

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5695905号
(P5695905)

(45) 発行日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(24) 登録日 平成27年2月13日(2015.2.13)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	N
A 61 K 31/517	(2006.01)	A 61 K 31/517	
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00	1 1 1
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00	

請求項の数 10 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-528107 (P2010-528107)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月1日 (2008.10.1)
 (65) 公表番号 特表2010-540653 (P2010-540653A)
 (43) 公表日 平成22年12月24日 (2010.12.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2008/078474
 (87) 國際公開番号 WO2009/046123
 (87) 國際公開日 平成21年4月9日 (2009.4.9)
 審査請求日 平成23年9月27日 (2011.9.27)
 (31) 優先権主張番号 60/976,892
 (32) 優先日 平成19年10月2日 (2007.10.2)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-8732

(73) 特許権者 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 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 ディーエヌエーウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 スミス, ヴィクトリア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, バーリングーム, ドウワイトロード 19

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N L R R - 1 アンタゴニスト及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンタゴニスト性抗神経関連ロイシンリッチリピートタンパク質 - 1 (N L R R - 1) モノクローナル抗体の治療上有効量を小分子 E G F R チロシンキナーゼアンタゴニストと組み合わせて含む、患者における小分子 E G F R チロシンキナーゼアンタゴニストに耐性がある癌を治療するための医薬であって、

小分子 E G F R チロシンキナーゼアンタゴニストが、エルロチニブ ; P D 1 8 3 8 0 5 (C I 1 0 3 3 、 2 - プロペンアミド、 N - [4 - [(3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 7 - [3 - (4 - モルホリニル) プロポキシ] - 6 - キナゾリニル] - 、 ジハイドロクロリド) ; Iressa (登録商標) (Z D 1 8 3 9 、 ゲフィチニブ) ; Z M 1 0 5 1 8 0 ((6 - アミノ - 4 - (3 - メチルフェニル - アミノ) キナゾリン) ; B I B X - 1 3 8 2 (N 8 - (3 - クロロ - 4 - フルオロ - フェニル) - N 2 - (1 - メチル - ピペリジン - 4 - イル) - ピリミド [5 , 4 - d] ピリミジン - 2 , 8 - ジアミン) ; P K I - 1 6 6 ((R) - 4 - [4 - [(1 - フェニルエチル) アミノ] - 1 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 6 - イル] フェノール) ; (R) - 6 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 4 - [(1 - フェニルエチル) アミノ] - 7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン) ; C L - 3 8 7 7 8 5 (N [4 - [(3 - プロモフェニル) アミノ] - 6 - キナゾリニル] - 2 - ブチニアミド) ; E K B - 5 6 9 (N [4 - [(3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) アミノ] - 3 - シアノ - 7 - エトキシ - 6 - キノリニル] - 4 - (ジメチルアミノ) - 2 - ブテンアミド) ; lapatinib (Tykerb) ; Z D 6 4 7 4

10

20

(Zectima) ; CUDC-101 ; canertinib (CI-1033) ; AEE788 (6-[4-[4-エチル-1-ピペラジニル]メチル]フェニル) - N-[((1R)-1-フェニルエチル)-7H-ピロ口[2,3-d]ピリミジン-4-アミン)及びPKI166 (4-[4-[[(1R)-1-フェニルエチル]アミノ]-7H-ピロ口[2,3-d]ピリミジン-6-イル]フェノール)からなる群から選択される、医薬。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体がATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から產生されるモノクローナル抗体3D1.6.9である、請求項1に記載の医薬。

【請求項3】

前記モノクローナル抗体がキメラ、ヒト又はヒト化モノクローナル抗体である、請求項1に記載の医薬。

【請求項4】

前記キメラ又はヒト化モノクローナル抗体がATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から產生されるモノクローナル抗体3D1.6.9の6つ全てのCDRを含む、請求項3に記載の医薬。

【請求項5】

上皮増殖因子受容体(EGFR)が腫瘍細胞で重複していない、請求項1から4のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項6】

前記小分子EGFRチロシンキナーゼアンタゴニストがエルロチニブである、請求項1から5のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項7】

小分子EGFRチロシンキナーゼアンタゴニストのみと比較して、小分子EGFRチロシンキナーゼアンタゴニストと併用するNLRR-1アンタゴニストモノクローナル抗体が腫瘍細胞の増殖阻害を増強する、請求項1から6の何れか一項に記載の医薬。

【請求項8】

前記癌が、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、前立腺癌、肝癌、膀胱癌及び卵巣癌からなる群から選択される、請求項1から7のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項9】

前記癌がNLRR-1及びEGFRを発現する、請求項1から8のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項10】

アンタゴニスト性抗神経関連ロイシンリッチリピートタンパク質-1(NLRR-1)モノクローナル抗体の治療上有効量を含む、小分子EGFRチロシンキナーゼアンタゴニストと組み合わせて患者における小分子EGFRチロシンキナーゼアンタゴニストに耐性がある癌を治療するための医薬であって、

小分子EGFRチロシンキナーゼアンタゴニストが、エルロチニブ；PD183805(CI1033、2-プロペンアミド、N-[4-[3-クロロ-4-フルオロフェニル]アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]-6-キナゾリニル]ジハイドロクロリド)；Iressa(登録商標)(ZD1839、ゲフィチニブ)；ZM105180((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル)-アミノ)キナゾリン)；BIBX-1382(N8-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N2-(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン)；PKI-166((R)-4-[4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロ口[2,3-d]ピリミジン-6-イル]フェノール)；(R)-6-(4-ヒドロキシフェニル)-4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロ口[2,3-d]ピリミジン)；CL-387785(N[4-[3-プロモフェニル]アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチニアミド)；EKB-569(N[4-[3-クロロ-4-フルオロフェニル]アミノ]-3-シアノ-7-エトキシ-6-キノリニル)-4-(ジメチ

10

20

30

40

50

ルアミノ) - 2 - ブテンアミド) ; lapatinib (Tykerb) ; ZD6474 (Zectima) ; CUDC-101 ; canertinib (CI-1033) ; AEE788 (6-[4-[(4-エチル-1-ピペラジニル)メチル]フェニル]-N-[(1R)-1-フェニルエチル]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン) 及びPKI166 (4-[4-[(1R)-1-フェニルエチル]アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール) からなる群から選択される、医薬。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

10

(関連出願)

本出願は2007年10月02日出願米国仮出願番号第60/976,892号の優先権を主張し、その内容の全ては本願明細書に引用されたものとする。

【0002】

(発明の技術分野)

本発明は、癌及び他の疾患の治療のために有用な組成物及び方法に係わり、特に癌を治療するために有用な神経関連ロイシンリッチリピートタンパク質-1アンタゴニストに関する。

【0003】

(発明の背景)

20

神経関連ロイシンリッチリピート(NLRR)タンパク質は、まずマウス脳cDNAライブラリーから同定され、哺乳動物のthree-geneファミリーによってコード化される(Taguchi等、1996; Taniguchi等、1996)。それらは11又は12のLRRs、免疫グロブリンドメイン及びIII型フィブロネクチン・ドメインを含む新規なLRRタンパク質ファミリーを構成する(Bormann等、1999; Fukamachi等、2001; Hayata等、1998)。構造的特徴から、これらのグリコシル化膜貫通タンパク質は、細胞接着、遊走、形態形成又はシグナリングにおいて役割を果たすと仮定される。NLRRファミリー・タンパク質の制御された胚性発現及び細胞位置は、細胞接着、運動又はシグナリングの制御の発達における重要な役割を示唆するが(Haines等、2005)、それらの機能は理解されないままであった。EGFRとの物理的な関連を示す証拠はないが、おそらくクラトリン・被覆小窓及びエンドソームにおけるEGFRとEGFとの関連を促進することによって、NLRR-3は低濃度のEGFに応答してEGFRシグナリングを強化する役割を有することが示された(Fukamachi等、2002)。EGFRのエンドサイトーシスは減衰機構として長く認識されてきたが、いくつかの研究により、エンドソーム複合体がシグナリング活性を保持し、EGFR内部移行がMAPキナーゼ・リン酸化を增幅して細胞生存に導く経路を刺激することが明らかとなった(Haugh等、1999a; Haugh等、1999b; Sato等、2001; Schober等、2002; Wang等、2002)。

30

NLRR-1(LRRN1として公知)はNLRR-3とC末端のエンドサイトーシスマチーフの完全な保存を含む相同性を有している。NLRR-1は初期の神経外胚葉発達上のマーカーとして同定され(Aubert等、2003)、原体節発達における筋原の前駆体のサブセットにおいてもまた見られるが(Haines等、2005)、その機能は未だわかっていない。ヒト疾病状態におけるNLRRタンパク質の発現に関するデータは限られているが、神経芽細胞腫においてNLRR-1の発現はNLRR-3と異なり、短い生存及び低い予後の因子と関連している(Hamano等、2004)。

40

【0004】

上皮細胞成長因子受容体(EGFR)ファミリーは、4つの密接に関連した受容体(HER1/EGFR、HER2、HER3及びHER4)を含む。EGFRファミリー及び関連リガンドは、細胞増殖、遊走、分化及び生存を制御する一連の細胞内シグナリングのイベントを引き起こす(Wells, 1999)。EGFR経路の活性化は、悪性腫瘍において基本的な役割を果たし、EGFRを標的とした腫瘍治療の最近の進歩は、ゲノム增幅、タン

50

パク質発現、変異及び下流エフェクターとしてこのような因子の貢献を含む E G F R シグナリング及び腫瘍形成の活性化のいくつかの側面を強調した (Dziadziszko等、2006; Eberhard等、2005; Han等、2005; Lynch等、2004; Oliveira等、2006; Paez等、2004; Shepherd等、2005; Tsao等、2005)。

E G F R キナーゼ又はそのリガンドである T G F の過剰発現は、乳房、肺、結腸直腸、卵巣、腎臓細胞、膀胱、頭頸部の癌、神経グリア芽細胞腫及び神経膠星状細胞腫を含む多くの癌と高い頻度で関連し、これらの腫瘍の悪性の増殖に寄与すると考えられている。E G F R 遺伝子 (E G F R v I I I) における特定の欠失突然変異は、細胞腫瘍原性を増強することも見いだされた。E G F R 刺激シグナリング経路の活性化は、潜在的に癌促進性 (例えば増殖、血管新生、細胞運動性及び浸潤、減少したアポトーシス及び薬剤耐性の誘導) の多数のプロセスを促進する。増加した H E R 1 / E G F R 発現は、進行した疾患、転移及び予後不良に高い頻度で関連している。例えば、N S C L C 及び胃癌において、増加した H E R 1 / E G F R 発現が高い転移性速度と相關することが示され、低い腫瘍では異なっている。

E G F R のキナーゼ活性を直接阻害する抗腫瘍因子及び E G F R 活性化をブロックすることによって E G F R キナーゼ活性を減少させる抗体を作成するために、熱心な研究への努力が行われている (de Bono J.S. and Rowinsky, E.K. (2002) Trends in Mol. Medicine 8: S19-S26; Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003) Nature Rev. Drug Discovery 2:92-313)。いくつかの研究により、特定の他の抗癌剤又は化学療法剤又は治療と併用して用いられる場合、E G F R キナーゼ・インヒビターは腫瘍細胞又は新形成の死滅を改善するかもしれないことが示され、開示され又は示唆されている (例えばHerbst, R.S. et al. (2001) Expert Opin. Biol. Ther. 1:719-732; Solomon, B. et al (2003) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 55:713-723; Krishnan, S. et al. (2003) Frontiers in Bioscience 8, e1-13; Grunwald, V. and Hidalgo, M. (2003) J. Nat. Cancer Inst. 95: 851-867; Seymour L. (2003) Current Opin. Investig. Drugs 4(6): 658-666; Khalil, M.Y. et al. (2003) Expert Rev. Anticancer Ther.3: 367-380; Bulgari, A.M. et al. (2003) Expert Rev. Anticancer Ther.3: 269-279; Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003) Nature Rev. Drug Discovery 2:92-313; Ciardiello, F. et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6: 2053-2063; and Patent Publication No: US 2003/0157104)。

【 0 0 0 5 】

エルロチニブ(Erlotinib) (例えばエルロチニブ H C 1 (T A R C E V A (登録商標) 又は O S I - 7 7 4 として知られる)) は、E G F R キナーゼの経口的に利用可能なインヒビターである。インビトロで、エルロチニブは結腸直腸癌及び乳房癌を含む多くのヒト腫瘍株の E G F R キナーゼに対して重大な阻害活性を有することを示し (Moyer J.D. et al. (1997) Cancer Res. 57: 4838)、前臨床評価では E G F R を発現している多くのヒト腫瘍異種移植片に対しての活性を示した (Pollack, V.A. et al (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther. 291:739)。エルロチニブは、頭頸部癌を含む多くの適応症の臨床試験において活性を示した (Soulieres, D., et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:77), N S C L C (Perez-Soler R, et al. (2001) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:310a, abstract 1235), CRC (Oza, M., et al. (2003) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22:196a, abstract 785) and MBC (Winer, E., et al. (2002) Breast Cancer Res. Treat. 76:5115a, abstract 445; Jones, R.J., et al. (2003) Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22:45a, abstract 180)。第三相試験において、エルロチニブの単一療法は、進行した治療抵抗性 N S C L C を有する患者において、有意に生存を延長し、疾患進行を遅延させ、肺癌関連の症状の悪化を遅延させた (Shepherd, F. et al. (2004) J. Clin. Oncology, 22:14S (July 15 Supplement), Abstract 7022)。2004年11月、アメリカ食品医薬品局 (F D A) は、少なくとも一つの従来の化学療法投薬計画の失敗の後の、局所的に進行した又は転移性の肺非小細胞癌 (N S C L C) を有する患者の治療のための T A R C E V A (登録商標) を承認した。

癌の治療の有意な前進にもかかわらず、改良された治療は、まだ求められている。

10

20

30

40

50

【0006】

(発明の概要)

本発明の一態様は、神経関連ロイシンリッチリピートタンパク質-1 (N L R R - 1) アンタゴニストの有効量を含む組成物と細胞とを接触させることを含む、哺乳動物細胞においてEGFRシグナリングを阻害する方法を提供する。いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、抗N L R R - 1抗体又はその抗原結合フラグメント、s i R N A又は小分子である。いくつかの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体（例えばA T C C受託番号P T A - 8 7 3 2）を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9である。他の実施態様において、抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9と結合を競合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9と同じエピトープに結合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である。いくつかの実施態様において、キメラ又はヒト化抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有しているハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9の断片を含む。

いくつかの実施態様において、細胞は癌細胞である。いくつかの実施態様において、細胞は、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、膵癌細胞、又は卵巣癌細胞である。

【0007】

20

本発明の別の態様は、EGFR及びN L R R - 1の相互作用を阻害する薬剤の有効量を含む組成物と細胞とを接触させることを含む、哺乳動物細胞においてEGFRシグナリングを阻害する方法を提供する。いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、抗N L R R - 1抗体又はその抗原結合フラグメント、s i R N A又は小分子である。いくつかの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体（例えばA T C C受託番号P T A - 8 7 3 2）を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9である。他の実施態様において、抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9と結合を競合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9と同じエピトープに結合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である。いくつかの実施態様において、キメラ又はヒト化抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有しているハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9からの断片を含む。

30

いくつかの実施態様において、細胞は癌細胞である。いくつかの実施態様において、細胞は、乳がん細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、膵臓癌細胞、又は卵巣癌細胞である。

本発明の更に別の態様は、対象にN L R R - 1アンタゴニストの治療上有効量を投与することを含む、対象の腫瘍細胞の増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、抗N L R R - 1抗体又はその抗原結合フラグメント、s i R N A、又は小分子である。いくつかの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体（例えばA T C C受託番号P T A - 8 7 3 2）を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9である。他の実施態様において、抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9と結合を競合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9と同じエピトープに結合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である。いくつかの実施態様において、キメラ又はヒト化抗体は、A T C C受託番号P T A - 8 7 3 2を有しているハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3 D 1 . 6 . 9からの断片を含む。

40

50

【0008】

いくつかの実施態様において、EGFRは、腫瘍細胞において増幅されない。いくつかの実施態様において、対象は、EGFRアンタゴニストの治療的有効量を更に投与される。いくつかの実施態様において、EGFRアンタゴニストは、抗EGFR抗体又はその抗原結合フラグメント、siRNA、又は小分子である。いくつかの実施態様において、小分子はエルロチニブである。いくつかの実施態様において、対象の腫瘍細胞はEGFRアンタゴニスト耐性である。いくつかの実施態様において、対象の腫瘍細胞はエルロチニブ耐性である。いくつかの実施態様において、NLRR-1アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストの投与は、NLRR-1アンタゴニストの投与を伴わないEGFRアンタゴニストの投与と比較して、腫瘍細胞増殖の阻害を増加させる。

10

いくつかの実施態様において、腫瘍細胞は、乳がん細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、膵臓癌細胞又は卵巣癌細胞である。

【0009】

本発明の別の態様は、対象にNLRR-1アンタゴニストの効果的量を投与することを含む、対象の癌の治療方法を提供する。いくつかの実施態様において、アンタゴニストは、抗NLRR-1抗体又はその抗原結合フラグメント、siRNA、又は小分子である。いくつかの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体（例えばATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9）である。他の実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9と結合を競合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9と同じエピトープに結合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である。いくつかの実施態様において、キメラ又はヒト化抗体は、ATCC受託番号PTA-8732を有しているハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9からの断片を含む。

20

いくつかの実施態様において、EGFRは、癌において増幅していない。いくつかの実施態様において、対象は、更にEGFRアンタゴニストの治療上有効量を投与される。いくつかの実施態様において、EGFRアンタゴニストは、抗EGFR抗体又はその抗原結合フラグメント、siRNA、又は小分子である。いくつかの実施態様において、小分子はエルロチニブである。いくつかの実施態様において、対象の腫瘍細胞はEGFRアンタゴニスト耐性である。いくつかの実施態様において、対象の腫瘍細胞はエルロチニブ耐性である。いくつかの実施態様において、NLRR-1アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストの投与は、NLRR-1アンタゴニストの投与を伴わないEGFRアンタゴニストの投与と比較して、腫瘍細胞増殖の阻害を増加させる。

30

いくつかの実施態様において、腫瘍細胞は、乳がん細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、膵臓癌細胞又は卵巣癌細胞である。

【0010】

本発明の別の態様は、対象へのaNLRR-1アンタゴニストの有効量を投与することを含む、EGFRアンタゴニストの治療に耐性である患者の癌を治療するための方法を提供する。いくつかの実施態様において、抗体はモノクローナル抗体（例えばATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9）である。他の実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9と結合を競合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、ATCC受託番号PTA-8732を有するハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9と同じエピトープに結合する。これまでに他の実施態様において、抗体は、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である。いくつかの実施態様において、キメラ又はヒト化抗体は、ATCC受託番号PTA-8732を有しているハイブリドーマ細胞から産生されるモノクローナル抗体3D1.6.9からの断片を含む。

40

50

いくつかの実施態様において、EGFRは癌において増幅していない。いくつかの実施態様において、対象は、更にEGFRアンタゴニストの治療的有効量を投与される。いくつかの実施態様において、EGFRアンタゴニストは、抗EGFR抗体又はその抗原結合フラグメント、siRNA、又は小分子である。いくつかの実施態様において、小分子はエルロチニブである。いくつかの実施態様において、癌はEGFRアンタゴニスト耐性である。いくつかの実施態様において、癌はエルロチニブ耐性である。いくつかの実施態様において、NLRR-1アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストの投与は、NLRR-1アンタゴニストの投与を伴わないEGFRアンタゴニストの投与と比較して、腫瘍細胞増殖の阻害を増加させる。

いくつかの実施態様において、腫瘍細胞は、乳がん細胞、結腸直腸癌細胞、肺癌細胞、前立腺癌細胞、肝癌細胞、膵臓癌細胞又は卵巣癌細胞である。

【0011】

本発明の更に別の態様は、患者から単離した試験細胞集団及び対照細胞集団に存在するNLRR-1レベルを比較することを含み、試験細胞集団におけるNLRR-1発現量の増加がNLRR-1アンタゴニストでの治療により患者が恩恵を受けられることを示す、NLRR-1アンタゴニストでの治療により恩恵を受け得る患者を同定するための方法を提供する。

本発明の更に別の態様は、患者から単離した試験細胞集団及び対照細胞集団に存在するNLRR-1レベルを比較することを含み、試験細胞集団はEGFRの増幅を含まず、試験細胞集団におけるNLRR-1発現量の増加がNLRR-1アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストの併用治療により患者が恩恵を受けられることを示す、NLRR-1アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストの併用治療により恩恵を受け得る患者を同定するための方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、悪性度の高い前立腺癌におけるNLRR-1発現を示す。1A：マイクロアレイ解析によって測定された前立腺癌のNLRR-1転写産物レベル（ダイヤモンド）及び平均発現（正方形）。Norm、正常；BPH、前立腺肥大症；PIN、前立腺上皮細胞間の腫瘍形成；AdCa、腺癌。1B：マイクロアレイ解析によって測定された前立腺腫瘍のレーザー捕捉顕微解剖からのNLRR-1転写産物レベル。1C：前立腺腫瘍におけるMUC1及びNLRR-1転写産物のRT-PCR解析。量は、ヒト・ゲノムDNA標準曲線を用いて決定された。

【図2】図2は、癌の広域スペクトルにわたるNLRR-1発現を示す。2A：マイクロアレイ解析によって測定された正常（N）対腫瘍（T）のNLRR-1転写産物。2B：マイクロアレイ解析によって測定された多発性骨髄腫及びマントル細胞リンパ腫におけるNLRR-1転写産物の発現。2C：マイクロアレイ解析によって測定された2003の腫瘍におけるERBB2対EGFRの転写産物。2D：マイクロアレイ解析によって測定された2003の腫瘍のNLRR-1対EGFRの転写産物。

【図3】図3は、NLRR-1及びEGFRの免疫共沈降を示す。3A：NLRR-1、EGFR又はブタクサ(ragweed)モノクローナル抗体で処理され、タンパク質Gアガロースビーズで沈降され、NLRR-1ポリクローナル又はEGFRモノクローナル抗体で免疫プロットされたBT549細胞溶解物。3B：NLRR-1、EGFR又はブタクサモノクローナル抗体で処理され、タンパク質Gアガロースビーズで沈降され、EGFR、ERBB2、ERBB3、IGF1R及びアダプチンで免疫プロットされたNCI-H2009細胞可溶化物。

【図4】図4は、NLRR-1トランスフェクションによるERKリン酸化を示す。Cos-7細胞は、pEYFPベクター、又は、NLRR-1.YFPでトランスフェクションされ、飢餓にされ、100ng/mlEGF(4A)又は50nMTGFで刺激され、P-ERKについてフローサイトメトリーによって解析された。50,000のイベントが回収され、FSC、SSC及びYFPについてゲーティングされた。ベクター（）

10

20

30

40

50

; N L R R - 1 - Y F P ()。

【図5】図5は、N L R R 1及びE G F Rの細胞表面発現を示す。5 A : N L R R - 1トランスフェクション細胞のフローサイトメトリーによるN L R R - 1の検出。HEK293細胞は、p E Y F Pベクター、N L R R - 1 . Y F P又はN L R R - 1 C . Y F Pで一過性にトランスフェクションされ、モノクローナル抗体に続くマウスIg - a l e x a 647二次抗体で染色された。N L R R - 1 Cはアミノ酸681で切断され、クラトリン媒介エンドサイトーシス・モチーフを削除する。10,000のイベントが回収され、細胞はF S C、S S C、P I及びY F Pについてゲーティングされた。データは、平均相対蛍光単位を表す。5 B : N L R R - 1 s i R N Aノックダウン後のフローサイトメトリーによるE G F Rの検出。10,000のイベントが回収され、F S C、S S C及びP Iについてゲーティングされた。メジアン蛍光単位は、グラフで示される。

【図6】図6は、腫瘍細胞株におけるN L R R - 1のs i R N Aノックダウンを示す。6 A : 腫瘍細胞株のコントロール及びN L R R - 1 s i R N AノックダウンについてのR T - P C Rを用いたN L R R - 1転写産物解析。データは、R P L 1 9発現を用いて標準化される。6 B : コントロールの割合としてグラフで示されるN L R R - 1 s i R N Aノックダウンされた腫瘍細胞株の細胞生存率異常。データは、三回の平均±S Dで表す。6 C : 腫瘍細胞株におけるN L R R - 1 s i R N Aノックダウンでの飢餓により誘導されるアポトーシス。アポトーシスは、カスパーゼ3 / 7活性によって測定され、生存細胞について対応する複製物で標準化された。データは、三回の平均±S Dで表す。

【図7】図7は、E R K及びA K Tリン酸化を示す。7 A - E : フローサイトメトリーで測定されるE R Kリン酸化。細胞は、飢餓され、ブタクサ又はN L R R - 1モノクローナル抗体の何れかで処理され、A : 10 %血清、B : 5 0 n M T G F 、C : 1 0 0 n g / m l E G F 、D : 1 n g / m l E G F 、E : 0 . 0 1 n g / m l E G F の時間経過で刺激された。ブタクサ() ; N L R R - 1()。7 F - I : フローサイトメトリーで測定されるA K Tリン酸化。細胞は、飢餓され、ブタクサ又はN L R R - 1モノクローナル抗体の何れかで処理され、F : 10 %血清、G : 5 0 n M T G F 、H : 1 n g / m l E G F 、I : 0 . 0 1 n g / m l E G F の時間経過で刺激された。ブタクサ() ; N L R R - 1()。7 J - K : ブタクサ・コントロールの割合としてグラフで示される、2 . 5 M及び0 . 2 5 Mのブタクサ・モノクローナル抗体、N L R R - 1モノクローナル抗体及びエルロチニブと比較したJ : 時間経過、K : 1 6分における5 0 n M T G F 刺激後のE R Kリン酸化。ブタクサ() ; N L R R - 1() ; エルロチニブ2 . 5 M() ; エルロチニブ0 . 2 5 M(×)。フローサイトメトリーのために、5 , 0 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0のイベントは回収され、F S C及びS S Cについてゲーティングされた。

【図8】図8は、N L R R - 1 s i R N Aノックダウン及びエルロチニブの相乗効果を示す。E G F Rインヒビターエルロチニブに対する応答のアポトーシスは、コントロールs i R N A()又はN L R R - 1 s i R N A()を伴う腫瘍細胞株8 A : N C I - H 6 4 7、8 B : N C I - H 1 7 8 1、8 C : N C I - H 2 2 6、8 D : N C I - H 5 2 0、8 E : N C I - H 2 0 0 9、8 F : S K - M E S - 1 (N L R R - 1ネガティブ)において測定された。R、エルロチニブ耐性 (I C 5 0 > 8 M) ; S、エルロチニブ感受性 (I C 5 0 < 2 M)。

【図9】図9は、N L R R - 1及びN L R R - 3の転写産物発現を示す。9 A : 多発性骨髓腫(M M)におけるN L R R - 1のR T - P C R解析。多発性骨髓腫R N Aは、骨髓から得られたC D 1 3 8 +で精製された細胞から単離された。データは、ヒト・ゲノムD N A標準曲線を用いて算出される量を表す。h u B M (ヒト骨髓(Clontech)) ; h u s p l e e n (ヒト脾臓(Clontech)) ; n o r m a l B (正常なB細胞(Clontech)) ; L n C A P (前立腺腫瘍細胞株)。9 B : マイクロアレイ解析で測定された正常(N)対腫瘍(T)組織におけるN L R R - 3発現。

【図10】図10は、様々な腫瘍における転写産物レベル比較を示す。1 0 A : マイクロアレイ解析で測定された2 0 0 3の腫瘍におけるC B L対E G F R。1 0 B : マイクロアレイ解析で測定された2 0 0 3の腫瘍におけるE - カドヘリン(C D H 1)対E G F R。

