

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-527582

(P2017-527582A)

(43) 公表日 平成29年9月21日(2017.9.21)

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/395
A 61 K 45/00
A 61 P 35/00
A 61 P 43/00
A 61 K 31/7068

1 2 1

テーマコード(参考)

4 C 048
4 C 050
4 C 057
4 C 063
4 C 065

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2017-513488 (P2017-513488)

(86) (22) 出願日

平成27年9月10日 (2015.9.10)

(85) 翻訳文提出日

平成29年4月27日 (2017.4.27)

(86) 国際出願番号

PCT/US2015/049461

(87) 国際公開番号

W02016/040657

(87) 国際公開日

平成28年3月17日 (2016.3.17)

(31) 優先権主張番号

62/048,770

(32) 優先日

平成26年9月10日 (2014.9.10)

(33) 優先権主張国

米国(US)

(71) 出願人

506115514
ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1111 トゥエルフス プロア

(74) 代理人

100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人

100102118

弁理士 春名 雅夫

(74) 代理人

100160923

弁理士 山口 裕幸

(74) 代理人

100119507

弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K-Rasによって媒介されるシグナリング経路および悪性疾患の抗hLIF抗体によるターゲティング方法

(57) 【要約】

本発明は、白血病抑制因子(LIF)に拮抗する薬剤の治療的な量を対象へ投与する工程を含む、対象におけるK-Ras発現癌を処置する方法を提供する。対象におけるK-Ras発現癌を処置するための組成物およびキットも提供する。

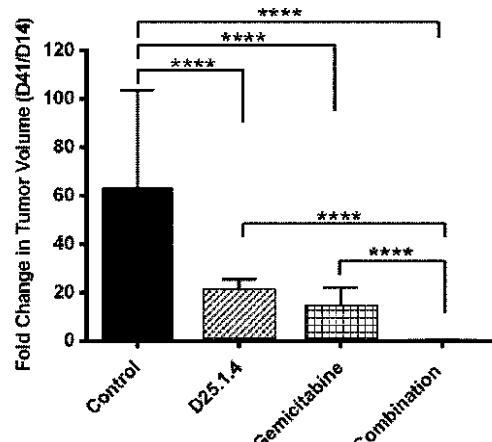
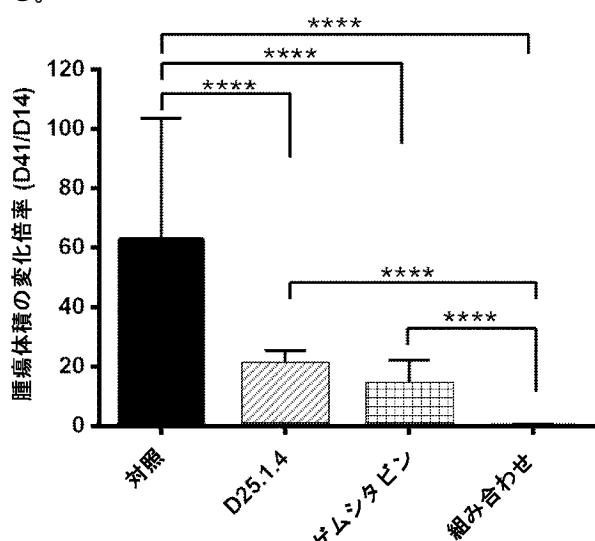


FIG. 5F

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

白血病抑制因子(LIF)に拮抗する薬剤の治療的な量を対象へ投与する工程を含む、対象におけるK-Ras発現癌を処置する方法。

【請求項 2】

K-Ras発現癌が膵臓癌、結腸直腸癌、または肺癌である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

K-Ras発現癌が膵臓癌である、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

膵臓癌が膵管腺癌である、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

LIFに拮抗する薬剤が抗LIF抗体である、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

抗LIF抗体がモノクローナル抗体である、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

抗LIF抗体が、Fab、F(ab')₂、およびFvからなる群より選択される抗体断片である、請求項5記載の方法。

【請求項 8】

LIFに拮抗する薬剤が経口投与されるか、静脈内投与されるか、または腹腔内投与される、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

LIFに拮抗する薬剤が化学療法剤と組み合わせて投与される、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

化学療法剤がゲムシタビンである、請求項9記載の方法。

【請求項 11】

LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤が同時に投与される、請求項9または10記載の方法。

【請求項 12】

LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤が連続的に投与される、請求項9または10記載の方法。

【請求項 13】

白血病抑制因子(LIF)に拮抗する薬剤の治療的な量を対象へ投与する工程を含む、対象における膵臓癌を処置する方法。

【請求項 14】

膵臓癌が膵管腺癌である、請求項13記載の方法。

【請求項 15】

LIFに拮抗する薬剤が抗LIF抗体である、請求項13または14記載の方法。

【請求項 16】

抗LIF抗体がモノクローナル抗体である、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

抗LIF抗体が、Fab、F(ab')₂、およびFvからなる群より選択される抗体断片である、請求項15記載の方法。

【請求項 18】

LIFに拮抗する薬剤が経口投与されるか、静脈内投与されるか、または腹腔内投与される、請求項13～17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

LIFに拮抗する薬剤が化学療法剤と組み合わせて投与される、請求項13～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

化学療法剤がゲムシタビンである、請求項19記載の方法。

【請求項 2 1】

LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤が同時に投与される、請求項19または20記載の方法。

【請求項 2 2】

LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤が連続的に投与される、請求項19または20記載の方法。

【請求項 2 3】

LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤を含む、K-Ras発現癌を処置するためのキット。

【請求項 2 4】

LIFに拮抗する薬剤が抗LIF抗体である、請求項23記載のキット。

【請求項 2 5】

抗LIF抗体がモノクローナル抗体である、請求項24記載のキット。

【請求項 2 6】

化学療法剤がゲムシタビンである、請求項23～25のいずれか一項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、2014年9月10日出願の米国仮出願第62/048,770号に基づく優先権を主張するものであり、その内容全体が、事実上、参照によって本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

膵臓癌は、初期に検出された場合ですら、しばしば予後不良の癌である。膵臓癌の全ての期を合わせて、診断の5年後に生存する患者は6%に過ぎないと推定されている。膵臓癌の最も一般的な型、膵管腺癌（PDAC）は、極めて予後不良であることが公知である。外科的切除を受けた患者については生存時間が改善されるが、PDACは、外科的切除が実現可能であるうちに診断されないことが多い。

【0 0 0 3】

癌遺伝子K-Rasは、膵臓癌、肺癌、および結腸直腸癌のような癌において高頻度に変異しており、90%を超えるPDACにおいて活性化K-Ras変異が存在する。しかしながら、K-Rasの機能を直接阻止し、前臨床モデルにおいて効力を示す低分子阻害剤の開発は、現在まで、成功していない。

【発明の概要】

【0 0 0 4】

一つの局面において、対象における癌を処置する方法が提供される。いくつかの態様において、方法は、白血病抑制因子（LIF）に拮抗する薬剤の治療的な量を対象へ投与する工程を含む。

【0 0 0 5】

いくつかの態様において、癌はK-Ras発現癌である。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は野生型K-Rasを発現する癌である。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は変異型K-Rasを発現する癌である。

【0 0 0 6】

いくつかの態様において、癌は膵臓癌、結腸直腸癌、または肺癌である。いくつかの態様において、癌は膵臓癌（例えば、膵管腺癌）である。

【0 0 0 7】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は抗LIF抗体である。いくつかの態様において、抗LIF抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、抗LIF抗体はFab、F(ab')₂、およびFvからなる群より選択される抗体断片である。

10

20

30

40

50

【0008】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は、経口投与されるか、静脈内投与されるか、または腹腔内投与される。

【0009】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は化学療法剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様において、化学療法剤はヌクレオシド類似体である。いくつかの態様において、化学療法剤はゲムシタビンである。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤は同時に投与される。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤および化学療法剤は連続的に投与される。

【0010】

もう一つの局面において、癌を処置するための組成物およびキットが提供される。いくつかの態様において、組成物またはキットは、白血病抑制因子（LIF）に拮抗する薬剤および化学療法剤を含む。

10

【0011】

いくつかの態様において、癌はK-Ras発現癌である。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は野生型K-Rasを発現する癌である。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は変異型K-Rasを発現する癌である。いくつかの態様において、癌は膵臓癌、結腸直腸癌、または肺癌である。いくつかの態様において、癌は膵臓癌（例えば、膵管腺癌）である。

【0012】

いくつかの態様において、化学療法剤はヌクレオシド類似体である。いくつかの態様において、化学療法剤はゲムシタビンである。

20

【0013】

もう一つの局面において、癌の処置において使用するための、白血病抑制因子（LIF）に拮抗する薬剤を含む組成物が提供される。いくつかの態様において、癌はK-Ras発現癌（例えば、野生型K-Rasを発現する癌または変異型K-Rasを発現する癌）である。いくつかの態様において、癌は膵臓癌、結腸直腸癌、または肺癌である。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤を含む組成物は、化学療法剤と組み合わせて使用される。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤を含む組成物は、化学療法剤をさらに含む。いくつかの態様において、化学療法剤はゲムシタビンである。

【0014】

さらにもう一つの局面において、癌の処置のための医薬の製造のための、LIFに拮抗する薬剤を含む組成物の使用が提供される。いくつかの態様において、癌はK-Ras発現癌（例えば、野生型K-Rasを発現する癌または変異型K-Rasを発現する癌）である。いくつかの態様において、癌は膵臓癌、結腸直腸癌、または肺癌である。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤を含む組成物は、化学療法剤をさらに含む。いくつかの態様において、化学療法剤はゲムシタビンである。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(A)マイクロアレイ分析(affymetrix Gene ST1.0)は、ベクター対照またはH-Ras^{V12}によって形質転換されたものと比較した時、K-Ras^{V12}によって形質転換されたNIH/3T3細胞において、LIFが有意に無制御であることを明らかにした(N=3)。

40

【図1B】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(B)qPCR(左パネル)およびウエスタンプロッティング分析(右パネル)は、K-Ras^{V12}によって形質転換されたNIH/3T3細胞におけるmRNAおよびタンパク質についてのLIF発現の上昇を確認した。(右パネル)K-Ras^{V12}形質転換体におけるLIF発現の増加は、STAT3のリン酸化レベルの増強に関係していた(qPCR分析においてN=3; **P<0.01; ***P<0.001)。

【図1C】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(C)qPCR分析は、変異体K-Rasによって駆動されたマウス膵臓癌が、変異体B-Rafによっ

50

て誘導されたマウス膵臓腫瘍と比較した時、より高いLIF発現を有することを示唆した（N = 3； **P < 0.01）。

【図1D】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(D) K-Ras変異状態による膵臓癌組織およびその他の型の癌におけるLIF/LIFR発現。

【図1E】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(E) 樹立膵臓癌細胞株におけるLIF発現は、特定のK-Ras変異アイソフォームと相關しない。

【図1F】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(F) shRNAによるLIFノックダウンは、発癌性K-Rasによって駆動されたmPCACにおいて、スフィア形成能を抑制した（N = 8； ***P < 0.0001）。

【図1G】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(G) 発癌性K-Rasによって駆動されたmPCACの2種の異なる株において、LIFノックダウンは、対照細胞と比較した時、5FU処置後の再発性コロニー形成効率を劇的に低下させた。

【図1H】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(H) 発癌性K-Rasによって駆動されたmPDACにおいて、LIFのノックダウンは、肉眼的(macro)転移膵病変の形成を低下させ、生存時間中央値を増加させた。

【図2A】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(A～E) 膵臓癌細胞株においてLIF発現レベルはK-Rasによって制御される。(A) K-Ras発現のノックダウンを有するPANC2.13は、ウエスタンプロットから、LIFおよびホスホSTAT3の発現の低下を示した。

【図2B】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(A～E) 膵臓癌細胞株においてLIF発現レベルはK-Rasによって制御される。(B) K-Ras発現のノックダウンを有するPANC1.0は、mRNAレベルでのLIFおよびホスホSTAT3の発現の低下を示した（N = 3； *P < 0.05； ***P < 0.001）。

【図2C】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(A～E) 膵臓癌細胞株においてLIF発現レベルはK-Rasによって制御される。(C) K-Ras発現のノックダウンを有するPANC2.03は、mRNAレベルでのLIFおよびホスホSTAT3の発現の低下を示した（N = 3； *P < 0.05； ***P < 0.001）。

【図2D】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(A～E) 膵臓癌細胞株においてLIF発現レベルはK-Rasによって制御される。(D) K-Ras発現のノックダウンを有するCaPan1は、mRNAレベルでのLIFおよびホスホSTAT3の発現の低下を示した（N = 3； **P < 0.01； ***P < 0.001； ****P < 0.0001）。

【図2E】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(A～E) 膵臓癌細胞株においてLIF発現レベルはK-Rasによって制御される。(E) K-Ras発現のノックダウンを有するHcG25は、mRNAレベルでのLIFおよびホスホSTAT3の発現の低下を示した（N = 3； **P < 0.01； ***P < 0.001； ****P < 0.0001）。

【図2F】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(F) LIF ELISAは、K-Ras発現のノックダウンを有するヒト膵臓癌細胞株が、対照細胞と比較して、有意に減少したLIFを培養培地中に分泌することを明らかにした（N = 4； *P < 0.05； ****P < 0.00001）。

【図2G】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(G) ウエスタンプロットは、K-Ras発現のノックダウンおよび結果的なLIFの発現のダウンレギュレーションを有する膵臓癌細胞が、減少したホスホSTAT3レベルを示すことを示唆した。

【図2H】膵臓癌においてLIF-pSTAT3シグナリングは発癌性K-Rasによって制御される。

(H) ホスホSTAT3ルシフェラーゼレポーターアッセイは、K-Ras発現のノックダウンを有する膵臓癌細胞が、有意に減少したSTAT3転写活性を有することを示唆した（N = 3； **P < 0.01； ***P < 0.001）。

【図3A】LIFはヒト膵臓癌成長／開始において重要な役割を果たす。(A) ヒト膵臓癌細胞株におけるヒトLIFを標的とするshRNAのノックダウン効率を確認するためのウエスタン

10

20

30

40

50

プロット。

【図3B】LIFはヒト膵臓癌成長／開始において重要な役割を果たす。(B)皮下異種移植モデルにおけるPANC2.03の無腫瘍生存曲線は、LIF発現のノックダウンを有する癌細胞が、対照細胞と比較した時、劇的に低下した腫瘍開始能を保有することを示唆した(N=6)。

【図3C】LIFはヒト膵臓癌成長／開始において重要な役割を果たす。(C)LIF発現のノックダウンを有する皮下異種移植片における膵臓腫瘍は、対照腫瘍と比較した時、有意に遅い速度で成長した(N=6; *P<0.01)。

【図3D】LIFはヒト膵臓癌成長／開始において重要な役割を果たす。(D)同所モデルにおいて、LIF発現のノックダウンは、PANC1によって駆動される腫瘍における腫瘍開始速度を低下させた(N=4)。

【図4】LIFは膵臓癌におけるゲムシタビン処置に対する抵抗性のために必要である。細胞生存度を査定するための比色定量アッセイであるMTS((3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)アッセイは、LIFノックダウンが、対照細胞と比較した時、ゲムシタビン処置に対してPANC2.03細胞を感作することを示唆した(N=6)。媒体処置(DMSO)を標準化のために使用した。

【図5A】LIF中和抗体は腫瘍開始を防止し、膵臓癌細胞におけるゲムシタビンの治療効力を改善する。(A)抗hLIF抗体競合アッセイによるLIF ELISAは、標的抗体の中和能を確認した。

【図5B】LIF中和抗体は腫瘍開始を防止し、膵臓癌細胞におけるゲムシタビンの治療効力を改善する。(B)腫瘍開始アッセイのため、50,000個のPANC2.03細胞をヌードマウスへ皮下注射した。腫瘍接種前に、抗LIF AB(クローンD25.1.4)を10mg/kgで与えた。その処置を週3回与えた。示されるように、LIF抗体は腫瘍開始を劇的に防止する。

【図5C】LIF中和抗体は腫瘍開始を防止し、膵臓癌細胞におけるゲムシタビンの治療効力を改善する。(C)薬物感作アッセイにおいて、 0.2×10^6 個のPANC2.03細胞をまずヌードマウスへ皮下注射した。接種後14日以内に腫瘍が形成された。マウスを、4つの異なる群：対照、Abのみ、ゲムシタビンのみ、および組み合わせへ無作為に分離した。ゲムシタビンおよびLIF Abの組み合わせ処置は、腫瘍10個のうち8個において完全な退縮を引き起こしたが、対照IgG、LIF抗体(D25.1.4)単独、またはゲムシタビン単独は、腫瘍退縮をもたらさなかった。

【図5D】LIF中和抗体は腫瘍開始を防止し、膵臓癌細胞におけるゲムシタビンの治療効力を改善する。(D)(C)の処置モデルによるPANC2.03皮下腫瘍における腫瘍体積変化曲線。

【図5E】LIF中和抗体は腫瘍開始を防止し、膵臓癌細胞におけるゲムシタビンの治療効力を改善する。(E)ゲムシタビンおよびLIF Abの組み合わせ処置は腫瘍増殖速度を劇的に低下させたが、ゲムシタビン単独によって処置された腫瘍は未だ正の成長速度を有していた。腫瘍増殖速度 = (後日の腫瘍体積 - 初日の腫瘍体積) / 初日の腫瘍体積 * 100。

