力を増加させることに適する。

40

【0013】

転移性癌の場合には、本発明は、有利には上記で定義されたとおりの過剰増殖疾病における、転移、転移形成又は／及び転移進行、特にマイクロ転移の治療のために適する。転移、特にマイクロ転移は、しばしば外科手術によってはアクセスされることができず、かつ、薬理学的又は／及び放射線治療を必要とする。FGFR4阻害剤との共投与が、抗ガン剤又は／及び放射線の用量の効力を増加させるとの事実は、成功した撲滅又は転移の機会を増加させる。

【0014】

本発明の有利な一実施態様において、過剰増殖疾患は、少なくとも部分的に治療抵抗性

50

の過剰増殖疾患である。より有利には、過剰増殖疾患は、少なくとも部分的に、アポトーシス誘発性治療手段又は／及び薬剤に対して抵抗性である。

【0015】

「治療抵抗性」とは、本発明の意味合いにおいて、過剰増殖性細胞／癌細胞中での、細胞増殖を抑制又は減少又は／及び細胞死を誘導するための、過剰増殖性細胞／癌細胞の治療に対する応答の不能性、即ち、療法的処理の不能性を含む。

【0016】

治療抵抗性の深刻な形態は、本願明細書においては、多剤抵抗性においても含まれ、これは、上記したとおりである。「治療抵抗性」は、また、単独療法、特に、細胞分裂抑制性、細胞毒性又は／及び化学療法剤、例えば、アポトーシス誘導剤又は放射線療法を用いた単独療法に対する過剰増殖疾病的抵抗性をも含む。「治療抵抗性」とは、また、細胞分裂抑制性、細胞毒性及び化学療法剤及び放射線から選択された少なくとも2種の組み合わせ治療に対する抵抗性も含む。

10

【0017】

「少なくとも部分的に治療抵抗性」とは、本願明細書において使用される場合には、特定の治療方式に対する過剰増殖細胞／癌細胞の減少されたか又は抑制された応答性を含み、その一方で、この細胞は、他の治療に対するこの完全な応答性を維持していく良い。このような特定の治療方式は、第1の抗ガン剤での治療であってよく、かつ、この過剰増殖性細胞／癌細胞は、「少なくとも部分的に治療抵抗性」であると考慮され、この特定の薬剤治療に対して減少したか又は抑制した応答性を有し、その一方で、過剰増殖性細胞／癌細胞は、まだなお、他の治療方式、例えば、第2の抗ガン剤を用いた治療での治療方式に対して応答する。治療抵抗性は、時間と共に増加していく。従って、「少なくとも部分的に治療抵抗性」とは、本願明細書中で使用される場合には、抗ガン剤治療方式に対する完全な応答性からこの治療に対する完全な抵抗性への、治療抵抗性の一時的な発達をも含む。

20

【0018】

F G F R 4 阻害剤と組み合わせるべき本発明の治療的手段は、任意の適した治療的手段を含み、これは、過剰増殖性疾病の予防、緩和又は／及び治療に適していて、特に、過剰増殖性細胞／癌細胞におけるアポトーシスの誘導に適している。従って、この治療的手段は、過剰増殖性疾病の予防、緩和又は／及び治療のための剤（抗ガン剤、特に、アポトーシス誘導剤）又は／及び放射線を用いた治療を含む。有利な一実施態様において、過剰増殖性疾病の予防、緩和又は／及び治療のための治療的手段は、放射線療法、より有利には、ガンマ線照射療法である。放射線治療方式は、当業者に知られている。この癌治療の技術水準の用量は、F G F R 4 阻害剤の投与と組み合わせられた場合には、減少されてよい。

30

【0019】

本発明のF G F R 4 阻害剤と組み合わせられるべき過剰増殖性疾病の予防、緩和又は／及び治療のための剤は、細胞増殖抑制性、細胞毒性又は／及び化学療法剤、医薬的許容な塩及びその誘導体、及びその組み合わせから選択される。有利には、この剤は、ドキソルビンシン、タキサン、例えばパクリタキセル又はドセラキセル、白金化合物、例えばシスプラチニン、トランスプラチニン又はオキサリプラチニン、ヌクレオシド類似体、例えば5-フルオロウラシル、又はフルオダラ、マイトマイシンD1、エトポシド、シクロホスファミド、トポイソメラーゼ阻害剤、例えばカンプトテシン、トポテカン又はイリノテカン、タンパク質、例えば抗腫瘍抗体、医薬的に許容可能な塩、及びその誘導体、及びその組み合わせから選択される。この組み合わせは、過剰増殖性疾病の予防、緩和又は／及び治療のための上記で定義された剤から選択された2種以上の活性成分を含む。

40

【0020】

本願明細書において使用される場合の共投与（組み合わせ治療又は組み合わせ療法とも呼ばれる）は、本発明のF G F R 4 阻害剤及び過剰増殖疾病的予防、緩和又は／及び治療のための治療的手段又は／及び剤、有利にはアポトーシス誘発性治療的手段又は／及びア

50

ポトーシス誘発性剤の投与を含み、この結果、これらは同じ時間に活性がある。

【0021】

共投与は、FGFR4阻害剤及び過剰増殖疾病的予防、緩和又は/及び治療のための剤の、単独組成物の形態での又は別個の組成物の形態での投与を含み、その際、有利には少なくとも2種の別個の組成物、より有利には2種の別個の組成物である。共投与は、治療的手段又は/及び過剰増殖疾病的予防、緩和又は/及び治療のための剤及びFGFR4阻害剤の同時(即ち、同じ時間での)又は逐次的な、即ち、間隔をおいた投与を含む。

【0022】

「間隔をおいた」共投与は、治療的手段及び/又は過剰増殖疾病的予防、緩和又は/及び治療のための剤と、FGFR4阻害剤との、最大で1時間、最大で6時間、最大で12時間、最大で1日間又は最大で1ヶ月間の間隔内での投与を含む。間隔をおいての共投与はまた、1日毎の、週毎の又は月毎のベースでの同じ又は異なるスケジュールを用いた治療的手段又は/及び剤とFGFR4阻害剤の投与を含み、これはまた、剤及びFGFR4阻害剤の投与形態にも依存し、これは同じか又は異なっていてよく、例えば、迅速放出投与形態、制御された放出投与形態及び/又はデポー形態であってよい。例えば、共投与は、上記で定義したとおりのアポトーシス誘発剤又は/及び放射線治療及びFGFR4阻害剤の投与のための異なるスケジュールを含む。

【0023】

本発明は、癌細胞中でFGFR4過剰発現が、通常のFGFR4発現を示す細胞と比較して、アポトーシス誘発に対する、例えば化学治療剤、例えばドキソルビシンに対する又は放射線による増加した抵抗性を媒介できることを実証する。この知見に基づき、FGFR4阻害が、癌細胞のアポトーシス誘発に対する感受性を増加させることが実証される。更なる知見は、FGFR4が、有利に、Bc1X_Lの発現及び/又は活性及びMAPキナーゼ、特にErk1及びErk2の発現を制御することである。

【0024】

理論に拘束されることを望むこと無しに、本発明のデータは、癌細胞中での薬剤/多剤抵抗性の1つの可能性のある機構は、FGFR4過剰発現であり、これによりシグナルカスケードが生じ、Bc1X_L及びMAPキナーゼ、例えばErk1及びErk2の過剰発現及び/又は増加した活性を生じる。従って、本発明の別の実施態様において、本発明のこの過剰増殖性疾患は、FGFR4過剰発現及びこれにより生じるシグナルカスケードに関連している。

【0025】

本発明の更なる観点は、FGFR4阻害剤の、過剰増殖疾病的に対する治療又は/及び剤、特にアポトーシス誘導療法又は/及び剤の効力を増加させるための医薬品の製造のための使用に関する。

【0026】

また更なる一観点は、過剰増殖疾病的放射又は/及び医薬品治療に対する感受性を増加させるための医薬品の製造のためのFGFR4阻害剤の使用に関する。

【0027】

本発明のまた別の実施態様においては、FGFR4阻害は特異的な阻害である。「特異的阻害」は、FGFR4活性の選択的阻害である。FGFR4の特異的な阻害において、他の細胞構成成分の活性、特にレセプター(例えばFGFR1、FGFR2又は/及びFGFR3)の活性は、顕著に阻害されず、即ち、FGFR4の特異的な阻害剤の他の細胞構成成分に対するIC₅₀値は、FGFR4に対するIC₅₀に比較して少なくとも10倍、有利には100倍、より有利には1000倍以上より大きい。本発明はまた、FGFR4の非特異的阻害をも参照する。

