

(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2007-530588
(P2007-530588A)**

(43) 公表日 平成19年11月1日(2007.11.1)

| (51) Int.C1. | F 1 | テーマコード (参考) |
|------------------------------|------------------------------|--|
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | Z N A 4 B024 |
| A61K 45/00 (2006.01) | A61K 45/00 | 4 C084 |
| A61K 39/395 (2006.01) | A61K 39/395 | D 4 C085 |
| A61K 38/21 (2006.01) | A61K 38/21 | Y 4 H045 |
| A61P 35/00 (2006.01) | A61P 35/00 | G |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | | (全 53 頁) 最終頁に続く |
| (21) 出願番号 | 特願2007-505213 (P2007-505213) | (71) 出願人 592221528 バイオジエン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、マサチューセッツ O2 142、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター 14 |
| (86) (22) 出願日 | 平成17年3月23日 (2005.3.23) | (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成18年11月20日 (2006.11.20) | (74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2005/009967 | (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹 |
| (87) 國際公開番号 | W02005/092927 | |
| (87) 國際公開日 | 平成17年10月6日 (2005.10.6) | |
| (31) 優先権主張番号 | 60/555,805 | |
| (32) 優先日 | 平成16年3月23日 (2004.3.23) | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | |

(54) 【発明の名称】 レセプターカップリング剤およびその治療用途

(57) 【要約】

本明細書において、癌を処置し、被験体中の腫瘍容積を阻害するために、抗TNFレセプター結合部分を含む多価構築物等のレセプターカップリング剤が開示される。本発明は、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はレセプターシグナル伝達を高める。別の実施形態において、レセプターカップリング剤はヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 2 つの別個の TNF ファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する、レセプターカップリング剤。

【請求項 2】

第 1 レセプターに対する第 1 結合特異性と第 2 レセプターに対する第 2 結合特異性を含む、請求項 1 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 3】

前記第 1 結合特異性が、抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項 10
2 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 4】

前記第 2 結合特異性が、抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項 3 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 5】

前記第 1 結合特異性が、単鎖 Fv フラグメントにより付与される、請求項 3 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 6】

前記第 2 結合特異性が、抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項 20
5 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 7】

前記第 1 結合特異性が、前記レセプターの天然リガンドにより付与される、請求項 2 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 8】

前記第 2 結合特異性が、抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項 7 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 9】

前記第 2 結合特異性が、前記レセプターの天然リガンドにより付与される、請求項 7 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 10】

少なくとも 1 つのレセプターがデンドメインを包含する、請求項 1 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 11】

前記レセプターが、TNFR1 (DR1)、Fas (DR2)、TRAIL-R1 (DR4)、TRAIL-R2 (DR5)、p75NGF-R および DR6 からなる群から選択される、請求項 10 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 12】

少なくとも 1 つのレセプターが組織分化に関与する、請求項 1 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 13】

少なくとも前記レセプターが、LTBR、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn14、Troy / Trade、TAJ および p75NGF-R からなる群から選択される、請求項 12 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 14】

少なくとも 1 つのレセプターが免疫調節に関与する、請求項 1 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 15】

前記レセプターが、TNFR1I、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1B
B、OX40、GITR、TACI、BAFF-R、BCMA および RELT からなる群
から選択される、請求項 14 に記載のレセプターカップリング剤。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

少なくとも1つの前記レセプターが、腫瘍細胞上で過剰発現される、請求項1に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 17】

少なくとも1つの前記レセプターが、正常な肝臓または内皮細胞上で過剰発現されない、請求項16に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 18】

前記第1結合特異性が、抗LTレセプター(LTR)抗体、またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項2に記載のレセプターカップリング剤。 10

【請求項 19】

前記抗LTR抗体が、ヒト化CB E 1 1抗体に由来する、請求項18に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 20】

前記第2結合特異性が、抗TRA IL-R2抗体、またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項18に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 21】

前記抗TRA IL-R2抗体がヒト化14A2抗体に由来する、請求項20に記載のレセプターカップリング剤。 20

【請求項 22】

前記第1結合特異性が、ヒト化CB E 1 1抗体の単鎖Fvフラグメントにより付与され、前記第2結合特異性がヒト化14A2抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与される、請求項19に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 23】

前記第1結合特異性が、少なくとも2つの三量体リガンド-Fc構築物により付与され、かつ第2の結合特異性が、3つの抗体により付与される、請求項2に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 24】

少なくとも1つの前記TNFファミリーレセプターが、細胞表面上のラフト環境で通常見られない、請求項1に記載のレセプターカップリング剤。 30

【請求項 25】

少なくとも1つの前記TNFファミリーレセプターが、細胞表面上のラフト環境で通常見られる、請求項1に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 26】

前記シグナル強度がレセプターにより高められる、請求項1に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 27】

少なくとも第1抗体と第2抗体またはその抗原結合フラグメントを含み、各抗体が別個のTNFファミリーレセプターに結合し、それによってヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する、レセプターカップリング剤。 40

【請求項 28】

前記第1抗体が抗LTR抗体に由来する、請求項27に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 29】

前記抗LTR抗体がヒト化CB E 1 1抗体に由来する、請求項28に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 30】

前記第2抗体が抗TRA IL-R2抗体に由来する、請求項28に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 31】

前記抗TRA IL-R2抗体がヒト化14A2抗体に由来する、請求項30に記載のレセ 50

プターカップリング剤。

【請求項 3 2】

細胞膜ラフトに対して TNF ファミリーレセプターを局在化する方法であって、該方法は、ラフト化 TNF ファミリーレセプターに対する第 1 結合特異性とラフト化されていない TNF ファミリーレセプターに対する第 2 結合特異性とを含むレセプターカップリング剤を投与する工程を包含し、ここで、該レセプターカップリング剤の結合が、該細胞膜内のラフトに対して該ラフト化されていない TNF レセプターを局所化する、方法。

【請求項 3 3】

レセプターシグナル伝達を高めるための方法であって、該方法は、少なくとも 2 つの別個の TNF ファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3 4】

腫瘍容積を減少するための方法であって、該方法は、少なくとも 2 つの別個の TNF ファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3 5】

癌の処置方法であって、該方法は、少なくとも 2 つの別個の TNF ファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を被験体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 3 6】

前記レセプターカップリング剤が IFN の存在下で投与される、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記レセプターカップリング剤が化学療法剤の存在下で投与される、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

少なくとも 2 つの別個の TNF ファミリーレセプターを特異的に活性化し、かつ第 1 TNF レセプターに向けられた第 1 結合特異性と第 2 TNF レセプターに向けられた第 2 結合特異性とを含むヘテロメリック複合体の形成を誘導する、レセプターカップリング剤。

【請求項 3 9】

前記第 1 および第 2 の結合特異性が、以下：

- a) 非デスドメイン含有 TNF レセプターおよびデスドメイン含有 TNF レセプター；
- b) 非デスドメインを含有する 2 つの TNF レセプター；ならびに
- c) デスドメインを含有する 2 つの TNF レセプター

からなる群から選択される TNF レセプターに向けられる、請求項 3 8 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 4 0】

少なくとも 1 つの結合特異性が、組織分化に関連した非デスドメイン含有 TNF レセプターに向けられる、請求項 3 9 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 4 1】

デスドメインを含有する 2 つの TNF レセプターが、LTBR / Fn14、LTBR / RANK、Fn14 / TAJ、LTBR / EDAR、LTBR / XEDAR、RANK / EDAR、RANK / XEDAR、TAJ / EDAR および TAJ / XEDAR からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載のレセプターカップリング剤。

【請求項 4 2】

前記非デスドメインを含有する TNF レセプターおよび前記デスドメインを含む TNF レセプターが、LTBR / TRAIL - R1、LTBR / TRAIL - R2、LTBR / p

10

20

30

40

50

75NGF-R、Fn14/p75NGF-Rおよびp75NGF-R/TAJからなる群から選択される、請求項39に記載のレセプターカップリング剤。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

(発明の背景)