【図5F】LIF中和抗体は腫瘍開始を防止し、膵臓癌細胞におけるゲムシタビンの治療効力を改善する。(F)腫瘍体積の変化倍率は、ゲムシタビンおよびLIF Abの組み合わせ処置は腫瘍増殖速度を劇的に低下させたが、ゲムシタビン単独によって処置された腫瘍は未だ正の成長速度を有していたことを示唆した。

【図6A】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(A~B)TCGA結腸直腸癌データセットにおけるLIF発現。

【図6B】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(A~B)TCGA結腸直腸癌データセットにおけるLIF発現。

10

20

30

40

50

【図6C】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(C)D'Errico胃癌データセットにおけるLIF発現。

【図6D】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(D)Wang胃癌データセットにおけるLIF発現。

【図6E】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(E)Bredel脳癌データセットにおけるLIF発現。

【図6F】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(F)Barretina細胞株データセットにおけるLIF発現。LIF発現は膵臓癌において濃縮されていることが見出された。

【図6G】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(G)Garnett細胞株データセットにおけるLIF発現。LIF発現は膵臓癌において濃縮されていることが見出された。

【図6H】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(H)Pei膵臓癌データセットにおけるLIF発現。

【図6I】LIF発現は複数の型の癌において濃縮されている。(A~I)正常組織と比較して、複数の型の癌についてのLIF発現レベルを決定するため、異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(I)Garnett細胞株データセットにおけるLIF発現。mRNAにおけるLIF発現は、野生型K-Ras発現を有する癌細胞株と比較した時、変異体K-Rasを有する樹立癌細胞株において有意に増強されていた。

【図7A】mRNAにおけるLIF発現は化学療法感受性癌において劇的に減少している。(A~I)LIF発現レベルを決定するため、化学療法感受性腫瘍標本および化学療法抵抗性腫瘍標本の遺伝子プロファイルを含む異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(A)Garnett細胞株データセット(シタラビン抵抗性およびシタラビン感受性の脳およびCNSの癌細胞株)におけるLIF発現。

【図7B】mRNAにおけるLIF発現は化学療法感受性癌において劇的に減少している。LIF発現レベルを決定するため、化学療法感受性腫瘍標本および化学療法抵抗性腫瘍標本の遺伝子プロファイルを含む異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(B)Garnett細胞株データセット(ボリノスタット抵抗性およびボリノスタット感受性の多重癌細胞株)におけるLIF発現。

【図7C】mRNAにおけるLIF発現は化学療法感受性癌において劇的に減少している。LIF発現レベルを決定するため、化学療法感受性腫瘍標本および化学療法抵抗性腫瘍標本の遺伝子プロファイルを含む異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine(商標)(Invitrogen)を使用した。(C)Garnett細胞株データセット(AZD8055抵抗性およびAZD8055感受性の脳およびCNSの癌細胞株)におけるLIF発現。

【図7D】mRNAにおけるLIF発現は化学療法感受性癌において劇的に減少している。LIF発現レベルを決定するため、化学療法感受性腫瘍標本および化学療法抵抗性腫瘍標本の遺伝

10

20

30

40

50

子プロファイルを含む異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine（商標）（Invitrogen）を使用した。（D）Garnett細胞株データセット（トレチノイン抵抗性およびトレチノイン感受性の脳およびCNSの癌細胞株）におけるLIF発現。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

I. 導入

本発明は、ヒトの膵臓癌細胞株において高度に発現される、幹細胞およびSTAT3によって制御されるケモカイン、白血病抑制因子（LIF）が、発癌性K-Rasによって制御されるという驚くべき発見に一部分基づく。具体的な理論に拘束されないが、LIFは、活性化されたK-Rasを有する膵臓癌細胞の幹細胞性を制御することによって、K-Rasによって駆動された膵臓癌にとって不可欠な下流エフェクターとして作用すると考えられる。10

【0017】

従って、一つの局面において、本発明は、LIFに拮抗する薬剤の治療的な量を投与することによって、対象における野生型K-Rasを発現する癌または変異型K-Rasを発現する癌のような癌を処置する方法を提供する。もう一つの局面において、本発明は、任意で、化学療法剤と組み合わせて、LIFに拮抗する薬剤を含む、K-Ras発現癌のような癌を処置するための組成物およびキットも提供する。20

【0018】

II. 定義

本明細書において使用されるように、「K-Ras」という用語は、「カーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子相同意体」をさす。K-Ras遺伝子によってコードされるタンパク質は、細胞内シグナル伝達において機能する小さいGTPアーゼである。ヒトK-Rasの遺伝子およびタンパク質の配列は、例えば、Genbankアクセション番号M54968.1およびAAB414942.1に示される。ヒト癌において見出されるいくつかの一般的なK-Rasの遺伝子およびタンパク質は、コドン12、コドン、コドン61、コドン146、および／またはその他の同時発生的な部位に変異を含有している。K-Ras変異の非限定的な例には、コドン5（例えば、K5E）、コドン9（例えば、V9I）、コドン12（例えば、G12A、G12C、G12D、G12F、G12R、G12S、G12V、G12Y）、コドン13（例えば、G13C、G13D、G13V）、コドン14（例えば、V14I、V14L）、コドン18（例えば、A18D）、コドン19（例えば、L19F）、コドン22（例えば、Q22K）、コドン23（例えば、L23R）、コドン24（例えば、I24N）、コドン26（例えば、N26K）、コドン33（例えば、D33E）、コドン36（例えば、I36L、I36M）、コドン57（例えば、D57N）、コドン59（例えば、A59E、A59G、A59T）、コドン61（例えば、Q61H、Q61K、Q61L、Q61R）、コドン62（例えば、E62G、E62K）、コドン63（例えば、E63K）、コドン64（例えば、Y64D、Y64H、Y64N）、コドン68（例えば、R68S）、コドン74（例えば、T74P）、コドン92（例えば、D92Y）、コドン97（例えば、R97I）、コドン110（例えば、P110H、P110S）、コドン117（例えば、K117N）、コドン118（例えば、C118S）、コドン119（例えば、D119N）、コドン135（例えば、R135T）、コドン138（例えば、G138V）、コドン140（例えば、P140H）、コドン146（例えば、A146T、A146V）、コドン147（例えば、K147N）、コドン153（例えば、D153N）、コドン156（例えば、F156L）、コドン160（例えば、V160A）、コドン164（例えば、R164Q）、コドン171（例えば、I171M）、コドン176（例えば、K176Q）、コドン185（例えば、C185R、C185S）、およびコドン188（例えば、M188V）における変異が含まれる。30

【0019】

「K-Ras発現癌」とは、検出可能なレベルのK-Ras（野生型または変異型のいずれか）の発現を有する癌をさす。いくつかの態様において、癌組織試料中の細胞の少なくとも0.1%が、K-Ras活性化（例えば、野生型K-Ras、またはコドン12、コドン13、コドン61、および／もしくはその他のコドンにおけるK-Ras活性化変異）について陽性である時、その癌は、検出可能なレベルの発現を有する。いくつかの態様において、癌は、検出可能なレベ40

10

20

30

40

50

ルの野生型K-Rasの発現を有する。いくつかの態様において、癌は、検出可能なレベルの変異型K-Rasの発現を有する。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は、対照（例えば、正常ヒト末梢リンパ球のような、K-Rasを発現しない非疾患の細胞または組織）におけるK-Ras発現のレベルより少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、または200%大きいレベルのK-Ras（例えば、野生型K-Rasまたは変異型K-Ras）の発現を有する。

【0020】

「癌」という用語は、異常細胞の無調節の成長を特徴とする疾患をさす。この用語には、悪性、良性、軟部組織、または固形のいずれとして特徴決定されるかに関わらず、全ての公知の癌および新生物状態が含まれ、転移前の癌および転移後の癌を含む、全ての期および悪性度の癌が含まれる。異なる型の癌の例には、胃癌（gastric cancer）（例えば、胃癌（stomach cancer））、結腸直腸癌、胃腸間質腫瘍、消化管カルチノイド腫瘍、結腸癌、直腸癌、肛門癌、胆管癌、小腸癌、および食道癌のような消化器および胃腸の癌；乳癌；肺癌；胆囊癌；肝臓癌；脾臓癌；虫垂癌；前立腺癌、卵巣癌；腎臓癌；中枢神経系の癌；皮膚癌（例えば、黒色腫）；リンパ腫；神経膠腫；絨毛癌；頭頸部癌；骨肉腫；ならびに血液癌が含まれるが、これらに限定されない。本明細書において使用されるように、「腫瘍」は1個以上の癌細胞を含む。いくつかの態様において、癌は脾臓癌である。

10

【0021】

「白血病抑制因子（LIF）」とは、細胞分化を阻害するインターロイキンクラス6サイトカインをさす。ヒトLIFの遺伝子およびタンパク質の配列は、例えば、Genbankアクセスション番号AK315310およびAAC05174に示される。

20

【0022】

「白血病抑制因子に拮抗する薬剤」または「LIFに拮抗する薬剤」とは、LIFの発現または活性を阻害するか、不活化するか、減少させるか、阻止するか、またはダウンレギュレートする任意の薬剤である。いくつかの態様において、薬剤と接触させられた生物学的試料（例えば、細胞または組織）におけるLIFの発現または活性を、対照試料（例えば、接觸前の生物学的試料）と比べて、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上減少させる場合、その薬剤は、LIFに拮抗する。いくつかの態様において、薬剤は抗LIF抗体である。

30

【0023】

「薬剤」という用語は、天然に存在するかまたは合成の任意の分子、例えば、ペプチド、タンパク質、オリゴペプチド（例えば、約5～約25アミノ酸長、例えば、約5アミノ酸長、10アミノ酸長、15アミノ酸長、20アミノ酸長、もしくは25アミノ酸長）、小有機分子（例えば、約2500ダルトン未満、例えば、2000ダルトン未満、1000ダルトン未満、もしくは500ダルトン未満の分子量を有する有機分子）、環状ペプチド、ペプチド模倣体、抗体、多糖、脂質、脂肪酸、阻害性RNA（例えば、siRNAもしくはshRNA）、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、アプタマー、薬物化合物、またはその他の化合物をさす。

【0024】

「抗体」という用語は、抗原に特異的に結合し認識する、免疫グロブリン遺伝子によってコードされたポリペプチドまたはその機能性断片をさす。認識されている免疫グロブリン遺伝子には、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、 ϵ 、 κ 、 λ 、および μ 定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、またはのいずれかとして分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、 α 、または ϵ として分類され、それらが、それぞれ、免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを定義する。

40

【0025】

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含む。各四量体は、2つの同一のポリペプチド鎖対から構成されており、各対が、1本の「軽」鎖（約25kDa）および1本の「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のN末端は、抗原認識を主に担う、約100～110アミノ酸またはそれ以上の可変領域を定義する。従って、「可変重鎖」、「V_H」、または「V_H」という用語は、Fv、scFv、dsFv、またはFabを含む免疫グロブリン重鎖の可変領域

50

をさし；「可変軽鎖」、「 V_L 」、または「VL」という用語は、Fv、scFv、dsFv、またはFabを含む免疫グロブリン軽鎖の可変領域をさす。

【0026】

抗体の機能性断片の例には、完全抗体分子、Fv、単鎖Fv(scFv)、相補性決定領域(CDR)、VL(軽鎖可変領域)、VH(重鎖可変領域)、Fab、F(ab)2'、およびそれらの任意の組み合わせのような抗体断片、または標的抗原に結合することができる免疫グロブリンペプチドのその他の機能性部分が含まれるが、これらに限定されない(例えば、FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY(Paul ed.,4th ed.2001)を参照すること)。当業者によって認識されるように、多様な方法、例えば、ペプシンのような酵素による完全抗体の消化；または新規合成によって、様々な抗体断片を入手することができる。抗体断片は、しばしば、化学的に新規合成されるか、または組換えDNA方法論を使用することによって新規合成される。従って、抗体という用語には、本明細書において使用されるように、完全抗体の修飾によって作製された抗体断片、または組換えDNA方法論を使用して新規合成されたもの(例えば、単鎖Fv)、またはファージディスプレイライブラリーを使用して同定されたもの(例えば、McCafferty et al.,(1990)Nature 348:552を参照すること)が含まれる。「抗体」という用語には、二価または二重特異性の分子、ジアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)、およびテトラボディ(tetrabody)が含まれる。二価分子および二重特異性分子は、例えば、Kostelnik et al.(1992)J.Immunol.148:1547、Pack and Pluckthun(1992)Biochemistry 31:1579、Hollinger et al.(1993),PNAS.USA 90:6444、Gruber et al.(1994)J Immunol.:5368、Zhu et al.(1997)Protein Sci.6:781、Hu et al.(1996)Cancer Res.56:3055、Adams et al.(1993)Cancer Res.53:4026、およびMcCartney,et al.(1995)Protein Eng.8:301に記載されている。10 20

【0027】

「ヒト化」抗体とは、非ヒト抗体の反応性を保持しているが、ヒトにおける免疫原性が低い抗体である。これは、例えば、非ヒトCDR領域を保持し、抗体の残りの部分をヒトカウンターパートに交換することによって達成され得る。例えば、Morrison et al.,PNAS USA,81:6851-6855(1984)；Morrison and Oi,Adv. Immunol.,44:65-92(1988)；Verhoeyen et al.,Science,239:1534-1536(1988)；Padlan,Molec. Immun.,28:489-498(1991)；Padlan,Molec. Immun.,31(3):169-217(1994)を参照すること。30

【0028】

「単鎖Fv(svFv)」または「単鎖抗体」とは、scFv抗体の V_H 領域および V_L 領域が、2鎖抗体に見出されるものに類似した抗原結合部位を作出するよう折り畳まれた単鎖を構成するタンパク質をさす。scFv抗体を作成する方法は、例えば、Ward et al.,Exp Hematol.(5):660-4(1993)；およびVaughan et al.,Nat Biotechnol.14(3):309-14(1996)に記載されている。単鎖Fv(scFv)抗体は、任意で、50アミノ酸長を超えない、一般に、40アミノ酸長を超えない、好ましくは、30アミノ酸長を超えない、より好ましくは、20アミノ酸長を超えないペプチドリンカーを含む。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、配列Gly-Gly-Gly-Ser、例えば、2個、3個、4個、5個、または6個のそのような配列のコンカテマーである。しかしながら、リンカー内にいくつかのアミノ酸置換が作成されてもよいことが認識されるべきである。例えば、グリシンがバリンに置換されてもよい。付加的なペプチドリンカーおよびそれらの使用は、当技術分野において周知である。例えば、Huston et al.,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 8:5879(1988)；Bird et al.,Science 242:4236(1988)；Glockshuber et al.,Biochemistry 29:1362(1990)；米国特許第4,946,778号、米国特許第5,132,405号、およびStemmer et al.,Biotechniques 14:256-265(1993)を参照すること。40

【0029】

「抗体に特異的に(または選択的に)結合する」という語句は、タンパク質またはペプチドに言及する時、タンパク質およびその他の生体物質の不均一な集団の存在下で、タンパク質の存在を決定する結合反応をさす。従って、指定のイムノアッセイ条件の下で、明示された抗体は、特定のタンパク質(例えば、LIFまたはその一部分)に結合し、試料中50

に存在するその他のタンパク質には有意な量で結合しない。そのような条件の下での抗体との特異的結合は、特定のタンパク質に対する特異性のために選択された抗体を必要とし得る。例えば、LIFに対して作製された抗体は、そのタンパク質と特異的に免疫反応性であって、多形バリエント、例えば、関心対象の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、または99%同一のタンパク質を除く、他のタンパク質とは免疫反応性でない抗体を入手するため、選択され得る。多様なイムノアッセイフォーマットが、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性の抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイ、ウエスタンプロット、または免疫組織化学が、タンパク質と特異的に免疫反応性のモノクローナル抗体を選択するため、ルーチンに使用されている。特異的な免疫反応性を決定するために使用され得るイムノアッセイのフォーマットおよび条件の説明については、Harlow and Lane Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, NY(1988)を参照すること。典型的には、特異的または選択的な反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、より典型的には、バックグラウンドの10~100倍を超えるであろう。

10

【0030】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーをさすために本明細書において交換可能に使用される。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーと同様に、1個以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマーにも当てはまる。本明細書において使用されるように、この用語には、アミノ酸残基が共有結合性のペプチド結合によって連結されている、全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖が包含される。

20

【0031】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸をさし、天然に存在するアミノ酸に類似した様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体もさす。天然に存在するアミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされたもの、ならびに後に修飾されたそれらのアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、カルボキシグルタミン酸、およびD-ホスホセリンである。アミノ酸類似体とは、天然に存在するアミノ酸と同一の基本的化学構造、即ち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基に結合した炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムをさす。そのような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同一の基本的化学構造を保持している。「アミノ酸模倣体」とは、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸に類似した様式で機能する化合物をさす。

30

【0032】

アミノ酸は、一般的に公知の3文字記号またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨された1文字記号のいずれかによって本明細書において言及され得る。ヌクレオチドは、同様に、一般に認められている1文字コードで言及され得る。