【0028】

本発明のFGFR4阻害は、有利には、FGFR4の細胞外ドメインに対する分子結合である。

【0029】

10

20

30

40

50

本発明の F G F R 4 阻害剤は、直接的な阻害剤又は非直接的な阻害剤であってよい。 F G F R 4 の直接的な阻害剤は、直接的に F G F R 4 、 F G F R 4 転写産物又は / 及び F G F R 4 遺伝子を阻害し、これにより、 F G F R 4 活性を減少させる。

【 0 0 3 0 】

F G F R 4 の非直接的な阻害剤は、上記のように直接的に F G F R 4 を阻害せず、しかしながら、 F G F R 4 と相互作用するターゲット、例えば F G F R 4 リガンド、例えば F G F 1 、 - 2 、 - 4 、 - 6 、 - 8 、 - 1 6 、 - 1 7 、 - 1 8 又は - 1 9 上で、下流のターゲット、例えば B c 1 X L 、又は、 M A P キナーゼカスケード中のタンパク質、例えば E r k 1 又は / 及び E r k 2 上で阻害する。更に、 F G F R 4 の非直接的な阻害は、転写又は翻訳上の阻害剤又は輸送経路又は脂質ラフトの阻害剤により実施されてよい。

10

【 0 0 3 1 】

本願明細書において使用する場合の「 F G F R 4 活性」は、生理学的な又は病理学的な作用、特にアポトーシスに対する細胞の抵抗性を生じるための F G F R 4 ポリペプチドの能力を含む。

【 0 0 3 2 】

本発明において、 F G F R 4 の活性は、核酸レベル、例えば、遺伝子レベル又は転写レベルで阻害されてよい。遺伝子レベルでの阻害は、部分的な又は完全な遺伝子不活性化、例えば遺伝子破断による遺伝子不活性化を含んでよい。阻害はまた、転写レベルで生じてよく、例えば、 F G F R 4 m R N A 、 F G F R 4 リガンド m R N A 又は / 及び下流のターゲットの m R N A に対して指向されていてよいアンチセンス分子、リボザイム、 s i R N A 分子の投与により生じてよい。適したアンチセンス分子は、 D N A 分子、 R N A 分子及び核酸アナログから選択されてよい。リボザイムは、 R N A 分子及び核酸アナログから選択されてよい。 R N A 干渉できる二重鎖 R N A 小分子 (s i R N A) は、 R N A 分子及び核酸アナログから選択されてよい。有利な二重鎖 s i R N A 分子は、 1 9 ~ 2 5 ヌクレオチド及び場合により少なくとも 1 つの 3 オーバーハンギの長さの鎖を有する。適した s i R N A 分子は、例えば、 Elbashir et al. (Nature 411 (2001) , 494-498) , Elbashir et al. (Genes & Dev. 15 (2001) , 188-200) 又は Elbashir et al. (EMBO J. 20 (2001) , 6877-6898) により得られてよい。この文献の内容は、参照により本願に取り込まれる。

20

【 0 0 3 3 】

更に、 F G F R 4 活性は、タンパク質レベルで阻害されてよく、例えば、特異的な F G F R 4 阻害を生じる化合物の投与により阻害されてよい。タンパク質レベルでのこの阻害は、例えば抗体又は抗体断片の適用を含んでよい。特に、これらの抗体又は抗体断片は、 F G F R 4 に対して指向されていて、有利には、 F G F R 4 の細胞外ドメイン又は F G F R 4 リガンド又は / 及び下流のターゲットに対して指向されている。この抗体は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体、組み換え抗体、例えば一重鎖抗体又はこのような抗体の断片であって、少なくとも 1 つの抗原結合部位を含有するもの、例えば、タンパク質加水分解抗体断片、例えば F a b 、 F a b 又は F (a b) 2 断片又は組み換え抗体断片、例えば s c F v 断片であってよい。治療上の目的のために、特に、ヒトの治療のために、キメラ抗体、ヒト化した抗体又はヒトの抗体の投与が特に有利である。

30

【 0 0 3 4 】

更に、溶解性 F G F R 4 レセプター、例えばレセプター断片であって膜アンカードメインのないもの、アンタゴニスト性 F G F R 4 リガンド突然変異タンパク質、例えば、 F G F 1 、 F G F 2 、 F G F 4 、 F G F 6 、 F G F 8 、 F G F 9 、 F G F 1 6 、 F G F 1 7 、 F G F 1 8 又は F G F 1 9 の突然変異タンパク質、ペプチド又は低分子量 F G F R 4 阻害剤は本発明において使用されてよい。 F G F R 4 の低分子量阻害剤の例は、インドリノン (Mohammadi et al. (1997) , Science 276:955-960) , SU5402, SU4984, 及び PD17304 (Koziczak et al. (2004) , Biol. Chem. 279 , 50004-50011) である。

40

【 0 0 3 5 】

F G F R 4 m R N A と相互作用し、これにより F G F R 4 活性をノックダウンできる適した s i R N A 分子の例は、第 1 表に示されている。この表中には、 s i R N A 分子のセ

50

ンス鎖及び F G F R 4 m R N A 上のこのそれぞれの開始ヌクレオチドの位置 ((N C B I L 038 40) が、示されていることに留意すべきである。

第 1 表 :

【表 1】

	位置	
aagagcaggagctgacagtag	292	(siRNA 66)
cagtgcgtcgaccctgatagca	2650	(siRNA 74)
aactacctgctagatgtgctg	876	(siRNA 70)
		10
caggctcttccggcaagtcaa	1435	

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、上記した少なくとも 2 種の F G F R 4 阻害剤の投与を含み、特に 2 種、 3 種、 4 種又は 5 種の F G F R 4 阻害剤である。

【 0 0 3 7 】

更なる F G F R 4 阻害剤は、詳細に以下に概要が示されるとおりスクリーニング手順により同定されてよい。

【 0 0 3 8 】

本発明のまた別の観点は、
(a) 上記したとおりの F G F R 4 阻害剤、及び
(b) 過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための剤であって、(a) とは異なる剤、
を、場合により、医薬的に許容可能なキャリアー、希釈剤又は / 及び助剤と一緒に含有する、医薬組成物又はキットである。

【 0 0 3 9 】

有利には、本発明のキットの医薬組成物中においては、過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための剤は、アポトーシス誘発剤、例えば上記したとおりの化学療法剤である。

【 0 0 4 0 】

本発明における使用のために適した医薬組成物又はキットは、活性成分が、意図される目的の達成のために有効な量で含有されている組成物又はキットを含む。治療的に有効な量は、上記したとおりの過剰増殖疾病に苦しむ患者において症状の改善又は生存率の延長化を生じる、特に、 F G F R 4 阻害剤と上記したとおりの過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための剤又は / 及び治療的手段の相互作用を生じる化合物の量を指す。特に、相乗作用は、上記したとおりの共投与において過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための剤又は / 及び治療的手段の用量の減少又は / 及び増加した効力である。

【 0 0 4 1 】

F G F R 4 阻害剤及び過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための剤の毒性及び治療的効力は、細胞培養又は実験動物中での標準的な製薬的手段により決定されることができ、例えば、 L D 5 0 (集団の 5 0 % にとって致命的な用量) 及び E D 5 0 (集団の 5 0 % において治療的に有効な用量) の決定のためである。本発明において使用される任意の化合物のためには、この治療的な有効用量は、細胞培養アッセイから最初に見積もられることができる。例えば、用量は、動物モデル中で細胞培養中で決定されるとおり I C 5 0 を含む循環する濃度範囲を達成するために処方されることがある (即ち、この成長因子レセプター活性の半分の最大の阻害を達成する試験化合物の濃度) 。このような情報は、ヒト中で使用される用量をより正確に決定するために使用されることがある。

【 0 0 4 2 】

毒性と治療的作用との間での用量比は、治療的指数であり、かつ、これは L D 5 0 と E D 5 0 との間の比として表現されることがある。高い治療指数を示す化合物が有利であ

10

20

30

40

50

る。投与及び用量の正確な処方、経路は、個々の医者により患者の症状の観点から選択されることができる（例えば、Fingl et al., 1975, „The Pharmacological Basis of Therapeutics“, Ch. 1, p. 1 参照のこと）。用量及び間隔は、レセプター調節作用を維持するために十分な活性残基の血漿レベル又は最小有効濃度（M E C）を提供すべく個々に調節されてよい。このM E Cは、それぞれの化合物について変更されるが、しかしながら、in vitroのデータから、例えば、本願明細書において説明されたアッセイを用いるレセプターの50~90%阻害を達成するために必要な濃度を見積もることができる。化合物は、時間の10~90%、有利には30~90%、最も有利には50~90%にわたるM E Cを超える血漿レベルを維持する方式を用いて投与されるべきである。M E Cを達成するために必要な用量は個々の特性及び投与経路に依存するものである。局所投与又は選択的取り込みの場合に、この薬剤の有効な局所濃度は、血漿濃度に関連しなくてよい。