TNFファミリーの多様なメンバーによる細胞死を誘導する能力は腫瘍学者によってほぼ20年間にわたって追求されてきた。最初は、TNF自体を用いて固形腫瘍を処置するために使用されてきたが、最終的には全腕灌流によりメラノーマの局所処置に適用可能であることがわかった(非特許文献1)。ごく最近、リガンドまたは抗レセプター抗体によるTNFレセプターの活性化が臨床的な興味を集めた。例えば、Fasレセプターの活性化はかなりの有望性を示したが、肝臓毒性により制限され得る。TRAILリガンドによる別のTNFファミリーメンバーのTRAILR1またはTRAILR2の活性化はTRAIL感受性の癌細胞に対するアポトーシスシグナルを変換させることが報告されている(非特許文献2;および非特許文献3)。可溶性リガンドまたは作動性抗レセプターモノクローナル抗体によるTNFファミリーのさらに別のメンバーであるLT-Rの活性化はある癌腫の死を誘導することも示された(非特許文献4, 非特許文献5)。よって、作動薬TNF活性化剤による処置は被験体中の新生組織形成の発展、重症度および影響を処置または低減させるために有用であろう。

【非特許文献1】Lejeuneら、Curr Opin Immunol (1998年) 10: 573

【非特許文献2】Griffithら、J. Immunol. (1999年) 162: 2597

【非特許文献3】Degli Espostiら、Immunity (1997年) 7: 813-820

【非特許文献4】Lawrenceら、Nat Med (2001年) 7: 383

【非特許文献5】Ichikawaら、Nat Med (2001年) 7: 954

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0002】

(発明の要旨)

本発明は、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はレセプターシグナル伝達を高める。別の実施形態において、レセプターカップリング剤はヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は1つのレセプターに対する第1結合特異性と別のレセプターに対する第2結合特異性を含む。1つの実施形態において、第1結合特異性は、抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与されるか、もたらされる。別の実施形態において、第2結合特異性は、抗体またはその抗原結合フラグメントにより付与されるか、もたらされる。例えば、結合特異性は単一鎖Fvフラグメントにより付与され得る。別の実施形態において、第1結合特異性はレセプターの天然リガンドによりもたらされ、第2結合特異性は抗体またはその抗原結合フラグメントに由来する。さらに別の実施形態において、第1結合特異性はレセプターの天然リガンドによって付与され、第2結合特異性はレセプターの天然リガンドにより付与される。

【0003】

本発明は、少なくとも1つのレセプターがデスマイン(death domain)を含む、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はレセプターシグナル伝達を高めるか、またはヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導し、少なくとも1つのレセプターがデスマインを含む。1つの実施形態において、

10

20

30

40

50

デスドメインを含むレセプターは、TNFR1(DR1)、Fas(DR2)、TRAIL-R1(DR4)、TRAIL-R2(DR5)、DR6およびp75NGF-Rからなる群から選択される。

【0004】

本発明は、少なくとも1つのレセプターがデスドメインを含まない、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを活性化するレセプターカップリング剤を含む。また、本発明はレセプターシグナル伝達を高めるか、またはヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する、少なくとも1つのレセプターがデスドメインを含まないレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターはデスドメインを含まず、組織分化に関与する。別の実施形態において、デスドメインを含まないレセプターは、LTBR、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn14、Troy/TradeおよびTAJからなる群から選択される。10

【0005】

また、本発明は、少なくとも1つのレセプターが組織分化に関与する、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。また、本発明はレセプターシグナル伝達を高めるか、またはヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する少なくとも1つのレセプターが組織分化に関与するヘレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターはLTBR、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn14、Troy/Trade/TAJおよびp75NGF-Rからなる群から選択される。20

【0006】

1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、例えば、LTBR/TRAIL-R1、LTBR/TRAIL-R2、LTBR/p75NGF-R、Fn14/p75NGF-Rおよびp75NGF-R/TAJなどの、TNFレセプターを含む非デスドメインおよびデスドメインを含むレセプターを活性化する。

【0007】

別の実施形態において、レセプターカップリング剤は、例えば、LTBR/Fn14、LTBR/RANK、Fn14/TAJ、LTBR/EDAR、LTBR/XEDAR、RANK/EDAR、RANK/XEDARおよびTAJ/EDARおよびTAJ/XEDARなどの、デスドメインを含まない少なくとも2つのTNFレセプターを活性化する30。

【0008】

本発明のさらに別の実施形態において、レセプターカップリング剤は、少なくともデスドメインを含む2つのレセプターを活性化する。

【0009】

さらに、本発明は、少なくとも1つのレセプターが免疫調節に関与する少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターは、TNFRII、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX40、GITR、TACI、BAFF-R、BCMAおよびRELTからなる群から選択される。40

【0010】

本発明は、少なくともレセプターの1つが正常な肝臓または内皮細胞上で過剰発現されない、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を提供する。

【0011】

また、本発明は、レセプターカップリング剤が1つのレセプターに対する第1結合特異性と別のレセプターに対する第2結合特異性を含む、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、レセプターシグナル伝達を高めるか、またはヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する。1つの実施形態において、第150

結合特異性は、抗 L T R レセプター (L T R) 抗体、またはその抗原結合フラグメントにより付与されるか、それに由来する。抗 L T R 抗体の具体例としてヒト化 C B E 1 1 抗体が挙げられる。1つの実施形態において、第2結合特異性は抗 T R A I L - R 2 抗体、またはその抗原結合フラグメントにより付与されるか、それに由来する。抗 T R A I L - R 2 抗体の具体例としてヒト化またはキメラ 1 4 A 2 抗体である。別の実施形態において、第1結合特異性はヒト化 C B E 1 1 抗体の単一鎖 F v フラグメントにより付与され、第2結合特異性は 1 4 A 2 抗体により付与される。

【 0 0 1 2 】

本発明は、レセプターカップリング剤が1つのレセプターに対する第1結合特異性と別のレセプターに対する第2結合特異性含み、第1結合特異性が3つの二量体 F c 領域と6つのリガンド分子から共通して形成される少なくとも2つの三量体リガンド - F c 構築物を含む、少なくとも2つの別個の T N F ファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。この場合、第2結合特異性は3つの抗体分子より成り立つことがある。

【 0 0 1 3 】

本発明は、T N F ファミリーレセプターの少なくとも1つが細胞表面上のラフト (r a f t) 環境に通常見られない、少なくとも2つの別個の T N F ファミリーレセプターを特異的に活性化するレセプターカップリング剤を記載する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、レセプターシグナル伝達を高めるか、またはヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導し、ここで、T N F ファミリーレセプターの少なくとも1つは細胞表面上のラフト環境に通常見られない。

【 0 0 1 4 】

本発明は、T N F ファミリーレセプターの少なくとも1つが通常細胞表面のラフト環境に見られる、少なくとも2つの別個の T N F ファミリーレセプターを特異的に活性化するか、レセプターシグナル伝達を高めるか、またはヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を包含する。

【 0 0 1 5 】

さらに、本発明は、少なくとも2つの別個の T N F ファミリーレセプターを特異的に活性化するか、またはシグナル強度がレセプターを通して高められるレセプターシグナル伝達を高めるレセプターカップリング剤を記載する。

【 0 0 1 6 】

本発明は、各抗体が別個の T N F ファミリーレセプターに結合することによりヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導する、少なくとも2つの抗体またはその抗原結合フラグメントを含むレセプターカップリング剤を包含する。1つの実施形態において、抗体は、例えば、ヒト化 C B E 1 1 抗体等の抗 L T R 抗体から得られる。別の実施形態において、二次抗体は、例えば、ヒト化またはキメラ 1 4 A 2 抗体等の抗 T R A I L - R 2 抗体から得られる。

【 0 0 1 7 】

1つの実施形態において、本発明は、細胞膜ラフトに対して T N F ファミリーレセプターを局在化させる方法であって、この方法は、ラフト化 T N F ファミリーレセプターに対する第1結合特異性とラフト化されていない T N F ファミリーレセプターに対する第2結合特異性を含むレセプターカップリング剤を投与する工程を包含し、レセプターカップリング剤の結合が細胞膜内のラフトに対して、ラフト化されていない T N F レセプターを局所化させる方法を包含する。

【 0 0 1 8 】

本発明は、少なくとも2つの別個の T N F ファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を投与する工程を包含する、レセプターシグナル伝達の増強方法も包含する。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

40

50

さらに別の実施形態において、本発明は、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を被験体に投与する工程を包含し、腫瘍容積を減少する方法を記載する。

【0020】

さらに別の実施形態において、本発明は、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを特異的に活性化し、レセプターシグナル伝達を高め、かつヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤を被験体に投与する工程を包含する、癌の治療方法を包含する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤がIFNの存在下で投与される。別の実施形態において、レセプターカップリング剤が化学療法剤の存在下で投与される。10