10

20

30

40

50

【図11】図11は、ブタクサ及びNLRR-1抗体でのERKリン酸化を示す。11A：ブタクサ又はNLRR-1モノクローナル抗体、飢餓及び10%血清での刺激処理後のリン酸化ERKのフローサイトメトリー・プロット。5,000~10,000のイベントは回収され、FSC及びSSCについてゲーティングされた。11B：ブタクサ・コントロールに対する割合としてグラフ化された、独立して行われた5つの実験の10%血清刺激によるERKリン酸化のNLRR-1抗体阻害の概要。データは、平均±SEを表す。片側T-検定結果は、8分($p = 0.013$)及び16分($p = 0.023$)において統計学的に有意である(*)。11C：フローサイトメトリーで測定される血清刺激によるNCI-H520ERKリン酸化。ブタクサ()；NLRR-1()。

【図12】図12は、NLRR-1及びCYFP融合を示す。12A：融合タンパク構築物のダイアグラム、ホワイトボックス：NLRR-1細胞外ドメイン、斜線のボックス：膜貫通領域、ブラックボックス：クラトリン媒介エンドサイトーシス・モチーフ、陰をつけられたボックス：YFP。12B：融合タンパクのフローサイトメトリーによるNLRR-1の検出：HEK293細胞はpEYFPベクター、NLRR-1.YFP又はNLRR-1C.YFPで一過性にトランスフェクションされ、モノクローナル抗体に続くマウスIg-galex a 647二次抗体で染色された。10,000のイベントは回収され、細胞はFSC、SSC、PI及びYFPについてゲーティングされた。

【図13】図13は、マイクロアレイ解析で測定されたTGF(13A)及びEGF(13B)の正常(N)及び腫瘍(T)組織における転写産物レベルを示す。

【図14】図14は、pEYFPベクター、NLRR-1.YFP又はNLRR-1C.YFPで一過性にトランスフェクションされ、モノクローナル抗体に続くマウスIg-g-galex a 647二次抗体で染色され、フローサイトメトリーによって解析されたHEK293細胞を示す。10,000のイベントは回収され、細胞はFSC、SSC、PI及びYFPについてゲーティングされた。

【図15】図15は、ヒトNLRR-1のアミノ酸配列(配列番号：1)を示す。

【0013】

詳細な説明

定義

ここに用いられる用語「神経関連ロイシンリッチリピート」又は「NLRR」は、別途示されない限り、天然又は変異体(天然又は合成にせよ)NLRRポリペチドを意味する。一般に、NLRRタンパク質ファミリーは11又は12のLRRs(免疫グロブリンドメイン)及びIII型フィプロネクチン・ドメイを含む(Bormann等、1999; Fukamachi等、2001; Hayata等、1998)。NLRRファミリーのメンバーは、NLRR-1、NLRR-2、NLRR-3、NLRR-4、NLRR-5及びNLRR-6を含む。ヒトNLRR-1は、単離され、特性を決定されている。例えば、Genebank受託番号AAQ88679、米国特許第7,189,813号及び米国特許公開番号20050208523及び米国特許公開番号20060002943を参照のこと(ここにその開示の全てが援用されたものとする)。ヒトNLRR-1の核酸配列及びアミノ酸配列は、図15に提示される。

用語「野生型NLRR」は、一般に、天然に生じるNLRRタンパク質のアミノ酸配列を含むポリペチドを意味する。用語「野生型NLRR配列」は、一般に、天然に生じるNLRRにおいて見いだされるアミノ酸配列を意味する。

ここに用いられる用語「NLRR変異体」は、一つ以上のアミノ酸変異を天然のNLRR配列に含むNLRRポリペチドを意味する。選択的に、一つ以上のアミノ酸変異は、アミノ酸置換(s)を含む。

「天然配列」ポリペプチドは、天然に生じるポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。したがって、天然配列ポリペチドは、あらゆる哺乳動物の天然に生じるポリペプチドのアミノ酸配列を有してもよい。このような天然配列ポリペチドは、天然から単離されてもよく、組換え又は合成手段によって製造されてもよい。用語「天然の配列」ポリペプチドは、具体的には天然に生じる切断型又は分泌型のポリペプチド(例え

10

20

30

40

50

ば細胞外ドメイン配列)、天然に生じる変異型(例えば選択的にスプライスされた型)及び天然に生じるアレル変異体を含む。

ポリペプチド「変異体」は、天然配列ポリペプチドと少なくとも約80%アミノ酸配列同一性を有する生物学的活性なポリペプチドを意味する。このような変異体は、例えば、一つ以上のアミノ酸残基がN-又はC末端において付加又は欠失されたポリペプチドを含む。通常、変異体は、天然配列ポリペプチドと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸配列同一性及びさらにより好ましくは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0014】

「EGFR」は、Ullrich等 (Nature (1984) 309:418425) に記載される受容体チロシンキナーゼ・ポリペプチドである上皮増殖因子受容体を意味し、あるいはHer-1及びc-erbB遺伝子産物とその変異体(例えばEGFRvIII)を意味する。EGFRの変異体は、もまた欠失、置換及び挿入の変異体を含み、例えばそれらはLynch等 (New England Journal of Medicine 2004, 350:2129) Paez等 (Science 2004, 304:1497)、Pao等 (PNAS 2004, 101:13306) に記載されている。

「生体試料」(「試料」又は「組織又は細胞試料」と交換可能に用いられる)は、個体から得られる種々の試料型を含み、診断又はモニタリングアッセイにおいて用いてよい。定義は、生物学的起源の血及び他の液体試料、固体組織サンプル(例えば生検材料又は組織培養)又は、そこから由来される細胞及びその継代物を含む。定義は、獲得後に、例えば試薬による処理、可溶化又は特定の成分(例えばタンパク質又はポリヌクレオチド)の濃縮、又は切片作製のための半固体又は固体マトリックスへの包埋などのあらゆる操作をされた試料を含む。用語「生体試料」は臨床試料を含み、更に培養細胞、細胞上清、細胞可溶化物、血清、プラズマ、生物学的体液及び組織試料を含む。生体試料の供給源は、生、凍結及び/又は保存された器官又は組織試料又は生検又は吸引物;血液又はあらゆる血液成分;生体体液(例えば脳脊髄液、羊水、腹膜体液又は間質液);対象の妊娠又は発達のあらゆる時期からの細胞であってよい。いくつかの実施態様において、生体試料は、原発性又は転移性の腫瘍からの得られる。生体試料は、性質(例えば防腐剤、血液凝固阻止剤、バッファ、固定液、栄養分、抗生物質、等)の天然には混合されない化合物を含んでもよい。

【0015】

「NLRR-1アンタゴニスト」(「NLRR-1インヒビター」と交換可能に用いられる)は、NLRR-1機能と干渉する薬剤である。NLRR-1アンタゴニストの例は、NLRR-1に結合する抗体(「抗NLRR-1抗体」);小分子NLRR-1アンタゴニスト;アンチセンス及び抑制RNA(例えばshRNA又はsiRNA)分子を含む。好ましくは、NLRR-1アンタゴニストは、NLRR-1に結合する抗体又は小分子である。特定の実施態様では、NLRR-1アンタゴニストは約1,000nM以下のNLRR-1への結合能(解離定数)を有する。もう一つの実施態様では、NLRR-1アンタゴニストは約100nM以下のうNLRR-1への結合能を有する。もう一つの実施態様では、RLL-1アンタゴニストは約50nM以下のNLRR-1への結合能を有する。特定の実施態様では、NLRR-1アンタゴニストは1,000nM以下のIC50でNLRR-1を阻害する。もう一つの実施態様では、NLRR-1アンタゴニストは500nM以下のIC50でNLRR-1を阻害する。もう一つの実施態様では、NLRR-1アンタゴニストは50nM以下のIC50でNLRR-1を阻害する。

「EGFRアンタゴニスト」(「EGFRインヒビター」と交換可能に用いられる)は、EGFR活性化又は機能と干渉する薬剤である。EGFRアンタゴニストの例は、EGFRに結合するEGFR抗体(「抗EGFR抗体」);EGFRリガンド抗体;小分子EGFRアンタゴニスト;EGFRチロシンキナーゼ・インヒビター;アンチセンス及び抑制RNA(例えばshRNA及びsiRNA)分子を含む(WO2004/87207参照)。好ましくは、EGFRアンタゴニストは、EGFRに結合する抗体又は小分子である。いくつかの実施態様において、EGFRアンタゴニストはEGFRを目標とする

10

20

30

40

50

薬剤である。特定の実施態様では、EGFRアンタゴニストは約1,000nM以下のEGFRへの結合能(解離定数)を有する。もう一つの実施態様では、EGFRアンタゴニストは約100nM以下のEGFRへの結合能を有する。もう一つの実施態様では、EGFRアンタゴニストは約50nM以下のEGFRへの結合能を有する。特定の実施態様では、EGFRアンタゴニストは1,000nM以下のIC50でEGFRシグナリングを阻害する。もう一つの実施態様では、EGFRアンタゴニストは500nM以下のIC50でEGFRシグナリングを阻害する。もう一つの実施態様では、EGFRアンタゴニストは50nM以下のIC50でEGFRシグナリングを阻害する。

EGFRアンタゴニストは、EGFRに結合し、EGFR活性化を阻害する治療剤を含む。このような薬剤の例は、EGFRに結合する抗体及び小分子を含む。EGFRに結合する抗体の例は、MAb579(ATCC CRL HB 8506)、MAb455(ATCC CRL HB 8507)、MAb225(ATCC CRL 8508)を含む、MAb528(ATCC CRL 8509)(米国特許第4,943533号、Mendelsohn等参照)及びその変異体、例えばキメラ化225(C225又はCetuximab; ERBUTIX(登録商標))及び再構築されたヒト225(H225)(国際特許公報第96/40210号、Imclone Systems Inc.参照); IMC-11F8(完全にヒトEGFRを標的とした抗体(Imclone))；I型変異EGFRに結合する抗体(米国特許第5,212,290号)；米国特許第5,891,996号にて説明されるEGFRに結合するヒト化及びキメラ抗体；及びEGFRに結合するヒト抗体(例えばABX-EGF(国際特許公報第98/50433号(Abgenix)を参照)；EMD5590(Stagliotto et al. Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996))；EMD7200(matumumab)(EGF及びTGF- β とEGFRとの結合において競合するEGFRに対するヒト化EGFR抗体)；及びmAb806又はヒト化mAb806(Johns等、J. Biol. Chem. 279(29): 30375-30384 (2004))を含む。抗EGFR抗体は細胞障害性剤とコンジュゲートされていてもよく、したがって免疫複合体(EP659,439A2、Merck Patent GmbHを参照)を作製する。

【0016】

EGFRアンタゴニストは、US5616582、US5457105、US5475001、US5654307、US5679683、US6084095、US6265410、US6455534、US6521620、US6596726、US6713484、US5770599、US6140332、US5866572、US6399602、US6344459、US6602863、US6391874、WO9814451、WO9850038、WO9909016、WO9924037、WO9935146、WO0132651、US6344455、US5760041、US6002008、US5747498に記載されている化合物のような小分子を含む。特定の小分子EGFRアンタゴニストは、OSI-774(CP-358774、エルロチニブ, OSI Pharmaceuticals)；PD183805(CI1033、2-プロペンアミド、N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]-6-キナゾリニル]-、ジハイドロクロリド、ファイザーInc.)；Iressa(登録商標)(ZD1839、ゲフィチニブ、AstraZeneca)；ZM105180((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル-アミノ)キナゾリン、Zeneca)；BIBX-1382(N8-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N2-(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン、Boehringer Ingelheim)；PKI-166((R)-4-[4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]フェノール)；(R)-6-(4-ヒドロキシフェニル)-4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン)；CL-387785(N[4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチニアミド)；EKB-569(N[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-3-シアノ-7-エトキシ-6-キナゾリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブテンアミド)；lapatinib(Tykerb、GlaxoSmithKline)；ZD6474(Zactima、AstraZeneca)；CUDC-101(Curis)；canertinib(CI-1033)；

10

20

30

40

50

A E E 7 8 8 (6 -[4 -[(4-エチル-1-ピペラジニル)メチル]フェニル]-N -[(1 R)-1 -フェニルエチル]-7 H -ピロロ[2 , 3 -d]ピリミジン-4 -アミン, 国際特許公報第2 0 0 3 0 1 3 5 4 1号、Novartis) 及び P K I 1 6 6 (4 -[4 -[(1 R)-1 -フェニルエチル]アミノ]-7 H -ピロロ[2 , 3 -d]ピリミジン-6 -イル]-フェノール、国際特許公報第9 7 0 2 2 6 6号、Novartis)を含む。

「 E G F R 活性化」は、 E G F R の活性化又はリン酸化を意味する。一般に、 E G F R 活性化は、例えは E G F R 又は基質ポリペプチドのチロシン残基をリン酸化する E G F R 受容体の細胞内キナーゼドメインによって生じるシグナル伝達を生じる。 E G F R 活性化は、 E G F R を含む E G F R ダイマーに結合する E G F R リガンドによって媒介され得る。 E G F R ダイマーへの E G F R リガンド結合は、ダイマーにおける一つ以上の E G F R のキナーゼドメインを活性化し、このことにより一つ以上の E G F R におけるチロシン残基のリン酸化及び/又は付加的な基質ポリペプチドにおけるチロシン残基のリン酸化を生じさせ得る。

【 0 0 1 7 】

「 E G F R アンタゴニスト耐性」癌又は「 E G F R アンタゴニストでの治療に耐性である」癌は、その癌患者が E G F R アンタゴニスト治療を受けても進行し(すなわち、患者は「 E G F R 抵抗性」である)、あるいは E G F R アンタゴニストに基づく治療投薬計画を完了した後 12 カ月以内(例えは、1 、 2 、 3 又は 6 カ月以内で)で進行したことを意味する。例えは、 T 7 9 0 M 変異 E G F R を含む癌は、エルロチニブ及びゲフィチニブ治療に耐性である。「 E G F R アンタゴニスト耐性」腫瘍細胞は、 E G F R アンタゴニストでの治療に反応しない腫瘍細胞を意味する。例えは、腫瘍細胞は、 E G F R アンタゴニストでの治療後に生存し、アポトーシスを起こさない。

「エルロチニブ耐性」癌又は「エルロチニブでの治療に耐性である」癌は、その癌患者がエルロチニブに基づく治療を受けても進行し(すなわち、患者は「エルロチニブ抵抗性」である)、あるいはエルロチニブに基づく治療投薬計画を完了した後 12 カ月以内(例えは、1 、 2 、 3 又は 6 カ月以内で)で進行したことを意味する。「エルロチニブ耐性」腫瘍細胞は、エルロチニブでの治療に反応しない腫瘍細胞を意味する。例えは、腫瘍細胞は、エルロチニブでの治療後に生存し、アポトーシスを起こさない。

ここに用いられる用語「リガンド非依存性」は、例えは受容体シグナル活性に対して用いられると、リガンドの存在に依存しないシグナル活性を意味する。例えは、 E G F R シグナリングは、 H E R 2 などの H E R ファミリーの他のメンバーとの二量体化から生じ得る。リガンド非依存的なキナーゼ活性を有する受容体は、キナーゼ活性の付加的な活性化を起こすために、その受容体へのリガンドの結合を必ずしも妨げるわけではない。

ここに用いられる用語「恒常的」は、例えは受容体キナーゼ活性に対して用いられると、リガンド又は他の活性化分子の存在に依存しない受容体の連続的なシグナル活性を意味する。例えは、多形性神経膠芽腫において共通に見いだされる E G F R 変異体 I I I (E G F R v I I I) は、その細胞外ドメインの多くを欠失している。リガンドは E G F R v I I I を結合することができないにもかかわらず、それは連続的に活性で、異常な増殖及び生存と関連している。受容体の性質に従い、活性の全ては恒常的であってもよく、受容体の活性は他の分子(例えはリガンド)の結合によって更に活性化されてもよい。受容体の活性化を導く細胞のイベントは、当業者の間で周知である。例えは、活性化は例えは二量体化、三量体形成など高次の受容体複合体へのオリゴマー形成を含んでもよい。複合体は、一種類のタンパク質を含んでもよい(すなわちホモ複合体)。あるいは、複合体は、少なくとも 2 つの異なるタンパク質種を含んでもよい(すなわちヘテロ複合体)。複合体形成は、例えは、細胞表面に正常又は変異型の受容体の過剰発現によって生じ得る。複合体形成は、特定の変異又は受容体の変異によってもまた生じ得る。

【 0 0 1 8 】

「遺伝子増幅」なる語句は、遺伝子又は遺伝子断片の複数のコピーが特定の細胞又は細胞系統において形成されるプロセスを意味する。複製された領域(増幅された D N A のストレッチ)は、しばしば「アンプリコン」と称される。通常は、生成されるメッセンジャー

10

20

30

40

50

— R N A (m R N A) の量、即ち遺伝子発現レベルも、発現された特定遺伝子の作成されたコピー数に比例して増加する。

「 E G F R 発現、増幅又は活性化を示す」癌又は生体試料は、診断検査において、 E G F R を発現（過剰発現を含む）する、増幅された E G F R 遺伝子を有する、及び／又は E G F R の活性化又はリン酸化を示すものである。

「 E G F R 発現、増幅又は活性化を示さない」癌又は生体試料は、診断検査において、 E G F R を発現（過剰発現を含む）しない、増幅された E G F R 遺伝子を有さない、及び／又は E G F R の活性化又はリン酸化を示さないものである。

「 E G F R 活性化を示す」癌又は生体試料は、診断検査において、 E G F R の活性化又はリン酸化を示すものである。このような活性化は直接的に（例えば、 E G F R リン酸化を E L I S A で測定することによって）又は間接的に決定することができる。
10

「 E G F R 活性化を示さない」癌又は生体試料は、診断検査において、 E G F R の活性化又はリン酸化を示さないものである。このような活性化は直接的に（例えば、 E G F R リン酸化を E L I S A で測定することによって）又は間接的に決定することができる。

「 E G F R 増幅を示す」癌又は生体試料は、診断検査において、増幅された E G F R 遺伝子を有するものである。

「 E G F R 過剰発現又は増幅」を伴う癌細胞は、同じ組織型の非癌細胞から比較して、 E G F R タンパク質又は遺伝子の非常に高いレベルを有するものである。このような過剰発現は、遺伝子増幅、又は増加した転写又は翻訳によって生じ得る。 E G F R 過剰発現又は増幅は、細胞の表面に存在する E G F R タンパク質の増加したレベルを評価することによって（例えば免疫組織化学アッセイ； I H C により）、診断又は予後のアッセイにおいて決定され得る。あるいは又はさらに、細胞における E G F R - コード化核酸のレベルは、例えば蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ F I S H ； 1998 年 10 月に発行された国際特許公報第 98 / 45479 号を参照）、サザンプロッティング又はポリメラーゼ連鎖反応法（ P C R ）技術（例えば定量的リアルタイム P C R (q R T - P C R) ）により測定してもよい。上記のアッセイを除いて、様々なインビオ・アッセイは、熟練した実務者にとって利用可能である。例えば、患者の身体内の細胞に選択的に例えば放射性同位元素などで検出可能に標識化された抗体を暴露してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば放射能の外部スキャニング又は予め抗体に暴露された患者からの生検を解析することによって評価することができる。
20

「 E G F R を過剰発現又は増幅しない」癌細胞は、同じ組織型の非癌細胞と比較して、正常よりも高い E G F R タンパク質又は遺伝子のレベルを有しないものである。

ここに用いられる用語「変異」は、野生型タンパク質又は核酸と比較して、特定のタンパク質又は核酸（遺伝子、 R N A ）のアミノ酸又は核酸の配列の相違を意味する。

【 0019 】

本明細書中で用いる「突然変異」なる用語は、野生型タンパク質又は核酸と比べて、それぞれ特定のタンパク質又は核酸（遺伝子、 R N A ）のアミノ酸配列又は核酸配列の差異を意味する。変異したタンパク質又は核酸は、遺伝子の 1 の対立遺伝子（ヘテロ接合体）又は両方の対立遺伝子（ホモ接合体）から発現されうるか、遺伝子の 1 の対立遺伝子（ヘテロ接合体）又は両方の対立遺伝子（ホモ接合体）にみられ、体細胞又は生殖細胞系でありうる。
40 本発明において、通常突然変異は体細胞である。突然変異には、配列再編成、例えば挿入、欠失及び点突然変異（单一のヌクレオチド／アミノ酸多型を含む）が含まれる。

「阻害する」ことは、参照物質と比較して、活性、機能及び／又は量を減らす又は低くすることである。

タンパク質「発現」は、遺伝子にコード化される情報のメッセンジャー R N A (m R N A) への転換、次いでタンパク質への転換を意味する。

ここに、対象のタンパク質を「発現する」試料又は細胞は、タンパク質をコード化している m R N A 又はタンパク質（その断片を含む）が試料又は細胞に存在することが決定されるものである。「免疫複合体」（「抗体 - 薬剤コンジュゲート」又は「 A D C 」と交換可能に称される）は、一つ以上の細胞障害性剤（例えば化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、
50

毒素（例えばタンパク質毒素、バクテリア、菌類、植物又は動物の起源の酵素的に活性な毒素又はその断片）、又は放射性同位元素（すなわちラジオ・コンジュゲート））にコンジュゲートされた抗体を意味する。

【0020】

本明細書中で用いる「F c 領域」なる用語は、一般的にイムノグロブリン重鎖のC末端ポリペプチド配列を含有してなるダイマー複合体を指すものであり、C末端ポリペプチド配列は無傷の抗体のパパイン消化により生成されるものである。F c 領域は天然のF c 配列又は変異体F c 配列を含有しうる。免疫グロブリン重鎖のF c 配列の境界はまちまちであるが、ヒトIgG重鎖のF c 配列は、通常、およそCys226位又はおよそPro230位のアミノ酸残基からFc配列のカルボキシル末端まで延びていると定義される。免疫グロブリンのF c 配列は、通常、2つの定常ドメイン、1つのCH2ドメイン及び1つのCH3ドメインを含み、場合によってはCH4ドメインを含む。F c 領域のC末端のリジン（EU番号付けシステムによる残基447）は、例えば抗体の精製中又は抗体をコード化している核酸の組換えエンジニアリングによって取り除かれてもよい。したがって、この発明のF c 領域を有する抗体を含む組成物は、K447を有する抗体、全てK447が取り除かれた抗体、又はK447残基を有する抗体及び有さない抗体の混合物を含み得る。

ここで「F c ポリペプチド」はF c 領域を形成するポリペプチド鎖の一つを意味する。F c ポリペプチドは、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄サブタイプ、IgA、IgE、IgD又はIgMなどの任意の好適なイムノグロブリンから得ることができる。いくつかの実施態様では、F c ポリペプチドは野生型のヒンジ配列の一部又はすべてを（一般的にはそのN末端に）含有してなる。いくつかの実施態様では、F c ポリペプチドは機能的ヒンジ配列又は野生型ヒンジ配列を含有していない

ここで用いる「ヒンジ領域」、「ヒンジ配列」及びその変形例は、例えば、Janeway等、Immuno Biology: the immune system in health and disease, (Elsevier Science Ltd., NY) (第4版, 1999); Bloom等, Protein Science (1997), 6:407-415; Humphreys等, J. Immunol. Methods (1997), 209:193-202に示すように、当該分野に知られている意味を含む。

本願明細書及び請求項の全体にわたる、免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、ここに明示的に援用されるKabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)におけるEUインデックスである。「カバットに記載のEUインデックス」は、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを意味する。

【0021】

用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、特にそれらが所望の生物学的活性度を示す限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、一価抗体、多価抗体及び抗体フラグメントを含む。

「抗体断片」は、インタクト抗体の部分のみを含有するものであり、該部分はインタクト抗体中に存在する場合、その部分に通常伴う機能の少なくとも一、好ましくはほとんど又はすべてを保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全抗体の抗原結合部位を含有するため、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片、例えばF c 領域を含有するものは、完全抗体に存在するF c 領域が通常関連する少なくとも一の生物学的機能、例えばF c Rn結合、抗体半減期調節、ADCC機能及び補体結合を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全抗体と実質的に同じインビボ半減期を有する一価抗体である。例えばそのような抗体断片は、該断片にインビボ安定性を供与しうるF c 配列に結合した抗原結合アーム上に含みうる。一実施態様では、本発明の抗体は、国際公開公報2005/063816に記載の一アーム形抗体、例えば、「ノブ(knob)」及び「孔(hole)」を構成するFc突然変異を含む抗体である。例えば、孔(hole)突然変異は、F c ポリペプチド内のT366A、L368A及び/又はY407Vの一又は複数であり、腔(cavity)突然変異はT366Wでありうる。

10

20

30

40

50

「遮断(ブロッキング)」抗体又は抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低減するものである。好適な遮断抗体又はアンタゴニスト抗体は、完全に抗原の生物学的活性を阻害する。

別途示されない限り、「多価抗体」という表現は、この明細書の全体にわたって、3つ以上の抗原結合部位を含む抗体を意味するために用いられる。多価抗体は、好ましくは3つ以上の抗原結合部位を有するように設計され、一般に天然配列のIgM又はIgA抗体ではない。

【0022】

「Fv」断片は、完全な抗原認識および結合部位を含む抗体断片である。この領域は、堅く結合した重鎖可変ドメイン1つと軽鎖可変ドメイン1つの二量体から成り、その結合は自然界では例えばscFvにおけるように共有結合である。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してV_H - V_L二量体の表面の抗原結合部位を確定するのはこの構成である。この6つのCDRまたはそのサブセットは、共同して抗体に抗原結合特異性を賦与する。しかし、単一の可変ドメイン(または抗原に特異的なCDRを3つしか含んでいないFvの半分)でさえ、通常は結合部位全体より親和性は低いものの、抗原を認識して結合する能力を有する。

本明細書で使われる場合、「抗体可変ドメイン」は相補性決定領域(CDR; すなわち、CDR1、CDR2およびCDR3)ならびにフレームワーク領域(FR)のアミノ酸配列を含む、抗体分子の軽鎖および重鎖の部分を指す。V_Hは重鎖の可変ドメインを指す。V_Lは軽鎖の可変ドメインを指す。本発明で使用される方法によると、CDRとFRに割り当てられるアミノ酸位置はカバットに従って規定される(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987及び1991))。抗体または抗原結合断片のアミノ酸のナンバリングも、カバットのそれに準じる。

本明細書で使われるよう、用語「相補性決定領域(CDR; すなわち、CDR1、CDR2およびCDR3)」は、抗原結合のために存在している必要がある抗体可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは、一般的にCDR1、CDR2およびCDR3と同定される3つのCDR領域を持つ。各相補性決定領域はカバットが記載しているような「相補性決定領域」からのアミノ酸残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基約24~34(L1)、50~56(L2)、および89~97(L3)ならびに重鎖可変ドメインの31~35(H1)、50~65(H2)および95~102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD.(1991))、および/または「超可変ループ」からの残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基約26~32(L1)、50~52(L2)および91~96(L3)ならびに重鎖可変ドメインの26~32(H1), 53~55(H2)および96~101(H3); Chothia及びLesk, J.Mol.Biol.196:901-917頁(1987))を含んでもよい。いくつかの場合には、相補性決定領域はカバットの記載により定義されているCDR領域および超可変ループの両方からのアミノ酸を含むことができる。例えば、抗体4D5の重鎖のCDRH1は、アミノ酸26~35を含む。