【0043】

投与される医薬組成物又はキットの実際の量は、治療される被験体、被験体の体重、この病気の深刻度、投与経路及び処方する医師の判断に依存する。抗体及び治療的に活性のある核酸分子又は他の化合物のためには、例えば、一日あたり0.001~100mg/kg、特に0.01~10mg/kgの一日量が適している。

【0044】

投与の適した経路は、例えば、経口、直腸、経粘膜又は直腸投与；非経口配送、筋肉内、皮下、髄内注射、また同様に鞘的な、直接的な心室内、静脈内、腹腔内、経鼻又は経眼注射を含む。

【0045】

又は、本発明の医薬組成物又はキットを全身的にではなくむしろ局所的に投与してよく、例えば、前記化合物を直接的に充実性腫瘍中に、しばしばデポー又は維持された放出処方において、注射することを介して投与されてよい。

【0046】

更に、本発明の医薬組成物又はキットを、標的化した薬剤配送系において、例えば腫瘍特異的抗体で被覆したリポソームにおいて投与してよい。このリポソームは、腫瘍に標的化され、腫瘍により選択的に取り込まれる。

【0047】

本発明の医薬組成物又はキットにおいて、(a)のFGFR4阻害剤及び過剰増殖疾病的予防、緩和及び/又は治療のための(b)の剤は、1つの医薬組成物（単独投与形態）において提供されてよく、又は、異なる組成物（別個の投与形態）において提供されてよく、有利には少なくとも2種の別個の組成物、より有利には、2種の別個の組成物において提供されてよい。特に、本発明の医薬組成物の別個の組成物が、同じ経路により又は異なる経路により投与されてよい。前記医薬組成物又はキットの、治療的手段、例えばアポトーシス誘発性の治療的手段、例えば放射線治療と一緒にでの共投与は、上記したとおりである。

【0048】

本発明のまた別の観点は、FGFR4阻害剤を有効量で、過剰増殖疾病的予防、緩和及び/又は治療のための治療的手段又は/及び剤と共に投与においてこれを必要とする被験体に投与することを含む過剰増殖疾病的予防、緩和及び/又は治療のための方法である。有利には、この方法において過剰増殖疾病的予防、緩和及び/又は治療のためのこの治療的手段又は/及び剤は、アポトーシス誘発性治療手段又は/及び剤である。この方法の特定の実施態様は、過剰増殖疾病、FGFR4阻害剤、アポトーシス誘発性治療的手段、アポトーシス誘発性剤又は/及び治療的手段又は/及び剤と上記したとおりのFGFR4粗顔剤との共投与のモードに関する。予防、緩和又は/及び治療の方法の有利な一実施態様において、過剰増殖疾患は、少なくとも部分的に治療抵抗性の過剰増殖疾患である。

【0049】

予防、緩和又は/及び治療の必要のある被験体は、過剰増殖疾病に苦しんでいてよい任

10

20

30

40

50

意の動物であってよく、特には哺乳類、特にはヒトである。

【0050】

本発明の更なる観点は、過剰増殖疾病に罹患している可能性のある被験体からの試料を、*F G F R 4* 遺伝子の発現について分析する、過剰増殖疾病的診断方法に関する。この試料は、例えは体液試料又は組織試料であってよく、例えはバイオプサイであってよい。*F G F R 4* 発現は、標準的な方法に応じて、例えは遺伝子アレイ又は免疫化学的、即ち、免疫組織化学的方法を用いて核酸レベル又はタンパク質レベルで決定されてよい。*F G F R 4* の過剰発現は、分析すべき試料中の*F G F R 4* 発現と、対照試料、例えは健康な被験体から試料における*F G F R 4* 発現又は標準的な値とを比較することにより、決定される。

10

【0051】

本発明の更なる一観点は、被験体からの試料中の*F G F R 4* 多形の決定を含む過剰増殖疾病的診断に関する。この決定は、例えは、標準的な方法により、例えは、制限断片長さ多形(*R F P L*)決定により核酸レベルで実施されてよい。特に有利な一実施態様において、*F G F R 4 - 388G1y* 及び*F G F R 4 - 388Arg* アレルの多形分析が実施される。

【0052】

本発明の更なる観点は、*F G F R 4* 発現の分析及び*F G F R 4* 多形の決定を含む、過剰増殖疾病的診断に関する。

【0053】

F G F R 4 発現の分析又は/及び*F G F R 4* 多形の決定の結果に基づき、過剰増殖疾病的治療のための治療方式が設計されてよい。*F G F R 4* 過剰発現により特徴付けられる非転移性腫瘍の治療のためには、この治療方式は、*F G F R 4* 阻害剤と、上記したとおりの放射線又は/及び化学療法と組み合わせた共投与を含んでよい。また、*F G F R 4 - 388Arg* アレルの過剰発現により特徴付けられる転移性腫瘍は、*F G F R 4* 阻害剤と、例えは放射線又は/及び化学療法と組み合わせた投与により治療されてよい。他方では、*F G F R 4 - 388G1y* アレルを有する被験体における腫瘍転移は、WO 03/063893中に説明されたとおりの*F G F R 4* の活性化により治療されてよい。

20

【0054】

本発明の別の観点は、過剰増殖細胞のアポトーシス抵抗性を減少させるために適した化合物を同定又は/及びキャラクリゼーションするためのスクリーニング方法であり、その際、このスクリーニング方法は、この化合物が*F G F R 4* 阻害剤であるかどうかを決定することを含む。

30

【0055】

特定の一実施態様において、*F G F R 4* 阻害剤を同定する本発明のスクリーニング方法は、

- (a) *F G F R 4* と少なくとも1つの化合物を接触させる工程、及び
- (b) *F G F R 4* 活性をこの化合物の存在下で決定する工程を含む。

【0056】

本発明のスクリーニング方法は、単離されたタンパク質、細胞抽出物、組み換え細胞又は/及びトランスジェニック非ヒト動物の使用を含んでよい。特に、この*F G F R 4* 阻害剤は、分子又は/及び細胞アッセイにおいて同定されてよい。

40

【0057】

この組み換え細胞又は/及びトランスジェニック非ヒト動物は有利には、野生型の相応する細胞又は動物と比較して改変された*F G F R 4* 発現、特に、*F G F R 4* 過剰発現を示す。

【0058】

本発明のスクリーニング方法において、*F G F R 4* 阻害剤は、有利には、*F G F R 4* によるポジティブな *B c 1 X* 及び/又は *M A P* キナーゼ制御の阻害剤、又は/及び *F G F*

50

R 4 誘発されたアポトーシスに対する抵抗性の阻害剤である。従って、上述したとおり、工程 (b) は、FGFR 4 の量の決定、FGFR 4 による Bcl-X_L 又は / 及び MAP キナーゼ上方調節又は / 及びアポトーシス誘発に対する FGFR 4 誘発された抵抗性の決定を含んでよい。

【0059】

本発明のスクリーニング方法は、新規の化合物又は化合物のクラスを同定するためのハイスループット形式において実施されることができる。更に、本発明のスクリーニング方法は、既知の化合物の薬理的有効性又は / 及び副作用のキャラクリゼーションのためのバリデーション手段として適している。

【0060】

更に、本発明は、以下の図及び実施例により説明されるものである。

本発明の実施態様

[実施態様 1]

過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための医薬品の製造のための、FGFR 4 阻害剤の、更なる治療的手段又は / 及び更なる治療剤と組み合わせた使用。

[実施態様 2]

更なる治療的手段又は / 及び剤が、アポトーシス誘発性治療的手段又は / 及び剤である、実施態様 1 記載の使用。

[実施態様 3]

過剰増殖疾病が、FGFR 4 過剰発現と関連している、実施態様 1 又は 2 記載の使用。

20

[実施態様 4]

過剰増殖疾病が、癌、例えば腎臓、膀胱、脳、食道、胃、脾臓、小腸、結腸、胸、肺、肝臓、脾臓、甲状腺、下垂体、副腎、卵巣、頸部、精巣の癌、前立腺癌、グリオーマ、メラノーマ、又は / 及び白血病から選択される、実施態様 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 5]

過剰増殖疾病が、少なくとも部分的に治療抵抗性である、実施態様 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 6]

過剰増殖疾病が、少なくとも部分的に、アポトーシス誘発性治療的手段又は / 及び剤に対して抵抗性である、実施態様 1 から 5 までのいずれか 1 項記載の使用。

30

[実施態様 7]

更なる治療的手段が、放射線療法である、実施態様 1 から 6 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 8]