【0021】

また、本発明は、少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターを活性化し、かつヘテロメリック複合体の形成を誘導し、第1TNFレセプターに向けられた第1結合特異性と第2TNFレセプターに向けられた第2結合特異性を含みレセプターカップリング剤も包含する。1つの実施形態において、第1および第2の結合特異性は、非デスドメインを含むTNFレセプターとデスドメインを含むTNFレセプター；非デスドメインを含む2つのTNFレセプター；またはデスドメインを含む2つのTNFレセプター等のTNFレセプターに向けられる。別の実施形態において、少なくとも1つの結合特異性が、組織分化に関連した非デスドメインを含むTNFレセプターに向けられる。さらに別の実施形態において、デスドメインを含む2つのTNFレセプターが、LTBR/Fn14、LTBR/RANK、Fn14/TAJ、LTBR/EDAR、LTBR/XEDAR、RANK/EDAR、RANK/XEDAR、TAJ/EDARおよびTAJ/XEDARからなる群から選択される。本発明の別の実施形態において、非デスドメインを含むTNFレセプターおよびデスドメインを含むTNFレセプターが、LTBR/TRA1L-R1、LTBR/TRA1L-R2、LTBR/p75NGF-R、Fn14/p75NGF-Rおよびp75NGF-R/TAJからなる群から選択される。20

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

(発明の詳細な説明)

30

(I. 定義)

便宜上、本発明の更なる説明の前に、明細書、実施例および添付の請求の範囲で使用される用語をここで定義する。

【0023】

「投与する」という用語は、薬学的組成物または治療剤等の、しかし、これらに限定されない本発明の化合物の被験体への系または被験体内または被験体表面の特定の領域への送達のどのような方法も含む。ここで用いられる「全身投与」、「全身に投与される」、「末梢投与」および「末梢に投与される」との語句は、中枢神経系への直接の投与ではなく、患者の系に入るような化合物、薬物または他の物質の投与を意味するため、代謝や他の類似のプロセスの影響を受けやすく、例えば、皮下投与が挙げられる。「非経口投与」および「非経口で投与される」とは、通常は注射による経腸投与と局所投与以外の投与態様を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔、関節包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、皮内、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内および胸骨内の注射および注入等が挙げられるが、これらに限定されない。40

【0024】

ここに用いられる「抗体」との用語は、完全でそのままの抗体、ならびにFab、Fab'、F(ab)₂、F_vおよび望ましい結合特異性を本発明の構築物に付与する他のそのフラグメントを言及することが意図される。抗体として、例えば、ネズミモノクローナル抗体等のモノクローナル抗体、キメラ抗体、抗イディオタイプ抗体、抗-抗イディオタイプ抗体およびヒト化抗体ならびにそれらの多価形が挙げられる。「免疫グロブリン」ま50

たは「抗体」(ここでは交換可能に用いられる)という用語は、2つの重鎖および2つの軽鎖からなる基本的な4ポリペプチド鎖構造を有する抗原結合タンパク質をいい、該鎖は、例えば抗原に特異的に結合する能力を有する鎖間ジスルフィド結合によって安定化させられている。重鎖と軽鎖はともにドメインに折り畳まれる。「ドメイン」との用語は、例えばブリーツシートおよび/または鎖内ジスルフィド結合により安定化させたペプチドループ(例えば、3~4ペプチドループを含む)からなる重鎖または軽鎖ポリペプチドの球状領域をいう。ドメインは、さらに、「定常」領域の場合に多様なクラスメンバーのドメイン内に配列変化が比較的少ないこと、または「可変」領域の場合に多様なクラスメンバーのドメイン内の顕著な変化に基づいてここでは「定常」または「可変」と称する。軽鎖上の「定常」ドメインは「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「CL」領域または「CL」ドメインと互いに交互可能に言及される。重鎖上の「定常」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域または「CH」ドメインと互いに交互可能に言及される。軽鎖上の「可変」ドメインは「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「VL」領域または「VL」ドメインと互いに交互可能に言及される。重鎖上の「可変」ドメインは、「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域または「CH」ドメインと互いに交互可能に言及される。

10

【0025】

「領域」との用語は、抗体鎖の一部または一部分をいい、ここに定義される定常または可変ドメインならびに該ドメインのさらに別々の部分を含む。例えば、軽鎖可変ドメインまたは領域として、ここに定義される、「フレームワーク領域」または「FR」間に散在する「相補性決定領域」または「CDR」が挙げられる。

20

【0026】

免疫グロブリンまたは抗体はモノマーまたはポリマー形態で存在することができる。「抗原結合(性)フラグメント」との用語は、抗原に結合するか、または抗原結合(すなわち、特異的結合)に関して、インタクトな抗体(すなわち、それらが由来する、インタクトな抗体)と競合する免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチドフラグメントをいう。「立体構造」との用語はタンパク質またはポリペプチド(例えば、抗体、抗体鎖、そのドンメインまたは領域)の三次構造をいう。例えば、「軽(または重)鎖立体構造」との語句は、軽(重)鎖可変領域の三次構造をいい、「抗体立体構造」または「抗体フラグメント立体構造」との語句は、抗体またはそのフラグメントの三次構造をいう。結合フラグメントは、組換えDNA技術により、またはインタクトな免疫グロブリンの酵素的または化学的切断により生成される。結合フラグメントとして、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fabc、Fv、単鎖および一本鎖抗体が挙げられる。「二重特異性」または「二官能性」免疫グロブリンや抗体以外では、免疫グロブリンまたは抗体はその結合部位のそれを同一としていると理解される。「二重特異性」または「二官能性抗体」は、2つの異なる重鎖/軽鎖の対および2つの異なる結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二重特異性抗体はハイブリドーマの融合またはFab'フラグメントの連結等の多様な方法により生成することができる。例えば、Song sivilai & Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321; Kostelnyak, (1992) J. Immunol. 148, 1547-1553を参照されたい。

30

【0027】

「抗体構築物」という用語は、抗体の重鎖と軽鎖の可変ドメインに由来する2つ以上の抗原結合フラグメントを含む組換え型分子をいう。抗体構築物は5種類のIgクラス(例えば、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM)のいずれかに由来する抗体の定常領域の全体または一部を含んでよい。例えば、抗体構築物は、C末端に単鎖可変フラグメントを含む重鎖を有する抗体から生成されてよい。別の例において、抗体構築物は、カルボキシおよびアミノ末端に単鎖の可変フラグメントを含む抗体の2つの重鎖の定常領域の全体または一部から生成されてよい。所望の結合特異性を付与する抗体構築物の例を図9に概略的に示す。さらに別の例において、抗体構築物は、2つ以上の可変領域を有する2

40

50

つの重鎖および1つ以上の可変領域を有する2つの軽鎖を含み得、その2つの重鎖がジスルフィド結合か他の共有結合により連結されている。別の例において、抗体構築物は、2つ以上の可変領域を含む2つの重鎖を含み得、その2つの重鎖がジスルフィド結合か他の共有結合により連結されている。

【0028】

ここで用いられる「抗原」との用語は、特異的な抗体と反応性のある分子を意味する。

【0029】

「抗原結合(性)部位」または「抗原認識部位」との用語は、抗原上のエピトープに特異的に結合する抗体の領域をいう。

【0030】

ここで用いられる「アポトーシス」、「アポトーシス細胞死」または「プログラム細胞死」との用語は、細胞分化の特定の段階または特定の刺激に対して起こる細胞事象のカスケードから生じる細胞死をいう。アポトーシス細胞死は、死につつある細胞の細胞質および核の凝集によりしばしば特性付けられる。

【0031】

「結合特異性」との用語は、特定のTNFファミリーレセプターに対する結合部位から付与され、与えられ、達成され、またはそれから得られる開示されたレセプターカップリング剤の性質である。本発明の結合特異性は、例えば、抗体またはその抗原結合フラグメント、単鎖Fvフラグメント可溶性リガンド、fc融合物等を含む結合部分によって付与され得る。当業者は本出願の目的のために、「結合特異性」および「結合部分」との用語は文脈上の制限により特に示されなければ互換可能に用い得る。よって、結合特異性(結合部分)は、TNFファミリーレセプターと相互作用するTNFリガンドを含み得る。本発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、1つのTNFレセプターに対する少なくとも1つの結合特異性(または結合部分)およびもう1つのTNFレセプターに対する第2の結合特異性(または結合部分)を含む。