「フレームワーク領域」(以下FRと称す)は、CDR残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、一般的にFR1、FR2、FR3およびFR4と同定される4つのFRを持つ。CDRがカバットの定義に従うならば、軽鎖FR残基は残基約1~23(LCFR1)、35~49(LCFR2)、57~88(LCFR3)および98~107(LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は重鎖残基の残基約1~30(HCFR1)、36~49(HCFR2)、66~94(HCFR3)および103~113(HCFR4)に位置する。CDRが超可変ループからのアミノ酸残基を含むならば、軽鎖FR残基は軽鎖の残基約1~25(LCFR1)、33~49(LCFR2)、53~90(LCFR3)および97~107(LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は重鎖残基の残基約1~25(HCFR1)、33~52(HCFR2)、56~95(HCFR3)および102~113(HCFR4)に位置する。いくつかの場合には、CDRがカバットの定義によるCDRと超可変ループの両方からのアミノ酸を含む場合、FR残基はそ

10

20

30

40

50

れに応じて調節されるであろう。例えば、CDRH1がアミノ酸H26-H35を含むとき、重鎖FR1残基は位置1~25にあり、FR2残基は位置36~49にある。

「Fab」断片は、軽鎖の可変および定常ドメインと重鎖の可変ドメインおよび第1の定常ドメイン(CH1)を含む。Fab(ab')₂抗体断片は一対のFab断片を含み、通常これらはその間にあるヒンジシスティンによってそのカルボキシ末端の近くで共有結合により連結される。抗体断片の他の化学的結合も当技術分野で公知である。

【0023】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は抗体のV_HおよびV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、FvポリペプチドはV_HおよびV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーはscFvが抗原結合にとって望ましい構造を形成するのを可能にする。scFvのレビューに関しては、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, RosenbergおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, 269-315頁(1994)を参照。

用語「ダイアボディ」は、抗原結合部位を2つ備える小さな抗体断片を指し、この抗体断片は同じポリペプチド鎖(V_HおよびV_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖の上の2つのドメインの間で対合させるにはあまりに短いリンカーを用いて、このドメインを他の鎖の相補性ドメインと強制的に対合させ、2つの抗原結合部位をつくる。ダイアボディについては、例えば欧州特許第404097号; WO93/11161号; およびHollinger他, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:6444-6448頁(1993)でさらに詳しく記載されている。

表現「線状抗体」はZapata他, Protein Eng., 8(10):1057-1062頁(1995)に記載されている抗体を指す。つまり、これらの抗体は相補性の軽鎖ポリペプチドと共に一対の抗原結合領域を形成する、一対のタンデムFdセグメント(V_H-C_H1-V_H-C_H1)を含む。線状抗体は二重特異性または単一特異性であり得る。

【0024】

「モノクローナル」との修飾詞は、ほぼ均一な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作ることができ、それらの技術には例えばハイブリドーマ法(例えば、Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975); Hongo等, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow等, Antibodies: A laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版 1988); Hammerling等: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)、ファージディスプレイ法(例えば、Clarkson等, Nature, 352:624-628 (1991); Marks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004); Lee等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)参照)、及びヒト免疫グロブリン座位又はヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子の一部又は全部を有する動物においてヒト又はヒト様抗体を产生する技術(例えば、WO1998/24893; WO1996/34096; WO1996/33735; WO1991/10741; Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 及び同第5,661,016号; Marks等, Bio/Technology, 10:779-783 (1992); Longerg等, Nature, 368:856-859 (1994); Morrison, Nature, 368:812-813 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnology, 14:845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology, 14:826 (1996); 及びLongerg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995))が含まれる。

ここに記載のモノクローナル抗体は、特に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種から由来するか、特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一か相同である一方、鎖の残りが、他の種から由来するか、他の抗体クラス又はサブクラスに属

10

20

30

40

50

する抗体の対応する配列と同一か相同である「キメラ」抗体、並びにそれらが所望の生物活性を示す限りはそのような抗体の断片を含む(米国特許第4816567号；及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。キメラ抗体は、抗体の抗原結合部位が、例えば興味の抗原により免疫化したマカクザルによって産生される抗体由来であるPRIMATIZED(登録商標)抗体を含む。

【0025】

非ヒト(例えば齧歯類)抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト抗体から得られた最小配列を含むキメラ抗体である。大部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類のような所望の抗体特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、FR領域は結合親和性を改良する1又は複数のアミノ酸置換を含んでもよい。FRのこれらのアミノ酸置換の数は、典型的にはH鎖で6以下であり、L鎖で3以下である。ヒト化抗体は、場合により免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986) ; Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988) ; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。

「ヒト抗体」は、ヒトにより生成される抗体のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基を有するもの、及び/又はここに開示するようなヒト抗体をつくる既知の技術のいずれかを使用して、つくられたものである。ヒト抗体のこのような定義は、非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を特に除く。ヒト抗体は、様々な従来技術を使用して生成することができる。一実施態様では、ファージライブラリがヒト抗体を発現する場合、このようなファージライブラリからヒト抗体を選択する(Vaughan他, Nature Biotechnology, 14:309-314, 1996; Sheets他 PNAS, アメリカ合衆国、95:6157-6162, 1998; HoogenboomおよびWinter, J. Mol. Biol., 227:381, 1991; Marks他, J. Mol. Biol., 222:581, 1991)。ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン座を、トランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が特異的にまたは完全に非活性化されているマウスに導入することにより生成することができる。実験によりヒト抗体の産生が確認されており、それは遺伝子の再配列、アセンブリ、および抗体のレパートリーを含め、すべての面でヒトに見られる抗体産生に非常に類似している。この方法は、例えば、米国特許第5,545,807号、同第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,661,016号、およびMarks他, Bio/Technology, 10: 779-783, 1992; Lonberg他, Nature, 368: 856-859, 1994; Morrison, Nature, 368:812-13, 1994; Fishwild他, Nature Biotechnology, 14: 845-51, 1996; Neuberger, Nature Biotechnology, 14: 826, 1996; Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol., 13:65-93, 1995。或いは、ヒト抗体は、標的となる抗原を志向する抗体を産生するBリンパ球(このようなBリンパ球は個体から回収できるか、またはインビボで免疫することができる)の不死化により調製することもできる。例えば、Cole他, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77, 1985; Boerner他, J. Immunol., 147 (1): 86-95, 1991; および米国特許第5,750,373号を参照のこと。

「裸の抗体」は、異種性の分子、例えば細胞障害性成分又は放射標識にコンジュゲートされない抗体である。

【0026】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の変更を有する抗体であって、そのような変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性を向上させる

10

20

30

40

50

。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks他は、Bio/Technology, 10:779-783(1992)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDRおよび/またはフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci., USA 91:3809-3813(1994); Schier他、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton他、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson他、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); およびHawkins他、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

指定された抗体の「生物学的特徴」を有している抗体は、同じ抗原に結合する他の抗体から区別されるその抗体の生物学的特徴の一つ以上を有するものである。 10

対象の抗体により結合される抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような日常的な交差ブロッキングアッセイを行うことができる。

本発明のアミノ酸配列を含んでいる抗体、又は、ポリペプチドの半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように、抗体（特に抗体フラグメント）にサルベージ受容体結合エピトープを付けることができる。

例えば、設計された核酸分子によって発現される融合タンパク質がサルベージ受容体結合エピトープ及び本発明のポリペプチド配列を含むように、サルベージ受容体結合エピトープをコード化している核酸分子は、本発明のポリペプチド配列をコード化している核酸にインフレームで結合させることができる。ここで使用しているように、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子（例えばIgG1、IgG2、IgG3、又は、IgG4）のインビボ血清半減期を増加させる役割を果たすIgG分子のFc領域のエピトープを意味する（例えばGhetie等、Ann. Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)、表1）。そのFc領域における置換及び増加した血清半減期を有する抗体は、国際特許公報第00/42072号、国際特許公報第02/060919号；Shields等、J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001); Hinton, J. Biol. Chem. 279:6213-6216 (2004)にも記載されている。もう一つの実施態様では、血清半減期は、例えば他のポリペプチド配列を付けることによっても増加させることができる。例えば、本発明の方法において有用な抗体又は他のポリペプチドは、血清アルブミンが抗体又はポリペプチドに結合するように（例えば、そのようなポリペプチド配列は国際特許公報第01/45746号に開示される）、FcRn受容体又は血清アルブミン結合ペプチドと結合する血清アルブミン又は血清アルブミンの一部に付けることができる。 20

【0027】

「単離された」ポリペプチド又は「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及びタンパク質様又は他の非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（1）ローリー(Lowry)法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、（2）スピニングカップシーカエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは（3）クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサルツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。 40

「断片」により、对照核酸分子又はポリペプチド完全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、またはそれより多く含むポリペプチド又は核酸分子の部分を意味する。断片は10、20、30、40、50、60、70、80、90又は100、200、300、400、500、650 50

00又はそれより多いヌクレオチド又は10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200アミノ酸又はそれより多くを含む。

「処理」は、治療上の処理及び予防又は防止処置の両方を意味する。処理を必要とするものとして、すでに良性、前癌性又は非転移性の腫瘍を有している、又は癌の発生又は再発が妨げられるべきものを含む。

「治療的有効量」という用語は、哺乳類の疾病や疾患の治療のために有効な薬剤の量に相当する。癌の場合は、治療的有効量の薬剤により、癌細胞の数を減少させ；腫瘍の大きさを小さくし；癌細胞の周辺器官への浸潤を阻害(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)し；腫瘍の転移を阻害(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)し；腫瘍の成長をある程度阻害し；及び／又は疾患に関連する一又は複数の症状をある程度和らげることが可能である。ある程度、薬剤は、成長を妨げ及び／又は現存の癌細胞を殺すことが可能で、細胞分裂停止性及び／又は細胞障害性である。癌治療に対しては、インビボにおける効力は、例えば生存期間、病状の進行時間(TTP)、応答速度(RR)、応答期間、及び／又は生活の質の測定により測定される。

【0028】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節されない細胞増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は記述する。癌の例には、限定するものではないが、カルチノーマ、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病又はリンパ性悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより具体的な例には、腎臓又は腎性癌、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肺癌、例として小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、扁平細胞癌(例えば上皮の扁平細胞癌)、子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、肝癌、膀胱癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌を含む胃(gastric、stomach)癌、消化管間質腫瘍(GIST)、脾癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、莢膜細胞腫、男化腫瘍、肝細胞癌、非ホジキンリンパ腫を含む血液悪性腫瘍(NHL)、多発性骨髄腫及び急性の血液系悪性腫瘍、子宮内膜ないし子宮カルチノーマ、子宮内膜症、線維肉腫、絨毛膜癌、唾液腺カルチノーマ、外陰部癌、甲状腺癌、食道カルチノーマ、肝癌、肛門部のカルチノーマ、陰茎カルチノーマ、上咽頭癌、喉頭のカルチノーマ、カポシ肉腫、メラノーマ、皮膚カルチノーマ、シュワン腫、乏突起細胞腫、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、尿路カルチノーマ、甲状腺カルチノーマ、ウィルムス腫瘍、並びにB細胞リンパ腫(例えば低グレード／濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)；小リンパ球性(SL)NHL；中間グレード／濾胞性NHL；中間グレード広汎性NHL；高グレード免疫芽細胞NHL；高グレードリンパ芽球NHL；高グレード小型非分割細胞NHL；巨大腫瘍病変(bulky disease)NHL；マントル細胞リンパ腫；エイズ関連のリンパ腫；及び、ワルデンシュトーレムマクログロブリン血症)；慢性リンパ球性白血病(CLL)；急性リンパ芽球性白血病(ALL)；線毛細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；及び、移植後のリンパ増殖性疾患(PTLD)、並びに母斑症、浮腫(脳腫瘍と関係しているものなど)及びメイグス症候群と関係している異常な血管性増殖が含まれる。本明細書中で用いられる「腫瘍」は、悪性又は良性のいずれであっても、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖、及びすべての前癌性及び癌性の細胞及び組織を指す。

「癌」という用語には、造血性癌又は血液関連癌、例えばリンパ腫、白血病、骨髄腫又はリンパ性悪性腫瘍に加え、脾臓の癌及びリンパ節の癌が含まれる。そのようなB細胞関連癌の具体的な例として、例えば、高悪性度、中悪性度及び低悪性度のリンパ腫(例えば粘膜内リンパ組織B細胞リンパ腫及び非ホジキンリンパ腫等のB細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、周辺帯リンパ腫、拡散性大細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びホジキンリンパ腫及びT細胞リンパ腫を含む)、白血病(二次性白血病、慢性リンパ性白血病、例えばB細胞白血病(CD5+Bリンパ球)、骨髄性白血病、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、リンパ性白血病、例えば急性リンパ芽球性白血病及び骨髄異形成症候群を含む)、プラズマ細胞悪性腫瘍等の多発性骨髄腫、並びにその他血液学的及び／又はB細胞又はT細胞関連癌が挙げられる。更には

10

20

30

40

50

追加的な造血性細胞の癌が含まれ、このような細胞には、好塩基球、好酸球、好中球及び单球等の多形核白血球、樹状細胞、血小板、赤血球及びナチュラルキラー細胞が含まれる。B細胞癌の起源を説明する。周辺帯B細胞リンパ腫は周辺帯の記憶B細胞を起源とし、濾胞性リンパ腫及び拡散性大B細胞リンパ腫は胚中心の軽帯(light zone)の中心細胞を起源とし、多発性骨髄腫はプラズマ細胞を起源とし、慢性リンパ性白血病及び小リンパ球白血病はB1細胞(CD5+)を起源とし、マントル細胞リンパ腫はマントル帯のナイーブなB細胞を起源とし、バーキットリンパ腫は胚中心の暗帯(dark zone)の中心芽細胞を起源とする。本明細書で「造血性細胞組織」と呼ぶ造血性細胞を含む組織には、胸腺及び骨髄及び末梢性リンパ組織、例えば脾臓、リンパ節、粘膜に関連するリンパ組織、例えば消化管関連のリンパ組織、扁桃腺、バイエル板及び虫垂及びその他粘膜に関連するリンパ組織、例えば気管支内側が含まれる。

10

【0029】

用語「前癌性の」は、典型的に癌に先行又は進行する健康状態又は成長を意味する。「前癌の」成長は、異常な細胞周期調節、増殖又は分化によって特徴づけられる細胞を有し、それは細胞周期調節、細胞増殖、又は、分化のマーカーによって決定されることがある。

「ディスプレシア」は、組織、器官又は細胞のあらゆる異常な増殖又は発達を意味する。

好ましくは、ディスプレシアは悪性度が高い、又は前癌性である。

「転移」は、その原発部位から体の他の場所への癌の拡散を意味する。癌細胞は、原発腫瘍から離れ、リンパ管及び血管に浸潤し、血流中を循環し、体の正常組織の他の遠い病巣において増殖(転移)する。転移は、局所的又は遠位であり得る。転移は逐次的なプロセスであり、腫瘍細胞の原発腫瘍からの離脱、血流を介した移動、遠位での停止が条件となる。新規な部位で、細胞は血液供給を確立し、増殖して致命的な腫瘍を形成し得る。

20

腫瘍細胞内の刺激性及び抑制の分子経路はこの挙動を制御し、遠位における腫瘍細胞と宿主細胞の相互作用はもまた重要である。

「非転移性」は、良性又は原発部位で残り、リンパ管又は血管システム又は原発部位以外の組織に浸透しない癌を意味する。一般に、非転移性の癌は、ステージ0、I又はIIのあらゆる癌、及び場合によりステージIIIの癌である。

「原発腫瘍」又は「原発癌」は、最初の癌を意味し、患者の身体における他の組織、器官又は場所にある転移性病巣を意味していない。

30

「良性腫瘍」又は「良性癌」は、起源の部位に残る腫瘍を意味し、浸潤、侵入又は遠位へ転移する能力を有する腫瘍を意味していない。

「腫瘍組織量」は、身体における癌細胞数、腫瘍サイズ又は癌の量を意味する。腫瘍組織量は、腫瘍量とも称される。

「腫瘍数」は、腫瘍の数を意味する。

「対象」又は「患者」は、ヒト又はウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ又はネコのような非ヒト哺乳動物を含むがこれに限られない。好ましくは、対象又は患者は、ヒトである。

【0030】

用語「抗癌治療」は、癌の処理に有用な治療を意味する。抗癌治療剤の例は、例えば、化学療法剤、増殖阻害性薬剤、細胞障害性薬剤、放射線療法において用いられる薬剤、抗血管新生薬剤、アポトーシス薬剤、抗チュービュリン薬剤及び癌を処理する他の薬剤、抗CD20抗体、血小板由来増殖因子インヒビター(例えばG1e e v e c(登録商標)、Imatinib Mesylate)、COX-2インヒビター(例えばcelecoxib)、インターフェロン、サイトカイン、以下の一つ以上から標的Erbb2、Erbb3、Erbb4、PDGFR-、BlyS、APRIL、BCMA又はVEGF受容体、TRAIL/Apo2に結合するアンタゴニスト(例えば中和抗体)及び他の生理活性性及び有機性化合物等を含むがこれに限られない。その組合せも本発明に含まれる。

40

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、I¹³¹、I¹

50

² ⁵、^Y ⁹ ⁰ 及び ^R ^e ¹ ⁸ ⁶ の放射性同位体)、化学治療薬、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素を含むように意図されている。

【0031】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテバ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(alretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(trimethylenethiophosphaamide)及びトリメチローロメラミン(trimethylololomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；カンプトテシン(合成アナログトポテカンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スponギスタチン；クロランブシリ、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフオスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスターなどのナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、口ムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン1I及びカリケアマイシンI1(例えばAgnew Chem Int'l. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin)Aを含むダイネマイシン；クロドロン酸のようなビスホスホネート；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabiciin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIMYCIN(登録商標)ドキソルビシン(モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む)、エビルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトイシンCのようなマイトイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodoxorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、ブテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトブリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフルール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(folinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグ

10

20

30

40

50

リコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル (bestrabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziqone)；エルフォルニチン (elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポチロン(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン(lonidainine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K (登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(r azoxane)；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸 (tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziqone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin)A、ロリジン(roridine)A及びアンゲイジン(anguidine))；ウレタン；ピンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカーバジン；マンノムスチニン(mannomustine)；ミトプロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosome)；アラビノシド('Ara-C')；シクロフォスファミド；チオテパ；タキソイド類、例えばTAXOL (登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、クレモフォー無添加ABRAXANETM (パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤)(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)、及びTAXOTERE (登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；GEMZAR (登録商標)ゲンシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトレキサート；プラチナアナログ、例えばシスプラチニン及びカルボプラチニン；ビンプラスチニン；プラチナ；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトキサントロン；ビンクリスチニン；NAVELBINE (登録商標)ビノレルビン；ノバントロン(novantrone)；イリノテカン(Camptosar、CPT-11) (イリノテカンの5-FU及びロイコボビン(leucovovin)との治療計画を含む)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチロールニチニン(DMFO)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタビン(capecitabine)；コンブレタスタチン(combretastatin)；ロイコボリジン(LV)；オキサリプラチニン(oxaliplatin)の治療計画(FOLFOX)を含むオキサリプラチニン；細胞増殖を減少させるPKC-、Raf、H-Ras、EGFR及びVEGFR-Aの阻害剤(例えばエルロチニブ(TarcevaTM))及び上述したものの中のいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0032】

またこの定義に含まれるものには、癌の増殖を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ(SERM)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX (登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene) (EVISTRA (登録商標))、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストロン(onapristone)、及びFARESTON (登録商標)トレミフェン；副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4-(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(MEGASE (登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN (登録商標))、フォルメスタン(formestanone)、ファドロゾール、ボロゾール(RIVISOR (登録商標))、レトロゾール(FEMLARA (登録商標))、及びアナストロゾール(ARIMIDEX (登録商標))；抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド(nilutamide)、バイカルタミド(bicalutamide)、ロイプロリド(leuprolide)及びゲセレリン(geserelin)；トロクサシタビン(a1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細

10

20

30

40

50

胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、及びH-Ras；リボザイム、例えばVEGF発現阻害剤（例えばANGIOZYME（登録商標）リボザイム）及びHER2発現阻害剤；ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVETIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVAXID（登録商標）ワクチン；PROLEUKIN（登録商標）rIL-2；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼ1阻害剤；ABARELIX（登録商標）rmRH；ビノレルビン及びエスペラミシン（米国特許第4675187号参照）及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0033】

10

この出願で用いられる用語「プロドラッグ」は、親薬剤に比較して腫瘍細胞に対する細胞障害性が低く、酵素的に活性化又はより活性な親形態に変換される製薬的活性物質の前駆体又は誘導体形態を意味する。例えば、Wilman, 「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」, Biochemical Society Transactions, 14, :375-382, 615th Meeting, Belfast (1986)、及びStella等, 「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」、Directed Drug Delivery, Borchardt等(編), 247-267項, Humana Press (1985)参照。本発明のプロドラッグは、限定するものではないが、ホスファート含有プロドラッグ、チオホスファート含有プロドラッグ、スルファート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、-ラクタム含有プロドラッグ、任意に置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意に置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性のある細胞毒のない薬剤に転換可能な5-フルオロシトシン及び他の5-フルオロウリジンプロドラッグを含む。限定はしないが、本発明で使用されるプロドラッグ形態に誘導体化可能な細胞障害性剤の例には、前記の化学療法剤が含まれる。

20

「放射線療法」は、正常に機能する能力を制限する、又は細胞を破壊するのに充分な障害を細胞に誘導するガンマ線又は線の使用を意味する。当該分野において知られる処理の用量及び期間を決定するための多くの方法が存在することはいうまでもない。日につき一回の投与及び10から200単位（グレイ）の典型的な用量範囲で、典型的な処理が行われている。

【0034】

30

方法及び組成物

本発明は、治療目的のための本発明の方法を用いて利用され得るNLRR-1の特定の新規な特性及び活性を同定する。

ここに開示されるように、NLRR-1はEGFRシグナリング複合体に関連し、TGFに応答してMAPキナーゼ活性化を促進する。そして、NLRR-1がEGFRシグナリングにおいて重要な役割を果たすことを示している。さらにまた、NLRR-1との関連は、EGFRの内部移行を促進する。内部移行されたEGFR複合体からのシグナリングは、MAPキナーゼ・リン酸化を增幅し、細胞生存に導く経路を刺激し得（Haugh等、1999a；Haugh等、1999b；Sato等、2001；Schoeberl等、2002；Wang等、2002）、NLRR-1の減少により腫瘍細胞で増加するアポトーシスの観察と一致した。さらに、NLRR-1は、EGFR/ERBB2ヘテロダイマーと関連し得る。

40

したがって、本発明の一態様は、NLRR-1アンタゴニストを細胞と接触させることを含む、哺乳動物細胞においてEGFRシグナリングを阻害する方法を提供する。EGFRシグナリングのレベルは、NLRR-1アンタゴニストとの接触に応じて減少する。

本発明の別の態様は、NLRR-1とのEGFRの相互作用を阻害する剤と細胞と接触させることを含む、哺乳動物細胞におけるEGFRシグナリングを阻害する方法を提供する。薬剤によるEGFRとNLRR-1との相互作用の阻害は、EGFRシグナリングの減少を生じる。

NLRR-1（NLRR-3のホモログ）の広範囲にわたる発現は、種々の腫瘍において観察され、前立腺腫瘍のより詳細な転写産物解析において、発現は高いグリーソン・ス

50

コア及び予後不良の独立して特徴づけられたマーカーであるM U C 1と相関していた (Andren等、2006a; Lapointe等、2004)。実施例に記載されるように、N L R R - 1は前立腺腫瘍だけでなく上皮性腫瘍及びいくつかの悪性度の高い血液癌 (例えば多発性骨髄腫及びマントル細胞リンパ腫) (図2A, B; 図9A)、脾臓、乳房、肺及び転移性結腸にわたって発現される。

【0035】

T G F は種々の腫瘍型にわたって過剰発現することが頻繁に見いだされ、より悪性の疾患及び予後不良と相関しており、オートクライイン又はパラクライインのいずれかで機能し得、E G F R シグナリングの強力な活性化因子 (図13A, B) (Ebner and Derynck, 1991; El-Obeid等、2002; Jhappan等、1990; Jiang等、1998; Maeda等、2002; Martinez-Arcia等、2005; O'Dwyer P and Benson, 2002; Scher等、1995; Wang等、1998)。血清又はT G F に応答したM A P キナーゼ及びP I 3 キナーゼ経路活性化のN L R R - 1に特異的なモノクローナル抗体を用いた減衰は、N L R R - 1の腫瘍細胞でのE G F R 経路活性化における重要な役割を示す。

実施例に示すように、肺腫瘍細胞株におけるN L R R - 1の減少は成長不全を生じ、内因性のN L R R - 1発現の全てのレベルでアポトーシスを増加させた。そして、癌細胞がその生存においてN L R R - 1に大きく依存していることを示した。N L R R - 1の発現は腫瘍全体の高いE G F R から逆相関している。そして、E G F R が増幅されていない場合でも、N L R R - 1が腫瘍細胞におけるE G F R 経路シグナリングを活性化することを示す。さらに、肺腫瘍細胞株におけるN L R R - 1の減少は、E G F R インヒビターエルロチニブでの処理によりアポトーシスを促進する。感受性の有意な増加はエルロチニブ耐性の細胞株N C I - H 6 4 7で明白であり、N L R R - 1ノックダウン及びエルロチニブの相乗効果は耐性の細胞株で観察された。このデータは、N L R R - 1がE G F R シグナリングにおいて重要な役割を果たし、N L R R - 1がいくつかの腫瘍によって示されるE G F R キナーゼ・インヒビター (例えばエルロチニブ)への耐性に寄与し得ることを示す。

したがって、本発明の別の態様は、対象にN L R R - 1アンタゴニストの治療上有効量を投与することを含む、対象における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの実施態様において、腫瘍細胞はE G F R を発現する。他の実施態様において、腫瘍細胞はE G F R を発現するが、E G F R の発現は増幅されない。

【0036】

本発明の更に別の態様は、対象にN L R R - 1アンタゴニストの有効量を投与することを含む、対象における癌を治療する方法を提供する。いくつかの実施態様において、癌の細胞はE G F R を発現する。他の実施態様において、癌の細胞はE G F R を発現するが、E G F R の発現は増幅されない。

ある種の実施態様では、E G F R アンタゴニストは、N L R R - 1アンタゴニストに加えて、対象に投与される。いくつかの実施態様において、処理される腫瘍細胞又は癌は、E G F R アンタゴニストによる処理に耐性である。もう一つの実施態様では、N L R R - 1アンタゴニストと共に投与されるE G F R アンタゴニストは、エルロチニブである。もう一つの実施態様では、処理される腫瘍細胞又は癌は、エルロチニブでの処理に耐性である。他の実施態様において、N L R R - 1アンタゴニスト及びE G F R アンタゴニストの投与は、いずれかのアンタゴニストの単独投与と比較して、腫瘍細胞又は癌の増殖阻害を増加させる。他の実施態様において、組合せ治療による腫瘍増殖又は癌の阻害の増加は、N L R R - 1アンタゴニスト又はE G F R アンタゴニストの単独治療と比較して相乗的である。

【0037】

用語「癌」は、前癌の増殖、良性腫瘍及び悪性腫瘍を含むがこれに限らず、増殖性の疾患の一群を包含する。上記方法によって処理される癌は、固形腫瘍又は非固形腫瘍又は軟部組織腫瘍を含むそれらの癌を含む。軟部組織腫瘍の例は、白血病 (例えば慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、成熟したB

10

20

30

40

50

細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、前リンパ球性白血病又はヘアリーセル白血病)、ミエローマ(多発性骨髄腫)又はリンパ腫(例えば非ホジキンリンパ腫、悪性皮膚T細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫又はホジキン病)を含む。 固形腫瘍は、血液、骨髄又はリンパ系以外のあらゆる体組織癌を含む。 固形腫瘍は、上皮細胞を原発巣とするものと非上皮細胞を原発巣とするものに更に分けられてもよい。 上皮細胞固形腫瘍の例は、胃腸管、結腸、乳房、前立腺、肺、腎臓、肝臓、脾臓、卵巣、頭頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、胆嚢、下唇、鼻いん頭、皮膚、子宮、男性生殖器、泌尿器、膀胱及び皮膚の腫瘍を含む。 非上皮細胞を原発巣とする固形腫瘍は、肉腫、脳腫瘍及び骨腫瘍を含む。