更なる治療剤が、細胞分裂抑制的、細胞毒性又は / 及び化学療法的な剤から選択される、実施態様 1 から 7 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 9]

細胞分裂抑制的、細胞毒性又は / 及び化学療法的な剤がドキソルビシン、タキサン、白金化合物、ヌクレオシド類似体、マイトマイシン D、エトボシド、シクロホスファミド、トポイソメラーゼ阻害剤及びタンパク質、例えば抗腫瘍抗体、から選択される、実施態様 8 記載の使用。

40

[実施態様 10]

過剰増殖疾病が、Bcl-X_L 又は / 及び MAP キナーゼの過剰発現又は / 及び過剰活動と関連している、実施態様 1 から 9 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 11]

過剰増殖疾病に対する治療又は / 及び剤の効力を増加させるための医薬品の製造のための FGFR 4 阻害剤の使用。

[実施態様 12]

過剰増殖疾病的放射線又は / 及び医薬品治療に対する感受性を増加させるための医薬品

50

の製造のための F G F R 4 阻害剤の使用。

[実施態様 13]

過剰増殖疾病が癌である、実施態様 11 又は 12 記載の使用。

[実施態様 14]

F G F R 4 阻害剤が、直接的な F G F R 4 阻害剤である、実施態様 1 から 13 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 15]

F G F R 4 阻害剤が、非直接的な F G F R 4 阻害剤である、実施態様 1 から 13 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 16]

F G F R 4 阻害剤が、アンチセンス分子、リボザイム、s i R N A 分子、抗体及び抗体断片、溶解性 F G F R 4 分子、アンタゴニスト性の F G F R 4 リガンドアナログ、ペプチド及び低分子量化合物から選択される、実施態様 1 から 15 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 17]

F G F R 4 阻害剤が、F G F R 4 抗体又は F G F R 4 m R N A に対して指向した s i R N A 分子である、実施態様 1 から 16 までのいずれか 1 項記載の使用。

[実施態様 18]

活性成分として、

(a) F G F R 4 阻害剤、及び

(b) 過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための剤であって、(a) とは異なる剤、

を、場合により、医薬的に許容可能なキャリアー、希釈剤又は / 及び助剤と一緒に含有する、医薬組成物又はキット。

[実施態様 19]

剤 (b) が、アポトーシス誘発剤である、実施態様 18 記載の医薬組成物又はキット。

[実施態様 20]

(a) の阻害剤及び (b) の剤を、単独の組成物の形態で又は少なくとも 2 つの別個の組成物の形態で提供する、実施態様 18 又は 19 記載の組成物又はキット。

[実施態様 21]

F G F R 4 阻害剤の有効量を、更なる治療的手段又は / 及び更なる治療的な剤との共投与においてこれらを必要とする被験体に投与することを含む過剰増殖疾病的予防、緩和又は / 及び治療のための方法。

[実施態様 22]

更なる治療的手段又は / 及び剤が、アポトーシス誘発性治療的手段又は / 及び剤である、実施態様 21 記載の方法。

[実施態様 23]

過剰増殖疾病が、少なくとも部分的に治療抵抗性である、実施態様 21 又は 22 記載の方法。

[実施態様 24]

過剰増殖疾病に罹患している可能性のある被験体からの試料を、F G F R 4 遺伝子の発現について分析する、過剰増殖疾病的診断方法。

[実施態様 25]

過剰増殖疾病に罹患している可能性のある被験体からの試料を、F G F R 4 遺伝子中の多形の存在について分析する、過剰増殖疾病的診断方法。

[実施態様 26]

過剰増殖疾病に罹患している可能性のある被験体からの試料を、F G F R 4 遺伝子の発現及び F G F R 4 遺伝子中の多形の存在について分析する、過剰増殖疾病的診断方法。

[実施態様 27]

多形が、ヒトの F G F R 4 のアミノ酸 388 をコードする位置にある、実施態様 25 又

10

20

30

40

50

は 2 6 記載の方法。

[実施態様 2 8]

過剰増殖疾病が、癌である、実施態様 2 4 から 2 7 までのいずれか 1 項記載の方法。

[実施態様 2 9]

癌が、非転移性癌である、実施態様 2 8 記載の方法。

[実施態様 3 0]

癌が、転移性癌である、実施態様 2 8 記載の方法。

[実施態様 3 1]

過剰増殖疾病的アポトーシス抵抗性状態を決定することを更に含む、実施態様 2 4 から 3 0 までのいずれか 1 項記載の方法。

10

[実施態様 3 2]

診断の結果に基づき過剰増殖疾病的治療のための治療方式を設定することを更に含む、実施態様 2 4 から 3 1 までのいずれか 1 項に記載の方法。

[実施態様 3 3]

過剰増殖疾病が、F G F R 4 過剰発現に関連した非転移性癌であり、その際、この治療方式は、更なる治療的手段又は / 及び更なる治療剤と組み合わせた、F G F R 4 阻害剤の投与を含む、実施態様 3 2 記載の方法。

[実施態様 3 4]

非転移性癌は、F G F R 4 - 3 8 8 G 1 y 又は / 及び F G F R 4 - 3 8 8 A r g アレルに関連している、実施態様 3 3 記載の方法。

20

[実施態様 3 5]

過剰増殖疾病が、F G F R 4 - 3 8 8 A r g アレル及び場合により F G F R 4 過剰発現に関連した転移性癌であり、その際、この治療方式は、更なる治療的手段又は / 及び更なる治療剤と組み合わせた、F G F R 4 阻害剤の投与を含む、実施態様 3 2 記載の方法。

[実施態様 3 6]

過剰増殖疾病が、F G F R 4 - 3 8 8 G 1 y アレルに関連した転移性癌であり、その際、この治療方式は、更なる治療的手段又は / 及び更なる治療剤と場合により組み合わせた、F G F R 4 アゴニストの投与を含む、実施態様 3 2 記載の方法。

[実施態様 3 7]

化合物が F G F R 4 阻害剤であるかどうかを決定することを含む、過剰増殖疾病的アポトーシス抵抗性を減少させるために適した化合物を同定又は / 及びキャラクタリゼーションするためのスクリーニング方法。

30

[実施態様 3 8]

過剰増殖疾病が、少なくとも部分的に療法に抵抗性のある過剰増殖疾病である、実施態様 3 7 記載のスクリーニング方法。

[実施態様 3 9]

分子的又は / 及び細胞的アッセイを含む、実施態様 3 7 又は 3 8 記載のスクリーニング方法。

[実施態様 4 0]

(a) 少なくとも 1 の化合物を F G F R 4 と接触させる工程、及び
(b) この化合物の存在下で F G F R 4 活性を決定する工程
を含む、F G F R 4 阻害剤を同定する、実施態様 3 7 から 3 9 までのいずれか 1 項記載のスクリーニング方法。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 1 】

【 図 1 】 図 1 は、F G F R 4 は、ドキソルビシン (D X R) 処理された M D A - M B - 4 5 3 クローンにおいて上方制御されることを示す図である。

【 図 2 A 】 図 2 A は、M C F 7 - F G F R 4 - 及び M C F 7 - M o c k 細胞溶解物の、モノクローナル F G F R 4 抗体を用いた免疫沈降、及び、ポリクローナル F G F R 4 抗体を用いたプロットの探査を示す図である。

50

【図2B】図2Bは、453R1ノックダウン細胞中でのFGFR4の免疫沈降を示す図である。

【図2C】図2Cは、DXRの異なる濃度を用いて24時間の用量/応答アッセイ及びヨウ化プロピジウム染色及びその後のFACSを用いたアポトーシス細胞の測定を示す図である。

【図2D】図2Dは、化学治療剤シクロホスファミド(CPA)、タキソテレ(Taxotere)(TXT)及びシスプラチニ(CP)を用いた48時間のアポトーシスの誘導を示す図である。

【図3】図3は、大腸癌細胞系列769-P中でのFGFR4のノックダウンは、アポトーシス感受性を増加させることを示す図である。 10

【図4】図4は、一過的なFGFR4ノックダウン細胞中での下流のシグナル経路の分析を示す図である。

【図5】図5は、FGFR4は、様々な細胞系列においてBcl-x1の発現に影響を及ぼすことを示す図である。

【図6】図6は、FGFR4ブロック化抗体の使用はFGF19誘導したMAPK活性化の阻害を媒介することを示す図である。

【図7】図7は、FGFR4ブロック化抗体(10F10)は、DXR処理した癌細胞の化学療法抵抗性を減少させることを示す図である。

【0062】

図の説明

図1：FGFR4は、ドキソルビシン(DXR)処理されたMDA-MB-453クローニにおいて上方制御される。 20

【0063】

A アレイ分析によるFGFR4の発現。細胞系列MDA-MB-453及びこの抵抗性のクローニ(453R)を用いた10個の独立した実験におけるFGFR4の平均遺伝子発現。B それぞれの抵抗性のクローニ(453R1-R29)の発現を、3つの独立した実験によりアセンブリーした。