40

【0033】

本明細書において使用されるように、「核酸」および「ポリヌクレオチド」という用語は、交換可能に使用される。「ポリヌクレオチド」という用語の使用には、オリゴヌクレオチド（即ち、短いポリヌクレオチド）が含まれる。この用語は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および天然に存在するバリエントもさし、例えば、非限定的に、ホスホロチオエート、ホスホロアミド酸、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（PNA）等のような、合成核酸および/または天然に存在しない核酸（即ち、核酸類似体または修飾された骨格残基もしくは連結を含む）もさすことができる。他に示されない限り、特定の核酸配列は、明示的に示された配列と同様に、それらの保存的に修飾されたバリエント（例えば、縮重コドン置換）および相補配列も、暗示的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1個以上の選択

50

された（または全ての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基に置換された配列を生成することによって達成され得る（例えば、Batzer et al., Nucleic Acid Res.19:5081(1991) ; Ohtsuka et al., J.Biol.Chem.260:2605-2608(1985) ; およびCassol et al.(1992) ; Rossolini et al., Mol.Cell.Probes 8:91-98(1994)を参照すること）。

【0034】

「生物学的試料」には、血液および血液画分または血液製剤（例えば、血清、血漿、血小板、赤血球等）；痰または唾液；腎臓、肺、肝臓、心臓、脳、神経組織、甲状腺、眼、骨格筋、軟骨、または骨組織；培養細胞、例えば、初代培養物、外植片、および形質転換細胞、幹細胞、便、尿等が含まれる。そのような生物学的試料には、生検試料および剖検試料のような組織の切片、ならびに組織学的目的のために採取された凍結切片も含まれる。生物学的試料は、典型的には、「対象」、即ち、真核生物、最も好ましくは、靈長類、例えば、チンパンジーもしくはヒトのような哺乳動物；ウシ；イヌ；ネコ；齧歯類、例えば、モルモット、ラット、もしくはマウス；ウサギ；またはトリ；爬虫類；または魚から入手される。

10

【0035】

薬剤（例えば、LIFに拮抗する薬剤）の「治療的な量」または「治療的に有効な量」とは、対象における癌（例えば、K-Ras発現癌）の症状を防止するか、緩和するか、軽減するか、またはその重症度を低下させる薬剤の量である。

20

【0036】

「投与する」、「投与される」、または「投与すること」という用語は、薬剤、化合物、または組成物を生物学的作用の所望の部位へ送達する方法をさす。これらの方法には、局所送達、非経口送達、静脈内送達、皮内送達、筋肉内送達、結腸送達、直腸送達、または腹腔内送達が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に記載された薬剤および方法と共に任意で利用される投与技術には、例えば、Goodman and Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, current ed.; Pergamon ; およびRemington's, Pharmaceutical Sciences(current edition), Mack Publishing Co., Easton, PAに記述されたようなものが含まれる。

20

【0037】

III. 癌を処置する方法

30

一つの局面において、対象における癌を処置または防止する方法が提供される。いくつかの態様において、方法は、白血病抑制因子（LIF）に拮抗する薬剤の治療的な量を対象へ投与する工程を含む。いくつかの態様において、対象は、ヒト、例えば、ヒト成人またはヒト子供である。

【0038】

いくつかの態様において、癌は、K-Ras発現癌、例えば、野生型K-Rasを発現するかもしくは過剰発現する癌、または変異型K-Rasを発現する癌である。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は、膵臓癌、結腸直腸癌、または肺癌である。いくつかの態様において、K-Ras発現癌は、膵臓癌、例えば、膵管腺癌である。いくつかの態様において、方法は、対象由来の試料（例えば、腫瘍組織試料）中のK-Ras発現のレベルを測定する工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、対象由来の試料（例えば、腫瘍組織試料）中の発現されているK-Ras遺伝子型を決定する工程をさらに含む。

40

【0039】

いくつかの態様において、方法は、以下の工程をさらに含む：

対象由来の試料（例えば、対象由来の腫瘍細胞または腫瘍組織の試料）中のK-Ras発現のレベルを検出する工程；

対象由来の試料におけるK-Ras発現のレベルが、対照（例えば、正常ヒト末梢リンパ球のような、K-Rasを発現しない非疾患の細胞または組織）のK-Ras発現のレベルより大きいか否かを決定する工程；および

対象由来の試料におけるK-Ras発現のレベルが対照のK-Ras発現のレベルより大きい時、LI

50

Fに拮抗する薬剤を対象へ投与する工程。

【0040】

いくつかの態様において、癌は、K-Rasを発現するかまたは過剰発現する癌ではない。非限定的な例として、いくつかの態様において、癌は、K-Rasを発現または過剰発現しない膵臓癌（例えば、膵管腺癌）である。

【0041】

K-Ras発現癌

いくつかの態様において、癌は、検出可能なレベルでK-Rasを発現する癌である。いくつかの態様において、癌組織試料中の細胞の少なくとも0.1%が、K-Ras活性化（例えば、野生型K-Ras、またはコドン12、コドン13、コドン61、および／もしくはその他のコドンにおけるK-Ras活性化変異）について陽性である時、その癌は、検出可能なレベルのK-Ras発現を有する。いくつかの態様において、癌は、検出可能なレベルの野生型K-Rasの発現を有する。いくつかの態様において、癌は、検出可能なレベルの変異型K-Rasの発現を有する。いくつかの態様において、K-Ras変異は、コドン5（例えば、K5E）、コドン9（例えば、V9I）、コドン12（例えば、G12A、G12C、G12D、G12F、G12R、G12S、G12V、G12Y）、コドン13（例えば、G13C、G13D、G13V）、コドン14（例えば、V14I、V14L）、コドン18（例えば、A18D）、コドン19（例えば、L19F）、コドン22（例えば、Q22K）、コドン23（例えば、L23R）、コドン24（例えば、I24N）、コドン26（例えば、N26K）、コドン33（例えば、D33E）、コドン36（例えば、I36L、I36M）、コドン57（例えば、D57N）、コドン59（例えば、A59E、A59G、A59T）、コドン61（例えば、Q61H、Q61K、Q61L、Q61R）、コドン62（例えば、E62G、E62K）、コドン63（例えば、E63K）、コドン64（例えば、Y64D、Y64H、Y64N）、コドン68（例えば、R68S）、コドン74（例えば、T74P）、コドン92（例えば、D92Y）、コドン97（例えば、R97I）、コドン110（例えば、P110H、P110S）、コドン117（例えば、K117N）、コドン118（例えば、C118S）、コドン119（例えば、D119N）、コドン135（例えば、R135T）、コドン138（例えば、G138V）、コドン140（例えば、P140H）、コドン146（例えば、A146T、A146V）、コドン147（例えば、K147N）、コドン153（例えば、D153N）、コドン156（例えば、F156L）、コドン160（例えば、V160A）、コドン164（例えば、R164Q）、コドン171（例えば、I171M）、コドン176（例えば、K176Q）、コドン185（例えば、C185R、C185S）、およびコドン188（例えば、M188V）のうちの1個以上における活性化変異である。いくつかの態様において、K-Ras変異は、アミノ酸残基G12における変異（例えば、G12C、G12V、G12D、G12A、G12S、G12R、またはG12Fの置換）である。いくつかの態様において、K-Ras変異は、アミノ酸残基G13における変異（例えば、G13CまたはG13Dの置換）である。いくつかの態様において、K-Ras変異は、アミノ酸残基Q61における変異（例えば、Q61HまたはQ61Kの置換）である。いくつかの態様において、K-Ras変異は、アミノ酸残基A146における変異（例えば、A146TまたはA146Vの置換）である。いくつかの態様において、検出可能なレベルで野生型または変異型のK-Rasを発現する癌は、膵臓癌、肺癌、または結腸直腸癌である。

【0042】

いくつかの態様において、癌はK-Rasを過剰発現する癌である。本明細書において使用されるように、K-Ras（例えば、野生型K-Rasまたは変異型K-Ras）の発現のレベルが閾値または対照試料（例えば、正常ヒト末梢リンパ球のような、K-Rasを発現しない非疾患の細胞もしくは組織、またはK-Rasの発現について陰性であることが既知の対象由来の癌試料）と比べて増加している場合、その癌はK-Rasを「過剰発現する」。いくつかの態様において、K-Ras（例えば、野生型K-Rasまたは変異型K-Ras）の発現のレベルが、閾値または対照試料（例えば、K-Rasの発現について陰性であることが既知の癌）におけるK-Ras発現のレベルより少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、または200%大きい場合、その癌はK-Rasを過剰発現する。いくつかの態様において、K-Ras（例えば、野生型K-Rasまたは変異型K-Ras）の発現のレベルが、閾値または対照試料（例えば、K-Rasの発現について陰性であることが既知の癌）におけるK-Ras発現のレベルと比べて、少なくとも2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、またはそれ以上である場合、そ

10

20

30

40

50

の癌はK-Rasを過剰発現する。いくつかの態様において、野生型K-Rasまたは変異型K-Rasを過剰発現する癌は、膵臓癌、肺癌、または結腸直腸癌である。

【0043】

癌におけるK-Rasの発現のレベルは、当技術分野において公知の方法によって測定され得る。いくつかの態様において、癌におけるK-Ras遺伝子の発現のレベルが測定される。いくつかの態様において、癌におけるK-Rasタンパク質の発現のレベルが測定される。K-Ras遺伝子もしくはK-Rasタンパク質の発現のレベル、またはK-Ras遺伝子型の検出は、対象由来の生物学的試料において測定され得る。いくつかの態様において、生物学的試料は、癌細胞（例えば、腫瘍から入手されたかまたは由来する細胞）を含む。いくつかの態様において、生物学的試料は腫瘍組織試料である。

10

【0044】

K-Rasタンパク質の発現のレベルは、当技術分野において公知の多数のイムノアッセイのいずれかを使用して測定され得る。イムノアッセイの技術およびプロトコルは、Price and Newman, "Principles and Practice of Immunoassay," 2nd Edition, Grove's Dictionaries, 1997；およびGosling, "Immunoassays: A Practical Approach," Oxford University Press, 2000に一般に記載されている。競合イムノアッセイおよび非競合イムノアッセイを含む多様なイムノアッセイ技術が使用され得る（例えば、Self et al., Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65(1996)を参照すること）。イムノアッセイという用語には、非限定的に、EMIT法（enzyme multiplied immunoassay technique）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、IgM抗体キャプチャーエルイザ（MAC ELISA）、および微粒子酵素イムノアッセイ（MEIA）のような酵素イムノアッセイ（EIA）；キャピラリー電気泳動イムノアッセイ（CEIA）；ラジオイムノアッセイ（RIA）；イムノラジオメトリックアッセイ（IRMA）；免疫蛍光（IF）；蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）；ならびに化学発光アッセイ（CL）を含む技術が包含される。所望により、そのようなイムノアッセイは自動化されてもよい。イムノアッセイはレーザー誘起蛍光と共に使用されてもよい（例えば、Schmalzing et al., Electrophoresis, 18:2184-93(1997)；Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci., 699:463-80(1997)を参考すること）。

20

【0045】

抗体のタンパク質（例えば、K-Ras）との特異的な免疫学的結合は、直接または間接的に検出され得る。直接標識には、抗体に付着した蛍光性または発光性のタグ、金属、色素、放射性核種等が含まれる。ヨウ素125(¹²⁵I)によって標識された抗体が使用され得る。タンパク質マーカーに特異的な化学発光性抗体を使用する化学発光アッセイは、タンパク質レベルの高感度の非放射性の検出のために適当である。蛍光色素によって標識された抗体も適当である。蛍光色素の例には、非限定的に、DAPI、フルオレセイン、ヘキスト33258、R-フィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ローダミン、テキサスレッド、およびリサミンが含まれる。間接標識には、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（AP）、ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ等のような、当技術分野において周知の様々な酵素が含まれる。西洋ワサビペルオキシダーゼ検出系は、例えば、過酸化水素の存在下で450nmにおいて検出可能な可溶性の生成物を与える発色性基質テトラメチルベンジジン（TMB）と共に使用され得る。アルカリホスファターゼ検出系は、例えば、405nmにおいて容易に検出可能な可溶性の生成物を与える発色性基質p-ニトロフェニルリン酸と共に使用され得る。同様に、ガラクトシダーゼ検出系は、410nmにおいて検出可能な可溶性の生成物を与える発色性基質o-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド（ONPG）と共に使用され得る。ウレアーゼ検出系は、ウレア-プロモクレゾールパープル（urea-bromocresol purple）（Sigma Immunochemicals ; St. Louis, MO）のような基質と共に使用され得る。

30

【0046】

直接標識または間接標識からのシグナルは、例えば、発色性基質からの色を検出する分光光度計；¹²⁵Iの検出のためのガンマカウンターのような放射線を検出する放射線計数管；またはある種の波長の光の存在下で蛍光を検出する蛍光光度計を使用して分析され得る

40

50

。酵素に連結された抗体の検出のため、EMAX Microplate Reader (Molecular Devices ; Menlo Park,CA) のような分光光度計を、製造業者の説明書に従って使用して、定量分析を行うことができる。所望により、本発明のアッセイを自動化するかまたはロボットを利用して実施することができ、複数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。いくつかの態様において、自動化されたハイコンテンツイメージングシステムを使用してシグナルの量を定量化することができる。ハイコンテンツイメージングシステムは、市販されている（例えば、ImageXpress、Molecular Devices Inc.,Sunnyvale,CA）。

【 0 0 4 7 】

抗体を、磁性粒子またはクロマトグラフィマトリックス粒子、アッセイプレート（例えば、マイクロタイターウェル）の表面、固体基質材料または膜の片（例えば、プラスチック、ナイロン、ペーパー）等のような多様な固体支持体へ固定化することができる。抗体または複数の抗体のアレイを固体支持体上にコーティングすることによって、アッセイストリップを調製することができる。次いで、このストリップを試験試料に浸し、洗浄および検出の工程を通して迅速に処理し、有色スポットのような測定可能なシグナルを生成することができる。

【 0 0 4 8 】

K-Ras核酸発現レベルまたはK-Ras遺伝子型の分析は、サザン分析、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、または関心対象のコード配列の一部分に相補的な核酸配列とのハイブリダイゼーションに基づくその他の方法（例えば、スロットプロットハイブリダイゼーション）のようなルーチンの技術を使用して、達成され得、本発明の範囲内である。
適用可能なPCR増幅技術は、例えば、Ausubel et al. および Innis et al.（前記）に記載されている。一般的な核酸ハイブリダイゼーション法は、Anderson, "Nucleic Acid Hybridization," BIOS Scientific Publishers, 1999に記載されている。マイクロアレイに配置されたmRNAまたはcDNAの配列から、複数の核酸配列（例えば、ゲノムDNA、mRNA、またはcDNA）の増幅またはハイブリダイゼーションを実施することもできる。マイクロアレイ法は、Hardiman, "Microarrays Methods and Applications:Nuts & Bolts," DNA Press, 2003；および Baldi et al., "DNA Microarrays and Gene Expression:From Experiments to Data Analysis and Modeling," Cambridge University Press, 2002に一般に記載されている。

【 0 0 4 9 】

核酸発現レベルまたは遺伝子型の分析は、非限定的に、マイクロアレイ、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づく分析、配列分析、および電気泳動分析を含む当技術分野において公知の技術を使用して実施されてもよい。PCRに基づく分析の非限定的な例には、Applied Biosystemsから入手可能なTaqman（登録商標）対立遺伝子識別アッセイが含まれる。配列分析の非限定的な例には、マクサム・ギルバート配列決定、サンガー配列決定、キヤピラリーアレイDNA配列決定、サーマルサイクル配列決定（Sears et al., Biotechniques, 13:626-633(1992)）、固相配列決定（Zimmerman et al., Methods Mol. Cell Biol., 3:39-42(1992)）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF/MS；Fu et al., Nat. Biotechnol., 16:381-384(1998)）のような質量分析による配列決定、ピロシーケンシング（Ronaghi et al., Science, 281:363-365(1998)）、およびシーケンシングバイハイブリダイゼーションが含まれる。Chee et al., Science, 274:610-614(1996)；Drmanac et al., Science, 260:1649-1652(1993)；Drmanac et al., Nat. Biotechnol., 16:54-58(1998)。電気泳動分析の非限定的な例には、アガロースゲル電気泳動またはポリアクリルアミドゲル電気泳動のようなスラブゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、および変性勾配ゲル電気泳動が含まれる。いくつかの態様において、核酸バリアントを検出する方法には、例えば、Third Wave Technologies, Inc. からのINVADER（登録商標）アッセイ、制限断片長多形（RFLP）分析、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、ヘテロ二本鎖移動度アッセイ、一本鎖高次構造多形（SSCP）分析、一塩基プライマー伸長（SNUPE）、およびピロシーケンシングが含まれる。

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

50

検出可能モエティが、本明細書に記載されたアッセイにおいて使用され得る。多様な検出可能モエティが使用され得、標識の選択は、必要とされる感度、抗体とのコンジュゲーションの容易さ、安定性要件、ならびに入手可能な機器および廃棄規定に依る。適当な検出可能モエティには、放射性核種、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、Oregon Green（商標）、ローダミン、テキサスレッド、テトラローダミンイソチオシアネート（TRITC）、Cy3、Cy5等）、蛍光マーカー（例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）、フィコエリトリン等）、腫瘍関連プロテアーゼによって活性化される自己消光（autoquenched）蛍光化合物、酵素（例えば、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、ナノ粒子、ビオチン、ジゴキシゲニン等が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0051】

多様な物理的フォーマットで分析を実施することができる。例えば、多数の試験試料の処理を容易にするため、マイクロタイタープレートの使用または自動化を使用することができる。