更にここに記載されるように、本発明もまた単独及び併用で上記化合物を含む組成物を提供する。組成物は、対象における病的状態(例えば腫瘍)を処理するために有用である。

【0038】

N L R R - 1 アンタゴニスト

本発明の方法において有用なN L R R - 1 アンタゴニストは、N L R R - 1 に特異的に結合するポリペプチド、N L R R - 1 抗体(抗N R L L - 1 抗体)、小分子、受容分子及び誘導体(例えばイムノアドヘシン)(N L R R - 1 に特異的に結合する)及び融合タンパク質を含む。N L R R - 1 アンタゴニストは、N L R R - 1 ポリペプチドのアンタゴニスト性変異体、RNAアプタマー及びN L R R - 1 に対するペプチボディー(peptibody)も含む。これらの各々の例が以下に記載される。

本発明の方法において有用である抗N L R R - 1 抗体は、N L R R - 1 に充分なアフィニティ及び特異性で結合するか、N L R R - 1 活性を減少又は阻害するか、EGFR又はHER2、HER3及びHER4を含むEGFR経路のあらゆるメンバーとのN L R R - 1 の関連を阻害し得るあらゆる抗体を含む。選択される抗体は通常N L R R - 1 に対して十分に強い結合親和性を有し、例えば抗体は100nM-1pM間のKd値でヒトN L R R - 1 と結合し得る。抗体アフィニティは、例えば表面プラスモン共鳴ベースのアッセイ(例えばP C T出願公開番号W O 2 0 0 5 / 0 1 2 3 5 9にて説明したようなB I A c o r eアッセイ)；酵素結合免疫吸着アッセイ(E L I S A)；及び競合アッセイ(例えばR I A's)によって決定されてもよい。好ましくは、本発明の抗N L R R - 1 抗体は、N L R R - 1 / EGFR活性が関与する疾患又は健康状態を標的とする、又は干渉する治療剤として用いられてもよい。同様に、抗体は、例えばその治療薬としての効果を評価するために、他の生物学的活性アッセイにかけられてもよい。このようなアッセイは、従来技術において周知であり、抗体の標的抗原及び使用目的に依存する。

ある種の実施態様では、抗N L R R - 1 抗体は、American Type Culture Collection受託番号A T C C P T A - 8 7 3 2の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株(ハイブリドーマ3 D 1 . 6 . 9)によって產生されるモノクローナル抗体である。他の実施態様において、抗体は、American Type Culture Collection受託番号A T C C P T A - 8 7 3 2の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株(ハイブリドーマ3 D 1 . 6 . 9)によって產生されるモノクローナル抗体の断片を含む。他の実施態様において、抗体は、American Type Culture Collection受託番号A T C C P T A - 8 7 3 2の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株(ハイブリドーマ3 D 1 . 6 . 9)によって產生されるモノクローナル抗体のCDR配列の一つ以上を含む。他の実施態様において、抗体は、American Type Culture Collection受託番号A T C C P T A - 8 7 3 2の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株(ハイブリドーマ3 D 1 . 6 . 9)によって產生されるモノクローナル抗体と競合する。他の実施態様において、抗体は、American Type Culture Collection受託番号A T C C P T A - 8 7 3 2の下で寄託されたハイブリドーマ細胞株(ハイブリドーマ3 D 1 . 6 . 9)によって產生されるモノクローナル抗体と同じエピトープに結合する。

【0039】

10

20

30

40

50

EGFR又はEGFR経路の他のメンバーに特異的に結合するN L R R - 1ポリペプチド又はその断片は、例えば、結合し、GFRタンパク質を隔離することによりシグナリングを妨げるなど、本発明の方法において用いられてもよい。好ましくは、N L R R - 1ポリペプチド又はその断片は、可溶形態である。いくつかの実施態様において、ポリペプチドの可溶形態はEGFRに結合することによってEGFRタンパク質の生物学的活性の阻害作用を行い、それによって、その天然のリガンドとの関連を妨げる。

アプタマーは、標的分子（例えばN L R R - 1ポリペプチド）に特異的に結合する三次構造を形成する核酸分子である。アプタマーの生成及び治療上の使用は、その分野において確立されている。米国特許番号5,475,096参照。アプタマーについての付加的な情報は、米国特許出願公開番号20060148748において見つかる。

ペプチボディーは、免疫グロブリン分子の断片又は部分をコード化しているアミノ酸配列に連結されるペプチド配列である。ポリペプチドは、特異的結合のためのあらゆる方法（ファージディスプレー技術を含むがそれに限定されない）によって選択されるランダム化された配列からの誘導されてもよい。好ましい実施態様において、選択されたポリペプチドは、免疫グロブリンのFc部分をコード化しているアミノ酸配列に連結していくてもよい。特異的にN L R R - 1を結合しアンタゴナイズするペプチボディーは、本発明の方法においても有用である。

【0040】

EGFRアンタゴニスト

EGFRアンタゴニストは、例えばnimotuzumab (YM Biosciences)として知られるヒト化モノクローナル抗体などの抗体、完全ヒトABX-EGF (panitumumab, Abgenix Inc.)、E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3及びE7.6.3として知られ、米国特許第6,235,883号に記載されている完全ヒト抗体；MDX-447 (Medarex Inc)を含む。Pertuzumab (2C4)は、HER2に直接に結合するヒト化抗体であるが、HER2-EGFR二量体化を妨害することによりEGFRシグナリングを阻害している。EGFRに結合する抗体の他の例は、MAb579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb455 (ATCC CRL HB 8507)、MAb225 (ATCC CRL 8508)、MAb528 (ATCC CRL 8509) (米国特許第4,943号、533、Mendelsohn et al. 参照) 及びその変異体、例えばキメラ化225 (C225又はCetuximab；ERBUTIX (登録商標)) 及び再構築されたヒト225 (H225) (国際特許公報第96/40210号 (Imclone Systems Inc.) 参照) ；IMC-11F8 (完全ヒト、EGFR目標抗体 (Imclone)) ；II型変異体EGFRに結合する抗体 (米国特許第5,212,290号) ；米国特許第5,891,996号にて記載される、EGFRと結合するヒト化及びキメラ抗体；及び例えばABX-EGFなどのEGFRと結合するヒト抗体 (WO98/50433 (Abgenix) を参照) ；EMD55900 (Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A: 636-640 (1996)) ；EGFR結合においてEGF及びTGF- β と競合する、EGFRに対するヒト化EGFR抗体であるEMD7200 (matuzumab) ；及びmAb806又はヒト化mAb806 (Johns等、J. Biol. Chem. 279(29): 30375-30384 (2004)) を含む。抗EGFR抗体は、細胞障害性剤とコンジュゲートされてもよく、したがって免疫複合体を作製する (欧州特許第659,439 A2号、Merck Patent GmbHを参照) 。

本発明の方法において有用である抗EGFR抗体は、EGFRへの充分なアフィニティ及び特異性を有し、EGFR活性を阻害し得るあらゆる抗体を含む。選択される抗体は通常EGFRに対して十分に強い結合親和性を有し、例えば抗体は100nM-1pM間のKd値でヒトEGFRと結合し得る。抗体アフィニティは、例えば表面プラスモン共鳴ベースのアッセイ (例えば国際特許公報第2005/012359号にて説明されるBIAcoreアッセイ) ；酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) ；及び競合アッセイ (例えばRIA's) によって決定されてもよい。好ましくは、本発明の抗EGFR抗体は、EGFR/EGFRリガンド活性が関与する疾患又は健康状態を標的とする、又は干渉す

10

20

30

40

50

る治療剤として用いられてもよい。同様に、抗体は、例えばその治療上の効果を評価するために、他の生物学的活性アッセイにかけられてもよい。このようなアッセイは、その分野において周知であり、抗体の標的抗原及び使用目的に依存する。

【0041】

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、EGFR及びNLRR-1に結合し得る。他の例では、例示的な二重特異性抗体は、例えばNLRR-1タンパク質などの同じタンパク質の2つの異なるエピトープに結合してもよい。あるいは、NLRR-1又はEGFRアームは、細胞防衛メカニズムをNLRR-1又はEGFR発現細胞へ集中させるために、T細胞受容体分子（例えばCD2、又は、CD3）又はIgG(FcR)のFc受容体（例えばFcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)）のような白血球上のトリガー分子に結合するアームと組み合わせられてもよい。二重特異性抗体は、EGFR又はNLRR-1を発現する細胞に、細胞障害性剤を局所化させるためにも用いられ得る。これらの抗体は、EGFR又はNLRR-1-結合アーム及び細胞障害性剤（例えばsaporin、抗インターフェロン-、ビンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位元素ハプテン）を結合するアームを有する。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメント（例えばF(ab')2二重特異性抗体）として調製されてもよい。

【0042】

EGFRアンタゴニストは、US5616582、US5457105、US5475001、US5654307、US5679683、US6084095、US6265410、US6455534、US6521620、US6596726、US6713484、US5770599、US6140332、US5866572、US6399602、US6344459、US6602863、US6391874、WO9814451、WO9850038、WO9909016、WO9924037、WO9935146、WO0132651、US6344455、US5760041、US6002008、US5747498に記載されている化合物のような小分子を含む。特定の小分子EGFRアンタゴニストはOSI-774(CP-358774、エルロチニブ、OSI Pharmaceuticals)；PD183805(CI1033(2-プロペンアミド)N[4[(3-クロロ4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3(4-モルホリニル)プロポキシ]-6-キナゾリニル]-ジヒドロクロラムド、Pfizer Inc.)；イレッサ（登録商標）(ZD1839、ゲフィチニブ、AstraZeneca)；ZM105180((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル-アミノ)-キナゾリン(Zeneca))；BIBX-1382(N8-(3-クロロ4-フルオロフェニル)-N2(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン(Boehringer Ingelheim))；PKI-166((R)4-[4[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール)；(R)-6(4-ヒドロキシフェニル)-4[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン)；CL-387785(N[4[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチナミド)；EKB-569(N-[4-[(3-クロロ4-フルオロフェニル)アミノ]-3-シアノ-7-エトキシ-6-キノリニル(ジメチルアミノ)-2-ブテナミド)；lapatinib(Tykerb, GlaxoSmithKline)；ZD6474(Zactima, AstraZeneca)；CUDC-101(Curis)；canertinib(CI-1033)；AEE788(6[4[(4-エチル-1-ピペラジニル)メチル]フェニル]-N-[(1R)-1-フェニルエチル]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン、国際特許公報第2003013541号、Novartis)及びPKI166(4[4[(1R)-1-フェニルエチル]アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール、国際特許公報第9702266号、Novartis)を含む。

【0043】

抗体

10

20

30

40

50

本発明の抗体は、本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体及びそのような抗体の抗体フラグメントを含む。例示的な抗体は、例えば、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、断片、二重特異的、多重特異的、ヘテロコンジュゲート、多価、エフェクター機能含有、などの抗体を含む。

ポリクローナル抗体

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含んでもよい。ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に公知である。例えば、本発明の抗体に対するポリクローナル抗体は、一又は複数の関連抗原及びアジュvantの皮下(s c)又は腹腔内(i p)注射により動物中で産生される。それは、例えば、免疫化される種において、例えばキーホール リンペットヘモシニアン、血清アルブミン、ウシ・サイログロブリン又はダイズ トリプシン阻害因子などの免疫原性であるタンパク質に対する関連抗原を、二機能性又は誘導体化剤(例えばmaleimidobenzoyl sulfoxuccinimidエステル(システイン残基によるコンジュゲート)、N-ヒドロキシサクシニミド(リジン残基による)、グルタールアルデヒド、無水コハク酸、SOC12又はR1N=C=NR(R及びR1は異なるアルキル基)を用いてコンジュゲートさせるために有用でもよい。

一実施態様において、動物は、3倍量の完全フロイントアジュvantと共に、複数の部位に皮内に溶液を注入することにより、タンパク質又はコンジュゲートの例えば100 μg又は5 μgを組み合わせることによって本発明の分子、免疫原性結合体又は誘導体に対して免疫化される(ウサギ又はマウスのそれぞれ)。1カ月後に、動物は、複数の部位への皮下注射により、当初の量の1/5~1/10のフロイント完全アジュvant中のペプチド又はコンジュゲートで追加免疫される。7~14日間後に、動物は採血され、血清は抗体価についてアッセイされる。動物は、力価がプラトーになるまで追加免疫される。通常、動物は同じ抗原のコンジュゲートで追加免疫されるが、異なるタンパク質に、及び/又は異なる架橋試薬ではコンジュゲートされない。コンジュゲートはタンパク質融合として組換え細胞培養物において作られてもよい。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

モノクローナル抗体

ここに記載される抗原に対するモノクローナル抗体は、Kohler等, *Nature*, 256:495 (1975)により初めて記載されているようなハイブリドーマ法、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)を使用することで作製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス又はハムスター又はアカゲザルなどの他の適切な宿主動物を上記のように免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。ポリエチレンリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103)。調整されたハイブリドーマ細胞は、未融合の不死化細胞の生存又は増殖を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R T又はH P R T)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチン、アミノブテリン及びチミジンを含み(「H A T培地」)、この物質がH G P R T欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0044】

典型的な不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、H A T培地のような培地に対して感受性である。これらの中でより好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばSalk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California USA)より入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍やAmerican Type Culture Collection (Rockville, Maryland USA)より入手可能であるSP-2又はX63-Ag8-653細胞である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)、Brodeur等, *Monoclonal Antibodies* 10 20 30 40 50

dy Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、対照の標的に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(R I A)や酵素結合免疫測定法(E L I S A)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、その分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤッチャード解析法によって測定することができる。

【0045】

10

所望の特異性、アフィニティ及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法で増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。この目的のための適当な培地には、例えば、D - M E M又はR P M I - 1 6 4 0 倍地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビオで腹水腫瘍として増殖させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA - セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィ等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地、腹水液又は血清から単離又は精製される。モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えば大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。抗体の組換え産生はより詳細に以下に記載される。

もう一つの実施態様では、抗体又は抗体フラグメントは、McCafferty等、Nature, 348: 552-554 (1990)に記載されている技術を用いて作製される抗体ファージライプラリーからの単離されてもよい。それぞれ、Clackson等、Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks等、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)はファージ・ライプラリーを用いたマウス及びヒト抗体の単離を記載する。後の公報には、チェイン・シャッフリング(chain shuffling)によって高親和性(nMの範囲)ヒト抗体の産生(Marks等、Bio/Technology, 10:779-783 (1992))、非常に大きいファージ・ライプラリー(Waterhouse等、Nuc. Acids. Res., 21:2 265-2266 (1993))を構築するためのストラテジーとしての組み合わせ感染及びインビオ組換えが記載されている。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代案である。

また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrison等, Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 6851 (1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。

このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、ある特異性を持つ1つの抗原結合部位、及び異なる抗原に対する特異性を持つ部位を有するキメラ性二価抗体を生成する。

【0046】

20

ヒト化抗体

30

40

50

本発明の抗体には、ヒト化抗体又はヒト抗体を含み得る。ヒト化抗体は非ヒト由来の一つ又は複数のアミノ酸残基を有する。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は、基本的に、Winter (Winter)及び共同研究者 (Jones等, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven等, *Science*, 239:1534-1536 (1988)) の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。

よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体 (米国特許第4,816,567号) である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

ヒト化抗体を作る際に用いられるヒト可変ドメイン (軽鎖及び重鎖) の選択は、抗原性を減らすために非常に重要である。いわゆる「最良適合」方法によれば、齧歯類の抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の完全なライブラリーに対してスクリーニング行われる。齧歯動物のそれに最も近いヒト配列はその時ヒト化抗体のヒト・フレームワーク (FR) として受け入れられる (Sims等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。他の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワークを使用する。同じフレームワークは、いくつかの異なるヒト化抗体で用いられてもよい (Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta等, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高結合親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親配列及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をコンセンサス及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、CDR残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0047】

内因性の免疫グロブリン産生がない状態で、免疫化によりヒト抗体のレパートリーを產生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域 (J_H) 遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子列の移入は、抗原投与時にヒト抗体の產生をもたらす。Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature*, 362:255-258 (1993); Brugermann等, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 及びDuchosal et al. *Nature* 355:258 (1992)を参照のこと。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーから誘導されうる (Hoogenboom等, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan et al. *Nature Biotech* 14:309 (1996)。ヒト抗体はファージディスプレイライブラリーを含む当該分野で知られる様々な技術を用いて產生することができる (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、糸状バクテリオファージ (例えばM13又はfd) の主な又はマイナーなコートタンパク遺伝子のいずれかにインフレームにクローニングされ、ファージ粒子の表面に機能的抗体フラグメントとして提示された。糸状の

10

20

30

40

50

粒子がファージゲノムの一重鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づく選択はそれらの特性を示している抗体をコード化している遺伝子の選択となる。したがって、ファージはB細胞のいくつかの特性を模倣する。バクテリオファージディスプレイは、種々のフォーマット（例えば、Johnson, K S. and Chiswell, D J., *Cur Opin in Struct Biol* 3:564-571 (1993)においてレビューされる）で行われてもよい。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源は、ファージディスプレイのために用いられてもよい。例えば、Clackson等、*Nature*, 352:624-628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さいランダムな組み合わせライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫化されていないヒト提供者からのV遺伝子のレパートリは構築され、抗原（自己抗原を含む）の多様なアレイの抗体は、例えば、Marks等、*J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)又はGriffith等、*EMBO J.* 12:725-734 (1993)によって記載されている技術に基本的に従うことによって単離されてもよい。米国特許番号5,565,332及び5,573,905を参照。Cole等及びBoerner等の技術はヒト・モノクローナル抗体の調製においても利用可能である（Cole等、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及びBoerner等、*J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)）。ヒト抗体は、インヴィトロで活性化されたB細胞（米国特許5,567,610及び5,229,275を参照）によっても作製され得る。

【0048】

抗体断片

抗体断片もまた本発明に包含される。抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されている（例えば、Morimoto等、*J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennan等、*Science*, 229:81(1985)を参照されたい）。しかしながら、これらの断片は、現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は、上述した抗体ファージライブラリーから単離することができる。また、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合して $F(ab')_2$ 断片を形成することができる（Carter等、*Bio/Technology* 10:163-167(1992)）。他のアプローチによると、抗体断片は組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体断片を生産するための他の技術は当業者には明らかである。他の実施態様において、最適な抗体は、一本鎖Fv断片（scFv）である。国際特許公開公報93/16185；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号を参照。Fv及びscFvは、定常領域が欠けている完全な結合部位を有する唯一の種であり、それらはインビボで用いる場合に減少した非特異的結合のために適切である。scFv融合タンパクは、scFvのアミノ末端又はカルボキシ末端においてエフェクター・タンパク質の融合体を産生するように構築されてもよい。Antibody Engineering, ed. Borrebaeck、上掲を参照。例えば米国特許第5,641,870号に記載されるように、抗体フラグメントは「線状抗体」であってもよい。このような線形抗体フラグメントは、単一特異性又は二重特異性であってもよい。

多重特異性抗体（例えば、二重特異性）

本発明の抗体はもまた、例えば、多重特異性抗体を含み、それは少なくとも2つの異なる抗原への結合特異性を有する。このような分子が通常2つの抗原（すなわち二重特異性抗体、BsAbs）に結合するだけであるのに対して、ここに用いられる場合、三重特異性又は他の多重特異性（つまり、一つの分子に含まれる四以上の特異性）抗体のような附加的な特異性を有する抗体がこの表現に含まれる。当該分野において知られるBsAbsの例は、腫瘍細胞抗原に対するアーム及び細胞障害性トリガー分子（例えば、抗FcRI/抗CD15（抗p185HER2/FcRIII（CD16））抗CD3/抗悪性のB細胞（1D10）、抗CD3/抗p185HER2、抗CD3/抗-p97、抗CD3/抗-腎細胞癌、抗CD3/抗-OVCA-3、抗CD3/L-D1（抗結腸癌）、抗CD3/抗-メラニン細胞刺激ホルモンアナログ、抗EGF受容体/抗CD3、抗CD3/抗-CAM1、抗CD3/抗-CD19、抗CD3/MoV18、抗神経細胞付着分子（NCAM）/抗CD3、抗葉酸結合タンパク質（FBP）/抗CD3、抗原（AM

10

20

30

40

50

O C - 3 1) に関連した抗パン癌 / 抗 C D 3) に対する他のアームを有するもの ; 腫瘍抗原に特異的に結合する及アーム及び抗 s a p o r i n / 抗 - I d - 1 、抗 C D 2 2 / 抗 s a p o r i n 、抗 C D 7 / a n t i s a p o r i n 、抗 C D 3 8 / 抗 s a p o r i n 、抗 C E A / 抗リシン A 鎖、抗インターフェロン - (I F N -) / 抗ハイブリドーマ・イディオタイプ、抗 C E A / 抗ビンカアルカロイド) などの毒素に結合するアームを有する B s A b s ; 抗 C D 3 0 / a n t i - アルカリホスファターゼ (マイトマイシン・リン酸塩プロドラッグのマイトマイシン・アルコールへの転換に触媒作用を及ぼす) のような転換酵素活性化プロドラッグに対する B s A b s ; 抗フィブリン / 抗組織プラスミノーゲンアクチベーター (t P A) 、抗フィブリン / 抗ウロキナーゼ - 型プラスミノーゲンアクチベーター (u P A) などの線維素溶解素として用いられ得る B s A b s ; 抗低密度リポタンパク質 (L D L) / 抗 F c レセプター (例えは F c R I 、 F c R I I 又は F c R I I I) などの細胞表面受容体に対する標的免疫複合体の B s A b s ; 抗 C D 3 / 抗単純ヘルペスウィルス (H S V) 、抗 T 細胞受容体 : C D 3 複合体 / 抗インフルエンザ、抗 F c R / 抗 H I V のような感染症の治療に用いられる B s A b s ; インビトロ又はインビボでの腫瘍検出のための B s A b s (例えは抗 C E A / 抗 E O T U B E 、抗 C E A / 抗 D P T A 、抗 p 1 8 5 H E R 2 / a 抗ハプテン) ; ワクチンのアジュvantとしての B s A b s ; 及び抗ウサギ I g G / 抗フェリチン、抗ワサビ・ペルオキシダーゼ (H R P) / 抗ホルモン、抗ソマトスタチン / 抗サブスタンス P 、抗 H R P / 抗 F I T C 、抗 C E A / 抗 - ガラクトシダーゼなどの診断ツールとしての B s A b s を含む。三重特異性抗体の例は、抗 C D 3 / 抗 C D 4 / 抗 C D 3 7 、抗 C D 3 / 抗 C D 5 / 抗 C D 3 7 及び抗 C D 3 / 抗 C D 8 / 抗 C D 3 7 を含む。特定の本発明の態様において、二重特異性抗体の抗体の一つは、マクロファージ特異的細胞マーカー及びその他の樹状細胞特異的細胞マーカーと結合してもよい。ある種の実施形態では、このような抗体は、どちらか一方のマーカーのみ又は他のマーカーを有する細胞よりも、あるマクロファージ特異的な細胞マーカー及びある樹状細胞特異的な細胞マーカーの両方を有する細胞により密接に結合する。
10

二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体フラグメントとして調製されてもよい (例えは F (a b ') 2 二重特異性抗体) 。二重特異性抗体を作るための方法は、当該分野において周知である。完全長二重特異性抗体の従来の產生は 2 つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の共発現に基づき、 2 つの鎖は異なる特異性を有する (Millstein 等、 Nature, 305:537-5 39 (1983)) 。免疫グロブリン重鎖および軽鎖の任意組合せにより、これらのハイブリドーマ (クアドローマ) は 10 の異なる抗体分子の潜在的混合物を產生し、ただ一つのみが正しい二重特異性の構造を有する。正しい分子の精製 (通常アフィニティーコロマトグラフィによって行われる) は、かなり扱いにくく、産物収量は低い。同様の手法が、国際特許公報第 9 3 / 0 8 8 2 9 号及び Traunecker 等、 EMBO J. , 10:3655-3659 (1991) に開示される。
20

【 0 0 4 9 】

異なる手法によれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗体 - 抗原結合部位) は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。融合物は好ましくは免疫グロブリン重鎖定常ドメインとであり、少なくともヒンジ、 C H 2 及び C H 3 領域の一部を含む。軽鎖の結合のために必要な部位 (少なくとも 1 つの融合物に存在する) を含む第一の重鎖定常領域 (C H 1) を有することが好まれる。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望により免疫グロブリン軽鎖をコード化している D N A s は、別々の発現ベクターに挿入され、適切な宿主生物に共トランスフェクションさせる。構築物において用いられる 3 つのポリペプチド鎖の不均等な比率が最適生産量を提供する場合、実施態様の 3 つのポリペプチド断片の相互の比率を調整する際の大きなフレキシビリティが提供される。それは、しかしながら、少なくとも 2 つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高い収率を生む、もしくは比率が特に重要でない場合、一つの発現ベクター内で 2 つ又は全 3 つのポリペプチド鎖のコード配列を挿入することが可能である。
40

この手法の一実施態様において、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を一つのアームに有する複合型免疫グロブリン重鎖あるアーム、及び他のアームに (第二の結合特異性を
50

提供する)複合型免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアから成る。二重特異性分子の片側半分としての免疫グロブリン軽鎖の存在は分離の安易な方法を提供するので、この非対称の構造は望ましくない免疫グロブリン鎖の結合から所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが明らかとなった。この手法は、国際特許公報第94/04690号において開示される。二重特異性抗体作製の詳細は、Suresh等、Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照のこと。

例えば国際特許公報第96/27011号に記載されている他の手法によれば、一対の抗体分子間の境界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーの割合を最大にするために設計されてもよい。好適な境界面は、少なくとも抗体定常ドメインのCH3ドメインの一部を含む。この方法では、第一の抗体分子の境界面の一つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)で交換される。大きい側鎖(s)と同一又は類似したサイズの代償性の「キャビティ」は、より小さいアミノ酸側鎖(例えばアラニン又はスレオニン)で大きいアミノ酸側鎖を交換することによって、第二の抗体分子の境界面に作成される。これは、他の望ましくない最終生産物(例えばホモダイマー)よりもヘテロダイマーの産生を増加させるためのメカニズムを提供する。

【0050】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を作製するための技術も当該分野において知られている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を用いて調製することができる。Brennan等、Science, 229: 81 (1985)は、完全な抗体がFab(ab')2断片を作製するためにタンパク分解性に切断される手法を記載する。これらの断片は、近接のジチオールを安定させ、分子間ジスルフィド形成を妨げるために、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下では減少している。作製されるFab(ab')2断片は、チオ・ニトロベンゾアート(TNB)誘導体に変換される。あるFab(ab')2-TNB誘導体は、メルカプトエチルアミンで還元されることによってFab(ab')2-チオールに再転換され、二重特異性抗体を形成するために他のFab(ab')2-TNB誘導体の等モル量と混合される。産生される二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として用いることができる。

最近の進歩により大腸菌からのFab(ab')2-SH断片の直接の回収が容易となり、二重特異性抗体を形成するために化学的に結合することができる。Shalaby等、J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体Fab(ab')2分子の産生について記載する。それぞれのFab(ab')2断片は、別々に大腸菌から分泌され、二重特異性抗体を形成するために、インビトロで直接的な化学結合が行われた。形成される二重特異性抗体は、VEGF受容体を過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞と結合可能であり、ヒト乳房腫瘍標的に対してヒト細胞障害性リンパ球の溶解活性を起動させることができる。