【0064】

図2：FGFR4発現は、乳癌細胞の化学療法抵抗性に作用する。

【0065】

A MCF7-FGFR4-及びMCF7-Mock細胞溶解物の、モノクローナルFGFR4抗体を用いた免疫沈降、及び、ポリクローナルFGFR4抗体を用いたプロットの探査。MCF7-FGFR4及びMCF7-Mock細胞を2μM DXRで、48時間処理し、アポトーシスを誘導した。ヨウ化プロピジウム染色した細胞をFACSにより定量化した。B 453R1ノックダウン細胞中でのFGFR4の免疫沈降。ノックダウンを453R1で実施した。C DXRの異なる濃度を用いて24時間の用量/応答アッセイ及びヨウ化プロピジウム染色及びその後のFACSを用いたアポトーシス細胞の測定。D 化学治療剤シクロホスファミド(CPA)、タキソテレ(Taxotere)(TXT)及びシスプラチニ(CP)を用いた48時間のアポトーシスの誘導。アポトーシスの割合を、ヨウ化プロピジウム染色及びその後のFACSにより測定した。 40

【0066】

図3：大腸癌細胞系列769-P中でのFGFR4のノックダウンは、アポトーシス感受性を増加させる。

【0067】

769-ノックダウン細胞中でのFGFR4の免疫沈降。ノックダウンを、siRNA分子66、74及び70それぞれを用いて実施した(参照、第1表)。DXR処理した(2μM、48時間)769-P細胞のヨウ化プロピジウム染色及びフローサイトメトリー分析を、アポトーシス定量化のために実施した。

【0068】

図4：一過的なFGFR4ノックダウン細胞中での下流のシグナル経路の分析。 50

【0069】

A ルシフェラーゼ(対照)又はF G F R 4 siRNA(siF G F R 4)で一過的にトランسفエクションしたB T 4 7 4及びZ R 7 5 - 1細胞におけるF G F R 4の免疫沈降。T L免疫プロットを、E rkリン酸化をモニターするために実施した。B 示した時間点にわたるD X Rで処理した一過的なF G F Rノックダウンのアポトーシスアッセイ。

【0070】

図5:F G F R 4は、様々な細胞系列においてB c 1 - x 1の発現に影響を及ぼす。

【0071】

A M C F 7 M o c k 及び異所的にF G F R 4を発現する細胞中のB c 1 - x 1発現のアレイ分析。B M C F 7細胞中のB c 1 - x 1発現のT L免疫プロット。C B T 4 7 4及びZ R 7 5 - 1細胞中のF G F R 4ノックダウン及びB c 1 - x 1のT L免疫プロット。D M G F 7 - F G F R 4細胞を10 μMのU0126で6時間及び12時間処理した。U0126処理した細胞のc D N Aを、B c 1 - x 1プライマーを用いたR T - P C Rを実施するために利用した。それぞれのR T - P C Rにおいて利用されたc D N Aの統合性及び量は、G A P D H增幅により測定された。

【0072】

図6:F G F R 4ブロックj化抗体の使用はF G F 1 9誘導したM A P K活性化の阻害を媒介する。

【0073】

A 異なる乳癌細胞系列(B T - 4 7 4、M D A - M B - 3 6 - 1及びZ R 7 5 - 1)を、48時間0%のF C S /培地で培養した。細胞をF G F 1 9単独で又は10F 1 0 + F G F 1 9で処理し、かつ、この未処理の対照細胞と比較した。この細胞の刺激及び再度の阻害は、P - E R K - A Bを用いたT L免疫プロットにより示される。B D X R及び様々な刺激で処理されたM D A - M B 3 6 1及びB T 4 7 4乳癌細胞系列のアポトーシス割合。

【0074】

図7:F G F R 4ブロック化抗体(10F 1 0)は、D X R処理した癌細胞の化学療法抵抗性を減少させる。

【0075】

A c D N Aマイクロアレイ分析は、様々な乳癌細胞系列における相対的なF G F R 4発現を示す。B D X Rを用いたアポトーシスの、F G F 1 9又はF G F 1 9 / 1 0 F 1 0処理した、最も高いF G F R 4発現を示す乳癌細胞系列中の誘導。P J染色及び引き続くF A C S分析によるアポトーシス割合の定量化。C 上記したとおりに評価した、乳腺以外の起源を有する2種の癌細胞系列のアポトーシス割合。

【0076】

実施例

材料及び方法

試薬及び抗体

F G F リガンドを、T E B U (Offenbach, Germany)から購入した。この使用した抗体は、ポリクローナル抗F G F R 4、抗E rk 2及び抗A k t 1 / 2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、ウサギポリクローナル抗ホスホA k t (S e r 4 7 3) (New England BioLabs, Beverly, MA)、マウスモノクローナル抗ホスホチロシン抗体4 G 1 0 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)、マウスモノクローナル抗チューブリン(Sigma, St Louis, MO)、ウサギポリクローナル抗ホスホE rk (Cell signalling, USA)及びマウスモノクローナル抗B c 1 - x 1 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)、マウスモノクローナル抗V S V抗体、マウスモノクローナル抗F G F R 4抗体1 0 F 1 0 (U3pharma, Martinsried)であった。

【0077】

H R Pコンジュゲートした二次抗体は、ヤギ抗マウス(Sigma, Taufkirchen, Germany)

10

20

30

40

50

) 及びヤギ抗ウサギ (Biorad, Munich, Germany) であった。要求される場合には、細胞を完全な血清除去により 48 時間飢餓させ、そして図の説明において示したとおりに成長因子で処理した。

【0078】

細胞培養、プラスミド及びレトロウィルス感染

細胞系列 769-P、TE671、MDA-MB-453、BT474、MDA-MB 361、MDA-MB 231、ZR75-1 及び MCF7 を、ATCC (American type culture collection, Manassas, VA) から獲得し、そして、この供給者の指示に従って、MDA-MB-453 細胞以外は培養させ、これは、10% のウシ胎児血清 (FCS) 及びグルタミン (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Germany) で補給された RPMI 培地中で維持した。

【0079】

ヒト *fgr4* をコードする cDNA を含有する pLXSN ベクターは、以前説明されている (Bange 2002)。FGFR4 を発現するこのポリクローナル MCF7 細胞系列は、レトロウィルス遺伝子移入により産出された。アンホトロピックレトロウィルス上清を、Pear et al. 1993, Kinsella and Nolan 1996 により以前説明されているとおりの、リン酸カルシウム / クロロキン方法による適したベクターコンストラクトを用いたフェニックスパッキング細胞のトランスフェクションにより産出した。トランスフェクションの 48 時間後に、この組織培養媒体を、0.45 μm のフィルターを介して濾過し、ポリブレン (polybrene) (終濃度 4 μg/ml) と混合し、そしてこの細胞の感染のために使用した。細胞を 3 回少なくとも 4 時間にわたり感染させ、かつ、新規の媒体を用いて 24 時間にわたり回収した。FGFR4 を安定に発現するポリクローナル細胞を、G418 (2 mg/ml) を用いて 2 週間選択した。

【0080】

siRNA による下方制御のために FGFR4 タンパク質を標的化するために、pReetroSuper-FGFR4 コンストラクトを供給者 (OligoEngine) の指示に従って産出した。使用した siRNA の標的配列はこの明細書中では次のものである : GAGCAGGAGCTGACAGAGT (si 66), CTACCTGCTAGATGTTGCTG (si Ctrl) 及び GTGCTCGACCTTGATAGCA (si 74)。pReetroSuper-FGFR4 を有するポリクローナル細胞を、プロマイシン (puromycin) (2 μg/ml) を用いて 2 日間選択した。

【0081】

逆転写酵素 PCR (RT-PCR) 及び半定量的 PCR

RNA を、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて単離し、かつ、AMV 逆転写酵素 (Roche, Mannheim, Germany) 及び OligodT-プライマー (Gibco, Germany) を用いて cDNA 中に逆転写した。この RNA 及び cDNA 濃度を、NanoDrop ND1000 (PeqLab, Erlangen, Germany) 系を用いて測定した。半定量的 PCR 増幅のためには、以下のプライマー (MWG, Ebersberg, Germany) を使用した :

5'-ACCAACAGTCCTATGCCAT-CAC-3' (GAPDH フォワード) 40

及び 5'-TCCACCAACCTG-TTGTGCTGTA-3' (GAPDH リバース)