【0032】

「癌」または「新生組織形成」との用語は一般的に悪性新生物または細胞の自然の成長または増殖をいう。ここに用いられる用語は完全に発達した悪性の新生物と前癌状態の病変の両方を含む。例えば「癌」を有する被験体は腫瘍または白血病等の白血細胞増殖を有し得る。ある実施形態において、癌を有する被験体は固形腫瘍等の癌を有する被験体である。固形腫瘍を伴う癌としては、非小細胞肺癌(NSCLC)、睾丸癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、結腸直腸癌(CRC)、乳癌、ならびに前立腺癌、胃(gastric)癌、皮膚癌、胃(stomach)癌、食道癌および膀胱癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

「化学療法剤」との用語は、腫瘍細胞等の外来細胞または悪性細胞により引き起こされる疾患を処置するために用いられる低分子または生物製剤をいう。化学療法剤の非限定的な例として、DNA合成を中断する薬剤を含み、トポイソメラーゼIの阻害剤であり、アルキル化剤であり、または植物アルカノイドである。例示的な生物学的化学療法剤は、リツキシマブ、イブリツモマブ、ベバシズマブおよびトラスツズマブを含む。当業者は、本出願の教示に準じる他の化学療法剤が容易に識別可能なことを理解する可能性が在る。

【0034】

「DNA合成を中断する薬剤」との用語はDNA合成のプロセスを低減または阻害することのできる任意の分子または化合物をいう。DNA合成を中断する薬剤の例としては、例えば、ゲムシタビン、もしくは、例えばアドリアマイシン、ダウノムビシン、ドキソルビシンおよびイダムビシン等やエトポシドやテニポシド等のエピポドフィルロトキシン類が挙げられるが、これらに限定されないアントラサイクリン化合物等の、しかし、これらに限定されないピリミジンやプリンアナログ等のヌクレオシドアナログが挙げられるが、これらに限定されない。「トポイソメラーゼI阻害剤」との用語は、トポイソメラーゼI酵素の生物活性を阻害または低下させる、例えばカンプトサール(これに限定されない)

が挙げられる。「アルキル化剤」との用語は、（例えば、アミン、アルコール、フェノール、有機酸および無機酸の）求核基と反応することで、アルキル基（例えば、エチルまたはメチル基）をタンパク質または核酸等の別分子に付加するとのできる分子または化合物をいう。化学療法剤として用いられるアルキル化剤の例として、ビスルファン、クロラムブシリ、シクロホスファミド、イフオスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテバ、多様なニトロソ尿素化合物、およびシスプラチニやカルボプラチニ等の白金化合物が挙げられる。「植物アルカリイド」との用語は、生物活性があり、かつ細胞傷害のある植物に由来するアルカリ性の窒素含有分子のファミリーに属する化合物をいう。植物アルカリイドの例として、タキソール、ドセタキセルおよびパクリタキセル等のタキサン類およびピンプラスチン、ピンクリスチンおよびビノレルビン等のピンカ類が挙げられるが、これらに限定されない。10

【0035】

「キメラ抗体」との用語は、軽鎖と重鎖の遺伝子が、異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから、通常遺伝子工学により構築された抗体をいう。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変（V）セグメントを、IgG1およびIgG4等のヒトの定常（C）セグメントに結合させてよい。ヒトのイソタイプIgG1が好ましい。したがって、代表的なキメラ抗体はマウス抗体に由来するVまたは抗原結合ドメインおよびヒト抗体に由来するCまたはエフェクタードメインからなるハイブリッドタンパク質である。

【0036】

「デスマイン」（“death domain”）との用語は、TNFが媒介する細胞死シグナル伝達およびこれらにより媒介される細胞傷害誘導に関するそれらTNFファミリーレセプターの細胞質領域をいう。この領域は、レセプターを、外因性の死の経路の活性化をもたらすアダプタータンパク質によるカスパー活性化に連結する。デスマインを含むTNFレセプターの例として、TNFR1（DR1）、Fas（DR2）、TRAIL-R1（DR4）、TRAIL-R2（DR5）、p75NGFRおよびDR6が挙げられるが、これらに限定されない。20

【0037】

「有効量」との用語は、例えば、インピトロまたはインビボのいずれかで腫瘍容積を減少させる等の、しかし、これらに限定されない所望の結果を達成するのに十分な本発明の化合物、物質、または化合物を含む組成物の量をいう。本発明の薬学的組成物の有効量は、例えば、患者における癌の進行を緩和、安定化、阻止または遅延する等の、しかし、これらに限定されない所望の臨床的結果を達成するのに十分な薬学的組成物の量である。いずれの場合も、本発明の化合物の有効量は1回以上の投与で投与することができる。全身腫瘍組織量の減少、腫瘍の大きさの阻害、二次性腫瘍の増殖の減少、腫瘍組織における遺伝子の発現、生物指標の存在、リンパ節の関与、組織学的悪性度および細胞核悪性度等の、しかし、これらに限定されない上記指標の検出と測定は当業者に公知である。30

【0038】

「エピトープ」との用語は、抗体または抗体構築物が優先的かつ特異的に結合する抗原の領域をいう。モノクローナル抗体は、分子的に定義されうる分子の単一の特定エピトープに優先的に結合する。本発明において、複数のエピトープは多特異的抗体により認識され得る。40

【0039】

「Fcフラグメント」との用語は、重鎖と軽鎖の可変領域を含む抗体フラグメントをいう。Fcフラグメントとの用語は重鎖の定常領域を含む抗体のフラグメントをいう。

【0040】

「ヒト化免疫グロブリン」または「ヒト化抗体」との用語は、少なくとも1つのヒト化免疫グロブリンまたは抗体鎖（すなわち、少なくとも1つのヒト化軽鎖または重鎖）を含む免疫グロブリンまたは抗体をいう。「ヒト化免疫グロブリン鎖」または「ヒト化抗体鎖」（すなわち、「ヒト化免疫グロブリン軽鎖」または「ヒト化免疫グロブリン重鎖」）と50

の用語は、ヒト免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する可変フレームワーク領域と非ヒト免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する相補性決定領域（CDR）（例えば、少なくとも1つのCDR、好ましくは2つのCDR、さらに好ましくは3つのCDR）とを含む可変領域を有する免疫グロブリンまたは抗体鎖（すなわち、それぞれ軽鎖または重鎖）をいい、さらに定常領域（例えば、軽鎖の場合、少なくとも1つの定常領域またはその部分、重鎖の場合、好ましくは3つの定常領域）を含む。「ヒト化可変領域」（例えば、「ヒト化軽鎖可変領域」または「ヒト化重鎖可変領域」）との用語は、ヒト免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する可変フレームワーク領域と非ヒト免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する相補性決定領域（CDR）とを含む可変領域をいう。

【0041】

10

「ヘテロメリックレセプター複合体」との用語は、レセプターカップリング剤と、該レセプターカップリング剤が標的化する2つ以上のレセプターを含む複合体をいう。1つの実施形態において、本発明のヘテロメリックレセプター複合体は、レセプターカップリング剤と、該カップリング剤が標的化して活性化させる少なくとも2つのTNFファミリーレセプターを含む。好ましくは、レセプターによるシグナル伝達はヘテロメリックレセプター複合体形成の結果として高められる。本発明の1つの実施形態において、ヘテロメリックレセプター複合体は細胞膜内の脂質ラフト（lipid raft）上に形成する。別の実施形態において、本発明のヘテロメリックレセプター複合体は細胞膜上の脂質ラフトの外側に形成する。

【0042】

20

「腫瘍容積の阻害」との用語は腫瘍容積の減少または低減をいう。

【0043】

30

「リガンド」との用語はタンパク質上または他の分子上の特定の部位に結合する分子をいう。リガンドは、しばしば、機能的応答を誘発するように高親和性かつ特異的にレセプタータンパク質と結合するポリペプチドまたは化合物である。例えば、本発明のリガンドとして、TNFファミリーレセプターリガンドが挙げられる。「天然のリガンド」との用語は、正常な生理学的条件下でレセプターに結合するリガンドをいう。「レセプター」との用語は、ここでは、結合分子、すなわち、リガンドを認識することにより細胞応答を誘発する細胞上または細胞内に置かれた構築物、通常、ポリペプチドをいう。本発明のレセプターとして、例えば、TRAIL-R2、HVEMおよびLT-R等のTNFファミリーレセプターが挙げられる。