【0052】

あるいは、タンパク質または核酸の発現レベルの検出のため、抗体または核酸プローブを、顕微鏡スライドに固定化された対象試料へ適用することができる。得られた抗体染色またはインサイチューハイブリダイゼーションのパターンを、当技術分野において公知の多様な光学顕微鏡法または蛍光顕微鏡法のいずれかを使用して可視化することができる。

20

【0053】

例えば、単独の、または質量分析（例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、タンデムMS等）と組み合わせられた高圧液体クロマトグラフィ（HPLC）によっても、タンパク質または核酸の分析を達成することができる。

【0054】

K-Ras遺伝子型を決定する方法は、当技術分野において記載されている。例えば、Kramer et al., Cell Oncol. 31:161-167(2009) ; Chen et al., J.Chromatogr.A 1216:5147-5154(2009) ; Lamy et al., Modern Pathology 24:1090-1100(2011) ; Galbiati et al., PLoS ONE 8(3):359939(2013) ; およびWO 2010/048691を参照すること。

30

【0055】

LIFに拮抗する薬剤

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤の治療的な量が、その必要がある対象（例えば、癌、例えば、K-Rasを発現するかまたは過剰発現する癌を有する対象）へ投与される。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は、ペプチド、タンパク質、オリゴペプチド、環状ペプチド、ペプチド模倣体、抗体、多糖、脂質、脂肪酸、阻害性RNA（例えば、siRNA、miRNA、もしくはshRNA）、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、アブタマー、小有機分子、または薬物化合物である。薬剤は、合成または天然に存在するもののいずれかであり得る。

【0056】

抗LIF抗体

いくつかの態様において、薬剤は抗LIF抗体である。いくつかの態様において、抗LIF抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、抗LIF抗体は、Fab、F(ab')₂、およびFvのような抗体断片である。

40

【0057】

いくつかの態様において、抗LIF抗体は、American Type Culture Collectionアクセション番号ATCC HB11074（クローンD25.1.4）、ATCC HB11076（クローンD3.14.1）、ATCC HB11077（クローンD4.16.9）、もしくはATCC HB11075（クローンD62.3.2）の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって產生されたモノクローナル抗体、またはそれらのヒト化バージョンである。抗LIF抗体および抗LIF抗体を作成する方法は、各々、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許5,654,157号およびWO 2011/124566に記載されている。いくつかの態様において、抗LIF抗体は、American Type Culture Collectionアクセ

50

ション番号ATCC HB11074（クローンD25.1.4）、ATCC HB11076（クローンD3.14.1）、ATCC HB11077（クローンD4.16.9）、またはATCC HB11075（クローンD62.3.2）の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生された抗体と、エピトープとの結合について競合する抗体である。いくつかの態様において、抗LIF抗体は、American Type Culture Collectionアクセッション番号ATCC HB11074（クローンD25.1.4）、ATCC HB11076（クローンD3.14.1）、ATCC HB11077（クローンD4.16.9）、またはATCC HB11075（クローンD62.3.2）の下で寄託されたハイブリドーマ細胞によって産生された抗体と同一のエピトープに結合する抗体である。いくつかの態様において、抗LIF抗体は、ヒトLIFのアミノ酸160～202を含む領域内のエピトープに結合する抗体である。

【0058】

10

LIFに拮抗する抗体（例えば、組換え抗体またはモノクローナル抗体）の調製のため、当技術分野において公知の多くの技術を使用することができる。例えば、Kohler & Milstein, *Nature* 256:495-497(1975) ; Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72(1983) ; Cole et al., pp.77-96 in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R.Liss, Inc. (1985) ; Coligan, *Current Protocols in Immunology*(1991) ; Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*(1988) ; およびGoding, *Monoclonal Antibodies:Principles and Practice*(2d ed. 1986)を参照すること。

【0059】

20

関心対象の抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を、細胞からクローニングすることができ、例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子を、ハイブリドーマからクローニングし、組換えモノクローナル抗体を作製するために使用することができる。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子ライブラリーを、ハイブリドーマまたは形質細胞から作成することもできる。あるいは、ファージディスプレイまたは酵母ディスプレイのテクノロジーを、選択された抗原と特異的に結合する抗体およびヘテロマーFab断片を同定するために使用することができる（例えば、McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554(1990) ; Marks et al., *Biotechnology* 10:779-783(1992) ; Lou et al. (2010) PEDS 23:311を参照すること）。重鎖および軽鎖の遺伝子産物のランダムな組み合わせは、異なる抗原特異性を有する抗体の大きいプールを生成する（例えば、Kuby, *Immunology*(3rd ed. 1997)を参照すること）。単鎖抗体または組換え抗体の作製のための技術（米国特許第4,946,778号および米国特許第4,816,567号）も、抗体を作製するために適応し得る。抗体を、二重特異性、即ち、2種の異なる抗原を認識し得るようにすることもできる（例えば、WO 93/08829、Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659(1991) ; およびSuresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210(1986)を参照すること）。抗体は、ヘテロコンジュゲート、例えば、2種の共有結合で接合された抗体、またはイムノトキシンであってもよい（例えば、米国特許第4,676,980号、WO 91/00360 ; およびWO 92/200373を参照すること）。

30

【0060】

原核生物および真核生物の発現系を含む多数の発現系を使用して、抗体を作製することができる。いくつかの態様において、発現系は、ハイブリドーマまたはCHO細胞発現系のような哺乳動物細胞発現である。多くのそのような系が、商業的供給元から広く入手可能である。抗体がV_H領域およびV_L領域の両方を含む態様において、V_H領域およびV_L領域は、単一のベクターを使用して、例えば、2シストロン発現単位において、または異なるプロモーターの調節下で、発現され得る。他の態様において、V_H領域およびV_L領域は、別々のベクターを使用して発現されてもよい。本明細書に記載されるようなV_H領域およびV_L領域は、任意で、N末端にメチオニンを含んでいてもよい。

40

【0061】

非ヒト抗体をヒト化するかまたは靈長類化する方法も、当技術分野において公知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源から導入された1個以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、インポート残基と呼ばれ、典型的には、インポート可変ドメインから得られる。ヒト化は、本質的には、Winterらの方法に従つて（例えば、Jones et al., *Nature* 321:522-525(1986) ; Riechmann et al., *Nature* 332:3

50

23-327(1988) ; Verhoeven et al., *Science* 239:1534-1536(1988)、およびPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)を参照すること)、ヒト抗体の対応する配列を齧歯類のCDRまたはCDR配列に置換することによって実施され得る。そのようなヒト化抗体は、完全ヒト可変ドメインより実質的に少ない部分が、非ヒト種由来の対応する配列に置換されたキメラ抗体である(米国特許第4,816,567号)。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくいくつかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位由来の残基に置換されたヒト抗体である。トランスジェニックのマウスまたはその他の哺乳動物のようなその他の生物を、ヒト化抗体またはヒト抗体を発現させるために使用することができる(例えば、米国特許第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号、Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783(1992)；Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994)；Morrison, *Nature* 368:812-13(1994)；Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996)；およびLonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995)を参照すること)。

10

【0062】

ヒト化の代わりに、ヒト抗体を生成してもよい。非限定的な例として、免疫感作時に、内在性免疫グロブリン産生の非存在下で、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作製することができる。例えば、キメラマウスおよび生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖連結領域(JH)遺伝子のホモ接合性の欠失は、内在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。そのような生殖系列変異体マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、抗原チャレンジ時にヒト抗体の産生をもたらすであろう。例えば、Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993)；Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258(1993)；Brugermann et al., *Year in Immun.*, 7:33(1993)；ならびに米国特許第5,591,669号、第5,589,369号、および第5,545,807号を参照すること。

20

【0063】

いくつかの態様において、(Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはdABのような)抗体断片が生成される。抗体断片の作製のための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、完全抗体のタンパク質消化を介して得られていた(参照、例えば、Morimoto et al., *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 24:107-117(1992)；およびBrennan et al., *Science*, 229:81(1985))。しかしながら、現在は、これらの断片を、組換え宿主細胞を使用して直接作製することができる。例えば、抗体ファージライブラリーから抗体断片を単離することができる。あるいは、Fab'-SH断片を大腸菌(*E.coli*)細胞から直接回収し、F(ab')₂断片が形成されるよう化学的にカップリングすることができる(例えば、Carter et al., *BioTechnology*, 10:163-167(1992)を参照すること)。もう一つのアプローチによると、F(ab')₂断片を、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体断片の作製のためのその他の技術は、当業者に明白であろう。他の態様において、選択の抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。例えば、PCT公開番号WO 93/16185；ならびに米国特許第5,571,894号および第5,587,458号を参照すること。抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されたような直鎖抗体であってもよい。

30

【0064】

いくつかの態様において、延長されたインビボ半減期を提供するため、抗体または抗体断片を、もう一つの分子、例えば、ポリエチレンギリコール(PEG化)または血清アルブミンとコンジュゲートすることができる。抗体断片のPEG化の例は、Knight et al. *Platelets* 15:409, 2004(アブシキシマブについて)；Pedley et al., *Br. J. Cancer* 70:1126, 1994(抗CEA抗体について)；Chapman et al., *Nature Biotech.* 17:780, 1999；およびHumphreys, et al., *Protein Eng. Des.* 20:227, 2007に提供されている。

40

【0065】

抗体または抗体断片を、LIFの活性を中和する能力についてアッセイすることができる。LIF活性の阻害をアッセイする方法は、当技術分野において公知である。非限定的な例として、マウス白血病細胞株DA-1aを使用した細胞増殖アッセイにおいて、抗体または抗

50

体断片がLIFの活性を中和するか否かを決定するためのアッセイを実施することができる。Moreau et al., Nature 15:690-692(1988)を参照すること。発癌性K-Rasによって駆動されるマウス臍臓癌細胞においてmLIFのLIFRとの結合を阻止する能力、臍臓腫瘍形成を低下させる能力、および／または免疫適格同質遺伝子動物モデルにおいてゲムシタビンに対する臍臓腫瘍の治療的応答を改善する能力について、中和抗体を評価することもできる。

【0066】

他のLIFアンタゴニスト

LIFの付加的なアンタゴニストは、当業者に周知の方法によって容易に同定され得る。いくつかの態様において、LIFのアンタゴニストは、白血病抑制因子受容体（LIFR）との結合について、LIFと競合する能力について、可能性のあるアンタゴニストをスクリーニングすることによって同定され得る。競合アッセイは当技術分野において周知である。典型的には、競合結合アッセイは、既知のリガンドと少なくとも同等の親和性で既知の受容体（例えば、LIFR）に結合する候補について、ライブラリー（例えば、化合物またはペプチドのライブラリー）をスクリーニングするため、標識された既知のリガンド（例えば、LIF）を使用する。

10

【0067】

いくつかの態様において、LIFのアンタゴニストは、（例えば、細胞増殖アッセイにおいて）LIF生理活性を阻害する能力について、可能性のあるアンタゴニストをスクリーニングすることによって同定され得る。LIFのアンタゴニストについてアッセイする方法は、当技術分野において記載されている（例えば、Fairlie et al., Biochemistry 42:13193-13201(2003) ; Zhou et al., J.Endod 7:819-824(2011)）。

20

【0068】

スクリーニングアッセイは、細胞に基づくアッセイ等の使用によってインピトロで実施されてもよいし、または動物モデル等の使用によってインピボで実施されてもよい。いくつかの態様において、アッセイは、アッセイ工程を自動化し、アッセイすべき任意の便利な起源からの化合物を準備することによって、大きいケミカルライブラリーをスクリーニングするために設計され、それは、典型的には、平行して（例えば、ロボットアッセイにおいてマイクロタイタープレート上のマイクロタイターフォーマットで）実行される。LIFの可能性のあるアンタゴニストとしてスクリーニングされる薬剤は、小有機分子、ペプチド、ペプチド模倣体、ペプトイド、タンパク質、ポリペプチド、糖タンパク質、オリゴ糖、または阻害性RNA（例えば、siRNA、アンチセンスRNA）のようなポリヌクレオチドであり得る。

30

【0069】

本質的に任意の化学化合物を、LIFに拮抗する能力について試験することができる。いくつかの態様において、薬剤は、1,500ダルトン未満、いくつかの場合において、1,000ダルトン未満、800ダルトン未満、600ダルトン未満、500ダルトン未満、または400ダルトン未満の分子量を有する。より小さい分子は、より高い分子量を有する薬剤より、経口吸收を含む優れた薬物動態学的特徴と適合性の生理化学的特性を有する可能性が高いため、薬剤の比較的小さいサイズが望ましい場合がある。

40

【0070】

いくつかの態様において、ハイスループットスクリーニング法は、多数の可能性のある治療用化合物（可能性のあるLIFと拮抗する化合物）を含有しているコンビナトリアルライブラリーの準備を含む。そのような「コンビナトリアルケミカルライブラリーまたはコンビナトリアルペプチドライブラリー」を、所望の特徴的な活性を示すライブラリーメンバー（特定の化学種またはサブクラス）を同定するため、本明細書に記載される一つ以上のアッセイにおいてスクリーニングすることができる。このようにして同定された化合物は、従来の「リード化合物」として用いられてもよいし、またはそれ自体が可能性のあるもしくは実際の治療薬として使用されてもよい。

【0071】

コンビナトリアルケミカルライブラリーは、試薬のような多数の化学的な「ビルディン

50

「グローブ」を組み合わせることによって、化学合成または生物学的合成のいずれかによって生成された多様な化学化合物のコレクションである。例えば、ポリペプチドライブラリーのような直鎖コンビナトリアルケミカルライブラリーは、所定の化合物の長さ（即ち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数）についての全ての可能性のある方式で化学的ビルディングブロック（アミノ酸）のセットを組み合わせることによって形成される。化学的ビルディングブロックのそのような組み合わせ混合を通して、数百万種の化合物を合成することができる。

【0072】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者に周知である（例えば、Beeler et al., *Curr Opin Chem Biol.*, 9:277(2005)；およびShang et al., *Curr Opin Chem Biol.*, 9:248(2005)を参照すること）。本発明において有用なライブラリーは、アミノ酸化合物、核酸化合物、炭水化物、または小有機化合物から構成され得る。炭水化物ライブラリーは、例えば、Liang et al., *Science*, 274:1520-1522(1996)；および米国特許第5,593,853号に記載されている。10

【0073】

代表的なアミノ酸化合物ライブラリーには、ペプチドライブラリー（例えば、米国特許第5,010,175号；第6,828,422号；および第6,844,161号；Furka, *Int.J.Pept.Prot.Res.*, 37:487-493(1991)；Houghton et al., *Nature*, 354:84-88(1991)；ならびにEichler, *Comb Chem High Throughput Screen.*, 8:135(2005)を参照すること）、ペプトイド（PCT公開WO 91/19735）、コードされたペプチド（PCT公開WO 93/20242）、ランダムバイオオリゴマー（PCT公開WO 92/00091）、ビニロガス（vinylogous）ポリペプチド（Hagihara et al., *J.Amer.Chem.Soc.*, 114:6568(1992)）、-D-グルコース折り畳みを有する非ペプチドのペプチド模倣体（Hirschmann et al., *J.Amer.Chem.Soc.*, 114:9217-9218(1992)）、ペプチド核酸ライブラリー（例えば、米国特許第5,539,083号を参照すること）、抗体ライブラリー（例えば、米国特許第6,635,424号および第6,555,310号；PCT公開番号PCT/US96/10287；ならびにVaughn et al., *Nature Biotechnology*, 14:309-314(1996)を参照すること）、ならびにペプチジルホスホネート（Campbell et al., *J.Org.Chem.*, 59:658(1994)）が含まれるが、これらに限定されない。20

【0074】

代表的な核酸化合物ライブラリーには、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、阻害性RNA（例えば、RNAi、siRNA）、およびアンチセンスRNAのライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。例えば、Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. 1987-2005, Wiley Interscience；およびSambrook and Russell, *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照すること。核酸ライブラリーは、例えば、米国特許第6,706,477号；第6,582,914号；および第6,573,098号に記載されている。cDNAライブラリーは、例えば、米国特許第6,846,655号；第6,841,347号；第6,828,098号；第6,808,906号；第6,623,965号；および第6,509,175号に記載されている。RNAライブラリー、例えば、リボザイム、RNA干渉、またはsiRNAのライブラリーは、例えば、Downward, *Cell*, 121:813(2005)およびAkashi et al., *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 6: 413(2005)に記載されている。アンチセンスRNAライブラリーは、例えば、米国特許第6,586,180号および第6,518,017号に記載されている。40

【0075】

代表的な小有機分子ライブラリーには、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびジペプチドのようなダイバーソマー（diversomer）（Hobbs et al., *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 90:6909-6913(1993)）；小化合物ライブラリーの類似有機合成（Chen et al., *J.Amer.Chem.Soc.*, 116:2661(1994)）；オリゴカルバメート（Cho et al., *Science*, 261:1303(1993)）；ベンゾジアゼピン（例えば、米国特許第5,288,514号；およびBaum, *C&EN*, Jan 18, page 3(1993)）；イソプレノイド（例えば、米国特許第5,569,588号）；チアゾリジノンおよびメタチアザノン（例えば、米国特許第5,549,974号）；ピロリジン（例えば、米国特許第5,525,735号および第5,519,134号）；モルホリノ化合物（例えば、米国特許第5,506,337号50