組換え細胞培養物から直接に二重特異性抗体断片を作製し、単離するための様々な技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生された。Kostelny等、J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)。Foss及びJunnタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab部分に結合された。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法は、抗体ホモダイマーの産生のためにも利用することができる。Hollinger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に記載されている「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作るための代替的なメカニズムを提供した。断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間で対合するには短いリンカーによって軽鎖可変ドメイン(VL)に接続される重鎖可変ドメイン(VH)を含む。したがって、一つの断片におけるVH及びVLドメインは、他の断片の相補的なVL及びVHドメインと対合することを強制され、これにより2つの抗原結合部位を形成する。

一本鎖Fv(sFv)ダイマーの使用による二重特異性抗体断片作製のための他のストラテジーも報告されている。Gruber等、J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照。

2つ以上の結合価を有する抗体も意図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)。

【0051】

10

20

30

40

50

ヘテロコンジュゲート抗体

二重特異性抗体は、架橋された抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含み、それらは本発明の抗体である。そのような二重特異性抗体は、例えば、免疫系細胞が望ましくない細胞を標的とするように（米国特許第4,676,980号）、及びHIV感染症の治療のために（国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及び欧州特許第03089号）提案された。ヘテロコンジュゲート抗体は、いかなる簡単な架橋法を用いて製作されてもよい。適切な架橋剤は、公知技術であり、多くの架橋技術とともに、例えば米国特許第4,676,980号に開示される。

【0052】

多価抗体

本発明の抗体は多価抗体を含む。多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体よりも急速に内部移行（及び／又は分解）され得る。本発明の抗体は、3以上の抗原結合部位を有する多価抗体（IgMクラス以外）であり得（例えば四価の抗体）、抗体のポリペプチド鎖をコード化している核酸の組換え発現によって容易に產生することができる。多価抗体は、二量体化ドメインと3以上の抗原結合部位を含み得る。好ましい二量体化ドメインは、Fc領域又はヒンジ領域を含む（又はそれらからなる）。このシナリオにおいて、抗体は、Fc領域と、Fc領域のアミノ末端側の3以上の抗原結合部位とを含む。本明細書における好ましい多価抗体は、3から約8、好ましくは4の抗原結合部位を含む（又はそれらからなる）。多価抗体は、少なくとも一つのポリペプチド鎖（及び好ましくは2つのポリペプチド鎖）を含み、ポリペプチド鎖は2以上の可変ドメインを含む。例えば、ポリペプチド鎖はVD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fcを含み、VD1が第1の可変ドメインである、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖であり、X1とX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖は以下を含み得る：VH-CH1-フレキシブルリンクマー-VH-CH1-Fc領域鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖。本明細書における多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ（及び好ましくは4つ）の軽鎖可変ドメインポリペプチドを更に含む。本明細書における多価抗体は、例えば、およそ2ないしおよそ8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを含み得る。ここで意図される軽鎖可変ドメインポリペプチドは、軽鎖可変ドメインを含み、場合によってCLドメインを更に含む。多価抗体は、同じ抗原に対する複数の結合部位を有するか、2以上の異なる抗原に対する結合部位を有してもよい。

【0053】

エフェクター機能エンジニアリング

特定の疾患又は疾病的治療において抗体の効果を増強するように、エフェクター機能に関して本発明の抗体を改変することが望ましい。例えば、システイン残基がFc領域に導入されてもよく、それによってこの領域において鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、生成されるホモダイマー抗体は、改良された内部移行能及び／又は増強された補体媒介性細胞死滅と抗体依存性細胞障害（ADCC）を有し得る。Caron et al., J. Exp Med. 176: 1191-1195 (1992) 及び Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992) を参照のこと。

増強された抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体は、Wolff et al. Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されるようなヘテロ二機能性架橋剤を用いても調製され得る。あるいは、2つのFc領域を有するように設計でき、それにより増強された補体細胞溶解性とADCC能を有し得る。Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989) を参照のこと。抗体の血清半減期を増加させるために、例えば米国特許第5,739,277号に記載されるように、抗体（特に抗体断片）にサルベージ受容体結合エピトープを組み込んでよい。本明細書で用いられるように、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子（例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4）のインビボ血清半減期を増加させる役割を果たすIgG分子のFc領域のエピトープを意味する。

【0054】

免疫複合体

本発明は、細胞障害性剤（例えば化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素（例えばタンパク質毒素、バクテリア、菌類、植物又は動物の起源の酵素的に活性な毒素又はその断片）、又は放射性同位元素（すなわちラジオ・コンジュゲート））にコンジュゲートされた本明細書に記載の抗体を含む免疫接合体にも関連する。種々の放射性核種は、ラジオ・コンジュゲート抗体の製造に利用可能である。例えば 212Bi、131I、131In、90Y 及び 186Re を含むが、これに限定されるものではない。

そのような免疫複合体の生成において有用な化学療法剤は、上述している。例えば、BCNU、ストレプトゾシン、ビンクリスチン、5-フルオロウラシル、米国特許第 5,053,394 号及び第 5,770,710 号に記載される集合名詞的に LLE3328 10 として既知の薬剤群、エスペラミシン（米国特許第 5,877,296 号）等（本願明細書に記載の化学療法剤の定義を参照のこと）は、本発明の抗体又はその断片にコンジュゲートすることができる。腫瘍の選択的破壊のために、抗体は高度に放射能を有する原子を含んでもよい。

種々の放射性同位元素は、ラジオ・コンジュゲートされた抗体又はその断片の製造に利用可能である。例えば、211At、131I、125I、90Y、186Re、188Re、153Sm、212Bi、32P、212Pb、111In、Lu の放射性同位元素などが含まれるが、これに限定されるものではない。コンジュゲートが診断のために用いられる場合、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば 99mTc 又は 123I 20 、又はヨウ素 123、ヨウ素 131、インジウム 111、フッ素 19、炭素 13、窒素 15、酸素 17、ガドリニウム、マンガン又は鉄等の核磁気共鳴（NMR）画像（磁気共鳴画像（MRI）として公知）のためのスピン標識を含み得る。

放射性又は他の標識は、公知の方法でコンジュゲートに組み込まれ得る。例えば、ペプチドは、生合成されてもよく、例えば水素の代わりにフッ素 19 を含む適切なアミノ酸前駆物質を用いた化学的アミノ酸合成によって合成されてもよい。標識（例えば 99mTc 又は 123I、186Re、188Re 及び 111In）は、ペプチドのシステイン残基を介して付着させることができる。イットリウム 90 はリジン残基を介して付着させることができる。IODOGEN 法（Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57）は、ヨウ素 123 を組み込むために用いられ得る。詳細に他の方法を記載する Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989) を参照のこと。

用い得る酵素的に活性な毒素とその断片には、ジフテリア A鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性断片、炭疽毒素感染防御抗原、エキソトキシン A鎖（緑膿菌から得られる）、リシン A鎖、アブリン A鎖、モデッシン A鎖、サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質（PAPI、PAPI I 及び PAP-S）、ツルレイシインヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サバオナリア・オフィシナリスインヒビター、ゲロニン、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン(phenomycin)、ネオマイシンとトリコテシンが含まれる。1993 年 10 月 28 日に公開された国際公開第 93/21232 号を参照のこと。

抗体と細胞障害性剤のコンジュゲートは種々の二機能性タンパク質カップリング剤（例えば、N-サクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）-プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル 4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二機能性誘導体（例えばアジブイミド酸ジメチル HCL）、活性エステル（例えばスペリン酸ジサクシンイミジル）、アルデヒド（例えばグルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えばビス-（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えばビス-（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアナート（例えばトルエン 2,6-ジイソシアナート）、及びビス活性フッ素化合物（例えば 1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン））を用いて製造することができる。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitetta et al. Science 238: 1098 (1987) に記載されるように調製することができる。

10

20

30

40

50

きる。炭素 - 14 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレン - トリアミン五酢酸 (M X - D T P A) が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第 94 / 11026 号を参照のこと。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってもよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る (Chari et al., Cancer Research 52:127 131 (1992); 米国特許第 5,208,020 号)。

あるいは、抗 V E G F 抗体及び / 又は本発明のタンパク質に対する抗体と細胞障害性剤を含む融合タンパクは、例えば、組換え技術又はペプチド合成によって製造されてもよい。

D N A の長さは、互いに隣接するか、コンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコード化する領域によって分離される、コンジュゲートの 2 つの部分をコード化するそれぞれの領域を含み得る。

ある実施態様では、抗体は、腫瘍事前標的化の利用のために「レセプター」(例えばストレプトアビジン)にコンジュゲートされ、抗体 - レセプター-コンジュゲートは患者に投与され、続いて洗浄剤を用いた循環の非結合コンジュゲートの除去、及び細胞障害性剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートされた「リガンド」(例えばアビジン)の投与が行われる。ある実施態様では、免疫複合体は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えば R N A 分解酵素又は D N A 分解酵素; D n a s e などの D N A エンドヌクレアーゼ)との間で形成される。

【 0 0 5 5 】

メイタンシン及びメイタンシノイド

本発明は、1 以上のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされた本発明の抗体をさらに提供する。メイタンシノイドは、チュブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、アフリカ東部の低木 *M a y t e n u s s e r r a t a* (米国特許第 3,896,111 号) から初めて単離された。その後、特定の微生物が例えばマイタンシノールや C 3 マイタンシノールエステル (米国特許第 4,151,042 号) などのメイタンシノイドを產生することが発見された。合成マイタンシノール、その誘導体及びその類似体は、例えば、米国特許第 4,137,230 号; 米国特許第 4,248,870 号; 米国特許第 4,256,746 号; 米国特許第 4,260,608 号; 米国特許第 4,265,814 号; 米国特許第 4,294,757 号; 米国特許第 4,307,016 号; 米国特許第 4,308,268 号; 米国特許第 4,308,269 号; 米国特許第 4,309,428 号; 米国特許第 4,313,946 号; 米国特許第 4,315,929 号; 米国特許第 4,317,821 号; 米国特許第 4,322,348 号; 米国特許第 4,331,598 号; 米国特許第 4,361,650 号; 米国特許第 4,364,866 号; 米国特許第 4,424,219 号; 米国特許第 4,450,254 号; 米国特許第 4,362,663 号; 及び米国特許第 4,371,533 号に記載される。

本発明の抗体は、抗体又はメイタンシノイド分子の生物学的活性を有意に減少することなくメイタンシノイド分子にコンジュゲートすることができる。毒素 / 抗体の 1 つの分子でさえ裸の抗体の使用よりも細胞障害性を増強することが予想されるにもかかわらず、抗体分子につき平均 3 - 4 のメイタンシノイド分子は、抗体の機能又は溶解性に悪影響を及ぼすことなく標的細胞の細胞障害性を増強するのに有効であることが示されている。メイタンシノイドは、当技術分野で周知であり、公知の技術で合成するか、天然の供給源から単離することができる。適切なメイタンシノイドは、例えば、米国特許第 5,208,020 号や先に言及された他の特許公表や非特許文献において開示される。一実施態様において、メイタンシノイドは、マイタンシノール及びマイタンシノール分子(例えば様々なマイタンシノールエステル)の芳香環又はの他の位置で改変されたマイタンシノール類似体である。

例えば、米国特許第 5,208,020 号又は欧州特許第 0425235 B1 号及び Ch

10

20

30

40

50

ari et al., Cancer Research 52:127 131 (1992)に開示されるものを含め、抗体 - メイタンシノイドコンジュゲートを製作するための公知の連結基が数多く存在する。連結基は、上記の特許文献に開示されるように、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基又はエステラーゼ不安定基を含み、ジスルフィド基とチオエーテル基が好ましい。

抗体とメイタンシノイドのコンジュゲートは、N - サクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) - プロピオネート (S P D P)、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシラート、イミノチオラン (I T)、イミドエステルの二機能性誘導体 (例えばアジブイミド酸ジメチルH C L)、活性エステル (例えばスペリン酸ジサクシンイミジル)、アルデヒド (例えばグルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えばビス - (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えばビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアナート (例えばトルエン 2 , 6 - デイソシアナート)、及びビス活性フッ素化合物 (例えば 1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - デニトロベンゼン) などの様々な二機能性タンパク質カップリング剤を用いて製造することができる。典型的なカップリング剤は、ジスルフィド結合を提供するN - サクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) - プロピオネート (S P D P) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723 737 [1978]) 及びN - サクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオール) - ペンタノエート (S P P) を含む。

リンカーは、結合の型によって、メイタンシノイド分子の様々な位置に付着し得る。例えば、エステル結合は、従来のカップリング技術を用いて水酸基との反応によって形成され得る。反応は、水酸基を有するC - 3 位置、ヒドロキシメチルで修飾されたC - 1 4 位置、水酸基で修飾されたC - 1 5 位置、及び水酸基を有するC - 2 0 位置で起こり得る。

結合は、マイタンシノール又はマイタンシノール類似体のC - 3 位置で形成される。

【 0 0 5 6 】

カリケアマイシン

興味深い他の免疫複合体には、1 以上のカリケアマイシン分子にコンジュゲートされた本発明の抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖DNAを切断することができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5 , 712 , 374号、第5 , 714 , 586号、第5 , 739 , 116号、第5 , 767 , 285号、第5 , 770 , 701号、第5 , 770 , 710号、第5 , 773 , 001号、第5 , 877 , 296号 (全てAmerican Cyanamid Company) を参照されたい。用い得るカリケアマイシンの構造アナログは、1 I、2 I、3 I、Nアセチル1 I、P S A G 及びI 1を含むが、これに限定されるものではない (Hinman et al., Cancer Research 53:3336 3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925 2928 (1998) 及び上述のAmerican Cyanamidの米国特許)。抗体がコンジュゲートできる他の抗腫瘍薬剤は、抗葉酸剤であるQ F Aである。カリケアマイシンとQ F Aは、細胞内作用部位を有しており、原形質膜を容易に通過できない。したがって、抗体媒介性内部移行を介したこれらの薬剤の細胞取り込みは、それらの細胞障害性効果を増強する。

【 0 0 5 7 】

他の抗体改变

本発明の抗体の他の改変も、本願明細書において意図されている。例えば、抗体は、様々な非タンパク質ポリマー (例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマー) の一つに結合してもよい。抗体は、例えば、コロイド薬物送達系 (例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル又はマクロエマルジョン) において、コアセルベーション技術又は界面重合法 (それぞれ、例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン - マイクロカプセル及びポリ (メチルメタク

10

20

30

40

50

リレート)マイクロカプセル)によって調製されるマイクロカプセルに封入されてもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)において開示される。

【0058】

併用療法

本発明は、治療剤の併用活性の有益な効果又は相乗効果を提供することを意図した特定の療法投薬計画の一部として、N L R R - 1アンタゴニストとE G F Rアンタゴニストの併用を提供する。併用の有益な効果は、治療剤の併用により生じる薬物動態学的又は薬力学的相互作用を含むが、これに限定されるものではない。

いくつかの実施態様において、N L R R - 1アンタゴニストとE G F Rアンタゴニストで治療される腫瘍細胞又は癌は、N L R R - 1アンタゴニストでの治療の非存在下においてE G F Rアンタゴニストでの治療に耐性がある。もう一つの実施態様では、N L R R - 1アンタゴニストと共に投与されるE G F Rアンタゴニストは、エルロチニブである。もう一つの実施態様では、N L R R - 1アンタゴニストとエルロチニブとで治療される腫瘍細胞又は癌は、N L R R - 1アンタゴニストでの治療の非存在下においてエルロチニブでの治療に耐性がある。他の実施態様において、N L R R - 1アンタゴニスト及びE G F Rアンタゴニストの投与は、N L R R - 1アンタゴニストの投与なしのE G F Rアンタゴニストの投与と比較して、腫瘍細胞又は癌の増殖阻害を増強させる。他の実施態様において、併用療法を用いた腫瘍又は癌の増殖阻害の増強は、N L R R - 1アンタゴニスト又はE G F Rアンタゴニストの何れか単独での治療と比較して、相乗的である。

併用投与は、異なる製剤又は単一の製薬製剤を用いた同時投与又は同時的投与、及び何れかの順番での連続的な投与を含み、好ましくは、両方の(又は全て)の活性剤が同時にそれらの生物学的活性を発揮する時間がある。

【0059】

診断

N L R R - 1は多くの異なる腫瘍において発現され、その発現は上昇したE G F R発現と反相関しており、N L R R - 1がE G F R経路シグナリングを促進し、E G F Rの増幅を必要としない経路活性化を増強する手段を提供することを示している。さらにまた、N L R R - 1発現は、いくつかの腫瘍におけるE G F Rアンタゴニスト(例えばerlotinib)に対する耐性と相関している。E G F Rアンタゴニストに耐性のある癌細胞におけるN L R R - 1発現のノックダウンは、E G F Rを標的とした薬物療法での治療に対する感受性の増加を引き起す。

したがって、本発明の一態様は、癌などの細胞増殖性疾患を診断するための方法及び組成物を提供する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、試験細胞集団と基準細胞集団のN L R R - 1レベルを比較することを含み、試験細胞集団におけるN L R R - 1発現レベルの増加は、癌細胞が含まれることを示す。

本発明の別の態様は、E G F R増幅がない場合に試験細胞集団が活性化E G F R経路を有するかどうかを決定する方法を提供する。いくつかの実施態様において、本発明の方法は、E G F Rの重複を有していない試験細胞集団と基準細胞集団のN L R R - 1レベルを比較することを含み、N L R R - 1発現レベルの増加は、E G F R経路が活性化されていることを示す。この方法は、E G F R増幅がないことによってE G F Rアンタゴニストでの治療に耐性を有する可能性があるが、N L R R - 1アンタゴニストとE G F Rアンタゴニストとの併用治療から恩恵を受け得る患者を同定するのに有用である。

上記の方法において、試験細胞集団は、いかなる数の細胞、つまり1以上の細胞であってもよく、インビトロ、インビオ又はエクスピオで提供され得る。ある種の実施形態では、基準細胞集団の細胞は、試験試料(例えば腫瘍細胞集団)とできる限り類似した組織型に由来する。いくつかの実施態様において、基準細胞集団は、試験細胞集団と同一の対象に由来し、例えば試験細胞集団の起源の部位に近位の部位に由来する。いくつかの実施態様において、基準細胞集団は、試験細胞集団と同じ組織型に由来するが、対象から異なる時間に採取された(例えば試験細胞集団より早く)。いくつかの実施態様において、一連

10

20

30

40

50

の基準細胞集団試料は、対象から一定の時間間隔で採取される（例えば毎日、毎週、毎月又は毎年）。本発明の一実施例において、基準細胞集団は、複数の細胞に由来する。例えば、基準細胞集団は、前に試験された細胞のN L R R - 1 発現パターンのデータベースにすることができる。

あるいは、コントロールは、基準細胞集団のハウスキーピング遺伝子（例えばアクチンファミリーメンバー）の発現を測定することによって作製することができる。ハウスキーピング遺伝子は、N L R R - 1 遺伝子の過剰発現を測定する比較コントロールとしての機能を果たす。

他の実施態様において、E G F R レベルは、試験細胞集団と基準細胞集団においても測定される。

10

【 0 0 6 0 】

タンパク質と核酸の検出方法

本発明のタンパク質の存在、活性又は量を検出することは、公知技術を用いて容易に行なうことができる。発現は、タンパク質レベルで、すなわちポリペプチドのレベルを測定することによって測定することができる。そのような方法は周知であり、例えばタンパク質に対する抗体を基とするイムノアッセイを含む。試験細胞集団における1以上のタンパク質配列の発現レベルは、基準細胞集団の1以上の細胞におけるその配列の発現レベルと比較することができる。細胞の試験集団及びコントロール集団における配列の発現は、核酸配列の発現を比較するためのこの技術分野において認識されているあらゆる方法を用いて比較することができる。例えば、発現は、米国特許第5,871,697号及びShimkets et al., Nat. Biotechnol. 17:798-803に記載されるようなGENE CALLING（登録商標）法を用いて比較することができる。本発明の特定の実施態様において、1、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、20以上、25以上のタンパク質配列の発現が測定される。

20

この技術分野で公知の様々なアッセイ技術、例えば競合結合アッセイ、直接又は間接サンドイッチアッセイ及び均一相又は不均一相の何れかで実施される免疫沈降アッセイも利用できる（Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158）。アッセイで用いられる抗体又はその抗原結合断片は、検出可能な部分で標識することができる。検出可能な部分は、直接的又は間接的に検出可能なシグナルを產生することができる。例えば、検出可能な部分は、ラジオアイソトープ（例えば³H、¹⁴C、³²P、³⁵S又は¹²⁵I、蛍光又は化学発光化合物（例えばフルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン）、又は酵素（アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼ）であってもよい。Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Paine et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); 及びNygren, J. Histochem. And Cytochem., 30:407 (1982)に記載されるものを含め、検出可能な部分に抗体をコンジュゲートするためのこの技術分野で公知のいかなる方法が用いられ得る。

30

核酸検出技術もまたこの技術分野で公知であり、N L R R - 1 をコード化するm R N Aの存在を評価し、したがって細胞試料が抽出された細胞集団におけるN L R R - 1 の存在又は量を測定するために使用され得る。この技術分野で一般的に公知の核酸の存在、量又は活性を評価するために用いることができる組換えD N A技術の方法は、例えばAusubel et al. eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; 及びKriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NYに記載されている。そのような技術の例は、蛍光インサイチューハイブリダイゼイション（F I S H ; 1998年10月に公開された国際公開第98/45479号を参照）、サザンプロッティング又はポリメラーゼ連鎖反応（P C R ）技術（例えば定量的リアルタイムP C R (q R T - P C R) ）を含む。

40

場合によって、発現が測定されるパラメータ又は状態から独立しているコントロール核酸について、試験細胞集団と基準細胞集団との間で差次的に発現された配列の比較が行な

50

れる。試験核酸と基準核酸におけるコントロール核酸の発現レベルは、比較集団のシグナルレベルを標準化するために用いることができる。適切なコントロール核酸は、従来技術において当業者で容易に測定されることができる。

【0061】

化学療法剤

本発明の併用療法は、1以上の化学療法剤を更に含むことができる。併用投与は、異なる製剤又は単一の製薬製剤を用いた同時投与又は同時的投与、及び何れかの順番での連続的な投与を含み、好ましくは、両方の（又は全て）の活性剤が同時にそれらの生物学的活性を発揮する時間がある。

化学療法剤は、投与される場合、公知の用量で投与されるか、場合によって薬剤の複合作用又は代謝拮抗化学療法剤の投与に起因するマイナスの副作用により少なくされる。そのような化学療法剤の調製及び投薬スケジュールは、製造業者の説明書又は熟練した施術者によって経験的に決定されるように用いられる。

併用できる様々な化学療法剤は、先に開示される。併用される好ましい化学療法剤は、タキソイド（ドセタキセル及びパクリタキセルを含む）、ピンカ（例えばビノレルビン又はピンプラスチン）、白金化合物（例えばカルボプラチニン又はシスプラチニン）、アロマターゼ阻害薬（例えばレトロゾール、アナストロゾール又はエキセメスタン）、抗エストロゲン（例えばフルベストラント又はタモキシフェン）、エトポシド、チオテバ、シクロホスファミド、メトトレキセート、リポソームドキソルビシン、ペグ化リポソームドキソルビシン、カペシタビン、ゲムシタビン、COX-2阻害剤（例えばセレコキシブ）又はプロテオゾーム阻害剤（例えばPS342）からなる群から選択される。

【0062】

製剤、用量及び投与

本発明で用いられる治療剤は、望ましい医療行為に一致した方法で調製、服用及び投与される。これに関連する考慮すべき因子には、治療されるべき特定の疾患、治療される特定の対象、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与日程、併用する薬剤の薬物間相互作用及び医師の公知の他の因子が含まれる。

治療製剤は、所望の純度を有する活性成分を、選択的な生理的に許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤と混合することにより、この技術分野で公知の標準法を用いて調製される（Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA）。許容可能な担体には、食塩水又はバッファー（例えばリン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸）；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質（例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えばポリビニルピロリドン、アミノ酸（例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン））；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む单糖、二糖及び他の炭水化物；キレート剤（例えばEDTA）；糖アルコール（例えばマンニトール又はソルビトール）；塩形成対イオン（例えばナトリウム）；及び/又は非イオン性界面活性剤（例えばTWEEN（登録商標）、PLURONICS（登録商標）又はPEG）が含まれる。

場合によって、しかし好ましくは、製剤には、薬学的に許容可能な塩（好ましくは塩化ナトリウム）が好ましくは生理的濃度で含まれる。場合によって、本発明の製剤には、薬学的に許容可能な防腐剤が含まれてもよい。いくつかの実施態様において、防腐剤の濃度は、0.1から2.0%（一般的にv/v）にわたる。適切な防腐剤には、製薬技術分野において公知のものが含まれる。ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン及びプロピルパラベンが好ましい防腐剤である。場合によって、本発明の製剤は、0.005~0.02%の濃度で薬学的に許容可能な界面活性剤を含んでもよい。

本願明細書の製剤は、治療される特定の徴候に必要な複数の活性化合物を、好ましくはお互いに悪影響を与えない相補的な活性を有するものを含み得る。そのような分子は、使用目的に有効な量で併用剤中に適切に存在する。

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合法（例えばヒドロキシメチ

10

20

30

40

50

ルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ - (メチルメタクリレート)マイクロカプセルのそれぞれ)によって調製されるマイクロカプセル、コロイド薬物送達系(例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョン中に封入されてもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences(上記)において開示される。

徐放性製剤も調製され得る。徐放性製剤の適切な例は、抗体を含む固体の疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、マトリックスは造形品(例えばフィルム又はマイクロカプセル)の形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル類、ヒドロゲル(例えばポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又は、ポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタミン酸塩のコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なミクロスフィア)などの分解可能な乳酸グリコール酸コポリマー及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸グリコール酸のようなポリマーが100日間以上の分子の放出を可能にするのに対して、特定のヒドロゲルはより短い期間タンパク質を放出する。カプセル化された抗体が長い間身体に残る場合、37で湿気への暴露の結果として変性又は凝集し、生物学的活性度の損失及び潜在的な免疫原性の変化が起こり得る。合理的なストラテジーは、関与されるメカニズムに従って、安定化のために考案され得る。例えば、凝集メカニズムがチオ-ジスルフィド相互交換による分子間S-S結合の形成であることが発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基を改变すること、酸性溶液を凍結乾燥すること、含水量を制御すること、適切な添加物を用いること及び特定のポリマー-マトリックス組成物を開発することによって成し遂げられ得る。

本発明の治療薬は、ボーラスのような静脈内投与などの公知の方法に従って、又は筋注、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節腔内、滑液包内、髄こう内、経口、局所又は吸入経路によりある期間にわたる継続投与によってヒト患者へ投与される。VEGFアンタゴニストについて、広範囲な副作用又は毒性がVEGFの拮抗作用と関連している場合、局所投与が特に望まれる。エキソビボストラテジーは、医療適用のためにも用いることができる。エキソビボストラテジーには、対象から得られた細胞を、NLR - 1又はEGFRアンタゴニストをコード化するポリヌクレオチドで形質移入又は形質導入することが関与する。形質移入又は形質導入された細胞は、次いで対象に戻される。細胞は、広範囲にわたるあらゆる型の細胞でもよく、造血細胞(例えば骨髄細胞、マクロファージ、単核細胞、樹状細胞、T細胞又はB細胞)、纖維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト又は筋細胞を含むがこれに限定されるものではない。

例えば、NLR - 1又はEGFRアンタゴニストが抗体である場合、抗体は非経口投与、皮下投与、腹腔内投与、肺内投与及び鼻腔内投与、局所的免疫抑制治療を望む場合は病巣内投与を含むあらゆる適当な手段によって投与される。非経口的注入は、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与又は皮下投与を含む。さらに、抗体は、パルス注入、特に抗体の用量減少を伴うパルス注入によって適切に投与される。好ましくは、投薬は、投与が短期間か長期間にわたるかどうかに部分的に依存して、注射(最も好ましくは静脈内注射又は皮下注射)によって与えられる。