【0044】

30

「TNFファミリーレセプター」または「TNF-R」との用語は、「システインリッチドメイン」またはCRDを形成するジスルフィド結合により特徴付けられるTNFレセプタースーパーファミリーに属するレセプターをいう。TNFレセプターファミリーメンバーは一般的に細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインからなる（概説については、Locksleyら（2001）Cell 104：487を参照されたい）。細胞外ドメインは、1～6コピーの堅くジスルフィドが結合したドメインから生成され、システイン残基の独自の配列に基づいて認識される（Bannerら（1993）Cell 73：431）。各TNFレセプターは対応するリガンドに結合するが、1つのリガンドが幾つかのレセプターを共有することがある。

【0045】

40

「リンホトキシン-ベータレセプター（LT-R）アゴニスト」との用語は、LT-Rに対するリガンド結合、細胞表面LT-Rクラスタリングおよび/またはLT-Rシグナル伝達を増強し得る。

【0046】

50

「多価抗体」または「多価抗体構築物」との用語は、2つ以上の抗原認識部位を含む抗体または抗体構築物をいう。例えば、「2価」抗体構築物は2つの抗原認識部位を有する一方で、「4価」抗体構築物は4つの抗原認識部位を有する。「一特異的」、「二重特異性」、「三特異的」、「四特異的」等との用語は、本発明の多価抗体構築物に存在する（

抗原認識部位の数とは対照的に)異なる抗原認識部位特異性の数をいう。例えば、「一特異的」抗体構築物の抗原認識部位はすべて同一のエピトープに結合する。「二重特異性」抗体構築物は、第1エピトープに結合する少なくとも1つの抗原認識部位と、第1エピトープとは異なる第2エピトープに結合する少なくとも1つの抗原認識部位とを有する。「多価一特異的」抗体構築物は、すべてが同一のエピトープに結合する複数の抗原認識部位を有する。「多価二重特異性」抗体構築物は複数の抗原認識部位を有し、その抗原認識部位の幾つかは第1エピトープに結合し、幾つかは第1エピトープとは異なる第2エピトープと結合する。本発明の1つの実施形態において、抗体は図9に示されるように多価の二重特異性抗体である。

【0047】

「患者」または「被験体」または「ホスト」とはヒトまたは非ヒト動物のいずれかをいう。

【0048】

「薬物送達デバイス」との用語は、単一または複数の薬剤を被験体に投与するために用いてよいデバイスをいう。薬物送達デバイスの非限定的なとして、皮下注射器、多室注射器、ステント、カテーテル、経皮パッチ、マイクロニードル、マイクロアブレーダーおよび移植可能な放出制御デバイスが挙げられる。1つの実施形態において、「薬物送達デバイス」との用語は注射の前に2つの化合物を混合することのできる二室注射器をいう。

【0049】

「薬学的に受容可能な」との用語は、適切な医学的判断の範囲内で、合理的な利益／危険率に相応して、過剰な毒性、刺激、アレルギー性応答または他の問題または面倒な事態なしに、ヒトおよび動物の組織に接触させて使用するのに適する化合物、物質、組成物および/または投薬形態を言及するためにここで使用される。

【0050】

ここで用いられる「薬学的に受容可能なキャリア」との用語は、対象の化合物を一器官または体の一部分から別の器官または体の別の部分への輸送または移動に関与する液体または固体フィラー、希釈剤、賦形剤、または溶媒カプセル化物質等の薬学的に受容可能な物質、組成物またはビヒクルを意味する。各キャリアは処方物の他の成分に適合性があり、患者に有害ではない意味で「受容可能な」ものでなければならない。薬学的に受容可能なキャリアとして役立ちうる物質の幾つかの例として、(1)ラクトース、グルコースおよびスクロース等の糖類；(2)コーンスタークおよびポテトスターク等のデンプン類；(3)セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよびセルロースアセテート；(4)粉末トラガカント；(5)麦芽；(6)ゼラチン；(7)タルク；(8)カカオ脂および座薬ワックス等の賦形剤；(9)ピーナッツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油および大豆油等の油類；(10)プロピレングリコール等のグリコール類；(11)グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール等のポリオール類；(12)オレイン酸エチルおよびラウリル酸エチル等のエステル；(13)寒天；(14)水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム等の緩衝剤；(15)アルギン酸；(16)発熱物質を含まない水；(17)等張食塩水；(18)リンガー溶液；(19)エチルアルコール；(20)pH緩衝溶液；(21)ポリエステル、ポリカーボネートおよび/または多無水物；および(22)薬学的処方物に用いられる他の非毒性の適合性のある物質が挙げられる。

【0051】

「薬学的に受容可能な塩」とは、化合物の比較的毒性がない無機および有機の酸付加塩をいう。

【0052】

「ラフト」("raft")または「脂質ラフト」("lipid raft")との用語は、特殊化した細胞膜ドメイン(Simonsら、(2000)Nature Reviews Molecular Cell Biology 1:31を参照のこと)

10

20

30

40

50

脂質ラフトまたはその一部をいう。特に、「脂質ラフト」との用語は真核細胞膜のコレステロールとスフィンゴ糖脂質とに富むミクロドメインをいう。脂質ラフトはシグナル伝達分子中に富む傾向があり、成長因子レセプターとセンサー分子がリガンド結合または架橋結合後に脂質ラフトに移動することが示されている。脂質ラフトは非イオン性界面活性剤による低温度での可溶化に対する抵抗により特徴付けられ、細胞内または細胞外の刺激に応答して大きさと組成を変化させることができる。特定のタンパク質・タンパク質相互作用が脂質ラフト内では好まれ、例えば、原形質膜サイトカインレセプターの場合にシグナル伝達カスケード活性の調節をもたらす可能性がある。

【0053】

あるレセプターの「ラフティング」(“rafting”)（ここでは、膜成分、例えばレセプターの脂質ラフトへの取込みと定義される）または「脱ラフティング」（ここでは、膜成分、例えばレセプターの脂質ラフトからの除去、流出または除外と定義される）の潜在的な効果として、サイトカインレセプター媒介シグナル伝達の誘発（時には、アボトーシス細胞死の誘発）、レセプターの細胞局在およびレセプターの豊富さが挙げられる。時々、脂質ラフトはクラスタ化することがある；そのようなクラスタリングはシグナル伝達カスケードを始動させるために人為的および生理学的の両方で用いられることが報告されている。1つの実施形態において、本発明のレセプターカップリング剤は2つのTNFファミリーメンバー-レセプターを脂質ラフトに運び込む。別の実施形態において、本発明のレセプターカップリング剤はTNFファミリーレセプターを脂質ラフトから引き出す。

10

20

【0054】

「レセプターカップリング剤」との用語は、少なくとも2つの異なる細胞表面レセプターを活性化することのできる物質または構築物を包含する。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はタンパク質性の物質である。レセプターカップリング剤は細胞表面レセプターのシグナル伝達能力を増強するために用いられる。本発明のレセプターカップリング剤はTNFファミリーレセプターに向けられている。場合によっては、レセプターカップリング剤による少なくとも2つのTNFファミリーレセプターの活性化は細胞死を引き起こすことができる。発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は二重特異性多価構築物からなる。さらに別の実施形態において、レセプターカップリング剤は抗LT-R結合部分または特異性および抗TRA IL-R2結合部分または特異性を有する二重特異性多価構築物である。別の実施形態において、レセプターカップリング剤は抗LT-R抗体（例えば、CB E 11）により付与される結合特異性と抗TRA IL-R2抗体（例えば、14A2）により付与される結合特異性を有する。

30

【0055】

「単鎖可変フラグメントまたはscFv」との用語は、重鎖ドメインおよび軽鎖ドメインが結合しているFvフラグメントをいう。1つ以上のscFvフラグメントは他の抗体フラグメント（例えば、重鎖または軽鎖の定常ドメイン）に結合して、1つ以上の抗原認識部位を有する抗体構築物を形成し得る。

40

【0056】

「相乗的」との用語は2種類以上の单一物質の相加効果よりも効果的な組合せをいう。本発明の1つの実施形態において、相乗的との用語は、LT--Rアゴニストおよび化学療法剤の両者が個々に腫瘍容積を阻害する能力を有する組合せタイプの相乗的な阻害を含む。「相乗作用」との用語は、2種類以上の物質の同時に起こる効果がそれら物質の独立した効果の合計よりも高い場合をいう。