) ; 四環系ベンゾイミダゾール (例えば、米国特許第6,515,122号) ; ジヒドロベンゾピラン (例えば、米国特許第6,790,965号) ; アミン (例えば、米国特許第6,750,344号) ; フェニル化合物 (例えば、米国特許第6,740,712号) ; アゾール (例えば、米国特許第6,683,191号) ; ピリジンカルボキサミドまたはピリジンスルホンアミド (例えば、米国特許第6,677,452号) ; 2-アミノベンゾキサゾール (例えば、米国特許第6,660,858号) ; イソインドール、イソオキシンドール、またはイソオキシキノリン (例えば、米国特許第6,667,406号) ; オキサゾリジノン (例えば、米国特許第6,562,844号) ; ならびにヒドロキシルアミン (例えば、米国特許第6,541,276号) が含まれるが、これらに限定されない。

【0076】

コンビナトリアルライブラーの調製のための装置は、市販されている。例えば、Advanced Chem.Tech (Louisville,KY) からの357 MPSおよび390 MPS、Rainin Instruments (Woburn,MA) からのSymphony、Applied Biosystems (Foster City,CA) からの433A、ならびにMillipore (Bedford,MA) からの9050 Plusを参照すること。10

【0077】

LIF活性に拮抗するとして初期に同定された薬剤を、明白な活性をバリデートするため、さらに試験することができる。好ましくは、そのような研究は、適当な細胞に基づくモデルまたは動物モデルによって実施される。そのような方法の基本的なフォーマットは、初期スクリーニングにおいて同定されたリード化合物を、モデルとして用いられる動物へ投与し、次いで、実際にLIFの活性が拮抗されるか否かを決定することを含む。バリデーション研究において利用される動物モデルは、一般に、任意の種類の哺乳動物である。適当な動物の具体例には、霊長類 (例えば、チンパンジー、サル等) および齧歯類 (例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等) が含まれるが、これらに限定されない。20

【0078】

投与および組み合わせ治療

治療剤 (例えば、LIFに拮抗する薬剤) の投与ルートは、経口、腹腔内、経皮、皮下、静脈内注射、筋肉内注射、吸入、局所、病巣内、注入；リポソームによって媒介される送達；局所、くも膜下腔内、歯肉ポケット、直腸、気管支内、鼻、経粘膜、腸、眼、もしくは耳への送達、または当技術分野において公知のその他の方針であり得る。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は、経口投与されるか、静脈内投与されるか、または腹腔内投与される。30

【0079】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は、治療的に有効な量または用量で投与される。約0.01mg/kg ~ 約500mg/kg、または約0.1mg/kg ~ 約200mg/kg、または約1mg/kg ~ 約100mg/kg、または約10mg/kg ~ 約50mg/kgの1日用量範囲を使用することができる。しかしながら、投薬量は、選ばれた投与ルート、組成物の製剤、患者の応答、状態の重症度、対象の体重、および処方する医師の判断を含むいくつかの因子によって変動し得る。投薬量は、個々の患者による必要に応じて、経時的に増加させられてもよいしまたは減少させられてもよい。ある種の場合において、最初に低用量を患者に与え、次いで、患者にとって許容される有効な投薬量に増加させることができる。有効量の決定は、十分に当業者の能力の範囲内である。40

【0080】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤は、第2の治療剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様において、第2の治療剤は化学療法剤である。いくつかの態様において、化学療法剤は、アルキル化剤 (例えば、シクロホスファミド、イホスファミド、クロラムブシリル、ブスルファン、メルファラン、メクロレタミン、ウラムスチニン (uramustine))、チオテバ、ニトロソウレア、もしくはテモゾロミド)、アントラサイクリン (例えば、ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、エピルビシン、もしくはミトキサントロン)、細胞骨格破壊剤 (例えば、パクリタクセルもしくはドセタキセル)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (例えば、ボリノスタットもしくはロミデプシン)、トポイソメラーゼの阻害剤 (例えば、イリノテカン、トポテカン、アムサクリン、エトポシド)、50

もしくはテニポシド)、キナーゼ阻害剤(例えば、ボルテゾミブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ベムラフェニブ、もしくはビスモデギブ)、ヌクレオシド類似体もしくは前駆物質類似体(例えば、アザシチジン、アザチオプリン、カペシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メルカブトプリン、メトトレキサート、もしくはチオグアニン)、ペプチド抗生物質(例えば、アクチノマイシンもしくはブレオマイシン)、白金に基づく薬剤(例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、もしくはカルボプラチン)、または植物アルカロイド(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンデシン、ポドフィロトキシン、パクリタクセル、もしくはドセタキセル)である。いくつかの態様において、化学療法剤はヌクレオシド類似体である。いくつかの態様において、化学療法剤はゲムシタビンである。

10

【0081】

同時投与される治療剤(例えば、LIFに拮抗する薬剤および本明細書に記載される第2の治療剤)は、共にまたは別々に、同時にまたは異なる時点で投与され得る。投与される時、治療剤は、独立に、必要に応じて、1日1回、2回、3回、4回、またはそれより多いかもしくは少ない頻度で投与され得る。いくつかの態様において、投与される治療剤は1日1回投与される。いくつかの態様において、投与される治療剤は、同時に、例えば、混合物として投与される。いくつかの態様において、治療剤のうちの1種以上が、徐放性製剤で投与される。

【0082】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤および第2の治療剤は同時に投与される。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤が、例えば、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、15日、20日、25日、30日、40日、50日、60日、70日、80日、90日、100日、またはそれ以上、まず投与された後、第2の治療剤(例えば、化学療法剤)が投与される。いくつかの態様において、第2の治療剤(例えば、化学療法剤)が、例えば、約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、15日、20日、25日、30日、40日、50日、60日、70日、80日、90日、100日、またはそれ以上、まず投与された後、LIFに拮抗する薬剤が投与される。

20

【0083】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤(および、任意で、第2の治療剤、例えば、本明細書に記載される化学療法剤)は、長期間にわたり、例えば、少なくとも30日、40日、50日、60日、70日、80日、90日、100日、150日、200日、250日、300日、350日、またはそれ以上の間、対象へ投与される。

30

【0084】

IV.組成物およびキット

もう一つの局面において、対象における癌(例えば、K-Rasを発現するかまたは過剰発現する癌)の処置または防止において使用するための組成物およびキットが提供される。

【0085】

いくつかの態様において、癌(例えば、野生型K-Rasまたは変異型K-Rasが発現されるかまたは過剰発現される癌)を有する対象への投与において使用するための、LIFに拮抗する薬剤を含む薬学的組成物が提供される。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤(例えば、抗LIF抗体)は、前記セクションIIIに記載されたようなものである。いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤と第2の治療剤(例えば、本明細書に記載される化学療法剤)との組み合わせは、適切な薬学的に許容される担体または希釈剤による製剤化によって、共にまたは別々に、薬学的組成物へ製剤化され、錠剤、カプセル剤、丸剤、散剤、顆粒剤、糖衣錠、ゲル剤、スラリー剤、軟膏剤、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、およびエアロゾル剤のような、固体、半固体、液体、または気体の形態の調製物へ製剤化され得る。

40

【0086】

本発明において使用するための製剤を調製するための案内は、例えば、参照によって本明細書に組み入れられる、Remington:The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed.,

50

2006(前記) ; Martindale: The Complete Drug Reference, Sweetman, 2005, London: Pharmaceutical Press ; Niazi, Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations, 2004, CRC Press ; および Gibson, Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form, 2001, Interpharm Pressに見出される。本明細書に記載された薬学的組成物は、当業者に公知の様式で、即ち、従来の混合、溶解、造粒、糖衣錠作成、粉碎、乳化、封入、捕捉、または凍結乾燥の過程によって製造され得る。以下の方法および賦形剤は、例示に過ぎず、決して限定的なものではない。

【0087】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤(および、任意で、第2の治療剤、例えば、本明細書に記載される化学療法剤)は、徐放性、放出制御型(controlled release)、持続放出型(extended-release)、タイムリリース型(timed-release)、または遅延放出型(delayed-release)の製剤で、例えば、治療剤を含有する固体の疎水性ポリマーの半浸透性マトリックスで、送達のために調製される。様々な型の徐放性材料が確立されており、当業者に周知である。現在の持続放出型製剤には、フィルムコート錠、マルチパートイクル系またはマルチペレット系、親水性または親油性の材料を使用するマトリックステクノロジー、および孔形成賦形剤を含むロウに基づく錠剤が含まれる(例えば、Huang, et al. Drug Dev. Ind. Pharm. 29:79(2003) ; Pearnchob, et al. Drug Dev. Ind. Pharm. 29:925(2003) ; Maggi, et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 55:99(2003) ; Khanvilkar, et al., Drug Dev. Ind. Pharm. 228:601(2002) ; および Schmidt, et al., Int. J. Pharm. 216:9(2001)を参照すること)。徐放性送達系は、設計に依って、数時間または数日、例えば、4時間、6時間、8時間、10時間、12時間、16時間、20時間、24時間、またはそれ以上にわたり化合物を放出する。一般的には、徐放性製剤は、天然に存在するポリマーまたは合成ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン(PVP)のようなポリマービニルピロリドン；カルボキシビニル親水性ポリマー；メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースのような疎水性および/または親水性の親水コロイド；ならびにカルボキシポリメチレンを使用して調製され得る。

【0088】

徐放性製剤または持続放出型製剤は、二酸化チタン、二酸化ケイ素、酸化亜鉛、および粘土を含む鉱物のような天然成分を使用して調製されてもよい(参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第6,638,521号を参照すること)。例示的な持続放出型製剤には、各々、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許第6,635,680号；6,624,200号；第6,613,361号；第6,613,358号、第6,596,308号；第6,589,563号；第6,562,375号；第6,548,084号；第6,541,020号；第6,537,579号；第6,528,080号、および第6,524,621号に記載されたものが含まれる。例示的な放出制御型製剤には、各々、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許第6,607,751号；第6,599,529号；第6,569,463号；第6,565,883号；第6,482,440号；第6,403,597号；第6,319,919号；第6,150,354号；第6,080,736号；第5,672,356号；第5,472,704号；第5,445,829号；第5,312,817号、および第5,296,483号に記載されたものが含まれる。当業者は、その他の適用可能な徐放性製剤を容易に認識するであろう。

【0089】

経口投与のため、LIFに拮抗する薬剤(および、任意で、第2の治療剤、例えば、本明細書に記載される化学療法剤)を、当技術分野において周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって、容易に製剤化することができる。そのような担体は、処置される患者による経口摂取のため、化合物を、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、乳剤、親油性および親水性の懸濁剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤等として製剤化することを可能にする。経口使用のための薬学的調製物は、化合物を固体の賦形剤と混合し、任意で、得られた混合物を破碎し、錠剤または糖衣錠コア入手するため、所望により、適当な助剤を添加した後、顆粒の混合物を処理することによって入手することができる。適当な賦形剤には、例えば、乳糖、ショ糖、マンニトール、もしくはソルビトール

10

20

30

40

50

を含む糖のような増量剤；例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、イネデンプン、ジャガイモデンプンのようなセルロース調製物、ゼラチン、トラガントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および／またはポリビニルピロリドン(PVP)が含まれる。所望により、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩のような崩壊剤を添加することができる。

【0090】

LIFに拮抗する薬剤（および、任意で、第2の治療剤、例えば、本明細書に記載される化学療法剤）を、注射、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のために製剤化することができる。注射のため、化合物は、植物油またはその他の類似した油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸またはプロピレングリコールのエステルのような水性または非水性の溶媒において、所望により、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定剤、および保存剤のような従来の添加剤と共に、それらを溶解させるか、懸濁させるか、または乳化することによって、調製物へ製剤化され得る。いくつかの態様において、化合物は、水性溶液、好ましくは、ハンクス液、リングル液、または緩衝生理食塩水のような生理学的に適合性の緩衝液において製剤化され得る。注射用の製剤は、単位剤形、例えば、アンプルで、または保存剤が添加された多用量容器で提示され得る。組成物は、油性または水性の媒体による懸濁液、溶液、または乳濁液のような形態をとることができ、懸濁化剤、安定剤、および／または分散剤のような製剤化のための薬剤を含有していてよい。

10

【0091】

LIFに拮抗する薬剤（および、任意で、第2の治療剤、例えば、本明細書に記載される化学療法剤）は、経粘膜的または経皮的な手段によって全身投与され得る。経粘膜的または経皮的な投与のため、透過すべき閑門にとって適切な浸透剤が製剤中に使用される。局所投与のため、薬剤は、軟膏剤、クリーム剤、膏薬、散剤、およびゲル剤へ製剤化される。一つの態様において、経皮送達剤はDMSOであり得る。経皮送達系には、例えば、パッチ剤が含まれ得る。経粘膜投与のため、透過すべき閑門にとって適切な浸透剤が製剤中に使用される。そのような浸透剤は、当技術分野において一般に公知である。例示的な経皮送達製剤には、各々、参照によって本明細書に組み入れられる、米国特許第6,589,549号；第6,544,548号；第6,517,864号；第6,512,010号；第6,465,006号；第6,379,696号；第6,312,717号、および第6,310,177号に記載されたものが含まれる。

20

【0092】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、許容される担体および／または賦形剤を含む。薬学的に許容される担体には、生理学的に適合性であり、好ましくは、治療剤の活性に干渉せずその他の方法でも阻害しない任意の溶媒、分散媒、またはコーティングが含まれる。いくつかの態様において、担体は、静脈内投与、筋肉内投与、経口投与、腹腔内投与、経皮投与、局所投与、または皮下投与のために適当である。薬学的に許容される担体は、例えば、組成物を安定化するため、または活性薬剤の吸収を増加させるかもしくは減少させるために作用する1種以上の生理学的に許容される化合物を含有することができる。生理学的に許容される化合物には、例えば、グルコース、ショ糖、もしくはデキストランのような炭水化物、アスコルビン酸もしくはグルタチオンのような抗酸化剤、キレート剤、低分子量タンパク質、活性薬剤の排除もしくは加水分解を低下させる組成物、または賦形剤もしくはその他の安定剤および／もしくは緩衝剤が含まれ得る。その他の薬学的に許容される担体およびそれらの製剤は、周知であり、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins, 2005に一般に記載されている。様々な薬学的に許容される賦形剤が、当技術分野において周知であり、例えば、Handbook of Pharmaceutical Excipients (5th ed., Ed. Rowe et al., Pharmaceutical Press, Washington, D.C.) に見出され得る。

30

【0093】

いくつかの態様において、癌（例えば、野生型K-Rasまたは変異型K-Rasが発現されるかまたは過剰発現される癌）を有する対象への投与において使用するためのキットが提供さ

40

50

れる。いくつかの態様において、キットは、白血病抑制因子（LIF）に拮抗する薬剤；および第2の治療剤を含む。

【0094】

いくつかの態様において、LIFに拮抗する薬剤（例えば、抗LIF抗体）は、前記セクションIIIに記載されたようなものである。いくつかの態様において、第2の治療剤は化学療法剤である。いくつかの態様において、化学療法剤は、アルキル化剤、アントラサイクリン、細胞骨格破壊剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、トポイソメラーゼの阻害剤、キナーゼ阻害剤、ヌクレオシド類似体もしくは前駆物質類似体、ペプチド抗生物質、白金に基づく薬剤、または植物アルカロイドである。いくつかの態様において、化学療法剤はヌクレオシド類似体である。いくつかの態様において、化学療法剤はゲムシタビンである。

10

【0095】

いくつかの態様において、キットは、本発明の方法の実施のための指示（即ち、プロトコル）を含有している説明材料（例えば、癌を処置するためにキットを使用するための説明書）をさらに含むことができる。説明材料には、典型的には、文書または印刷物が含まれるが、これらに限定されない。そのような説明を記憶することができ、エンドユーザに伝達することができる任意の媒体が、本発明によって企図される。そのような媒体には、電子的な記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD ROM）等が含まれるが、これらに限定されない。そのような媒体には、そのような説明材料を提供するインターネットサイトのアドレスが含まれ得る。

20

【実施例】

【0096】

V. 実施例

以下の実施例は、特許請求の範囲に記載された本発明を例示するために提示されるのであって、限定するために提示されるのではない。

【0097】

実施例1：発癌性K-Rasを発現する臍臓細胞を根絶するための白血病抑制因子（LIF）のターゲティング

K-Rasの活性化変異は、90%を超える臍臓癌に存在するが、発癌性K-Rasを標的とする効果的なアプローチは開発するのが困難であった。従って、K-Rasによって媒介される悪性疾患のための必須因子の同定は、この「治療薬の開発が不可能な（undruggable）」癌遺伝子を阻止するための代替的な方式を提供し得る。高度の配列相同意ならびに上流エフェクターおよび下流エフェクターの共通のセットのため、Rasの3つのアイソフォーム、N-Ras、H-Ras、およびK-Rasは、機能的に重複していると長い間推定されてきた。しかしながら、マウスにおけるK-Ras欠損は、胚致死をもたらすが、N-RasまたはH-Rasはそうでないため、K-Rasが幹細胞の機能のために必要とされることが示唆される（Koera et al., Oncogene 15:1151-1159(1997)）。正常な幹細胞と類似したある種の遺伝子発現サインおよび生物学的機能を共有する癌幹細胞（CSC）は、臍臓腺癌（PADC）を含む、多数のヒト悪性疾患において同定されている（Sampieri and Fodde, Semin Cancer Biol 22:187-193(2012)）。それらの自己再生、腫瘍開始、化学療法抵抗性、および転移特性のため、CSCは処置の失敗の基礎となると仮定されている。臍臓の発癌におけるK-Ras活性化の推測される役割にも関わらず、臍臓CSCにおける発癌性K-Rasの役割は、決定的には証明されていない。予備研究において、本発明者らは、発癌性K-Rasが、H-Rasと異なり、形質転換されたマウス織維芽細胞および臍臓癌細胞においてCSC様特性を引き起こすことを見出した（示されないデータ）。