5'-AGAATTCTGCCACCATGTCCTCAGAGCAACC-3' (Bc1-x1 フォワード) 及び

5'-GGG-TGATGTTGGAGCTGGGATGTC-3' (Bc1-x1 リバース)。PCR 産物を、2% のアガロースゲルに対して電気泳動し、かつ、DNA をエチジウムプロミド染色を用いて視覚化した。

【0082】

細胞溶解、免疫沈降及び免疫プロッティング

細胞培養体を、PBS で洗浄し、4 度、ホスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤 (1

10

20

30

40

50

0 mM ピロリン酸ナトリウム、1 mM PMSF、2 mM オルトバナジン酸ナトリウム、10 µg / ml アプロチニン)で補給した、溶解緩衝液(50 mM、HEPES / NaOH、pH 7.5、150 mM NaCl、1 mM EDTA、10%グリセロール及び1%Triton X-100)を用いてインキュベーションした。細胞デブリを、遠心分離により除去した。タンパク質濃度測定を、Pierce (Bonn, Germany)からのMicro-BCA-タンパク質アッセイを用いて実施した。免疫沈降のために、全細胞溶解物を、抗体及び30 µlのタンパク質A - 又はG - セファロースラリー (GE Healthcare)と組み合わせた。この試料を、3時間回転輪上で4℃でインキュベーションした。この沈殿物を、3×SDS試料緩衝液中に懸濁した、HNTG緩衝液(20 mM HEPES / NaOH、pH 7.5、150 mM NaCl、10%グリセロール、0.1% Triton X-100及び10 mM ピロリン酸ナトリウム)で3回洗浄し、3分間沸騰させ、かつ、SDS-PAGEにかけた。ウェスタンプロット分析のために、タンパク質をニトロセルロース膜に移し、かつ、適した抗体を用いてインキュベーションした。シグナルを、促進された化学発光検出系 (ECL, Perkin Elmer, Wellesley, MA)を介して展開した。再度探査する前に、膜を、2% SDSを含有する65 mM Tris / HCl pH 6.8緩衝液を用いて、50℃で1時間にわたりストリップした。

【0083】

RNA干渉

内因性の遺伝子を標的化するために21スクレオチド siRNAデュプレックス (Ambion, Huntington, Cambridge, UK)のトランスフェクションを、Elbashir et al. 2001により説明されたとおり、6ウェルプレートにつきLipofectamine 2000 (Invitrogen)及びsiRNAデュプレックス 0.84 µgを使用して実施した。トランスフェクションした細胞を、示された時間点で評価した。使用した siRNAの配列は次のとおりである： F G F R 4 5' - G G C U C U U C C G G C A A G U C A A t t - 3' 及び G L 2 - ルシフェラーゼ 5' - C G U A C G C G G A A U A C U U - C G A t t - 3'。F G F R 4 の特異的なサイレンシングを、イムノプロット分析により確認し、これは、以前説明されたとおりである。

【0084】

細胞死アッセイ

細胞死を、以前に説明されたとおりにフローサイトメトリーを用いて低二媒体細胞のベースンテージをカウントすることにより測定した (Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C1 Grignani, F., and Riccardi, C. (1991) J. Immunol. Methods 139, 271-279)。ヨウ化プロピジウム蛍光を、FACSCalibur (BD Biosciences)でFL2チャンネル中で測定した。細胞培養上清及びトリプシン化した細胞をプールした。

【0085】

cDNAアレイハイブリダイゼーション

cDNAsの放射線ラベル化を、Megaprime-ラベル化キット (Amersham Biosciences)及び50 µCiの[⁻³³P]ATPを反応につき使用して達成した。このラベル化したcDNAをQiagenからのNucleotide Removalキットを介して精製し、かつ、ハイブリダイゼーション緩衝液(5×SSC、0.1% SDS)中の0.5 mg / mlのCOT-DNA (Invitrogen)を用いて、5分間95℃及び30分間68℃でインキュベーションして、cDNA中の繰り返し配列をロックした。このcDNAを予備加熱(68℃)した、100 µg / mlのtRNA (baker's yeast, Roche Applied Science)を含有するハイブリダイゼーション緩衝液に添加した。cDNAアレイを、予備ハイブリダイゼーション緩衝液(5×デンハルト (Denhardfs)、5×SSC、100 mM NaPO₄、2 mM Na₂P₂O₇、100 µg / ml tRNA)中で4時間インキュベーションし、引き続きこのラベル化したcDNAをハイブリダイゼーション緩衝液中に16時間インキュベーションした。このcDNAを取り除き、かつこのcDNAアレイを、増加するストリッジエンサーで洗浄し、乾燥し、そしてリンイメージ化プレート (Fuji) 上に曝した。このプレートをFujiBas2500リンイメージ化装置 (phosphor imaging device) 上で読み取り

10

20

30

40

50

、かつ、この粗のスポット値（ボリューム）を、ArrayVision (RayTest, Canada)を用いて決定した。

【0086】

結果

DXR処理したMDA-MB453クローン中のFGFR4の増加した発現

乳癌細胞系列MDA-MB-453中での抗アポトーシス機構を同定するためのアッセイを実施した。従って、細胞をDXRで処理し、生存したクローンを単離した。平均してFGFR4 mRNAの2倍の上方調節が、アレイ分析により産出された遺伝子発現プロファイルが比較された場合に、DXR処理を生存したクローン中で見出された（図1A）。このクローンの約半分がFGFR4 mRNAレベルにおいて4倍までの増加を示し、その一方で、他のものは、弱い増加を示すか又は増加を示さなかった（図1B）。FGFR4発現レベルを、半定量的PCRにより評価し、かつ、定量化した。

【0087】

Fgfr4発現は、癌細胞の化学療法抵抗性に作用を及ぼす

更にFGFR4の抗アポトーシス機構における関連を分析するために、Fgfr4遺伝子を乳癌細胞系列MCF7において発現した（図2A）。これらの細胞の増殖は、通常の培養条件では影響を及ぼされなかった。しかしながら、DXR処理すると、MCF7-Fgfr4細胞は、MCF7に比較してより迅速な増殖を示した。異所的にFgfr4を発現する細胞中でのDXRに対するこの減少した感受性のために、我々は、フローサイトメトリーによりアポトーシス性細胞のパーセンテージを分析した。親のMCF7細胞に比較して、MCF7-Fgfr4発現細胞は、アポトーシスの減少した割合を示した（図2A）。

【0088】

化学療法抵抗性におけるFgfr4の役割を更に研究するために、抵抗性のMDA-MB453クローンの2種（453R1及び453R9）を利用し、かつ、腎臓癌腫細胞系列769-Pを、2種の異なるFGFR4-siRNAs（si66及びsi74）によるFgfr4安定なノックダウンについて、利用した。ここでは、siRNAs si66及びsi74は、このレセプター発現を、453R1、769-P（図2B）及び453R9細胞系列において効率的にノックダウンできた。これらの細胞は、Mock又はctr1-siRNA感染させた細胞に比較して、DXR処理に対してアポトーシス割合の増加を示した（図2B）。

【0089】

化学治療的薬剤に対する増加した感受性は、我々が分析したDXRの特定の濃度で存在するだけでなく、異所的にFGFR4を発現するMCF7細胞及び様々なDXR濃度でのFGFR4ノックダウンを有する453R1細胞のアポトーシス割合でも存在した。MCF7-Fgfr4細胞においてはアポトーシスは、様々なDXR濃度で減少した。結果として、FGFR4ノックダウン細胞は、感染していない細胞に比較してより高いアポトーシス割合を示した（図2C）。同様の結果は、FGFR4ノックダウンした場合の、内因性にFGFR4を発現する腎臓癌腫細胞系列769-PのDXR処理で得られた（図3）。

【0090】

最後に、我々は、MCF7中のFgfr4の異所性発現又は453R1細胞中のFgfr4ノックダウンが、他の化学薬品治療剤に対する感受性に影響を及ぼすかどうかを分析した。興味深いことに、サイトホスファミド（CPA）の場合にのみ、減少したアポトーシス感受性が、様々な化学的治療剤で処理された、FGFR4過剰発現細胞中で観察されることができた。期待どおり、453R1 siRNA66及び74細胞は、CPAで処理した場合に对照細胞に比較してより高いアポトーシス割合を示した（図2D）。細胞がタキソテレ（TXT）及びシスプラチニ（CP）で処理された場合には影響は観察されることができなかった。まとめると、これらの実験は、FGFR4の過剰発現がアポトーシス抵抗性を増加させ、その一方で、FGFR4の安定なノックダウンが、化学治療的薬