他の例では、疾患又は腫瘍の位置が許し、注射が周期的に繰り返すことができる場合、NLR - 1又はEGFRアンタゴニスト化合物は、例えば直接注射によって局所的に投与される。局所再発又は転移を予防又は減少させるために、腫瘍の外科的切除に続いて、NLR - 1又はEGFRアンタゴニストは、対象に全身的に送達されても、直接腫瘍細胞(例えば腫瘍又は腫瘍床)に送達されてもよい。

治療剤の併用投与は、一般的に、定義された時間(選択される併用によって、通常、分、時間、日又は週)にわたって実行される。併用療法は、連続した方法におけるこれらの治療剤の投与(つまりそれぞれの治療薬が異なる時間に投与される投与)だけでなく、これらの治療薬又はこれらの治療薬の少なくとも2つが実質的に同時に投与される投与を包

10

20

30

40

50

含することが意図されている。

治療剤は、同じ経路又は異なる経路で投与され得る。例えば、併用療法のEGFRインヒビターが経口投与されてもよいのに対して、併用療法のNLRR-1アンタゴニストは静脈内注射によって投与されてもよい。あるいは、例えば、治療剤によって、両方の治療薬が経口投与されてもよく、両方の治療薬が静脈内注射によって投与されてもよい。治療薬が投与される順序は、薬剤によって異なる。

疾病の型及び重症度によって、例えば複数回の投与又は継続投与による、それぞれの治療剤の約1μg/kgから100mg/kg(例えば0.1-20mg/kg)が、患者への候補初回投与量である。典型的な1日の用量は、前述の因子によって、約1μg/kgから約100mg/kg以上にまでわたり得る。少なくとも数日間にわたる反復投与は、状態によって、上記した方法で測定されるように、癌が治療されるまで治療は持続される。しかしながら、他の投与計画も有用であり得る。ある例では、NLRR-1又はEGFRアンタゴニストが抗体である場合、約5mg/kgから約15mg/kgまでわたる用量で、本発明の抗体は2~3週間ごとに投与される。NLRR-1又はEGFRアンタゴニストが経口小分子化合物である場合、薬剤は約25mg/kgから約50mg/kgまでわたる用量で毎日投与される。さらに、本発明の経口化合物は、従来の高用量間欠投薬計画で投与する、もしくは定期的に中断することなくより低用量かつ頻繁な用量を用いて投与する(「メトロノミック治療」と称する)いずれかで投与することができる。間欠投薬計画が用いられる場合、例えば、薬剤は、1日量及び特定の効能に依存して、2~3週間毎日投与した後に1週間中断する;又は4週間毎日投与した後に2週間中断して投与される。

本発明の治療の進歩は、従来の技術及びアッセイによって容易にモニターされる。本出願は、遺伝子治療によるNLRR-1又はEGFRアンタゴニストの投与を意図する。

細胞内抗体を生成するための遺伝子治療の使用について、1996年3月14日に公開された国際公開第96/07321号を参照されたい。

核酸(場合によりベクターに含まれる)を患者の細胞に入れるための2つの主要な手法がある;インビボ及びエキソビボにおいて。インビボ送達では、通常抗体が必要である部位で、核酸が直接患者に注入される。エキソビボ治療では、患者の細胞は摘出され、核酸はこれらの単離された細胞に導入され、改質細胞は患者に直接投与されるか、例えば患者に移植される多孔性膜中にカプセル化される(例えば米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号を参照)。核酸を生存細胞に導入するために利用可能な様々な技術が存在する。技術は、核酸がインビトロで培養細胞に、又はインビボで意図された宿主細胞に移入するかどうかによって変わる。インビトロで哺乳動物細胞への核酸の移入のための適切な技術は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などの使用を含む。

遺伝子のエキソビボ送達のために一般的に用いられるベクターは、レトロウイルスである。現在推奨されるインビボでの核酸移入技術は、ウイルスベクター(アデノウイルス、単純ヘルペスⅠウイルス又はアデノ随伴ウイルスのような)及び脂質ベースシステム(遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えばDOTMA, DOPE及びDC-Cholである)によるを含む形質移入である。いくつかの状況において、核酸供給源に標的細胞を標的とする薬剤(例えば標的細胞の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体、標的細胞上の受容体に対するリガンド)を提供することが望ましい。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスと関連している細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、ターゲティング及び/又は取り込みを容易にするため用いられてもよい(例えば特定の細胞型にカプシドタンパク質又はその断片、循環中に内部移行するタンパク質に対する抗体及び細胞内局在を標的として細胞内半減期を増強するタンパク質)。

受容体媒介性エンドサイトーシスの技術は、例えばWu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987);及びWagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990)に記載される。現在知られる遺伝子標識及び遺伝子治療のプロトコールの説明については

10

20

30

40

50

、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)を参照されたい。国際公開第93/25673号及びそこで引用される文献も参照されたい。

【0063】

製品

本発明の他の一実施態様において、上述の疾患の治療又は診断に有用な材料を含む製品が提供される。製品は、容器、標識及び添付文書を含む。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどを含む。容器はガラス又はプラスチックのような様々な材料で形成することができる。一実施態様において、容器は、疾患を治療するのに有効で、無菌の点検口を有し得る組成物を保持する（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってもよい）。一実施態様において、組成物中の少なくとも一つの活性剤は、N L R R - 1 アンタゴニストである。ある実施態様では、組成物はさらに E G F R アンタゴニストを含む。もう一つの実施態様では、組成物は、N L R R - 1 アンタゴニスト及び少なくとも第二の活性分子を含み、化学療法剤、サイトカイン、ケモカイン、抗血管新生剤、免疫抑制因子、細胞障害性剤及び増殖阻害剤を含むがこれに限定されるものではない。容器上又は容器に付随する標識は、組成物が疾患の最適の治療に用いられることを示す。製品は、製薬的に許容可能なバッファー（例えばリン酸塩緩衝食塩水、リングル液及びブドウ糖溶液）を含む第二容器をさらに含んでもよい。本発明の製品は、さらなる活性薬剤、他のバッファー、希釈液、フィルター、針及びシリンジを含む、商用及び使用者の見地に望ましい他の材料をさらに含んでもよい。製品は、増幅された E G F R を有さない癌を有する患者と同定した診断と関連して N L R R - 1 アンタゴニストが用いられるという説明書をさらに含んでもよい。製品は、組成物が E G F R を標的とする治療に耐性がある癌を有する患者に用いられるという説明書をさらに含んでもよい。

10

20

30

【0064】

材料の寄託

モノクローナル抗体mumab 3D1.6.9の培養物は、American Type Culture Collection (10801 University Blvd., Manassas, VA, USA (ATCC))に寄託され、PTA-8732と命名された。

この寄託は特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約およびそれに基づく規則（ブタペスト条約）の規定に基づいて行われた。これは寄託の日から30年間、生存できる培養の維持を保証するものである。この生物は、当該米国特許の発行時または米国または他の特許出願の公開時にいずれが最初になっても公衆に対してその培養の子孫の永続する無制限の利用可能性を保証し、35 USC 122とそれに準ずる長官規則（8860G638に対する特別な参照を伴う37 CFR 1.12を含む）に従って与えられるべき特許商標庁長官によって決定された者に対するその子孫の利用可能性を保証する、ジェネンテク、インコーポレイテッドとATCCの合意を受けて、ブタペスト条約の約定の下にATCCによって利用可能にされるであろう。

欧州特許が要求されるこれらの指摘に関して、寄託微生物のサンプルは、欧州特許の認可の陳述の公開までか、あるいは本出願が拒絶または取り下げ、または取り下げたものとみなされた日まで、サンプルを要求した個人により指名された専門家へのこのようなサンプルの供給によってのみ利用可能にされるであろう。（ルール28(4) EPC）

40

本願の出願人は、適当な条件下で培養された時に寄託された培養が死滅するか、失われるか、あるいは破壊された場合、その通知時に直ちに、同じ培養の生存できる標本と交換することを合意している。寄託された株の利用可能性を、あらゆる政府の機関の下にその特許法に従って認可された権利に違反する本発明の実施に対する許諾であるとみなすべきではない。

上記の説明は当業者をして本発明を実施させるに足ると考えられる。寄託された態様は、本発明のある側面を例示するものであるに過ぎず、機能的に等価な構築物（コンストラクト）はすべて本発明の範囲に包含されるので、本発明は寄託された構築物によって範囲を制限されるべきではない。本明細書における物質の寄託は本明細書の記述が本発明のな

50

んらか側面の実施を（その最適な方法を含めて）可能にするに足らないことを認めるものではなく、またそれらが表現する特定の例示に請求の範囲が制限されると見なすべきでもない。実際に、本明細書に示し記述するものに加えて、本発明の様々な変法が、上記の説明から当業者には明らかになるであろうし、これらも請求の範囲に包含される。

以下の実施例は、本発明の特定の実施態様を示すために含まれる。当業者であれば、以下に例示する技術は、本発明の実施例で非常に機能し、より好適な既知の実施形態を構成する発明者により発見された技術を示すものであることを理解するであろう。しかしながら、当業者であれば、本発明の開示を考慮して、開示されかつ同様の結果を得られる特定の実施例において、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの変更が可能であることは理解できるであろう。明細書全体にわたる全ての引用文献は、本願明細書にその全てが援用されたものとする。

10

【実施例】

【0065】

実施例 1

材料及び方法

マイクロアレイ及びR T - P C R 解析

マイクロアレイ解析：Tackels-Horne等によって記載されているように、N L R R - 1 転写産物は A f f y m e t r i x マイクロアレイ上で腫瘍及び正常組織で解析された（Tackels-Horne等、2001）。R T - P C R 解析：前立腺腫瘍は、Bio-Options (Fullerton, CA) 及びArdais (Lexington, MA) から得られた。コーティングされたビーズ (Miltenyi Biotec Inc, Auburn, CA) を用いて C D 1 3 8 で精製された細胞からなる多発性骨髄腫の試料は、Cureline (South San Francisco, CA) から得られた。R N A は、標準塩化セシウム手順の後に続くフェノールクロロフォルム抽出を用いて抽出された。抽出されたR N A は、逆転写され、T a q m a n G o l d キット (Applied Biosystems, Warrington, UK) 及び以下のプライマ及びプローブを用いて定量化された：N L R R - 1 フォワード：T C A A T C C C A C T A A A T G A G C T G T A (配列番号：2)、リバース：G T C T G C A G A A C C A T C T T T G T C T (配列番号：3)、プローブ：C C A C C A C T C A T T A A C C T C T G G G A A G G (配列番号：4)；M U C 1 フォワード：T G G C A G C A G C C T C T C T T A (配列番号：5)、リバース：C C C C T A C A A G T T G G C A G A A (配列番号：6)、プローブ：C A C A A C C C A G C A G T G G C A G C (配列番号：7)；R P L 1 9 フォワード：G C G G A T T C T C A T G G A A C A C A (配列番号：8)、リバース：G G T C A G C C A G G A G C T T C T T G (配列番号：9)、プローブ：C A C A A G C T G A A G G C A G A C A A G G C C C (配列番号：10)。全ての実験は、二回行われた。ヒト・ゲノムD N A (BD Biosciences, San Jose, CA) は C t (サイクル閾値) を量に変換する標準として用いられ、データは R P L 1 9 で標準化された。

20

【0066】

N L R R - 1 プラスミド構造及びトランスフェクション

C H O 発現のためのN L R R - 1 . E C D . H I S 構築物：C 末端をH i s で標識された

N L R R - 1 タンパク質の細胞外ドメインは、標準的なクローニング技術によって作製され、製造業者の説明書によってF u g e n e 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) を用いてCHO細胞にトランスフェクションされた。トランスフェクションの48時間後、高発現クローンは200nMメトトレキサートを含み、G H T を含まない培地において選択された。N L R R - 1 タンパク質は、モノクローナル抗体の生成のためにN i - N T A スーパーフローカラム (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、トランスフェクションされたC H O 細胞培養培地から精製された。バキュロウイルス発現のためのN L R R - 1 . E C D . H I S 構築物：C 末端をH i s で標識されたN L R R - 1 タンパク質の細胞外ドメインは、標準的なクローニング技術を用いて変更p V L 1 3 9 3 (BD Pharmingen, San Jose, CA) バキュロウイルス発現ベクターにクローニングされ、S F 9 昆虫細胞において発現された。タンパク質は、ウサギのポリクローナル抗体産生のためにQセファロースカラムで精製された。N L R R - 1 . Y F P 及びN L R R - 1 C . Y F P 構築物：全長及びC Y F P 融合構築物は、p E Y F P - N 1 ベクター (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) へのオーバーラップP C R クローニングによって作製され、増強された黄緑

30

40

50

色の蛍光タンパク質をコード化する。HEK293細胞は、製造業者の説明書に基づいてPolyfect (Qiagen) を用いてトランスフェクションされ、cos-7細胞は、製造業者の説明書に基づいてFugene6を用いて連続二回トランスフェクションされた。NLRR-1Cはアミノ酸681で切断され、クラトリン媒介エンドサイトーシス・モチーフを削除した。(図12A-B)。

【0067】

NLRR-1抗体の生成及びフローサイトメトリー

バキュロウイルスで発現され、精製されるNLRR-1. ECD. HISタンパク質はウサギにおいてポリクローナル抗体を作製するために用いられた (Invitrogen)。5匹のBalb/cマウス (Charles River Laboratories, Hollister, CA) は、モノクローナル抗体の生成のために、Ribi Adjvant (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO) においてバキュロウイルス又はCHOで発現されたポリヒスチジン標識されたヒト細胞外NLRR-1タンパク質で過免疫化された。これらのマウスからB細胞 (その全ては、直接ELISAにより高い抗NLRR抗体力値が示され、フローサイトメトリーによりトランスフェクトされた293、DP-12CHO及び内因的に発現しているLnCAP細胞に発現したNLRRへの特異的結合を示した) は、以前記載されているものと類似した変更プロトコルを用いて (Kohler and Milstein, 1975; Hongo等、1995)、マウス骨髄腫細胞 (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Rockville, MD) と融合させた。10-12日後、上清は抗体産生のために、直接ELISA及びフローサイトメトリーによって採取され、スクリーニングされた。合計8つの陽性クローニングは、限界希釈によるサブクローニング2回の後に最も高い免疫結合を示し、さらなる特徴付けのために増殖、培養された。それぞれのハイブリドーマ系統から採取された上清は、以前記載されているものと類似した変更プロトコルを用いて (Hongo等、1995)、アフィニティーコロマトグラフィ (Pharmacia fast protein liquid chromatography [FPLC]; Pharmacia, Uppsala, Sweden) により精製された。精製された抗体標本はその時、無菌ろ過され (0.2-μm細孔径; Nalgene, Rochester NY)、4℃でリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に保存された。

精製されたモノクローナル抗体は、ベクター又はNLRR-1YFP構築物で一過性トランスフェクションされたHEK293細胞のフローサイトメトリーによって試験された。細胞はNLRR-1モノクローナル抗体及びそれに続くマウスIg-g-allexa647二次抗体を用いて氷上でそれぞれ30分間染色され、FACScan (BD Biosciences) で解析された。細胞は前方散乱 (FSC)、側方散乱 (SSC)、よう化プロピジウム (PI) 及びYFPについてゲーティングされ、Flowjo (Treestar, Ashland, OR) で解析された。(図14)

【0068】

細胞培養

ヒト腫瘍株NCI-H2009、NCI-H647、NCI-H520、NCI-H1781、NCI-H226及びSK-MES-1は、RPMI1640培地において維持された。HEK293細胞は、F12:DMEM高グルコース50:50培地において維持された。CHODP12細胞は、GHTを伴うF12:DMEM 50:50培地において維持された。Cos-7細胞は、F12:DMEM 50:50培地において維持された。全ての培地は、10%FBS、L-グルタミン及びペニシリン-ストレプトマイシンを補充された。

免疫蛍光法

NLRR-1.YFP又はNLRR-1.C.YFPで一過性トランスフェクションされたHEK293細胞は、8つのチェンバーガラススライド上へ播種された。細胞は、室温で20分間、4%パラホルムアルデヒドで固定した。NLRR-1抗体染色のために、細胞は室温で20分間、0.4%サポニン・バッファーで透過処理された。細胞はNLRR-1ウサギ・ポリクローナル抗体及びそれに続くウサギ-Cy-3二次抗体により染色された。スライドはDapiを含むVectashieldマウント培地でマウントされ

10

20

30

40

50

た (Vector Lab, Burlingame, CA)。像は、カメラを備えた顕微鏡において 60 倍率で得られた。像の重ね合わせは、Adobe Photoshop ソフトウェアを用いて作製された。

免疫組織化学

組織マイクロアレイは Cybrid (Frederick, MD) から購入された。抗原賦活は、Borg Decloaker、Reveal 又は Universal Reveal (Biocare Medical, Concord, CA) 中で沸騰することによって行われた。N L R R - 1 ポリクローナル抗体及びコントロール・ウサギ Ig 抗体は、6 ug / ml で用いられた。シグナルは、Biocare Medical から得られた M A C H 3 システムを用いて検出された。

【0069】

10

免疫共沈降及びウエスタンプロット解析

細胞は、プロテアーゼインヒビター・カクテル (Roche, Basel, Switzerland) 及び PMSF を含む T B S 中の 0.5% NP 40 において 10 分間氷上で溶解された。DNA は 18 ゲージ針によってせん断され、破片は遠心によって取り除かれた。溶解物は 4 で 30 分間回転させて、10 g / ml - GP 120 モノクローナル抗体を用いて予め除去された (Genentech, Inc.)。予め除去された溶解液は、10 g / ml の N L R R - 1 モノクローナル抗体、E G F R (Cell Signaling, Danvers, MA) 又はブタクサ (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) 抗体と共に、4 で 2 時間回転させてインキュベートされ、タンパク質 G アガロースビーズで沈降された。沈殿物は溶解緩衝液で 4 回洗浄され、4 - 12% Bis - トリス・ゲル (Invitrogen, Carlsbad, CA) で分離された。タンパク質は、P V D F 膜 (Invitrogen) 上に転写され、N L R R - 1 ポリクローナル 1 / 500 (Genentech, Inc.)、E G F R モノクローナル抗体 1 / 1000 (MBL Corporation, Woburn, MA)、E R B B 2 1 / 1000 (LabVision, Fremont, CA)、H e r 3 1 / 1000 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、I G F 1 R 1 / 1000 (Cell Signaling) 及びアダブシン 1 / 500 (Santa Cruz Biotechnology) を用いたウエスタン解析により検出された。

E R K リン酸化 (P - E R K) 及び A K T リン酸化 (P - A K T) アッセイ

細胞は、75 - 85% の培養密度で 60 mm のプレートに播種され、オーバーナイトで回復させた。細胞は、Opti mem I (Invitrogen) 中で 2 g / ml の抗体を用いてオーバーナイトでインキュベーションする前に、6 ~ 8 時間 Opti mem I 中で飢餓された。細胞は、37 で 10% 血清、E G F 又は T G F で刺激され、直ちに氷上に置かれた。セルスクレーパーは、ホスホ - バッファー (P B S 中に 1 mM オルトバナジウム酸ナトリウム、1 mM アジ化ナトリウム、1 g / ml マイクロシスチン、1 mM - グリセロールリン酸) 中の細胞を採取するために用いられた。セルは、氷上で 20 分間の氷冷 90% メタノールの透過化処理の前に、37 で 10 分間、ホスホ - バッファー中の 1% ホルムアルデヒドで固定した。細胞は、Cell Signaling Technologies (Danvers, MA) から得られた P - E R K 及び P - A K T 抗体及びそれに続く蛍光性接合二次 - ウサギ又は - マウス Ig で染色された。5,000 ~ 10,000 のイベントは、フローサイトメトリーのために回収され、F S C 及び S S C についてゲーティングされた。Y F P 構築物でトランسفエクションされた H E K 2 9 3 及び C o s - 7 細胞は、刺激、採取及び上記のように染色する前に、オーバーナイトで飢餓された。10,000 ~ 50,000 のイベントはフローサイトメトリーのために回収され、細胞は F S C 、 S S C 及び Y F P についてゲーティングされた。

【0070】

30

N L R R - 1 の s i R N A ノックダウン及びアッセイ

N L R R - 1 s i R N A 二体鎖は、D h a r m a c o n (Lafayette, CO) によって設計及び合成された。センス配列は G C C A G A A C C U G A A U U A C U U (配列番号 : 11) であり、アンチセンス配列は 5' - P G U A A A U U U C A G G U U C U G G C U U (配列番号 : 12) である。N C I - H 2 0 0 9 、 N C I - H 6 4 7 、 N C I - H 2 2 6 及び S K - M E S - 1 細胞は 2 8 3 0 / cm² で播種され、N C I - H 5 2 0 及び N C I - H 1 7 8 1 細胞は 5 6 6 0 / cm² で播種

40

50

された。トランスフェクタントが新しい培地に交換される前に、100 nMのsiRNAはDharmaFECT4で6~8時間トランスフェクションされた。非ターゲッティングsiRNA配列(Dharmacon)はネガティブコントロールとして用いられた。RT-PCRは、製造業者の説明書に基づいてRNaseasyを用いて60mmのプレートから抽出されたRNAについて行われた(Qiagen, Valencia, CA)。EGFRフローサイトメトリー及び免疫プロット:24時間のsiRNAトランスフェクションの後、細胞は採取され、フローサイトメトリー解析のためにPEに接合された-EGFR抗体(BD Pharmingen)及びよう化プロピジウムで染色された。10,000のイベントは回収され、細胞はFSC、SSC及びPIについてゲーティングされた。イムノプロット分析のために、溶解物はEGFR(MBL)又はチュープリン(Santa Cruz Biotechnology)で免疫プロットされた。増殖アッセイ:siRNAノックダウンは、説明したように、96穴プレートにて行われた。細胞増殖は、製造業者の説明書に基づいてCell Titer Glo(Promega, Madison, WI)により4日間後に評価された。アポトーシス及びエルロチニブ相乗効果アッセイ:siRNAトランスフェクションは、説明したように、60mmのプレートにて行われた。細胞は、1200/wellで96穴プレートに播種された。エルロチニブアッセイのために、細胞は、2mg/ml BSAを含む培地で希釈されたエルロチニブで処理された。飢餓を伴うアポトーシス・アッセイのために、細胞はOptime mediumにおいて飢餓された。両方のアッセイのために、細胞生存率はCell Titer Glo(Promega, Madison, WI)で測定され、アポトーシスは2日間後にCaspase-Glo 3/7(Promega)で測定された。図の説明文に示されるように、データは平均±標準偏差(SD)又は標準誤差(SE)としてグラフで示される。

【0071】

実施例2

NLRR-1は前立腺腫瘍において発現され、高悪性度の疾患と関連している

NLRR-1発現は初期発生及び神経芽細胞腫と関連していた(Aubert等、2003; Haines等、2005; Hamano等、2004)。NLRR-1は、いくつかの他の腫瘍型とともに、前立腺腫瘍において発現されることが見いだされた(図1A、B、図2A)。レーザー捕捉顕微解剖及び発現プロファイリングは前立腺上皮(図1B)の発現を確認し、NLRR-1の細胞外ドメインに特異的なポリクローナル抗体での前立腺腫瘍の染色は前立腺腫瘍の形質膜染色を明らかにした。

前立腺腫瘍におけるNLRR-1の発現は、場合によりグリーソン・スコア7以上により高い転写レベル及びグリーソン7未満のより低い転写レベルの疾患、前立腺上皮細胞間の腫瘍形成及び前立腺肥大症などの特に悪性度の高い疾患と関連していた。より高いグリーソン・スコアは、前立腺癌におけるより低い予後と関連した臨床パラメータである(Andren等、2006b; Gleason and Mellinger, 1974)。NLRR-1と悪性度の高い疾患及び低い予後との関連の独立試験として、MUC1及びNLRR-1の転写産物定量は、前立腺腫瘍から単離されたRNAのRT-PCR解析を用いて行われた(図1D)。MUC1は前立腺癌による死の非常に増加したリスク及び前立腺癌の進行と関連し、他の臨床パラメータから独立している(Andren等、2006b; Lapointe等、2004)。MUC1及びNLRR-1の発現は、r²が0.93であり非常に相関しており(図1C)、更に高い悪性度、低い予後の疾患と高いNLRR-1発現との関連を裏づける。

【0072】

実施例3

NLRR-1は多くの異なる腫瘍において発現され、その発現は上昇したEGFRと反相関する

転写産物解析は、NLRR-1が、前立腺腫瘍だけでなく上皮性腫瘍及びいくつかの悪性度の高い血液癌(例えば多発性骨髄腫及びマントル細胞リンパ腫)全体にも発現されたことを明らかにした(図2A, B; 図9A)。比較として、高いNLRR-3転写産物は、腫瘍試料の非常に小さいサブセットにおいて検出された(図9B)。対応している正常組織におけるNLRR-1の発現はより制限されており、転写産物はほとんど検出さ

10

20

30

40

50

れなかった(図2A)。N L R R - 1ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学により、膵臓、乳房、肺及び転移性結腸のこれらの異なる腫瘍型のいくつかにおけるタンパク質の発現が確認された。

このデータは、N L R R - 1がE G F R経路シグナリングを容易にし、E G F Rの増幅を必要とすることのない経路活性化を増加させる手段を提供することを示す。腫瘍における1又は他の遺伝子の高い発現が経路刺激に十分であるように、腫瘍におけるいくらか反相関している発現パターンが予想され得る。このようなパターンは、例えば、E G F R及びE R B B 2 (H E R 2)転写産物に対して、主に乳腫瘍のサブセットにおけるE R B B 2増幅により観察され(図2C)、N L R R - 1及びE G F Rの転写産物データを前立腺、肺、乳房、結腸、膵臓、腎臓、胃、子宮内膜及び卵巣の腫瘍のトータルで全体を比較する場合もまた明白だった(図2D)。E G F Rの高いレベルを発現している大部分の腫瘍はほとんどN L R R - 1発現を示さず、高いN L R R - 1転写産物を伴う腫瘍は、よくても適度な、一般的には低いE G F Rのレベルを有していた。C B L及びC D H 1(リプレッサ能力のE G F Rと関連しているが、直接にフォワード・シグナリングに関係していない(Levkowitz等、1998; Qian等、2004))のような他のタンパク質は、同じ腫瘍データにおいてこの転写産物反相関のパターンを示さなかった(図10A, B)。

【0073】

実施例4

N L R R - 1は、物理的にE G F Rと関連し、M A Pキナーゼ活性化を促進する

N L R R - 1及びE G F R間の起こり得る物理的相互作用は、免疫共沈降解析によって調査された。抗N L R R - 1又はE G F Rモノクローナル抗体は、N L R R - 1を内因的に発現する細胞株からのタンパク質を沈殿させるために用いられ、E G F R又はN L R R - 1の存在の免疫プロットによって解析された。乳腫瘍株B T 5 4 9において抗N L R R - 1モノクローナル抗体で細胞を処理することは効果的にE G F Rを共沈降させ、相互実験において抗E G F R抗体はN L R R - 1を沈降させることができた(図3A)。細胞が無関係なタンパク質(ブタクサ)に対する抗体を用いて同じ条件下で処理された場合、どちらのタンパク質も沈降しなかった。この解析はN L R R - 1を高レベルで発現する肺腫瘍細胞株N C I - H 2 0 0 9に対しても拡張された。N L R R - 1、E G F R及びE R B B 2に対する抗体を用いた抗N L R R - 1抗体で処理された溶解物のプロービングプロットは全て適切なサイズのバンドを生じたのに対し、E R B B 3又は異なる受容体チロシンキナーゼファミリーメンバーであるI G F 1 Rでは検出されなかった(図3B)。これらのデータは、N L R R - 1がE G F Rと直接又はE G F Rシグナリング複合体の他の成分を経て間接的のいずれかにより、物理的に関連することを示唆する。N L R R - 1とクラトリンコート形成タンパク質アダプチン(A P 2 B 1)との関連もまた保存されたクラトリン媒介エンドサイトーシス・モチーフに基づいて予想され(Fukamachi等、2002)、これはN C I - H 2 0 0 9細胞の免疫共沈降及びイムノプロット分析(図3B)によっても検出された。