30

【0098】

シグナル伝達性転写因子3（STAT3）は、幹細胞の自己再生、癌細胞の生存および転移の重大な制御因子である。PDACの大部分が、STAT3の構成性の活性化を示す。Pdx1-Cre;LSL-KRAS^{G12D}トランスジェニックマウスマodelにおいて、STAT3の損失は、臍臓腫瘍の形成および進行を低下させ、このことから、発癌性K-Rasによって誘導された臍臓癌における治療標的としての可能性が示唆された（Corcoran et al., Cancer Res 71:5020-5029(2011)）。

40

50

)。しかしながら、現在までに報告されたSTAT3阻害剤の大部分は、限定された臨床的効力を提示している。従って、可能性のある抗膵臓癌治療として、STAT3を阻害するための代替アプローチが必要とされている。

【0099】

Ras^{V12}によって形質転換されたNIH3T3細胞における全ゲノム発現分析を通して、本発明者らは、幹細胞制御性ケモカインでありSTAT3活性化因子である白血病抑制因子(LIF)が、K-Rasによっては著しく無制御の因子であるが、H-Rasによってはそうでないことを同定した(図1A)。さらに、発癌性K-Rasによって誘導されたマウスPDACは、発癌性B-Rafによって誘導されたものと比較して、増強されたLIF発現を示した(図1C)。さらなる研究は、膵臓癌細胞におけるスフィア形成能および薬物抵抗性を含む、K-Rasによって媒介される幹細胞性において、LIFが必要とされることを証明した(図1F~1G)。同質遺伝子動物モデルにおいて、LIFがノックダウンされた、K-Rasによって駆動されるmPDACの同所移植を有するマウスは、より大きい生存可能性および損なわれた膵臓転移を示した(図1H)。

【0100】

これらの予備データに基づき、本発明者らは、活性化されたK-Rasを有する膵臓癌細胞の幹細胞性においてLIFが必須の役割を果たすとの仮説を立てた。従って、LIFは、K-Rasによって駆動される膵臓癌を根絶するための新規の治療標的となる。この仮説を試験するため、本発明者らは、変異体K-Rasによって駆動されたマウス膵臓癌細胞(FVBバックグラウンド; LSC-K-Ras^{G12D}; p53^{F/+}、pDX^{CRE})において、小さいヘアピンRNAを介してLIFをノックダウンすることによって、K-Rasによって駆動される膵臓癌の治療標的としてLIFをバリデートした。定量的PCRおよびウエスタンプロットティング分析によって、ノックダウン効率を確認した。shRNAによるK-Rasのノックダウンは、複数のヒト膵臓癌株においてLIFタンパク質発現を抑制した(図2A~2E)。さらに、LIF ELISAは、K-Ras発現のノックダウンを有するヒト膵臓癌細胞株が、対照細胞と比較して、有意に減少したLIFを培養培地中に分泌することを明らかにした(図2F)。

【0101】

ウエスタンプロットによって、そしてSTAT3応答ルシフェラーゼアッセイを使用して、STAT3のレベルおよびリン酸化を調査した。ウエスタンプロット分析およびホスホSTATルシフェラーゼレポーターアッセイは、K-Ras発現のノックダウンおよび結果的なLIFの発現のダウンリギュレーションを有する膵臓癌細胞が、減少したホスホSTAT3レベル(図2G)および有意に減少したSTAT3転写活性(図2H)を有することを示した。

【0102】

LIF-LIFRシグナリングが可能性のある臨床的な治療標的として働くことのさらなるバリデーションのため、小さいヘアピンRNAを介しても、活性K-Ras変異を有するヒト膵臓癌細胞株においてLIFをノックダウンした(図3A)。図3Bに示されるように、皮下異種移植モデルにおけるPANC2.03の無腫瘍生存曲線は、LIF発現のノックダウンを有する癌細胞が、対照細胞と比較した時、劇的に低下した腫瘍開始能を保有することを示唆した。さらに、LIF発現のノックダウンを有する皮下異種移植片における膵臓腫瘍は、対照腫瘍と比較した時、有意に遅い速度で成長した(図3C)。さらに、同所モデルにおいて、LIF発現のノックダウンは、PANC1によって駆動される腫瘍における腫瘍開始速度を低下させた(図3D)。

【0103】

ゲムシタビンに対する応答を膵臓癌細胞において分析した。図4に示されるように、MTSアッセイは、LIFのノックダウンが、対照細胞と比較した時、ゲムシタビン処置に対してPANC2.03細胞を感作することを示唆した。LIF中和抗体の効果もマウスモデルにおいて試験した。図5Bに示されるように、抗LIF抗体は、腫瘍接種前のヌードマウスへ注射された時、腫瘍開始を劇的に防止した。薬物感作アッセイにおいて、PANC2.03細胞を、腫瘍が形成されるよう、ヌードマウスへ皮下注射し、次いで、マウスを、抗LIF抗体、ゲムシタビン、または抗LIF抗体とゲムシタビンとの組み合わせによって処置した。ゲムシタビンと抗LIF抗体との組み合わせ処置は、10個の腫瘍のうちの8個において完全な退縮を引き起こし

10

20

30

40

50

たが、抗LIF抗体単独またはゲムシタビン単独は、腫瘍退縮をもたらさなかった（図5C）。さらに、ゲムシタビンと抗LIF抗体との組み合わせ処置は、腫瘍増殖速度を劇的に低下させたが、ゲムシタビン単独によって処置された腫瘍は、未だ正の成長速度を有していた（図5E～5F）。

【0104】

本発明者らは、（図6A～Iに示されるような）異なる発表されたデータセットを分析するため、オンラインソフトウェアOncomine（商標）（Invitrogen）を使用した。Oncomine（商標）は、大きい発表された全ゲノムマイクロアレイデータを収集するオンラインデータベースである。収集されたデータは、他の研究グループによって調査され発表される。興味深いことに、本発明者らは、複数のマイクロアレイプラットフォームおよび発表されたデータベースにおいて、結腸癌および膵臓癌を含む異なる型の癌においてヒトLIFが過剰発現されていることを見出した。さらに、図6Iに示されるように、変異体K-Rasを有する樹立癌細胞株において、野生型K-Ras発現を有するものと比較した時、mRNAにおけるLIF発現が有意に増強されていた。これらの結果は、異なる型のヒト癌、特に、K-Rasによって駆動される腫瘍における癌遺伝子としてのLIFの可能性のある役割を示唆する。

10

【0105】

本発明者らは、化学療法感受性癌および化学療法抵抗性癌におけるmRNAにおけるLIF発現を分析するためにも、Oncomine（商標）を使用した。Oncomine（商標）は、化学療法感受性腫瘍標本および化学療法抵抗性腫瘍標本の遺伝子プロファイルを含むいくつかのデータセットを提供する。興味深いことに、図7A～Dに示されるように、LIF発現は、異なる化学療法処置に対して抵抗性である腫瘍において、化学療法感受性腫瘍と比較した時、はるかに高く、このことから、LIFが化学療法に対するヒト癌の抵抗性において重要な役割を果たすことが示唆された。従って、中和抗体によるLIFのターゲティングは、従来の化学療法処置に対して腫瘍細胞を再感作することができる。

20

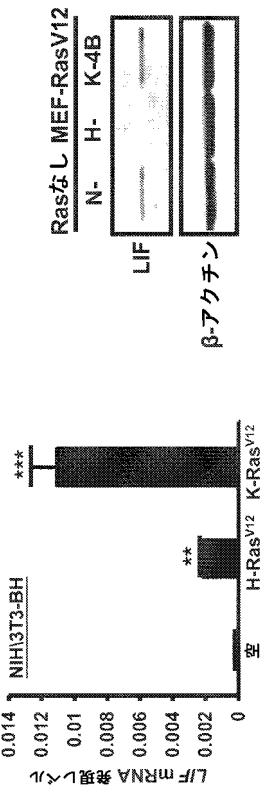
【0106】

以上、本発明を、理解の明確性のため、図および例によってある程度詳細に説明したが、当業者は、添付の特許請求の範囲の範囲内で、ある種の変化および修飾を実施し得ることを認識するであろう。さらに、各参照が参照によって個々に組み入れられるのと同一の程度に、本明細書中に提供された各参照は、参照によってその全体が組み入れられる。

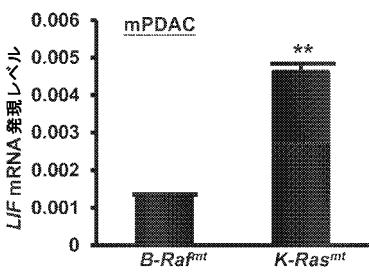
【図 1 A】

プローブID	遺伝子記号	遺伝子説明	logFC	発現平均値	P値	補正P値	KRas平均値	対照平均値	
10373918	Lif	白血病抑制因子	-2.2975	7.45033	3.43E-08	5.45E-05	6.88805	9.18554	6.27739

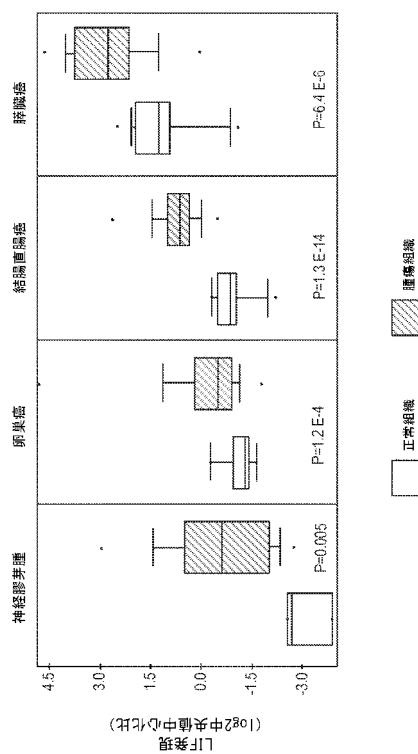
【図 1 B】

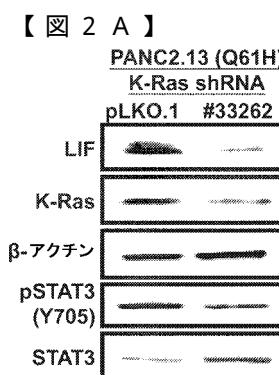
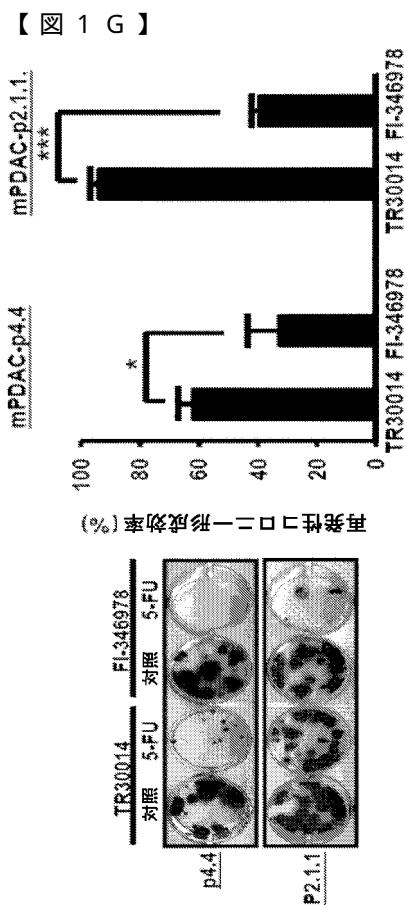
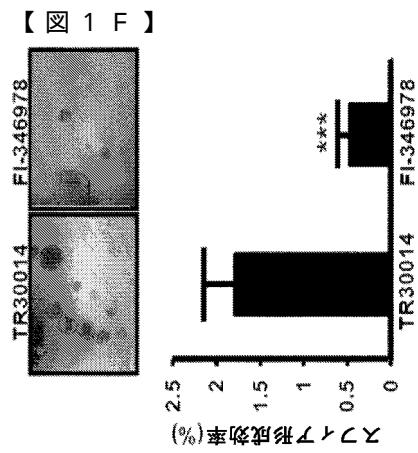
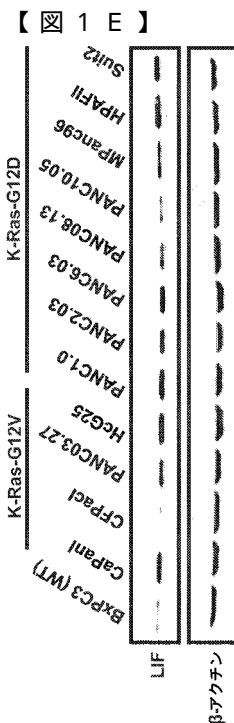


【図 1 C】

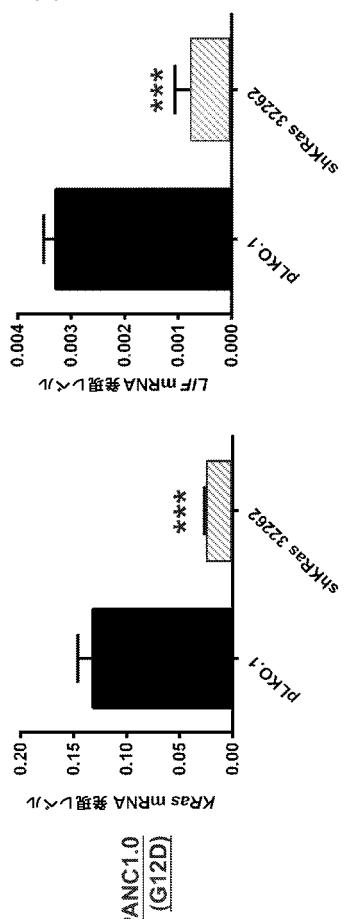


【図 1 D】

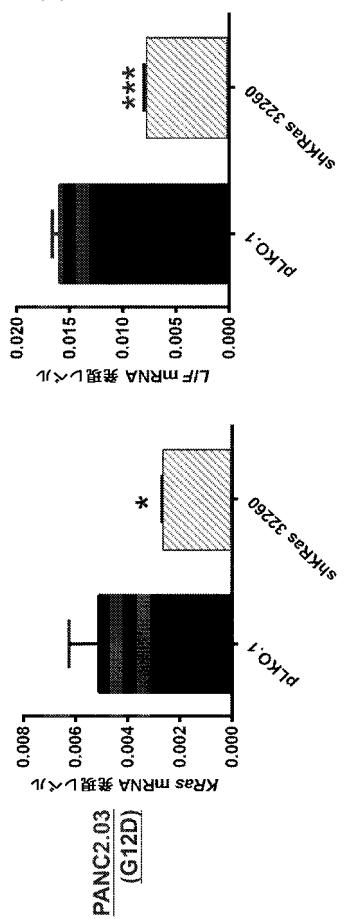




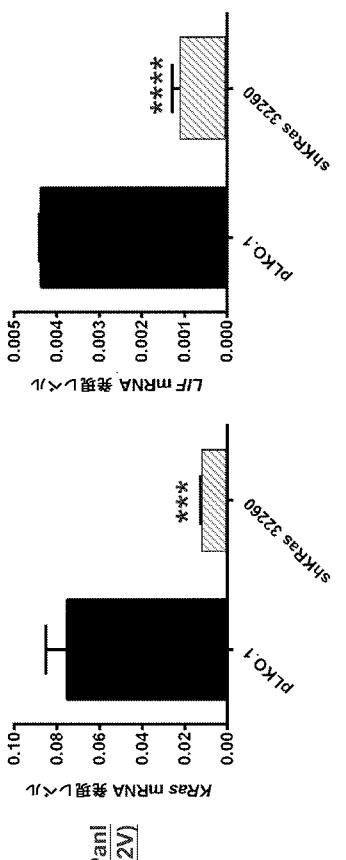
【図2B】



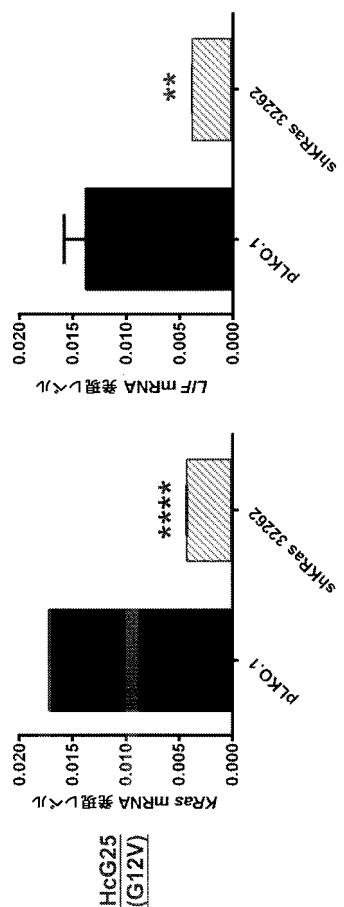
【図2C】



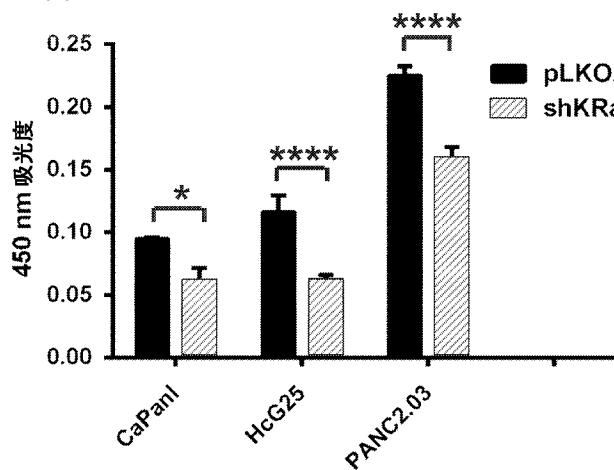
【図2D】



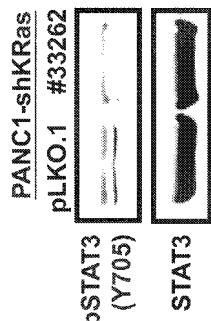
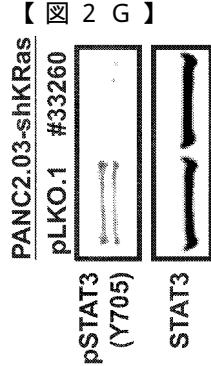
【図2E】