【0057】

被験体の癌を「処置する」または癌を有する被験体を「処置する」とは、癌の程度を減少または抑えるように、被験体に薬学的処置（例えば、薬物の投与）を受けさせることをいう。処置としては、薬学的組成物等の組成物の投与が挙げられ（ただし、これらに限定されない）、予防的に行っても、もしくは障害の事象の開始に続いて行ってもよい。

【0058】

50

「腫瘍容積」との用語は、腫瘍自体を含み、妥当であれば、侵されたリンパ節もさらに加えた腫瘍の全体的な大きさをいう。腫瘍容積は、従来知られている多様な方法、例えば、測径器、コンピュータ断層撮影（CT）または磁気共鳴画像（MRI）スキャンを用いて腫瘍の大きさを測定し、例えば z 軸直径に基づくか、または球、橢円または立方体等の標準形に基づく方程式を用いてその体積を計算することによって決定してよい。

【0059】

（II. レセプターカップリング剤の標的）

TNFファミリーレセプター活性化剤による処置の治療における制限要因は、しばしば、こぐ一部の腫瘍のみがそのような処置に感受性があると思われることである。レセプターカップリング剤はTNFファミリーレセプターを特異的に活性化でき、例えば、TNFファミリーレセプターを接近させることによりレセプターシグナル伝達を高めることができる（TNFレセプターおよびTNFファミリーの概説については、Locksleyら（2001）Cell 104:487を参照されたい）。本発明は、2つ以上のTNFファミリーレセプターを標的とし、かつシグナル伝達を高めることができて、改良癌治療法を提供するレセプターカップリング剤を提供する。そのようなものとして、レセプターカップリング剤は、さらに強いか、またはさらに複雑なシグナルを送ることができるため、実施例3に示されるようにさらに広い範囲の腫瘍に対してさらに効果的である。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は接合させるレセプターの数を多くすることによりシグナル強度を高める（Holler N Fau-Tardivelら、（2003）Mol. Cell Biol. 23:1428）。別の実施形態において、レセプターカップリング剤は2つの別個のTNFファミリーレセプターを活性化することによりシグナル強度を高め、2つの異なるシグナル伝達カスケードを始動させる。

10

20

30

【0060】

本発明のレセプターカップリング剤は少なくとも2つの別個のTNFファミリーレセプターメンバーに向けられた結合特異性を有する。結合特異性は、標的とすべき興味のあるTNFファミリーレセプターメンバーにしたがって選択される。例えば、1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はTNFレセプターTRAIL-R2に対する第1の結合特異性とTNFレセプターリンホトキシン-レセプター（LT-R）に対する第2の結合特異性を有する。以下、レセプター結合剤の標的化するよい異なる種類のTNFファミリーレセプターの具体例を詳細に説明する。

【0061】

（A. デンドメインを含むTNFレセプター）

レセプターカップリング剤はデンドメインを含むTNFファミリーレセプターを標的化し得、このことは癌の処置に有用であり得る。「デンドメイン」または「DD」とは6つの保存ヘリックスを含むある種のTNFレセプターのタンパク質ドメインをいう。デンドメインを含むTNFレセプターは本発明のレセプターカップリング剤の主要な標的であり、そのような構築物の例を実施例のセクションで示す。

40

【0062】

デンドメインレセプターの一例がFasである。Fas経路分子として、Fasにより引き起こされるアポトーシスまたはプログラム細胞死（PCD）を導く経路に関与するか、またはそれに関連する分子が挙げられる。Fas経路分子として、Fas、Fasリガンド（FasL）、およびレセプターのTNFRスーパーファミリーのメンバーが挙げられるが、これらに限定されない。FADD、カスパーゼ8、bidおよびカスパーゼ3もFas経路分子として含まれる。Fas経路分子はここに定義された他の集団に含めてもよい。

【0063】

リンパ球の細胞傷害効果の一部は、細胞死を始動する能力のある広く存在する細胞表面レセプター（NagataおよびGolstein, (1995) Science 267:1449-56を参照）であるFas-R（DR-2、APO-1およびCD95としても知られる；GenBank GI No. 4507583、No. 2351042

50

1、No. 23510423、No. 23510425、No. 23510427、No. 23510429、No. 23510431およびNo. 23510434)とのリンパ球産生リガンドの相互作用により媒介される。Fasレセプターに対するFasLの結合は細胞膜上のレセプター凝集およびDISCとして知られる細胞内シグナル分子の特定の補充、または死を誘導するシグナル複合体を導く。アダプタータンパク質であるFADDは、FLICEまたはMACHとしても知られているカスパーゼ-8の補充を導くFasの細胞内のデスドメインに結合する。Fasが誘導する細胞死は、ミトコンドリアの浸透性変化を変える経路を活性化することがある。

【0064】

単核細胞食細胞による細胞殺傷は、Fas-Rとそのリガンド(Vandenabeeleら、(1995) Trends in Cell Biology 5:392も参照)に構造的に関連するTNFとそのレセプターであるTNFR1(DR-1、CD120、p55-Rとしても知られる; GenBank GI No. 4507575;また、USS395, 760も参照)であるリガンド-レセプター結合対を必要とする。他のレセプター誘導効果のように、TNFレセプターおよびFas-Rによる細胞死の誘導は、これらの特定のレセプターの場合に細胞死をもたらすリガンド-レセプター結合から酵素的エフェクター機能の最終的な不活性化までの一連のタンパク質-タンパク質相互作用によって起こる。

【0065】

通常の環境下において、Fasレセプターの関与は炎症細胞の侵入と二次的な壊死を伴い、さらに、炎症促進性環境で細胞(例えば、肝細胞)の死を導く免疫細胞を動員し、活性化させる細胞ケモカイン(例えば、肝臓ケモカイン)の発現を誘導することにより、炎症(例えば肝臓炎症)を誘発する。対照的に、本発明のレセプターカップリング剤は特定の標的細胞で細胞死を誘導するように設計されている。本発明の標的療法は増強シグナル伝達のためにさらに有効であろうから、低用量の薬物による処置を可能とするだろう。そのような方法は、単一の細胞表面サイトカインレセプターの活性化によりアポトーシスが全身に誘導される場合に観察される否定的な結果を最小化し得る。

【0066】

Fas-RおよびTNF-R1に加えて、デスドメインを含むTNFレセプターファミリーの他のメンバーとして、DR3(TRAMP、TR3およびApo3とも称される; GenBank GI No. 4507569、No. 23200021、No. 23200023、No. 23200025、No. 23200027、No. 23200029、No. 23200031、No. 23200033、No. 23200035、No. 23200037およびNo. 23200039); TRAIL-R1(DR4およびApo2とも称される; GenBank GI No. 21361086); TRAIL-R2(DR5とも称される; GenBank GI No. 22547116およびNo. 22547119); p75NGF-R(TNFRSF16としても知られる; NCBI Reference Seq. NP_002498; GenBank GI No. 4505393); およびDR6(TRAIL-R3; GenBank GI No. 22547121)が挙げられ、これらのそれぞれがアポトーシスを直接に開始するデスドメインを含む。

【0067】

TRAIL-R1~4と呼ばれる4種類のヒトTRAILレセプターが存在する。TRAIL-R1およびR2は死のレセプター4および5(DR4~5)としても知られ、細胞内領域にデスドメインを含み、アポトーシスを始動することができる(WangおよびE1-Deiry(2003) Oncogene 22:8628)。TRAIL-R2はその活性化が肝細胞アポトーシスを始動しないために低減した毒性を有するだろうから、ヒトの腫瘍治療に好ましい(Ichikawaら(2001) Nat Med 7:954)。よって、デスドメインを含む多様なTNFファミリーレセプターを、単独で、または他のTNFR(例えばLT-R等の非デスドメインTNFR)と併せて活性化するレセ