M A Pキナーゼ・シグナリングを促進する際のN L R R - 1の役割は、C末端Y F P標識N L R R - 1を用いて調査された。トランスフェクションされた細胞は、Y F P発現細胞についてゲーティングされ、E G F又はT G F のいずれかで刺激してリン酸化E R Kについて定量的フローサイトメトリー解析にかけられた(この方法論に関する付加的なデータについては図11A, Bを参照)。シグナリングの増強は、C o s - 7細胞(図4A)においてE G F刺激では検出されなかった。しかしながら、ベクターをトランスフェクションされたコントロールと比較して、N L R R - 1でトランスフェクションされた細胞において、T G F を用いた刺激はM A Pキナーゼ活性化の大きさの有意な増加を產生した(図4B)。これらの所見は、N L R R - 1がT G F 媒介E G F Rシグナリングを促進するものとして役立つことを示唆する。

N L R R - 1は、クラトリン媒介エンドサイトーシス・モチーフ(おそらく細胞膜でのシグナリング成分のクラスタリング及び内部移行複合体のシグナリングを促進することによって、N L R R - 3のそれはE G Fの低濃度に応答してシグナリングを容易にする役割

10

20

30

40

50

を果たす)を含むC末端領域の完全な保存を含む、N L R R - 3と有意な配列相同性を共有する。正常細胞にトランスフェクションされたY F P 標識欠損構築物のフローサイトメトリーは、N L R R - 1のエンドサイトーシス・モチーフがN L R R - 1の内部移行を促進する働きをすることを示した(図5 A)が、N L R R - 1はこのモチーフなしで内部移行された。腫瘍細胞におけるE G F R の内部移行に対するN L R R - 1発現の効果をより直接的に取り組むために、N L R R - 1は、内因的に発現する腫瘍細胞株(図6 A)においてs i R N A ノックダウンを用いて減少され、表面E G F R タンパク質レベルをフローサイトメトリーによって解析し、非ターゲッティングs i R N A コントロール(図5 B)と比較した。定量的フローサイトメトリー(N C I - H 2 0 0 9、N C I - H 2 2 6、N C I - H 6 4 7)のための充分なE G F R を伴う3つの腫瘍株において、表面E G F R の増加はN L R R - 1 減少細胞において検出され、その大きさは、最も高い内因性レベルのN L R R - 1を発現した細胞(N C I - H 2 0 0 9、図6 A; 図5 B)において最も大きかった。これらのデータは、E G F R シグナリング複合体の取り込み促進におけるN L R R - 1の役割を裏づける。減少したN L R R - 1の細胞及びコントロール減少細胞においてトータルE G F R タンパク質のレベルは不变であり、表面における発現の減少が増加した分解によるものではなかったことを示した。
10

【0074】

実施例5

N L R R - 1は、内在的に発現する腫瘍細胞株における細胞生存率及びアポトーシスへの耐性にとって重要である
20

腫瘍細胞におけるN L R R - 1の役割は、N L R R - 1が様々な転写産物レベルで内因的に発現された5つの非小細胞肺癌細胞株(N C I - H 2 0 0 9、N C I - H 5 2 0、N C I - H 6 4 7、N C I - H 1 7 8 1、N C I - H 2 2 6; 図6 A)のパネルを用いて、更に調査された。A T Pベースの定量的細胞生存アッセイ(図6 A、B)を用いて解析した場合、s i R N A を用いたN L R R - 1のノックダウンは非ターゲッティングs i R N A コントロールと比較して、全ての細胞株で類似した増殖異常を生じさせた。対照的に、増殖の重大な異常は、N L R R - 1を発現しなかった肺癌細胞株であるS K - M E S 1におけるN L R R - 1 s i R N A ノックダウンでは観察されなかった(図6 A, B)。

腫瘍細胞におけるE G F R 経路の活性化は、細胞生存を含む多くの重要な細胞過程に影響を及ぼす。E G F R シグナリングは、細胞表面において内部移行された複合体から発生し、エンドソーム関連E G F R シグナリングは細胞生存に導くシグナル伝達経路の刺激に関与する(Wang等、2002)。E G F R シグナリング複合体のクラスタリング及び内部移行の促進におけるN L R R - 1の考え得る役割を仮定すると、N L R R - 1ノックダウンで観察された生存率異常は、生存率の明らか減少が減少した増殖のみから生じたかどうか、又はアポトーシス細胞死が役割を果たしていたかどうかを決定するために更に調査された。N L R R - 1はs i R N A を用いてノックダウンされ、細胞はアポトーシスを促進するために飢餓にかけられ、アポトーシスはカスパーゼ3 / 7活性により測定され、生存細胞で標準化された(図6 C)。N L R R - 1を内因的に発現した全ての細胞株は、非ターゲッティング・コントロールR N A と比較して、N L R R - 1のノックダウンに応じて、アポトーシスの増加を示した。これらのデータは、N L R R - 1がこれらの内因的に発現している腫瘍細胞株の生存率にとって重要であり、アポトーシス細胞死の耐性に寄与することを示す。
30

【0075】

実施例6

抗N L R R - 1モノクローナル抗体は、腫瘍細胞におけるM A P キナーゼ及びP I 3 キナーゼの活性化を減らす

ここに示されるように、正常細胞にトランスフェクションする場合、E R K のリン酸化によって評価されるようにN L R R - 1はM A P キナーゼ経路活性化を促進する。N L R R - 1が腫瘍細胞において同様の役割を果たすかどうかを調査するために、肺癌細胞株N C I - H 2 0 0 9は抗体で処理され、血清、E G F 又はT G F で刺激され、E R K のリ
40

ン酸化はフローサイトメトリーを用いて25分間隔で定量的に評価された。抗NLRR-1モノクローナル抗体3D1は、血清及びTGFへの応答としてERKリン酸化の大きさを、無関係なタンパク質（ブタクサ）に対するコントロール抗体と比較して有意に減少させることができた（図7A、B；図11）。アッセイの堅実性の評価において、いくつかの独立して行われたアッセイを通じた血清で刺激された細胞の解析は、ERKリン酸化の減衰が再現可能であり（図11B）、別のNLRR1-陽性細胞株（NCI-H520）においても明白であったことを示した（図11C）。これらのデータは、NLRR-1がTGF及び血清刺激に応答してMAPキナーゼ経路活性化において重要な役割を果たし得ることを示す。

NLRR-1でトランスフェクションされた正常細胞におけるEGFを用いたERK活性化で見られる効果の欠如と一致して、3D1抗体は100ng/ml及び1ng/mlのEGFの濃度ではNCI-H2009においてEGF媒介シグナリングに対してほとんど効果がなかった（図7C（D））。ERK活性化の遅延及び減少した大きさの証拠は、低濃度のEGFでのみ明白であった（0.1ng/ml；図7E）。これらのデータは、NLRR-1がEGFに応答してMAPキナーゼの活性化を促進するという役割が低濃度EGFにのみ関連することを示唆する。この結果はそれでもなお宿主において増殖因子に限定的な環境で腫瘍細胞と生理的に関連するかもしれない可能性があり、これらのデータは非常に低いEGF濃度のみで観察されたホモログNLRR-3により促進される増加した経路活性化とも一致している。（Fukamachi等、2002）。

EGFR活性化はPI3キナーゼ経路を通じたシグナリングをも生じさせ、細胞成長、増殖、生存及び運動性に影響を及ぼす反応力スケードを引き起こし、活発な腫瘍発達に寄与する（Hennessy等、2005；Vivanco and Sawyers, 2002）。腫瘍細胞でのPI3キナーゼ経路シグナリングの促進におけるNLRR-1の果たし得る役割は、したがって、10%血清、TGF及びEGFで処理した上で抗NLRR-1モノクローナル抗体3D1及びリン酸化AKTの定量的フローサイトメトリーを用いて調査された。MAPキナーゼ活性化の所見と一致して、3D1はTGF又は10%血清での刺激に応答してAKTリン酸化の大きさを減らした（図7F（G））。また、EGF刺激では阻害効果はほとんど見られず（図7H）、リン酸化の考え得る阻害のいくつかの証拠は超低濃度のEGFのみで検出された（0.01ng/ml、図7I）。

抗NLRR-1抗体3D1で観察されたMAPキナーゼ活性化の減衰は、選択的EGFRインヒビター、エルロチニブ（Tarceva）で生じた減衰と直接比較された。NCI-H2009細胞は、2uMの以下のIC50を有し、エルロチニブ感受性として特徴づけられた（Yauch等、2005）。NCI-H2009細胞は、3D1、無関係なタンパク質（ブタクサ）に対するコントロール抗体、及び0.25uM又は2.5uMのエルロチニブの存在下において、TGFで刺激された。2.5uMのエルロチニブと同様に、3D1抗体は少なくともMAPキナーゼ・リン酸化を減衰させることができた（図7J、K）。抗体でのNLRR-1のターゲティングが選択的キナーゼ・インヒビターによる直接的なEGFRのターゲッティングと同様の効果を生じたように、これらのデータはNLRR-1発現が内因的に発現する細胞株において経路活性化に重要であることを示す。NLRR-1モノクローナル抗体（図11C）でのNCI-H520におけるMAPキナーゼ活性化の減衰は、エルロチニブ耐性細胞株においてもあてはまる事を示す（Yauch等、2005）。

【0076】

実施例7

肺腫瘍細胞株におけるNLRR-1の減少は、EGFRインヒビターエルロチニブでの処理によるアポトーシスを促進する

腫瘍細胞悪性腫瘍に対するEGFRシグナリングの寄付は細胞生存の促進であり、選択的EGFRインヒビターは腫瘍細胞におけるアポトーシスを増加させることを示した（Chinnaiyan等、2005；Moyer等、1997；Ng等、2002；Sordella等、2004）。結腸腫瘍細胞において、小分子インヒビターでのEGFR及びERBB2のターゲッティングは、アポト

10

20

30

40

50

ーシスの相乗的増加を生じた (Zhou and Brattain, 2005)。この研究において用いられる肺腫瘍細胞株のいくつかはN L R R - 1を内因的に発現しており、8 uM以上のI C 50でエルロチニブ耐性として分類された (Yauch等、2005)。エルロチニブは併用療法において腫瘍細胞のアポトーシスを増強することが示された (Chinnaiyan等、2005; Ng等、2002)。内因的に発現する腫瘍株におけるN L R R - 1のノックダウンが増加したアポトーシスを生じるように、エルロチニブの存在下でのアポトーシスに対する感受性の変化が他の耐性細胞株におけるN L R R - 1のノックダウンにおいて観察されるかを決定するために研究は行われた。

N L R R - 1はs i R N Aノックダウンを用いて減少され、細胞は増加した濃度のエルロチニブ存在下で培養された。カスパーゼ3 / 7活性によって評価されるように、これらの細胞株のいくつかはアポトーシスの増加を示した (図8)。感度の有意な増加は他のエルロチニブ耐性の細胞株であるN C I - H 6 4 7でも明白であり (Yauch等、2005) (図8 A)、N L R R - 1ノックダウン及びエルロチニブの相乗効果は、耐性の細胞株N C I - H 1 7 8 1 (図8 B)、N C I - H 2 2 6 (図8 C)についても観察され、場合によりN C I - H 5 2 0 (図8 D)においてより小さい程度が観察された。N C I - H 2 0 0 9はエルロチニブに感受性であり (Yauch等、2005)、N L R R - 1が減少した細胞 (図8 E)における増加したアポトーシスを示さなかった。予想通りに、N L R R - 1 - ネガティブコントロール腫瘍細胞株であるS K - M E S (エルロチニブ感受性)は、N L R R - 1のノックダウンによるアポトーシスの増加を示さなかった (図8 F)。これらのデータは、N L R R - 1がE G F Rシグナリングにおいて重要な役割を果たすという我々の所見を裏づけており、N L R R - 1がいくつかの腫瘍において見られるE G F Rキナーゼ・インヒビター (例えばエルロチニブ)に対する非感受性に潜在的に寄与し得ることを示唆する。

【0077】

文献

Andren, O., Fall, K., Andersson, S., Rubin, M.A., Karlsson, M., Bismar, T.A., Johansson, J., and Mucci, L. (2006a). Muc-1 gene is associated with prostate cancer progression: A 20-year follow-up of a population based study in Sweden. 2006 Prostate Cancer Symposium.

Andren, O., Fall, K., Franzen, L., Andersson, S.O., Johansson, J.E., and Rubin, M.A. (2006b). How well does the Gleason score predict prostate cancer death? A 20-year followup of a population based cohort in Sweden. The Journal of urology 175, 1337-1340.

Aubert, J., Stavridis, M.P., Tweedie, S., O'Reilly, M., Vierlinger, K., Li, M., Ghazal, P., Pratt, T., Mason, J.O., Roy, D., et al. (2003). Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 100 Suppl 1, 11836-11841.

Bormann, P., Roth, L.W., Andel, D., Ackermann, M., and Reinhard, E. (1999). zfNLRR, a novel leucine-rich repeat protein is preferentially expressed during regeneration in zebrafish. Mol Cell Neurosci 13, 167-179.

Chinnaiyan, P., Huang, S., Vallabhaneni, G., Armstrong, E., Varambally, S., Tomlins, S.A., Chinnaiyan, A.M., and Harari, P.M. (2005). Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). Cancer research 65, 3328-3335.

Dziadziuszko, R., Witta, S.E., Cappuzzo, F., Park, S., Tanaka, K., Danenberg, P.V., Baron, A.E., Crino, L., Franklin, W.A., Bunn, P.A., Jr., et al. (2006). Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 12, 3078-3084.

Eberhard, D.A., Johnson, B.E., Amler, L.C., Goddard, A.D., Heldens, S.L., Herbst 50

- , R.S., Ince, W.L., Janne, P.A., Januario, T., Johnson, D.H., et al. (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23, 5900-5909.
- Ebner, R., and Derynck, R. (1991). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell regulation* 2, 599-612.
- El-Obeid, A., Hesselager, G., Westermark, B., and Nister, M. (2002). TGF-alpha-driven tumor growth is inhibited by an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 349-358. 10
- Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Kitanaka, C., Kuchino, Y., and Tsuda, H. (2001). Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 257-263.
- Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Ohno, H., Hamaguchi, T., and Tsuda, H. (2002). Neuronal leucine-rich repeat protein-3 amplifies MAPK activation by epidermal growth factor through a carboxyl-terminal region containing endocytosis motifs. *J Biol Chem* 277, 43549-43552.
- Gleason, D.F., and Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology* 111, 58-64. 20
- Haines, B.P., Gupta, R., Michael Jones, C., Summerbell, D., and Rigby, P.W. (2005). The NLRR gene family and mouse development: Modified differential display PCR identifies NLRR-1 as a gene expressed in early somitic myoblasts. *Dev Biol* 281, 145-159.
- Hamano, S., Ohira, M., Isogai, E., Nakada, K., and Nakagawara, A. (2004). Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int J Oncol* 24, 1457-1466.
- Han, S.W., Kim, T.Y., Hwang, P.G., Jeong, S., Kim, J., Choi, I.S., Oh, D.Y., Kim, J.H., Kim, D.W., Chung, D.H., et al. (2005). Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 23, 2493-2501. 30
- Haugh, J.M., Huang, A.C., Wiley, H.S., Wells, A., and Lauffenburger, D.A. (1999a). Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 34350-34360.
- Haugh, J.M., Schooler, K., Wells, A., Wiley, H.S., and Lauffenburger, D.A. (1999b). Effect of epidermal growth factor receptor internalization on regulation of the phospholipase C-gamma1 signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 8958-8965.
- Hayata, T., Uochi, T., and Asashima, M. (1998). Molecular cloning of XNLRR-1, a Xenopus homolog of mouse neuronal leucine-rich repeat protein expressed in the developing Xenopus nervous system. *Gene* 221, 159-166. 40
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews* 4, 988-1004.
- Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R.N., Fausto, N., Smith, G.H., and Merlini, G. T. (1990). TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61, 1137-1146.
- Jiang, D., Yang, H., Willson, J.K., Liang, J., Humphrey, L.E., Zborowska, E., Wang, D., Foster, J., Fan, R., and Brattain, M.G. (1998). Autocrine transforming growth factor alpha provides a growth advantage to malignant cells by facilitating re-entry into the cell cycle from suboptimal growth states. *J Biol Chem* 273, 3 50

1471-31479.

Lapointe, J., Li, C., Higgins, J.P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., et al. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 811-816.

Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes & development* 12, 3663-3674.

Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139. 10

Maeda, K., Kato, Y., and Sugiyama, Y. (2002). pH-dependent receptor/ligand dissociation as a determining factor for intracellular sorting of ligands for epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes. *J Control Release* 82, 71-82.

Martinez-Arca, S., Bech-Serra, J.J., Hurtado-Kuttner, M., Borroto, A., and Arribas, J. (2005). Recycling of cell surface pro-transforming growth factor- α regulates epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 280, 36970-36977. 20

Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., et al. (1997). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer research* 57, 4838-4848.

Ng, S.S., Tsao, M.S., Nicklee, T., and Hedley, D.W. (2002). Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 1, 777-783.

O'Dwyer P, J., and Benson, A.B., 3rd (2002). Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 29, 10-17. 30

Oliveira, S., van Bergen en Henegouwen, P.M., Storm, G., and Schiffelers, R.M. (2006). Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. *Expert opinion on biological therapy* 6, 605-617.

Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.

Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J., and Lowy, D.R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal* 23, 1739-1748. 40

Sato, Y., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Jain, S.K., Hamaoka, R., Miyagawa, J., Yaginuma, Y., Honke, K., Ishikawa, M., and Taniguchi, N. (2001). Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III enhances the epidermal growth factor-induced phosphorylation of ERK in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors. *J Biol Chem* 276, 11956-11962.

Scher, H.I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J., and Cordon-Cardo, C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* 1, 545-550. 50

- Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C., Gilles, E.D., and Muller, G. (2002). Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* 20, 370-375.
- Sebastian, S., Settleman, J., Reshkin, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A., and Paradiso, A. (2006). The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochimica et biophysica acta* 1766, 120-139.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., et al. (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132. 10
- Sordella, R., Belli, D.W., Haber, D.A., and Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305, 1163-1167.
- Tackels-Horne, D., Goodman, M.D., Williams, A.J., Wilson, D.J., Eskandari, T., Vogt, L.M., Boland, J.F., Scherf, U., and Vockley, J.G. (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* 92, 395-405.
- Taguchi, A., Wanaka, A., Mori, T., Matsumoto, K., Imai, Y., Tagaki, T., and Tohyama, M. (1996). Molecular cloning of novel leucine-rich repeat proteins and their expression in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 35, 31-40. 20
- Taniguchi, H., Tohyama, M., and Takagi, T. (1996). Cloning and expression of a novel gene for a protein with leucine-rich repeats in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 36, 45-52.
- Tsao, M.S., Sakurada, A., Cutz, J.C., Zhu, C.Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Lorimer, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., et al. (2005). Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353, 133-144.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.
- Wang, D., Li, W., Jiang, W., Humphrey, L.E., Howell, G.M., and Brattain, M.G. (1998). Autocrine TGF α expression in the regulation of initiation of human colon carcinoma growth. *J Cell Physiol* 177, 387-395. 30
- Wang, Y., Pennock, S., Chen, X., and Wang, Z. (2002). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 7279-7290.
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 637-643.
- Andren, O., Fall, K., Andersson, S., Rubin, M.A., Karlsson, M., Bismar, T.A., Johansson, J., and Mucci, L. (2006a). Muc-1 gene is associated with prostate cancer progression: A 20-year follow-up of a population based study in Sweden. 2006 Prostate Cancer Symposium. 40
- Andren, O., Fall, K., Franzen, L., Andersson, S.O., Johansson, J.E., and Rubin, M.A. (2006b). How well does the Gleason score predict prostate cancer death? A 20-year followup of a population based cohort in Sweden. *The Journal of urology* 175, 1337-1340.
- Aubert, J., Stavridis, M.P., Tweedie, S., O'Reilly, M., Vierlinger, K., Li, M., Ghazal, P., Pratt, T., Mason, J.O., Roy, D., et al. (2003). Screening for mammalian neural genes via fluorescence-activated cell sorter purification of neural precursors from Sox1-gfp knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1, 11836-11841. 50

- Bormann, P., Roth, L.W., Andel, D., Ackermann, M., and Reinhard, E. (1999). zfNL RR, a novel leucine-rich repeat protein is preferentially expressed during regeneration in zebrafish. *Mol Cell Neurosci* 13, 167-179.
- Chinnaiyan, P., Huang, S., Vallabhaneni, G., Armstrong, E., Varambally, S., Tomlins, S.A., Chinnaiyan, A.M., and Harari, P.M. (2005). Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer research* 65, 3328-3335.
- Dziadziszko, R., Witta, S.E., Cappuzzo, F., Park, S., Tanaka, K., Danenberg, P.V., Baron, A.E., Crino, L., Franklin, W.A., Bunn, P.A., Jr., et al. (2006). Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 3078-3084. 10
- Eberhard, D.A., Johnson, B.E., Amler, L.C., Goddard, A.D., Heldens, S.L., Herbst, R.S., Ince, W.L., Janne, P.A., Januario, T., Johnson, D.H., et al. (2005). Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23, 5900-5909.
- Ebner, R., and Derynck, R. (1991). Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes. *Cell regulation* 2, 599-612.
- El-Obeid, A., Hesselager, G., Westermark, B., and Nister, M. (2002). TGF-alpha-driven tumor growth is inhibited by an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 349-358. 20
- Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Kitanaka, C., Kuchino, Y., and Tsuda, H. (2001). Rat neuronal leucine-rich repeat protein-3: cloning and regulation of the gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 287, 257-263.
- Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Ohno, H., Hamaguchi, T., and Tsuda, H. (2002). Neuronal leucine-rich repeat protein-3 amplifies MAPK activation by epidermal growth factor through a carboxyl-terminal region containing endocytosis motifs. *J Biol Chem* 277, 43549-43552.
- Gleason, D.F., and Mellinger, G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology* 111, 58-64. 30
- Haines, B.P., Gupta, R., Michael Jones, C., Summerbell, D., and Rigby, P.W. (2005). The NLRR gene family and mouse development: Modified differential display PCR identifies NLRR-1 as a gene expressed in early somitic myoblasts. *Dev Biol* 281, 145-159.
- Hamano, S., Ohira, M., Isogai, E., Nakada, K., and Nakagawara, A. (2004). Identification of novel human neuronal leucine-rich repeat (hNLRR) family genes and inverse association of expression of Nbla10449/hNLRR-1 and Nbla10677/hNLRR-3 with the prognosis of primary neuroblastomas. *Int J Oncol* 24, 1457-1466. 40
- Han, S.W., Kim, T.Y., Hwang, P.G., Jeong, S., Kim, J., Choi, I.S., Oh, D.Y., Kim, J.H., Kim, D.W., Chung, D.H., et al. (2005). Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol* 23, 2493-2501.
- Haugh, J.M., Huang, A.C., Wiley, H.S., Wells, A., and Lauffenburger, D.A. (1999a). Internalized epidermal growth factor receptors participate in the activation of p21(ras) in fibroblasts. *J Biol Chem* 274, 34350-34360.
- Haugh, J.M., Schooler, K., Wells, A., Wiley, H.S., and Lauffenburger, D.A. (1999b). Effect of epidermal growth factor receptor internalization on regulation of the phospholipase C-gamma1 signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 8958-8965. 50

- Hayata, T., Uochi, T., and Asashima, M. (1998). Molecular cloning of XNLRR-1, a Xenopus homolog of mouse neuronal leucine-rich repeat protein expressed in the developing Xenopus nervous system. *Gene* 221, 159-166.
- Hennessy, B.T., Smith, D.L., Ram, P.T., Lu, Y., and Mills, G.B. (2005). Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews* 4, 988-1004.
- Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R.N., Fausto, N., Smith, G.H., and Merlino, G. T. (1990). TGF alpha overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61, 1137-1146.
- Jiang, D., Yang, H., Willson, J.K., Liang, J., Humphrey, L.E., Zborowska, E., Wang, D., Foster, J., Fan, R., and Brattain, M.G. (1998). Autocrine transforming growth factor alpha provides a growth advantage to malignant cells by facilitating re-entry into the cell cycle from suboptimal growth states. *J Biol Chem* 273, 3 1471-31479.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J.P., van de Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U., et al. (2004). Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 811-816.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes & development* 12, 3663-3674.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2 139.
- Maeda, K., Kato, Y., and Sugiyama, Y. (2002). pH-dependent receptor/ligand dissociation as a determining factor for intracellular sorting of ligands for epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes. *J Control Release* 82, 71-82.
- Martinez-Arca, S., Bech-Serra, J.J., Hurtado-Kuttner, M., Borroto, A., and Arribas, J. (2005). Recycling of cell surface pro-transforming growth factor- α regulates epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* 280, 36970-36 977.
- Moyer, J.D., Barbacci, E.G., Iwata, K.K., Arnold, L., Boman, B., Cunningham, A., DiOrio, C., Doty, J., Morin, M.J., Moyer, M.P., et al. (1997). Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer research* 57, 4838-4848.
- Ng, S.S., Tsao, M.S., Nicklee, T., and Hedley, D.W. (2002). Effects of the epidermal growth factor receptor inhibitor OSI-774, Tarceva, on downstream signaling pathways and apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Molecular cancer therapeutics* 1, 777-783.
- O'Dwyer P, J., and Benson, A.B., 3rd (2002). Epidermal growth factor receptor-targeted therapy in colorectal cancer. *Semin Oncol* 29, 10-17.
- Oliveira, S., van Bergen en Henegouwen, P.M., Storm, G., and Schiffelers, R.M. (2006). Molecular biology of epidermal growth factor receptor inhibition for cancer therapy. *Expert opinion on biological therapy* 6, 605-617.
- Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggan, T.J., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.