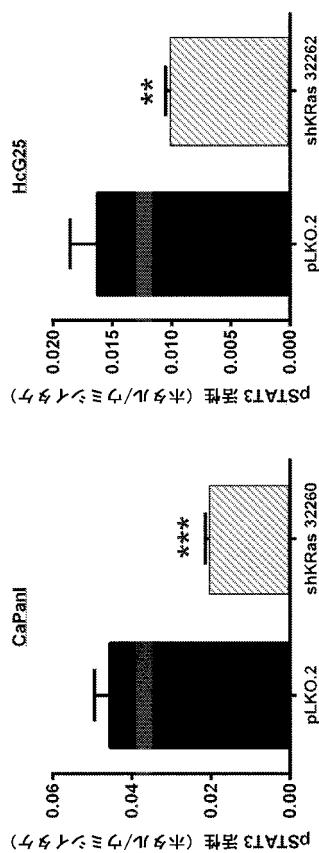
【図 2 F】



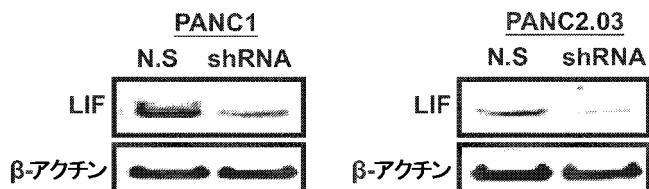
【図 2 G】



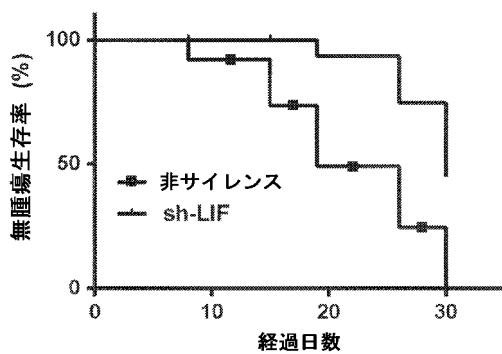
【図 2 H】



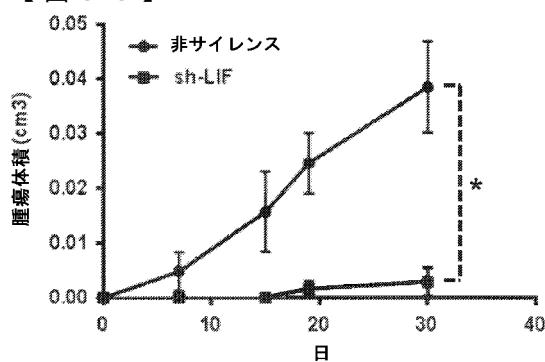
【図 3 A】



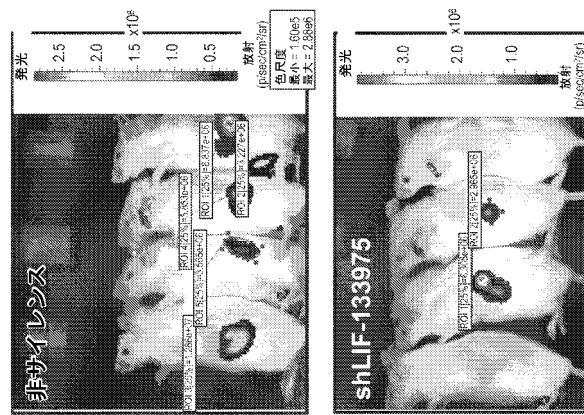
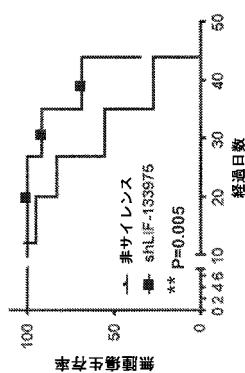
【図 3 B】



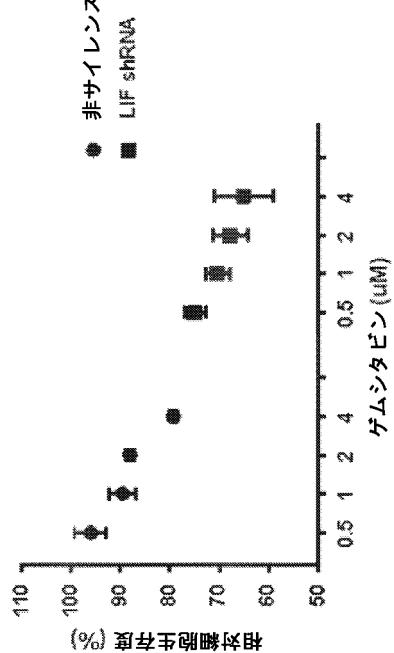
【図 3 C】



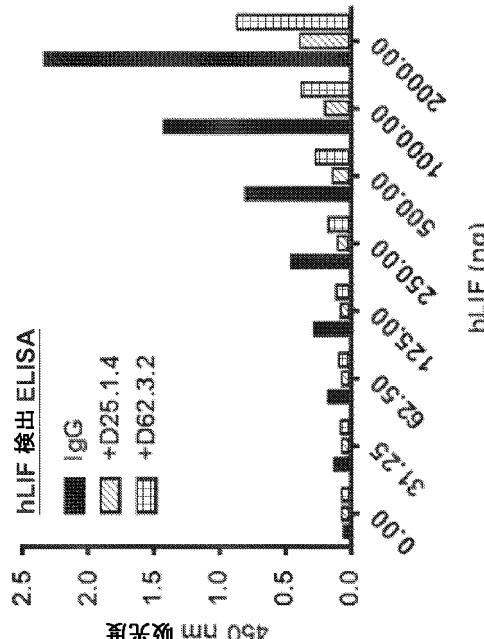
【図 3 D】

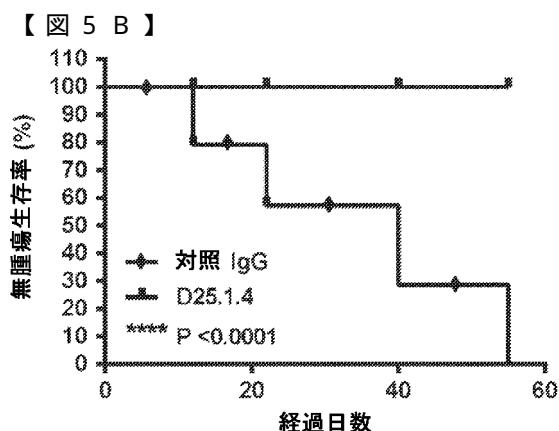


【図 4】



【図 5 A】





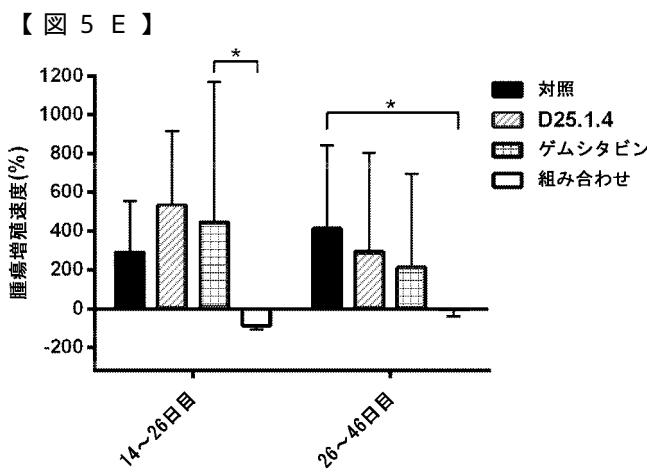
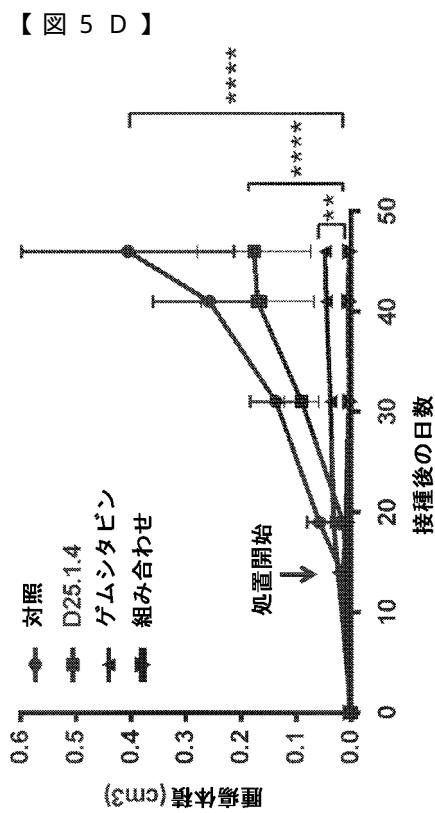
PANC2.03腫瘍の発達を有する
レシピエント(55日目)

5×10⁴ 細胞

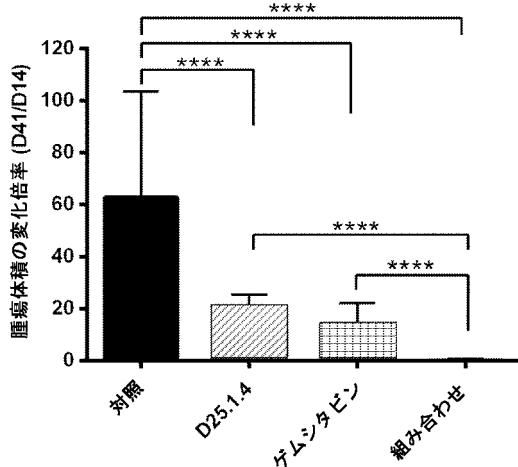
対照 IgG	6/6
D25.1.4	0/4
P 値	<0.0001

【図 5 C】

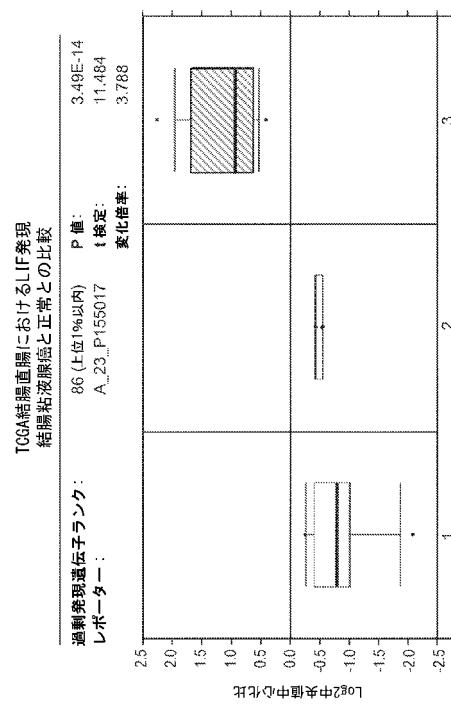
PANC2.03腫瘍の発達を有する レシピエント(14日目)		PANC2.03腫瘍の発達を有する レシピエント(14日目)	
処置前		32日の処置	
対照 IgG	9/9	対照 IgG	9/9
D25.1.4	6/7	D25.1.4	7/7
ゲムシタビン	10/10	ゲムシタビン	10/10
組み合わせ	10/10	組み合わせ	2/10



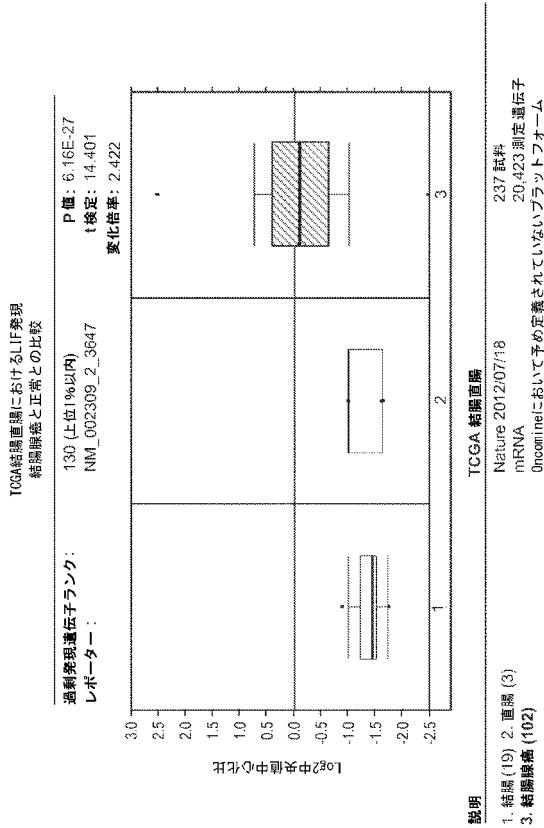
【図 5 F】



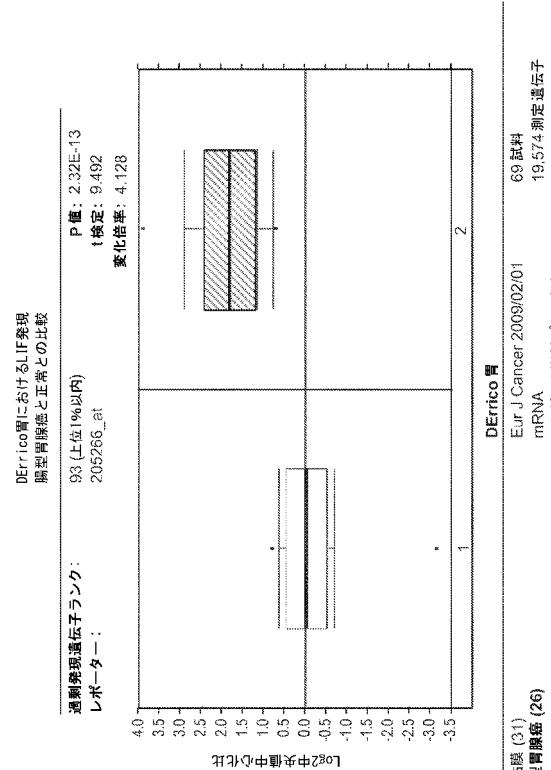
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】

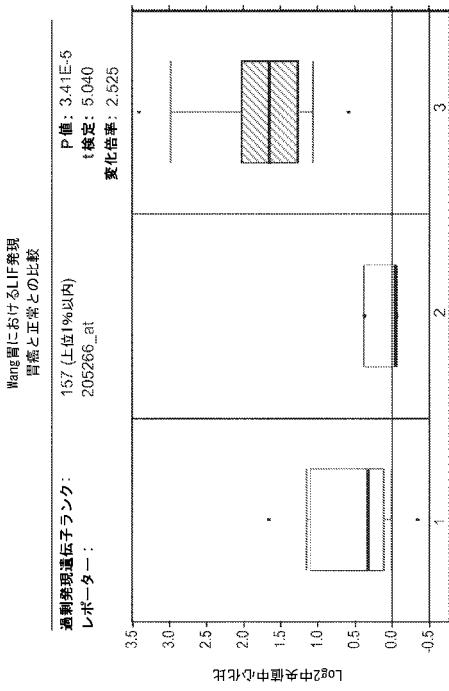


TCGA 組織直腸におけるLIF表現子ランクと正常との比較
説明
1. 結腸 (19) 2. 直腸 (3)
3. 組織標本 (102)

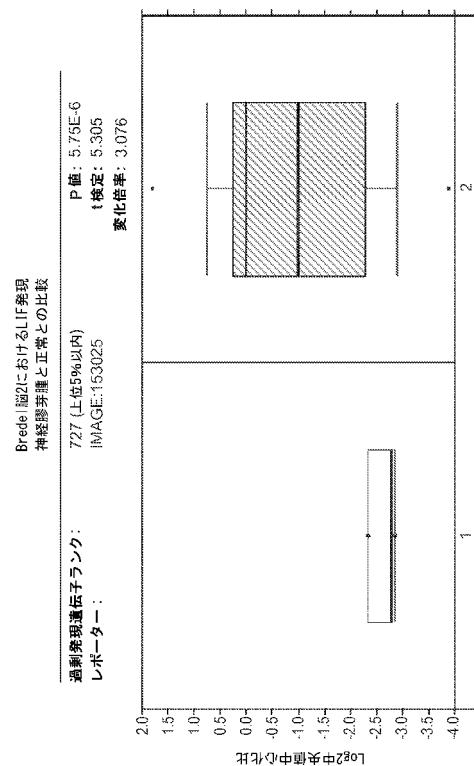
TCGA 組織直腸におけるLIF表現子ランクと正常との比較
説明
1. 結腸 (19) 2. 直腸 (3)
3. 組織標本 (102)