剤治療に対する癌細胞を敏感化させることを示す。

【0091】

F G F R 4 のノックダウンは、M A P K シグナル経路に影響を及ぼす

このF G F R 4 により支配されているシグナル経路を調べるために、我々は様々な乳癌細胞系列Z R 7 5 - 1 及びB T 4 7 4 を利用し、これはF G F R 4 の高い量を内因的に発現している。F g f r 4 に対して指向した合成のs i R N A (s i F G F R 4) を用いた一過的なノックダウンは、9 6 時間でのホスホE r k レベルにおける減少を示した(図4)。このA k t リン酸化は、ノックダウンにより影響を及ぼされず、かつ、全ての時間点で活性化されたままであった(データ示さず)。従って、F G F R 4 が、A k t よりもむしろM A P K 活性化を制御することを我々は結論付ける。アポトーシス割合もまた、様々な時間点でのF G F R 4 の一過的なノックダウンにより影響を及ぼされた(図4 B)。

【0092】

異所性F G F R 4 発現細胞の遺伝子発現分析は、B c 1 - x 1 の増加したレベルを明らかにする

F G F R 4 過剰発現細胞系列の化学療法抵抗性を媒介する分子機構に関する更なる知見を得るために、F G F R 4 細胞を異所的に発現するM C F 7 細胞の遺伝子発現アレイ分析を実施した。ここで、我々は、B c 1 - x 1 発現が未制御状態に比較して、F G F R 4 過剰発現のために2倍となることを検出できた(図5 A)。我々は、半定量的P C R によりB c 1 - x 1 の発現レベルにおける相違を評価した。B c 1 - x 1 タンパク質は、F G F R 4 を発現するM C F 7 細胞系列にのみ見出された(図5 B)。B c 1 - x 1 発現がF G F R 4 に依存していることを確認するために、我々は様々な細胞系列において一過的にF g f r 4 をノックダウンし、両者のタンパク質の発現の変化を分析した。ここで、我々はB c 1 - x 1 発現がF G F R 4 ノックダウンで抑制されていることを示すことができた。これらの結果は、B c 1 - x 1 発現はF G F R 4 発現に依存性であり、かつ、F G F R 4 ノックダウンにより抑制される能够性を示した。M A P K はB c 1 - x 1 発現の極めて重要なレギュレーターであるので、M C F 7 - F G F R 4 細胞をU 0126、特異的なM E K 阻害剤で処理した。この半定量的なP C R は、U 0126処理が、B c 1 - x 1 発現を破壊することを示した(図5 D)。従って、我々は、B c 1 - x 1 発現が、F G F R 4 発現及びM A P K 活性に依存することを結論付ける。

【0093】

F g f r 4 ブロック化抗体は、F G F 1 9 誘発されたM A P K 活性化を阻害する

次に、我々は、この促進された化学療法抵抗性が、様々な癌細胞系列においてF g f r 4 活性と連結しているかどうかとの問い合わせに言及したかった。この目的のために、F g f r 4 ブロック化抗体(1 0 F 1 0)を使用した。我々は、様々な乳癌細胞系列を特異的なりガンドF G F 1 9 で刺激し、この系列は内因的にF g f r 4 を発現する。F G F 1 9 処理されると、p - E r k - レベルは、刺激されていない対照細胞に比較して増加した。F g f r 4 ブロック化抗体でのこの細胞系列の予備インキュベーション及び引き続くF G F 1 9 刺激後に、単独でF G F 1 9 で処理された癌細胞系列に比較して減少したp - E r k レベルが検出された(図6 A)。この実験において、我々は、F g f r 4 ブロック化抗体(1 0 F 1 0)が、F g f r 4 媒介した下流のシグナリングを阻害することを明らかに示すことができた。

【0094】

このF g f r 4 レセプター活性のブロック化が、化学的治療薬剤に対する増加した感受性を生じるかどうかを確認するために、乳癌細胞系列M D A - M B - 3 6 1 及びB T 4 7 4 を、D X R 、V S V / 1 0 F 1 0 抗体で又は様々な組み合わせにおいてインキュベーションし、かつ、D X R - 処理4 8 時間後のアポトーシス割合を測定した。ここで、我々は、F G F R 4 の1 0 F 1 0 - 抗体によるブロック化が、D X R 誘発のためにアポトーシス割合の増加を生じ、その一方でこのV S V 抗体インキュベーションがアポトーシスに対して作用がないことを実証することができた(図6 B)。

【0095】

10

20

30

40

50

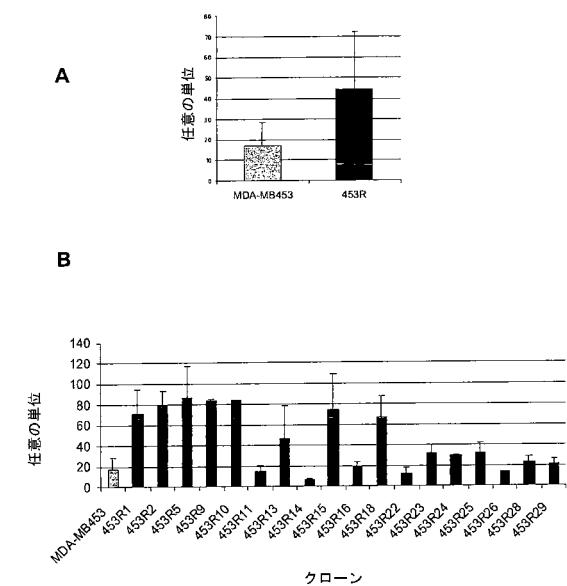
F G F R 4 ブロック化抗体 (1 0 F 1 0) は、 D X R 处理した癌細胞の化学療法抵抗性を減少した

c D N A マイクロアレイ実験において、 F g f r 4 が、入手可能な乳癌細胞系列の約 30 % において高度に発現していることを観察できた (図 7 A) 。このレセプターの高度の発現は、細胞系列 B T - 4 7 4 、 Z R 7 5 - 1 、 M D A - M B - 3 6 1 及び M D A - M B - 4 5 3 において観察された。従って、これらの細胞系列を使用して、 F G F R 4 シグナリングを阻害し、かつ、この癌細胞を化学療法のために敏感化した。 F G F 1 9 / D X R 处理した癌細胞系列のアポトーシス割合を、 F G F R 4 ブロック化抗体で更に処理した細胞系列と比較した。様々な細胞系列の D X R / F G F 1 9 处理は、アポトーシスを低度から中間の低度において誘発し、その一方で F G F R 4 ブロック化抗体での更なる処理は、更にこのアポトーシス割合を顕著に増加させた (図 7 B) : M D A - M B - 3 6 1 中約 40 % 、 Z R 7 5 - 1 中約 29 % 、そして、 B T - 4 7 4 中約 10 % 。 M D A - M B - 4 5 3 細胞中で、 1 0 F 1 0 - A B 处理を用いて増加したアポトーシスを検出できなかった。これは、この細胞系列中での F G F R 4 の構成的な活性化のためである可能性があり、これは、 1 0 F 1 0 抗体によりブロック化されることができなかった (データ示さず) 。しかしながら、これらの実験において、 F G F R 4 活性が、 D X R に対する癌細胞の抵抗性を支持し、その一方で F G F R 4 活性化の F G F R 4 ブロック化抗体 (1 0 F 1 0) による阻害は、癌細胞の増加した化学療法感受性を生じることが実証できた。

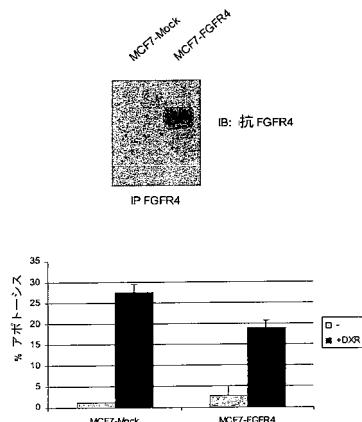
【 0 0 9 6 】

最後に、乳組織以外の起源の癌細胞系列中でのブロック化 A b 1 0 F 1 0 の有効性を分析した。一例として、 7 6 9 - P 腎臓癌腫及び T E 6 7 1 グリオblastoma細胞系列を使用した。ブロック化抗体での処理は、これらの細胞中でのアポトーシス割合を増加させた。