10

20

30

40

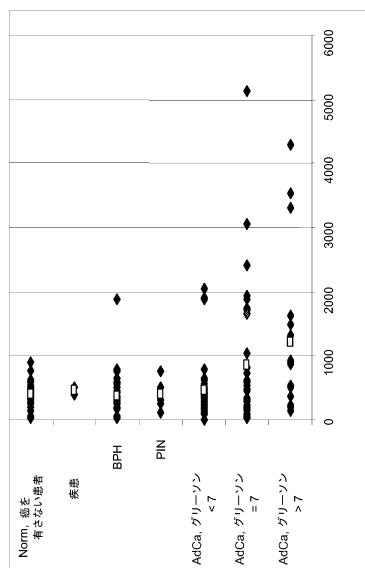
50

- Qian, X., Karpova, T., Sheppard, A.M., McNally, J., and Lowy, D.R. (2004). E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *The EMBO journal* 23, 1739-1748.
- Sato, Y., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Jain, S.K., Hamaoka, R., Miyagawa, J., Yaginuma, Y., Honke, K., Ishikawa, M., and Taniguchi, N. (2001). Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III enhances the epidermal growth factor-induced phosphorylation of ERK in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors. *J Biol Chem* 276, 11956-11962.
- Scher, H.I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J., and Cordon-Cardo, C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms. *Clin Cancer Res* 1, 545-550. 10
- Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C., Gilles, E.D., and Muller, G. (2002). Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nat Biotechnol* 20, 370-375.
- Sebastian, S., Settleman, J., Reshkin, S.J., Azzariti, A., Bellizzi, A., and Paradiso, A. (2006). The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochimica et biophysica acta* 1766, 120-139.
- Shepherd, F.A., Rodrigues Pereira, J., Ciuleanu, T., Tan, E.H., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., et al. (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353, 123-132. 20
- Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., and Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* 305, 1163-1167.
- Tackels-Horne, D., Goodman, M.D., Williams, A.J., Wilson, D.J., Eskandari, T., Vogt, L.M., Boland, J.F., Scherf, U., and Vockley, J.G. (2001). Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma and metastatic liver tumors by oligonucleotide expression profiling. *Cancer* 92, 395-405.
- Taguchi, A., Wanaka, A., Mori, T., Matsumoto, K., Imai, Y., Tagaki, T., and Tohyama, M. (1996). Molecular cloning of novel leucine-rich repeat proteins and their expression in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 35, 31-40. 30
- Taniguchi, H., Tohyama, M., and Takagi, T. (1996). Cloning and expression of a novel gene for a protein with leucine-rich repeats in the developing mouse nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 36, 45-52.
- Tsao, M.S., Sakurada, A., Cutz, J.C., Zhu, C.Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Loriger, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., et al. (2005). Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353, 133-144.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501. 40
- Wang, D., Li, W., Jiang, W., Humphrey, L.E., Howell, G.M., and Brattain, M.G. (1998). Autocrine TGFalpha expression in the regulation of initiation of human colon carcinoma growth. *J Cell Physiol* 177, 387-395.
- Wang, Y., Pennock, S., Chen, X., and Wang, Z. (2002). Endosomal signaling of epidermal growth factor receptor stimulates signal transduction pathways leading to cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 7279-7290.
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31, 637-643.
- Yauch, R.L., Januario, T., Eberhard, D.A., Cavet, G., Zhu, W., Fu, L., Pham, T.Q 50

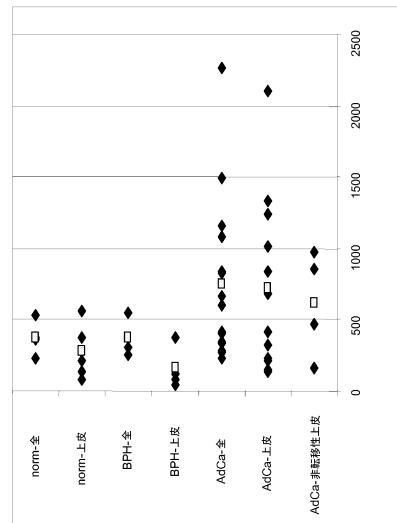
., Soriano, R., Stinson, J., Seshagiri, S., et al. (2005). Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 11, 8686-8698.

Zhou, Y., and Brattain, M.G. (2005). Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis. *Cancer research* 65, 5848-5856.

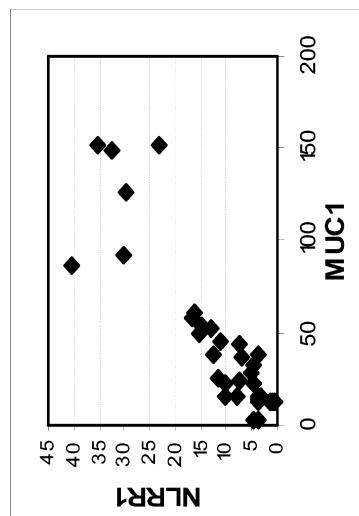
【図1A】



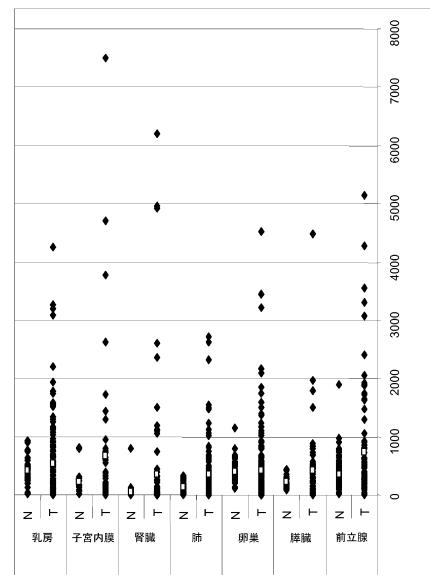
【図1B】



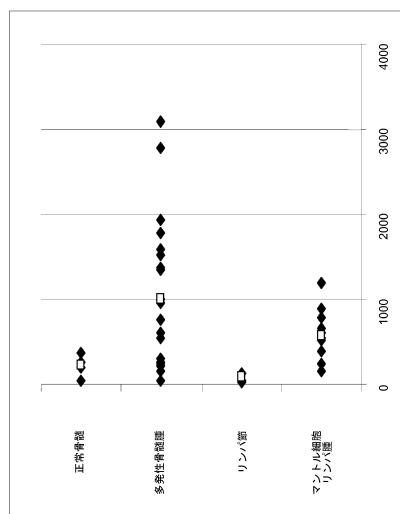
【図1C】



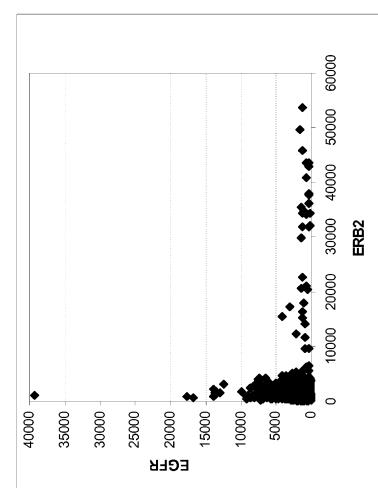
【図2A】



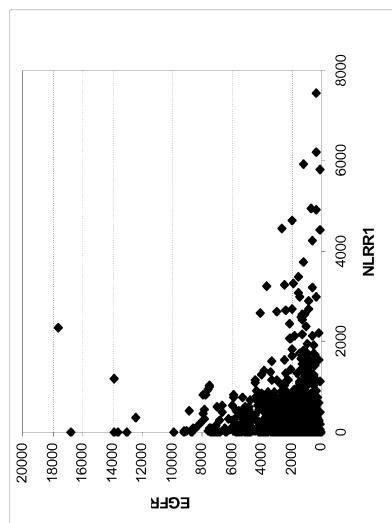
【図2B】



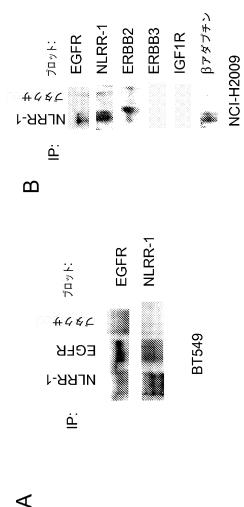
【図2C】



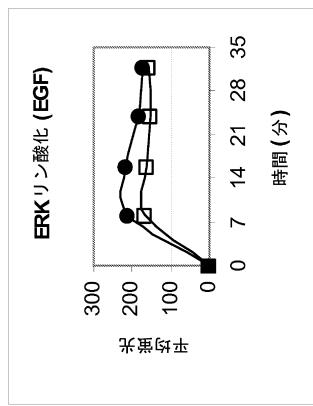
【図2D】



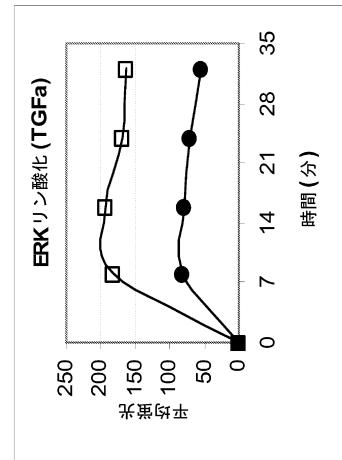
【 四 3 】



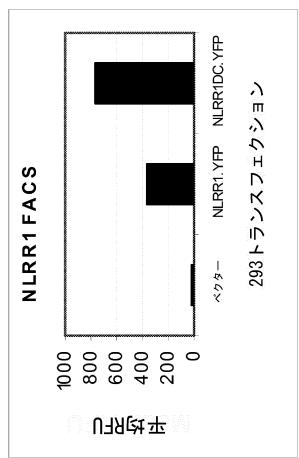
【図4A】



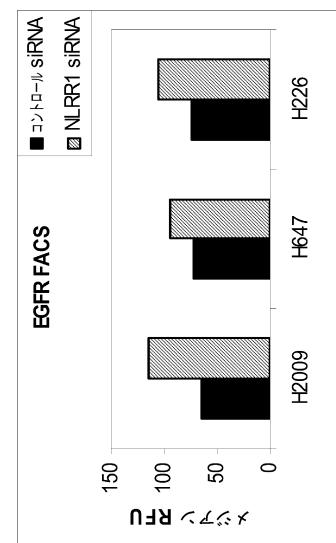
【 図 4 B 】



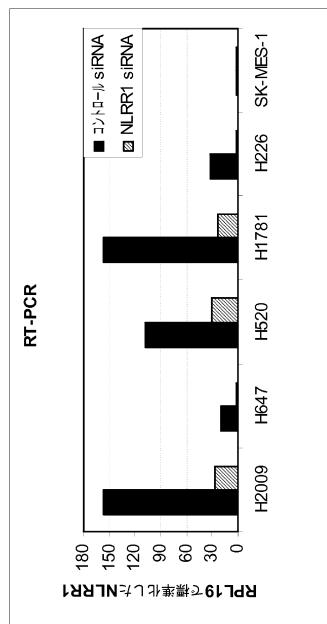
【図5A】



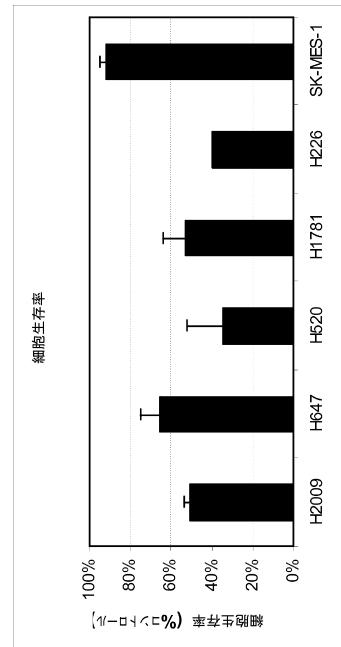
【図5B】



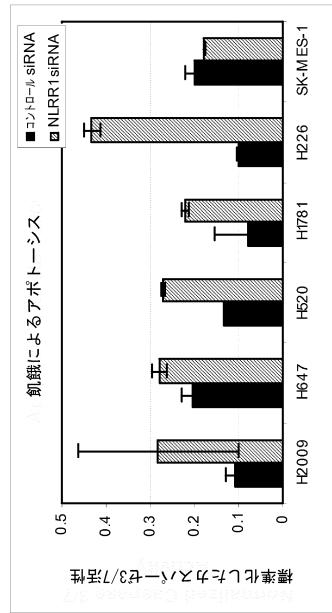
【図6A】



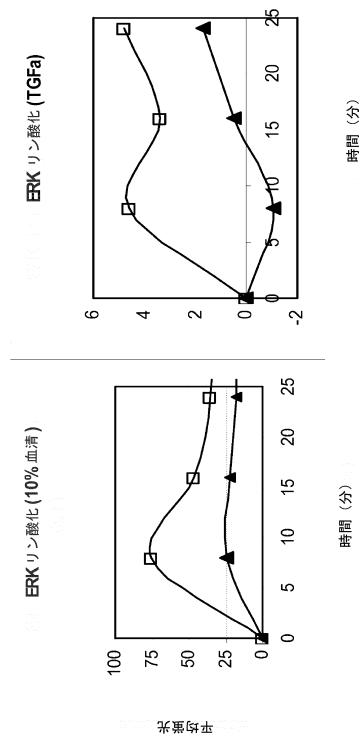
【図6B】



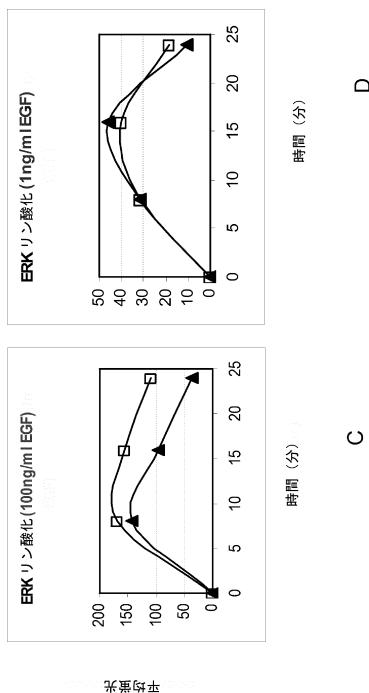
【図 6 C】



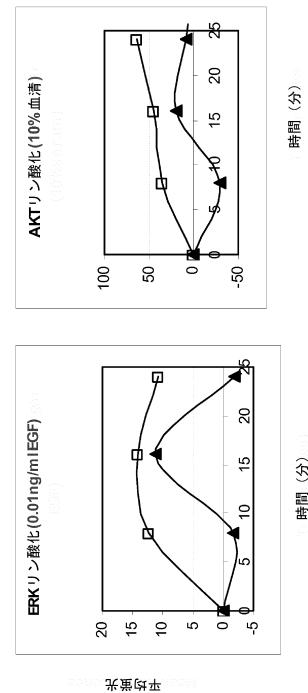
【図 7 A - B】



【図 7 C - D】



【図 7 E - F】



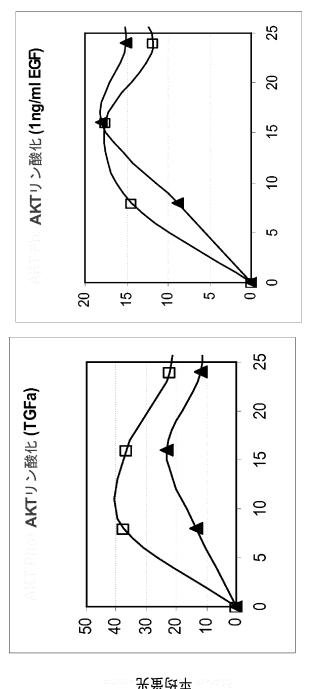
B

A

F

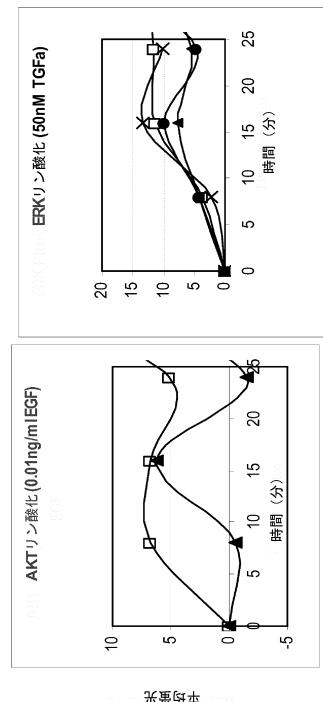
E

【図7 G - H】



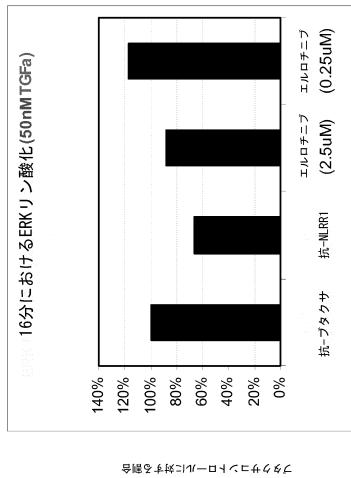
H

【図7 I - J】

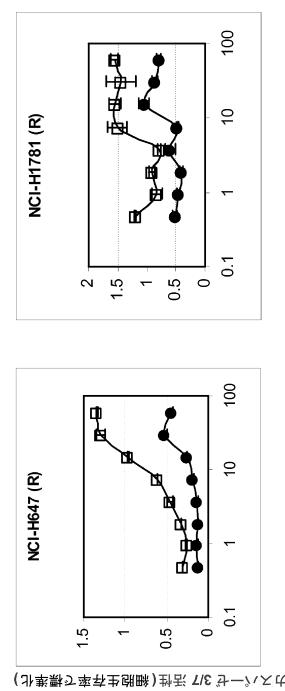


J

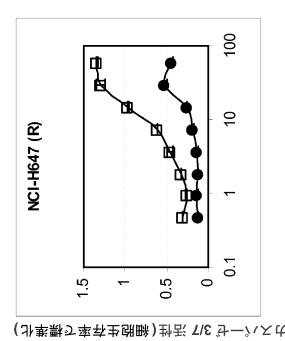
【図7 K】



【図8 A - B】

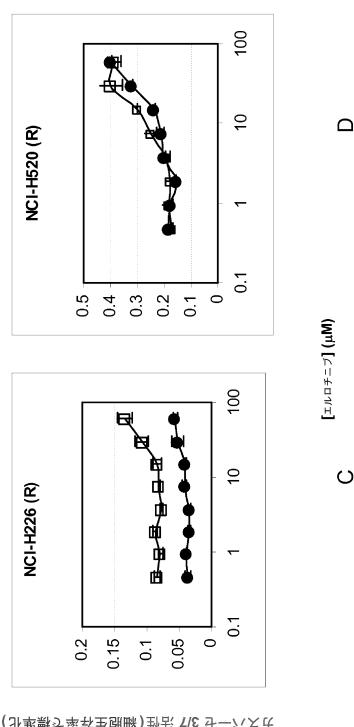


B

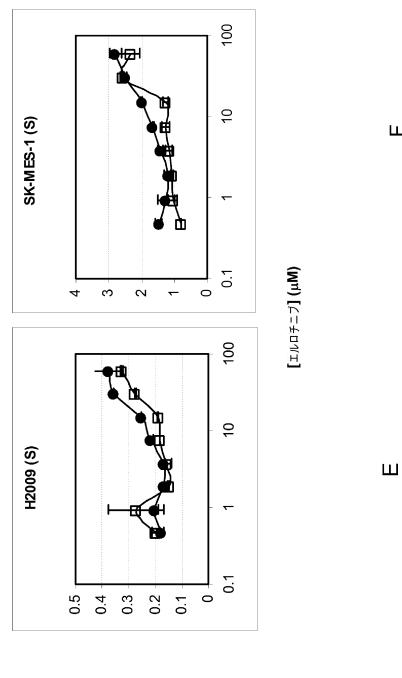


A

【図 8 C - D】

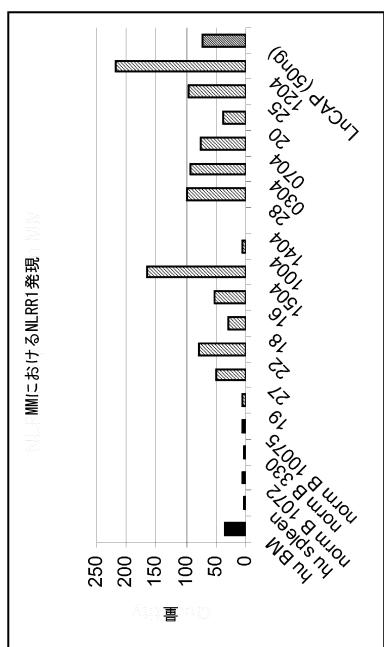


【図 8 E - F】

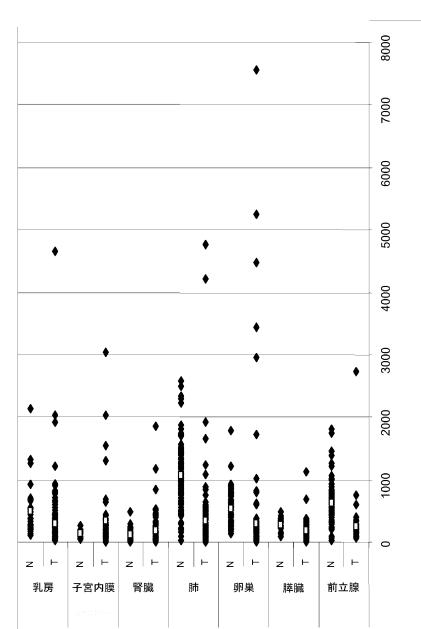


效力/活性 (37℃活性 (細胞生存率を標準化))

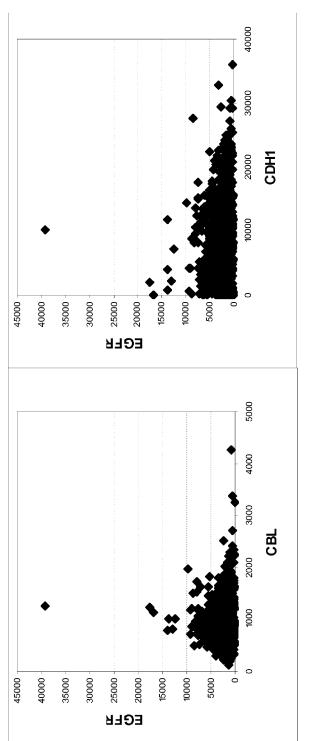
【図 9 A】



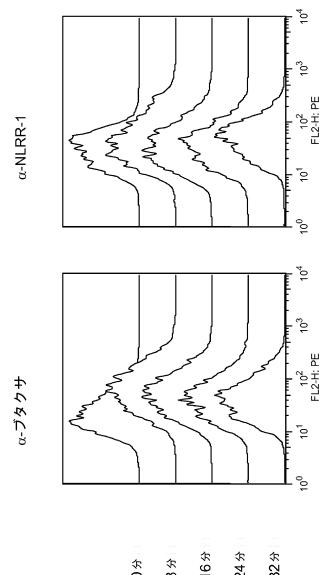
【図 9 B】



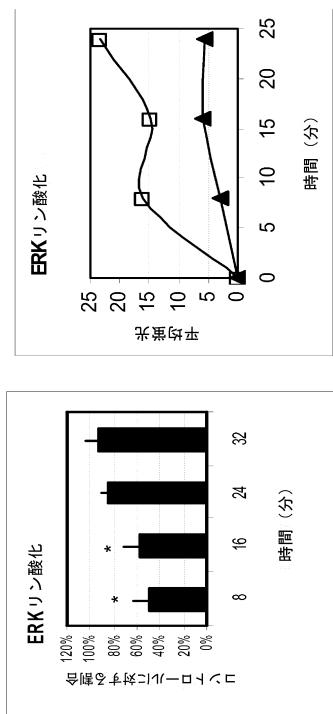
【図10A-B】



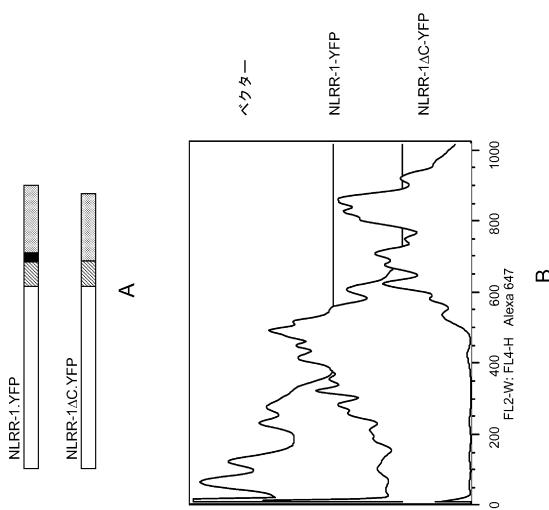
【図11A】



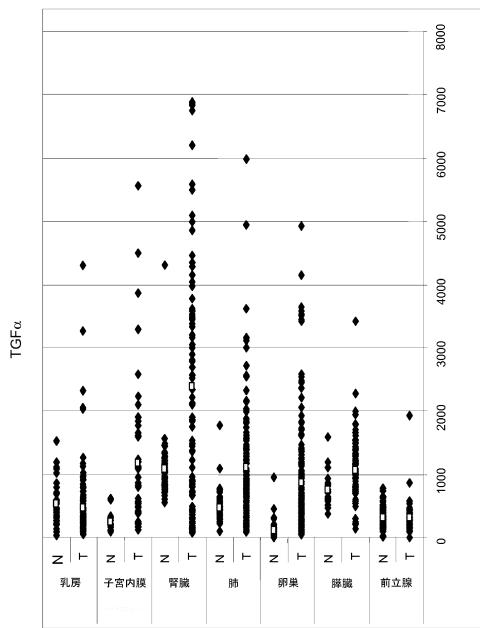
【図11B-C】



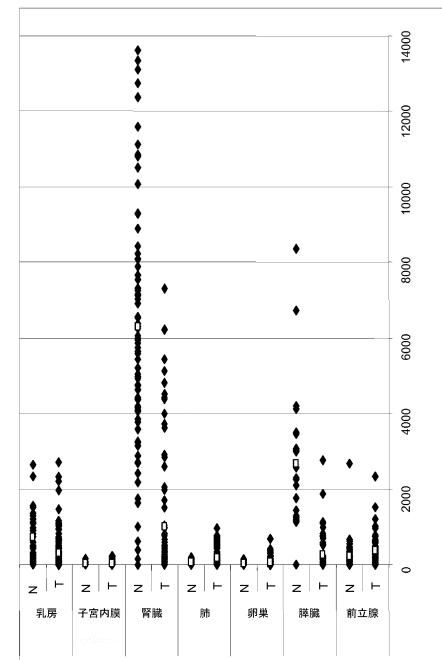
【図12A-B】



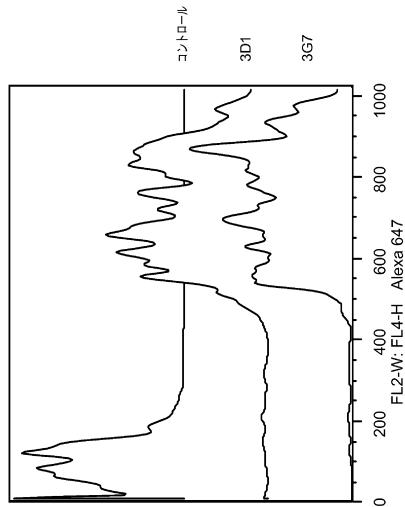
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 4】



【図 1 5】

MARMSEVIAACQVIGLLMITSLESSIONSECQLCVCEIPWMTPOSTYRATTVDCNDLRL
 TRIPSNLSSDIQVLLSINNIAKTVDEQLFLNLTEDFSNNNFNIKEVGLNLQLTLLHL
 EENQITEMTDYQCLDSNLQELYINHINQISTISAHAFAGLKNLRLHNSNKLKVIDSRWFD
 TPNLLELMGENFQGLDNINFPLNRLSVLAGNLTDPGNALVGLGDSLESYDNKLVK
 VPOLAQKVIPNLKFIDLANKNPHKIGEGDFKNMLRKEIGINNMGEIVSDRYALDNLP
 LPELT
 IHWNINSNKTNRMEPLISMFAMPPEYKGHOVKEVLDSSQCLPMISHOSFFNRLNDIG
 TVFLDCRMANAEPEPEWVTPGIKNTVETLSKYYKLSSEGTELEISNQIODESRYTOAONV
 QGADTRVATKNGTILDGTOVAKYVKOTESHISLISWVKVNSVNMTSNLKSATMKDNP
 ITTYARVVDVHETNLTHLPSDTEVCLTVNHTQKSCVNVTKAFAVDISDQEEST
 ALAAVWGSMAVISASAVYFAKRFKRKNYHISLKKYMKTSPLNLYPPLNLWEGDSE
 KOKDGSDATKPTODTSRSYMW [配列番号: 1]

【配列表】

0005695905000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 12 N 15/09 (2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A

(72)発明者 ホンゴー, ジョ-アン, エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, ショ-コート 3
1
(72)発明者 スティンソン, スザンナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94401, サンマテオ, ウッドサイド ウェイ 61
9シー¹
(72)発明者 ヘイゼン, メレディス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94403, サンマテオ, アパートメント 210,
デイヴィッド ストリート 1341

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第2007/050798 (WO, A1)
S.Hossain, et al., 日本癌学会学術総会記事、2007年8月、66、p.413
中川原章、厚生労働省がん研究助成金による研究報告集、2006年、2005、pp692-694
H.Inoue, et al., PNAS, Sep.2007, 104(36), pp14430-14435

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 61 K 39/395
CA / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI (STN)