10

20

30

40

50

プター カップリング剤が本発明に含まれる。

【 0 0 6 8 】

1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はデスドメインを含むTNFレセプターの毒性効果を減少させるために用いられる。デスドメインを含む一部のレセプター（例えばTNFR1またはFas）の活性化はインビボで毒性があることが示されている一方で、これらのレセプターを他のTNFレセプターにつなぐことは毒性を減少させため、毒性抗体を毒性の少ないものとする可能性がある。例えば、ラフト会合がTNFR1の完全なシグナル伝達に重要である場合、ラフト化されていないレセプターにつなぐことによる脱ラフティングは抗TNFR1毒性を減少させるために十分であろう。1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、抗LT-R抗体を含む結合部分、またはその抗原結合フラグメント、およびデスドメインを含む抗TNFファミリーレセプターに向けられた結合部分を含む。

10

[0 0 6 9]

(B . 非デスドメインのレセプター)

本発明のレセプターカップリング剤は、デスドメインを含まないTNFファミリー-レセプターを標的化してもよい。固体腫瘍の処置のために非デスドメインを含むTNFレセプター、具体的には抗LT-Rアゴニストモノクローナル抗体(mAb)の活性化は、抗腫瘍治療としての可能性も示す(Browningら(1996)J Exp Med 183:867, WilsonおよびBrowning(2003)Cell Death Diff 9:1321)。

20

[0 0 7 0]

非デスドメインを含むTNFレセプターファミリーメンバーの一例はLTRである。LTRは免疫系の特殊化された多様な間質細胞の成熟状態の調節に関与し、リンパ節原基の基質成分の発達中に重大な役割を果たす(Mebius(2003) Nat Rev Immunol 3: 292)。形質転換細胞との関連では、上皮細胞および線維芽球様細胞の発達プログラムの活性化はそれらの細胞の生存にとって有害であり、この作用はLTRレセプター活性化の抗腫瘍活性の一部を構成することが提唱されてきた。これらのレセプターは、ケモカイン放出をともなうか、または免疫学的な抗腫瘍応答を促進する炎症プログラムも開始することができる(Yular(2004) Nat Immunol 5: 141, Baud(2001) Trends Cell Biol 11: 372)。そのような放出は腫瘍の炎症状態に影響を与え、および/または免疫反応を促進するリンパ成分の腫瘍への侵入を引き起こす。よって、デスドメインを欠く多様なTNFファミリー-レセプターを、単独で、またはデスドメインを含むTNFレセプターと併せて活性化するレセプターカップリング剤は本発明に含まれる。

30

[0 0 7 1]

L T R に加えて、デスドメインを欠く TNF レセプターの他の例として、Fn14 (TWEAK-R とも称される；本出願人の同時係属出願 WO02/22166 を参照)；RANK (NCBI 受託番号 AAB86809、AF018253 を参照)；TAJ (TROY とも称される；NCBI 受託番号AAF71828、AAH47321、AAK28395 を参照)；EDAR (NCBI 受託番号AAD50076、AAD50077、AF130988 を参照)；XEDAR (NCBI 受託番号AAG28761、AAH34919、AAN73210 を参照)；および CD40 (CD40L レセプターとも称される；NCBI 受託番号AAH12419、AAH64518、AAR84238 を参照)。

10

[0 0 7 2]

デスマインを欠くTNFレセプターの下位集団として、発達および傷の治癒等の組織分化に関するTNFレセプターが挙げられる。いくつかのTNFレセプターは発達での明確な役割を有する(例えば、LT R、RANK、EDARおよびXEDAR(Mebius(2003) Nat Rev Immunol 3:292; Theiligら、(2002) Ann Rev Immunol 20:795; Larikkaら、(

50

2002) Development 129: 2541; Renner (2000) J Exp Med 192: 1677を参照)。分化とは、正常な細胞が発達して体の異なる組織を形成にしたがってそれらの細胞が物理的变化および構造的变化を受けるプロセスである。分化プログラムは腫瘍にいくつかの方法で影響を与えることがある。第1に、組織分化に関するTNFレセプターは変化した細胞周期進行により腫瘍増殖を直接的に遅延する可能性を有する。第2に、形質転換という状況でのプログラムは細胞周期の不一致とデフォルトアポトーシスを導くことがある。第3に、そのような相反するインプットは化学療法に対して細胞をさらに感受性のあるものとする可能性がある。

【0073】

TNFシグナル伝達を高めるために、組織分化を媒介することが示され、レセプターカップリング剤が標的としうるTNFレセプター分子の例として、RANK (TNFRSF11Aとしても知られる; GenBank GI No. 4507565; 受託番号AF018523; 米国特許第6,562,948号、第6,537,763号、第6,528,482号、第6,479,635号、第6,271,349号、第6,017,729号); EDAR1 (Downlessとしても知られる; GenBank GI No. 11641231; 受託番号AF130988; 米国特許第6,355,782号); およびTAJ/Troy/Trade (TNFRSF19としても知られる; GenBank GI No. 23238202およびNo. 23238204; 受託番号AF167555)が挙げられる。さらに、XEDAR (EDA-A2Rとしても知られる; GenBank GI No. 11140823; 受託番号AF130988)シグナル伝達は外胚葉性分化のプロセスに関与する。XEDARはNF- κ BおよびJNK経路の活性化に主要な役割を果たす。Fn14は神経変性に関与することが示されている(Tanabeら(2003)J. Neurosci. 23: 9675)。Fn14はTWEAKRおよびTNFRSF12Aとしても知られる(GenBank GI No. 7706186; 米国特許第6,727,225号; 米国特許出願第2004/0033225A1号を参照)。よって、組織分化に関与する多様なTNFファミリーレセプターを活性化するレセプターカップリング剤は本発明に含まれる。

【0074】

(C. 免疫調節レセプター)

TNFレセプタースーパーファミリーは免疫調節に関与する幾つかのレセプターも含み、これらは本発明の構築物が標的としうるものである。そのようなレセプターとして、TNFR2 (TNFRSF1Bとしても知られる; GenBank GI No. 4507577)、HVEM (TNFRSF14としても知られる; GenBank GI No. 23200041)、CD27 (TNFRSF7としても知られる; GenBank GI No. 4507587)、CD30 (TNFRSF8としても知られる; GenBank GI No. 4507589およびNo. 23510437)、CD40 (TNFRSF5としても知られる; GI No. 4507581およびNo. 23312371)、4-1BB (TNFRSF9としても知られる; GI No. 5730095)、OX40 (TNFRSF4としても知られる; GI No. 4507579)、GITR (TNFRSF18としても知られる; GenBank GI No. 4759246、No. 23238194およびNo. 23238197)、TACI (TNFRSF13Bとしても知られる; GI No. 6912694)、BAFF-R (TNFRSF13Cとしても知られる; GI No. 16445027)、BCMA (TNFRSF17としても知られる; GI No. 23238192)およびRELT (TNFRSF19Lとしても知られる; GI No. 21361873およびNo. 23238200)が挙げられる。免疫調節に関与するさらなるTNFファミリーレセプターとして、TRAIL-R3とTRAIL-R4が挙げられる。よって、免疫調節に関与する多様なTNFファミリーレセプターを活性化するレセプターカップリング剤は本発明に含まれる。

【0075】

(D. 他のTNFレセプター)

10

20

30

40

50

他の標的TNFファミリーレセプターは腫瘍形成でのそれらの役割から選択してよく、多様な腫瘍上に存在するか、または理想的には過剰発現するTNFファミリーレセプターの定義を可能とする多様な細胞型内のレセプター発現の既存のRNAデータベースを用いて同定することができる。さらに、既存のRNAデータベースは、ある腫瘍タイプ上または腫瘍の一部上でさらに独自に発現するが、正常な組織、特に肝臓および脈管構造では豊富ではないTNFファミリーレセプターの対を同定することによりそれらレセプター対を最適化できる点でさらに利点を提供する。強いシグナルを腫瘍に送り、正常な組織を傷つけないレセプター対（あるいはそれ以上）がそのように同定される。選択されたレセプターの有効性の試験方法は下記および実施例の部分でさらに詳しく説明する。

【0076】

10

本発明のレセプターカップリング剤は少なくとも2種類の別個のTNFレセプターを標的化する。標的TNFレセプターはレセプターの個々の特性に基づいて選択される。例えば、レセプターカップリング剤は、分化の事象に関わる2つのTNFレセプターを標的化するため、固形腫瘍の治療に効果的であろう。本発明のレセプターカップリング剤が対象とするTNFレセプターの組合せの他の例を以下に説明する。

【0077】

20

(非デスドメイン/デスドメインTNFレセプターカップリング剤)