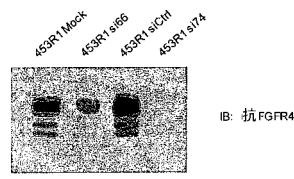
【 図 1 】



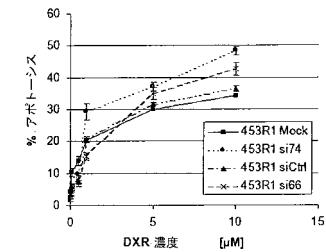
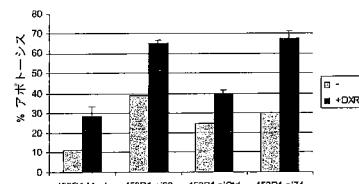
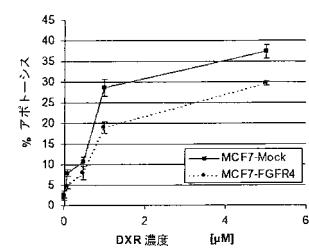
【 図 2 A 】



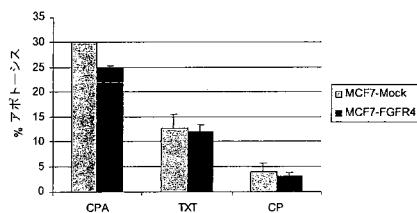
【図2B】



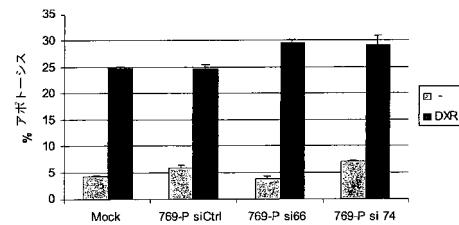
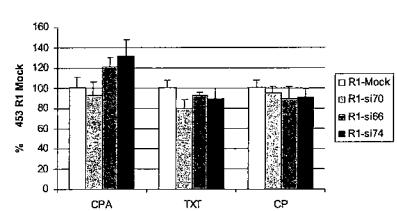
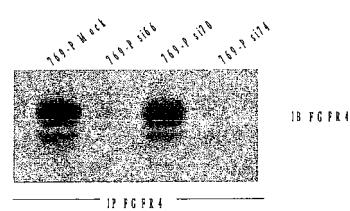
【図2C】



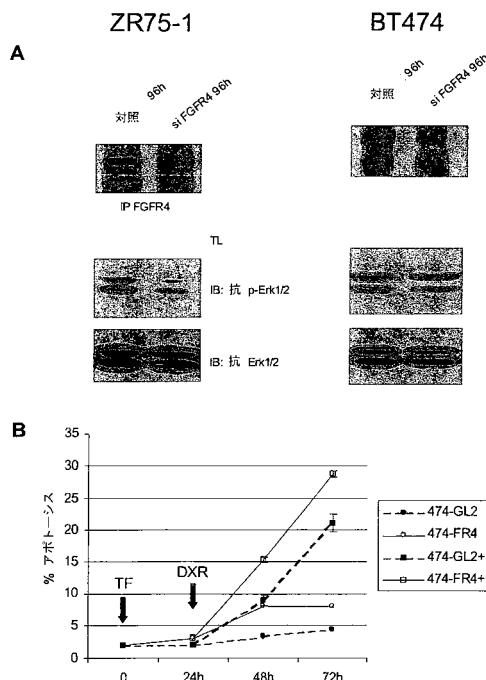
【図2D】



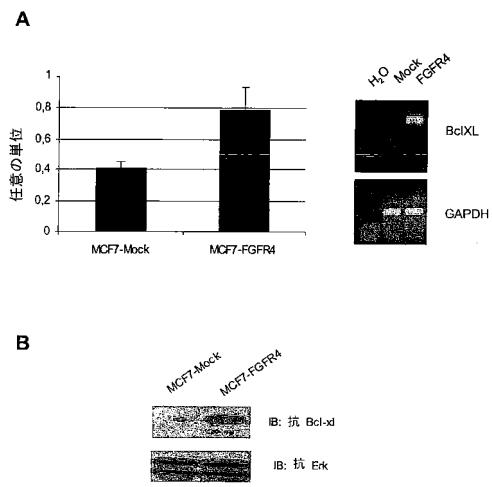
【図3】



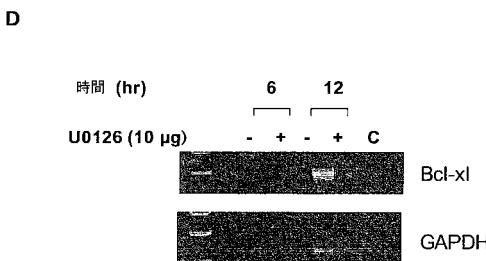
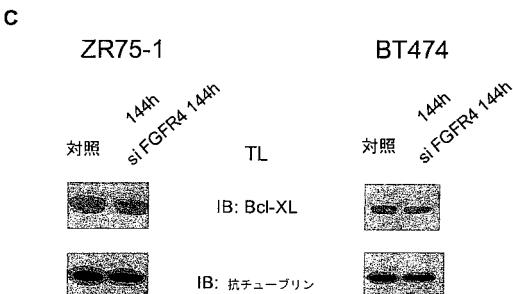
【図4】



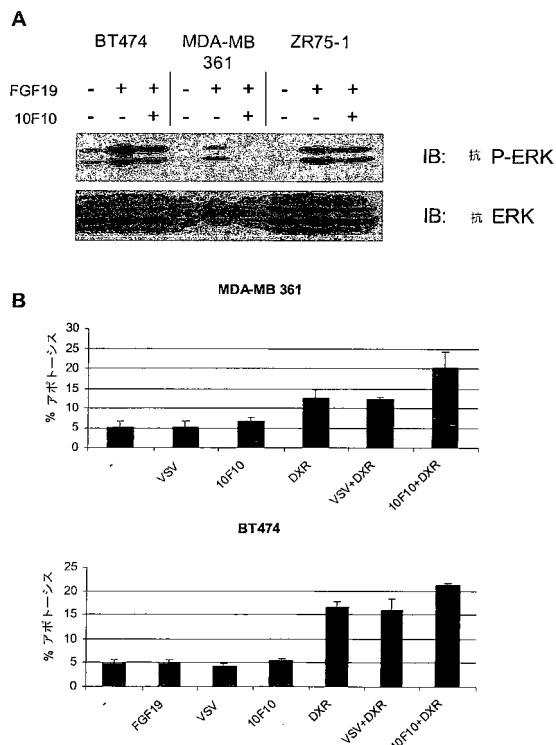
【図5-1】



【図5-2】

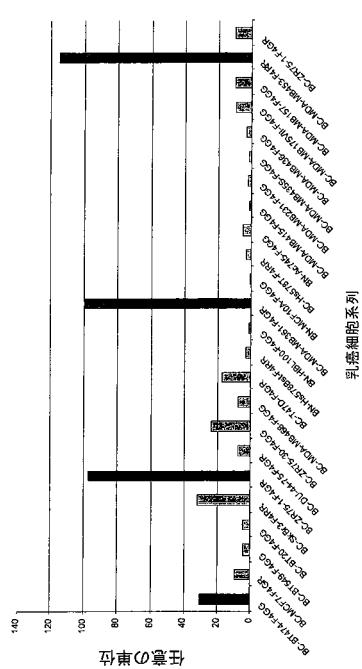


【図6】



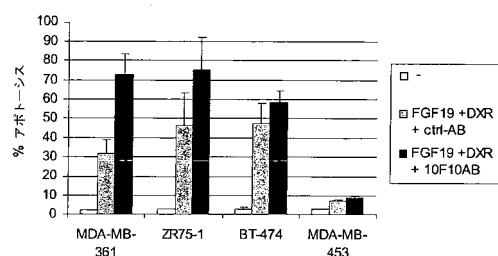
【図 7 - 1】

A

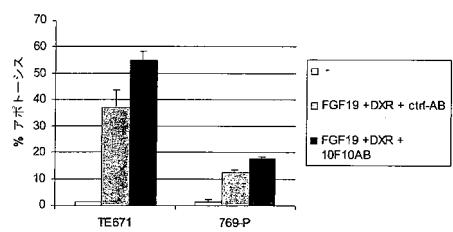


【図 7 - 2】

B



C



【配列表】

0005349320000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02
	A 6 1 P 35/04
	A 6 1 P 43/00 1 2 1

(72)発明者 アクセル ウルリッヒ
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン ブルンシュトラーセ 5
(72)発明者 ハンス - ユルゲン ベルガー
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン フュルステンリーダー シュトラーセ 8 アー
(72)発明者 アンドレアス ロイトル
ドイツ連邦共和国 ブフハイム タンネンシュトラーセ 5 9

審査官 池上 京子

(56)参考文献 Clinical Cancer Research, 2005年, vol.11, p.1336-1341
The Journal of Biological Chemistry, 2004年, vol.279, no.48, p.50004-50011
Journal of Clinical Oncology, 2006年 8月, vol.24, no.3, p.3747-3755

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
A 6 1 K 4 8 / 0 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)