TCGA 組織直腸におけるLIF表現子ランクと正常との比較
説明
1. 結腸 (19) 2. 直腸 (3)
3. 組織標本 (102)

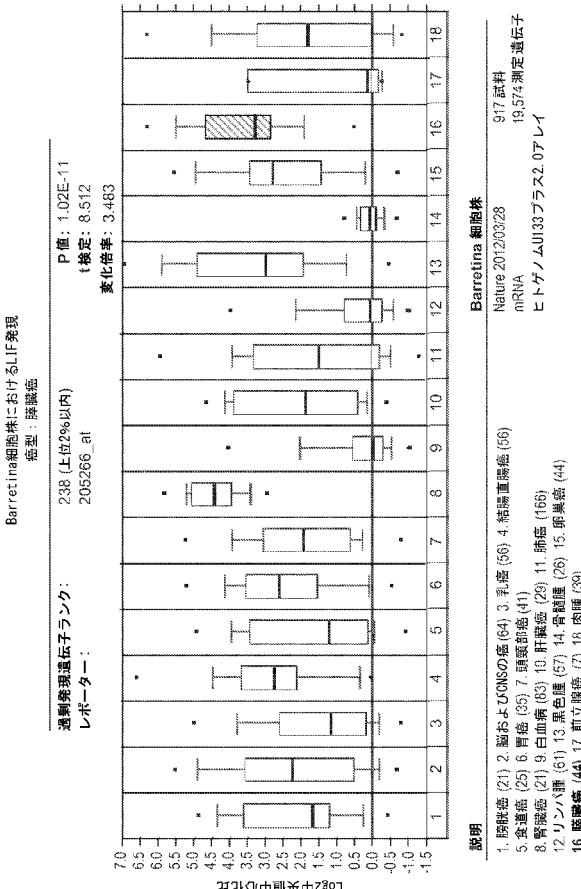
【図 6 D】



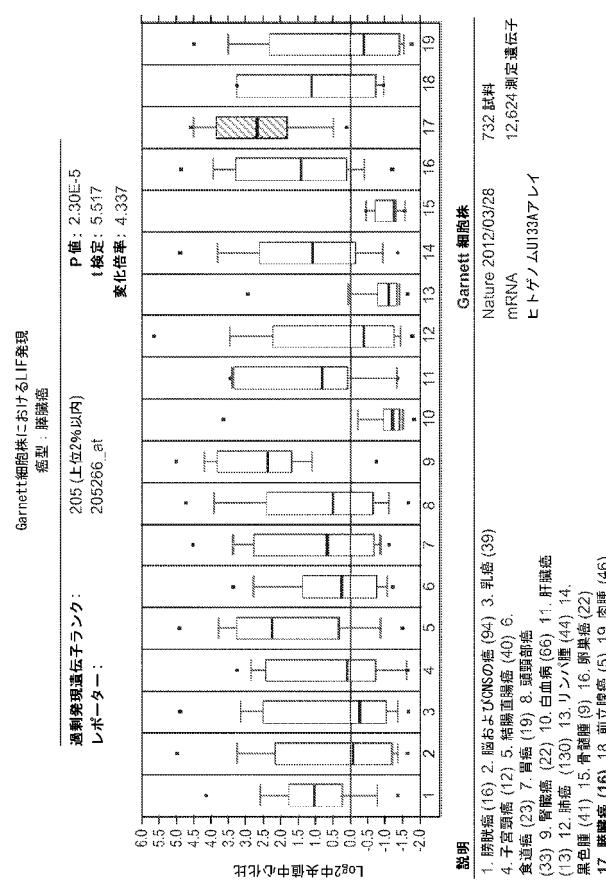
【図 6 E】



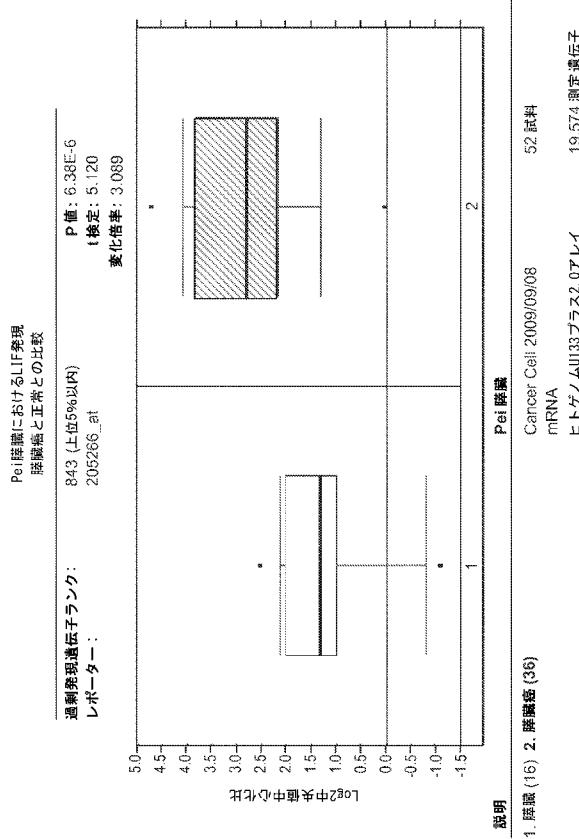
【図 6 F】



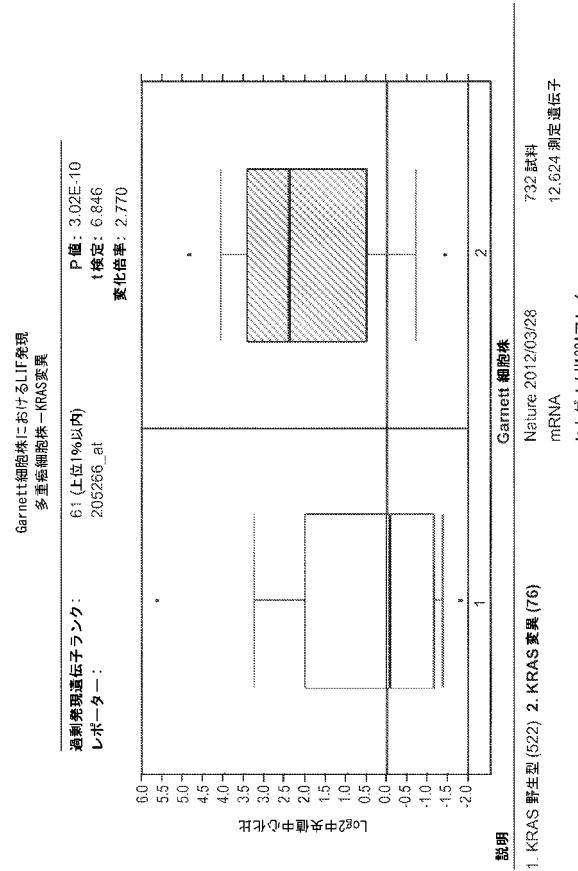
【図 6 G】



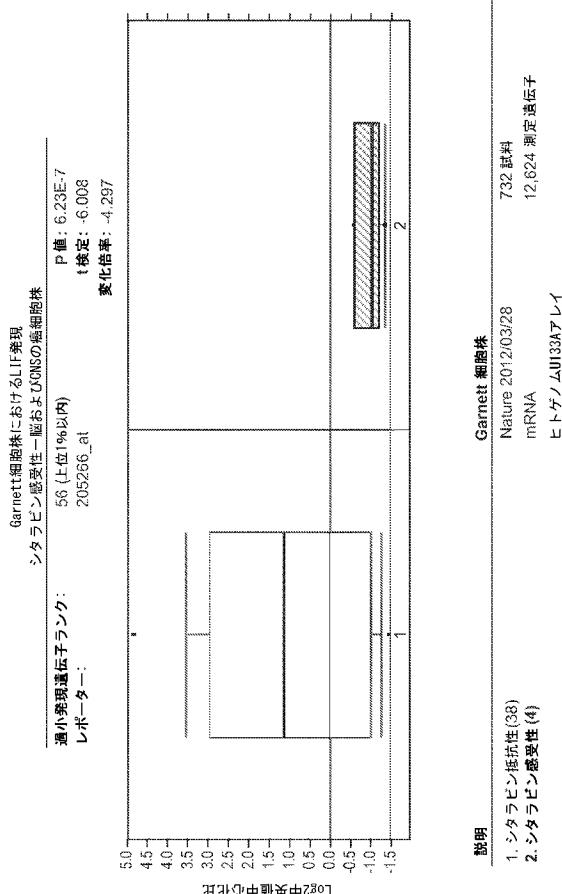
【図 6 H】



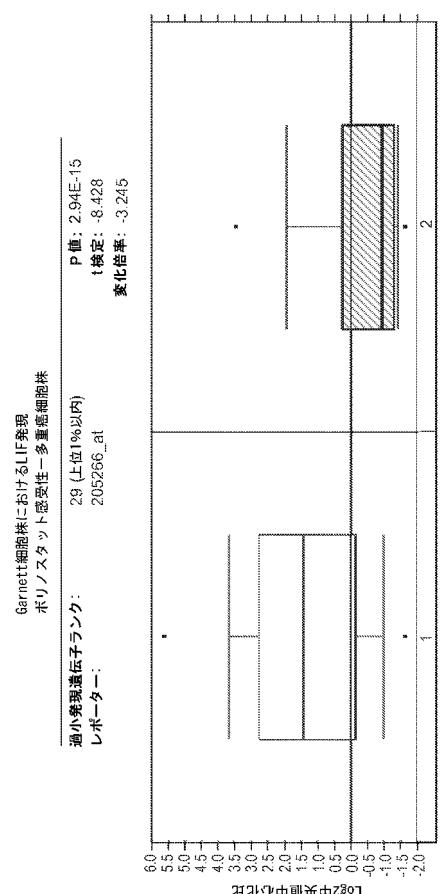
【図 6 I】



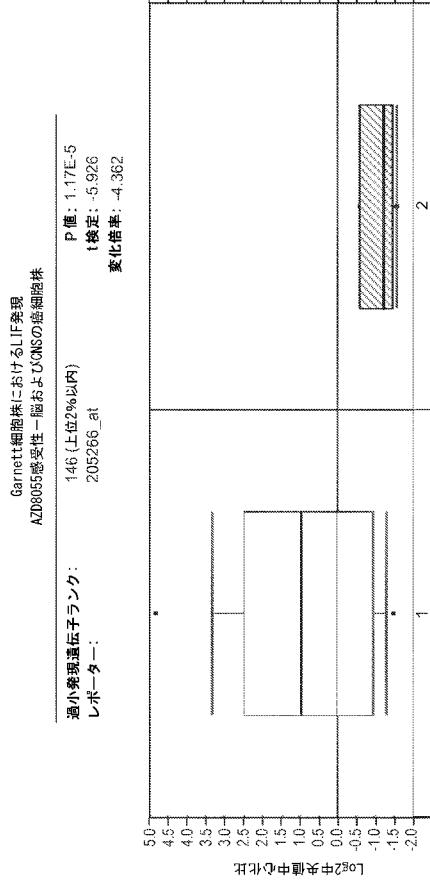
【図 7 A】



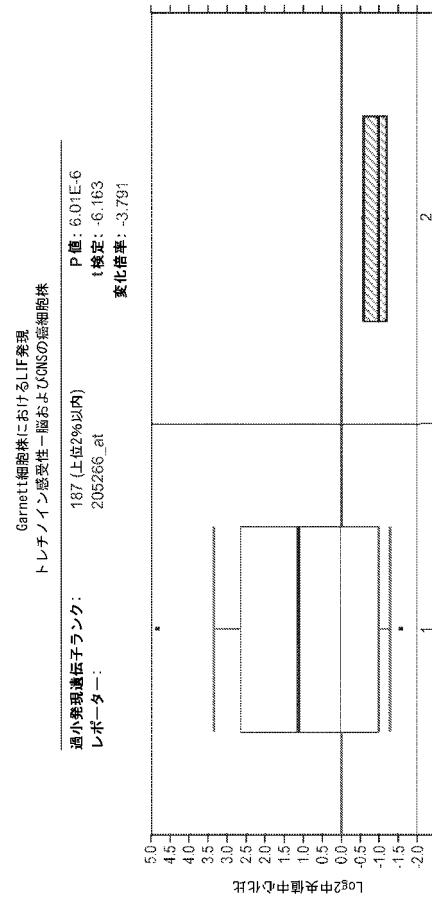
【図 7 B】



【図 7 C】



【図 7 D】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2015/049461																				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																						
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 39/395, 45/06, A61P 35/00																						
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																						
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch, EMBL, NCBI, PAJ, Espacenet, DWPI, PCT Online, USPTO DP, CIPO (Canada PO), SIPO DB																						
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																						
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
X Y	Leukemia inhibitory factor may be a promising target against pancreatic cancer, Home Cancer, 19.06.2012, pp.1-6, [retrieved on 13.11.2015]. Retrieved from the Internet: <URL: http://medicalxpress.com/news/2012-06-leukemia-inhibitory-factor-pancreatic-cancer.html	1-3, 13, 15 14, 16-17, 23-26																				
Y	EP 2371860 A1 (FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT D'INVESTIGACIÓ ONCOLÒGICA DE VALL D'HEBRON et al.) 05.10.2011, paragraphs [0029]-[0030], [0044],[0063], claims	16-17, 23-26																				
Y	WO 2013/114367 A9 (COMPUTEN LTD.) 08.08.2013, claims	14, 23-26																				
A	SIZHI PAUL GAO et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas, J. Clin. Invest., 2007, Vol. 117, no.12, pp. 3846- 3856	1-3, 13-17, 23-26																				
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E"</td> <td>earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family	"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																			
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																			
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																			
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family																			
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																					
Date of the actual completion of the international search 13 November 2015 (13.11.2015)	Date of mailing of the international search report 10 December 2015 (10.12.2015)																					
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37	Authorized officer I. Goretova Telephone No. 495 531 65 15																					

<p style="text-align: center;">INTERNATIONAL SEARCH REPORT</p>	International application No. PCT/US 2015/049461						
<p>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</p> <p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 4-12, 18-22 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 							
<p>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</p> <p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees. 3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 							
<p>Remark on Protest</p> <table style="margin-left: 20px;"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.						
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.						
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.						

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/675 (2006.01)	A 6 1 K 31/675	4 C 0 7 2
A 6 1 K 31/196 (2006.01)	A 6 1 K 31/196	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/255 (2006.01)	A 6 1 K 31/255	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/4188 (2006.01)	A 6 1 K 31/4188	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 31/473 (2006.01)	A 6 1 K 31/473	
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 K 31/437	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/475 (2006.01)	A 6 1 K 31/475	
C 0 7 H 19/073 (2006.01)	C 0 7 H 19/073	
C 0 7 D 487/04 (2006.01)	C 0 7 D 487/04	1 4 4
C 0 7 H 15/252 (2006.01)	C 0 7 H 15/252	
C 0 7 D 305/14 (2006.01)	C 0 7 D 305/14	
C 0 7 D 491/22 (2006.01)	C 0 7 D 491/22	
C 0 7 D 219/12 (2006.01)	C 0 7 D 219/12	
C 0 7 D 239/94 (2006.01)	C 0 7 D 239/94	
C 0 7 D 401/04 (2006.01)	C 0 7 D 401/04	
C 0 7 D 471/04 (2006.01)	C 0 7 D 471/04	1 0 4 Z
C 0 7 D 475/08 (2006.01)	C 0 7 D 475/08	
C 0 7 D 519/04 (2006.01)	C 0 7 D 519/04	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

- (74) 代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74) 代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74) 代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74) 代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74) 代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74) 代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74) 代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マコーミック フランク

アメリカ合衆国 94103 カリフォルニア州 サンフランシスコ バーニス ストリート 5

(72)発明者 ワン マン - ズー

アメリカ合衆国 94158 カリフォルニア州 サンフランシスコ ジーン フレンド ウェイ
550 アパートメント 614

F ターム(参考) 4C048 TT08 UU01 XX01

4C050 AA01 AA07 BB04 BB05 CC07 DD02 EE02 EE05 FF02 FF03

GG03 HH01

4C057 BB02 BB05 CC02 CC04 DD01 JJ50 LL17 LL19

4C063 AA01 BB01 CC29 DD12 EE01

4C065 AA04 BB04 CC01 DD02 EE02 HH03 JJ01 KK04 LL01 PP03

4C072 QQ00 UU01

4C084 AA17 MA02 MA52 MA55 MA66 NA05 NA14 ZB26 ZC75

4C085 AA14 EE01 EE03 GG02 GG06 GG08

4C086 AA01 AA02 BA02 BC46 BC50 CB05 CB09 CB21 CB22 DA25

DA35 EA10 EA17 GA07 GA08 GA12 MA02 MA04 MA07 MA52

MA55 MA66 NA05 ZB26 ZC75

4C206 AA01 AA02 FA31 JA06 MA02 MA04 MA11 MA72 MA75 MA86

NA05 ZB26 ZC75