本発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、デスドメインを含む1つのTNFレセプターと、デスドメインを含まない1つのTNFレセプターを標的化し、活性化する。標的とされる非デスドメイン/デスドメインを含むTNFレセプターの組合せの例として、LTBR/TRAIL-R1、LTBR/TRAIL-R2、LTBR/p75NGF-R、Fn14/p75NGF-Rおよびp75NGF-R/TAJが挙げられる。デスドメインを含むTNFレセプターを非デスドメインを含むレセプターに結合させることはデスドメインを含むレセプターの活性化の毒性をさらに減少させ得る。

【0078】

30

別の実施形態において、LTBR、RANKおよびFn14等の、しかし、これらに限定されない非デスドメイン含有TNFレセプターの少なくとも1つは細胞分化に関与する。以下詳細に説明するように、LTBR、RANKおよびFn14はそれぞれ細胞分化に関与する。非デスドメインTNFレセプターが細胞分化に関与する非デスドメインを含むTNFレセプター/デスドメインを含むTNFレセプターの例として、例えば、LTBR/p75NGF-R、Fn14/p75NGF-RおよびTAJ/p75NGF-Rが挙げられる。

【0079】

40

(非デスドメイン/非デスドメインTNFレセプターカップリング剤)

本発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、ともにデスドメインを含まない2つの別個のTNFレセプターを標的とし、活性化する。レセプターカップリング剤が標的化する非デスドメインを含むTNFレセプター物質/非デスドメインを含むTNFとして、LTBR/Fn14、LTBR/RANK、Fn14/TAJ、LTBR/EDAR、LTBR/XEDAR、RANK/EDAR、RANK/XEDAR、TAJ/EDAR、TAJ/XEDARおよびLTBR/CD40が挙げられる。

【0080】

別の実施形態において、非デスドメインを含むTNFレセプター/非デスドメインを含むTNFレセプターの少なくとも1つは細胞分化に関与する。例えば、レセプターカップリング剤はLTBRおよびFn14を対象とし得る。Fn14は、腺癌細胞株HT29に細胞死を誘導する能力を有するTNFリガンドであるTWEAKに対するレセプターである（Chicheporticheら（1997）J.Biol.Chem.272:32401を参照）。TWEAKのアポトーシス活性はFn14により媒介される。Fn14は損傷後の組織リモデリングにも関与する。組織リモデリングに見られる分子機構は組織分化に類似しており、そのようなプログラムは腫瘍増殖に有利ではない可能性がある。別の例において、レセプターカップリング剤はLTBRおよびRANKを対象としてよい

50

。RANKシグナル伝達は乳房上皮の分化を始動させるために、別の分化誘導剤と組み合わせた場合に増強活性を有することがある。よって、レセプターカップリング剤を用いるRANKとLTBRシグナル伝達の増強は腫瘍増殖を妨げるのに有用であろう。

【0081】

LTBR、RANKおよびFn14に加えて、TAJ/TROYは、具体的には軸索再生の調節において組織の分化にある役割をはたす(Shaoら(2005)Neuron 45:353)。TAJは、ミエリン成分に応答する神経突起伸長の抑制に関与、つまり、分化の事象に効果的に関与する。Fn14はポストニューロン損傷(Tanabeら(2003)J.Neurosci.23:9675)で発現するため、TAJによる一緒になった信号は中央神経系に関連する腫瘍を処置するために用いてよい。よって、1つの実施形態において、レセプターカップリング剤はTAJおよびFn14を標的化してもよい。

10

【0082】

組織分化に関与するので腫瘍増殖の阻害に有益であろう非デスドメイン含有TNFレセプターの組合せの他の例として、LTBR/EDAR、LTBR/XEDAR、RANK/EDAR、RANK/XEDAR、TAJ/EDARおよびTAJ/XEDARが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0083】

(デスドメイン/デスドメインTNFレセプターカップリング剤)

本発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は、ともにデスドメインを含む2つの別個のTNFレセプターに結合する。TRAIL-R1/TRAIL-R2は、レセプターカップリング剤が標的としうるデスドメイン/デスドメイン含有TNFレセプターの組合せの1例である。

20

【0084】

(免疫TNFレセプターカップリング剤)

本発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤は免疫応答に関与する2つの別個のTNFレセプターに結合する。B細胞応答を媒介する免疫応答TNFレセプターの組合せ例として、CD40/CD27、CD40/BAFF-R、CD40/BCM-AおよびBAFF-R/CD27が挙げられる。T細胞免疫応答を媒介するTNFレセプターの組合せ例として、CD27/CD30、CD27/OX-40、CD27/41B-BおよびOX-40/41BBが挙げられる。

30

【0085】

(III.レセプターカップリング剤)

レセプターカップリング剤は、レセプターカップリング剤および少なくとも2つのTNFファミリーレセプターからなるヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導し得る。TNFファミリーレセプターは共通するシグナル伝達様式および特異的なレセプターに独自な特殊化された伝達機構を有する。これらのシグナル伝達経路は多くの場合に活性化される3つ以上の経路と高度に複合化している。ヘテロメリックレセプター複合体の形成を誘導するレセプターカップリング剤の使用は腫瘍増殖をさらに効果的に制限することがある。例えば、デスドメインを含有するレセプター(例えば、TRAIL-R2)から生じるカスパーゼ活性化に連動した代用NF- κ B経路(Dejardinら、(2002)Immunology 17:525)を活性化するLT-Rの比較的まれな能力を標的化するレセプターカップリング剤は低下した腫瘍増殖をもたらす可能性がある。さらに、そのような物質は、2つの別個のTNFファミリーレセプターを、シグナル変換機構成分が新規で潜在的に非生理学的な凝集体とされる結合をもたらす1つの複合体へと並列させる。

40

【0086】

本発明のレセプターカップリング剤は、TNFファミリーレセプターを、シグナル伝達に影響を与える独自の細胞膜環境中に再度向かわせるために用いてよい。一部レセプターのシグナル伝達能力は脂質ラフト内等の特殊な膜環境内のそれらの位置に依存する。そのようなTNFファミリーレセプターの例として、Fasおよび場合によりTNFR-Iレ

50

セプターが挙げられる (Muppidi および Siegel (2004) Nat Immuno1 5 : 182, Leglerら、(2003) Immunity 18 : 655)。TRAILレセプターは複雑な局所化パターンを示す (Zhangら (2000) J Immunol 164 : 3961)。脂質ラフト内に通常存在するあるレセプターを、ラフトに通常存在しない別のレセプターに結合させるレセプターカッピング剤は第2レセプターをラフト環境内に押し入れて、そのシグナル伝達能力を高める可能性がある。同様に、脂質ラフト外に通常存在するあるレセプターを、ラフト内に通常存在する別のレセプターに結合させるレセプターカッピング剤は第1レセプターをラフト環境外にあるように強いて、そのシグナル伝達能力を減少させることがある。

【0087】

本発明のレセプターカッピング剤はシグナル強度を高め、新規なシグナル伝達特性を実体化し、および/またはレセプターを、シグナル伝達がさらに効果的であるか、または効果的ではない環境に再配置する新しい非生理学的ヘテロメリックレセプター複合体を形成することがある。1つの実施形態において、本発明のレセプターカッピング剤は、TNFファミリーレセプターをTNFファミリーレセプターが通常見られない脂質ラフト中にもたらすために用いられる。別の実施形態において、レセプターカッピング剤はTNFファミリーレセプターを脂質ラフトの外側に再配置することができる。

【0088】

本発明のレセプターカッピング剤として、少なくとも2つの別個のTNFレセプターとヘテロメリック複合体を形成することのできる物質が挙げられる。レセプターカッピング剤は、2つの別個のTNFレセプターに向けられた少なくとも2つの結合特異性を有する。結合特異性として、レセプターシグナル伝達に影響を与える、例えば、レセプターシグナル伝達を増強または減少させる構成要素が挙げられる。本発明のレセプターカッピング剤を調製するために用いることのできる結合特異性物質の例として、抗体、その抗原結合フラグメント、TNFレセプターに対するリガンド、またはそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0089】

(A. 抗体)

1つの実施形態において、本発明のレセプターカッピング剤は、TNFレセプターファミリーメンバーを対象とする少なくとも2つの抗体またはその抗原結合フラグメントを含むか、またはそれに由来する結合特異性または結合特異的部分を含む。二官能性構築物であるレセプターカッピング剤は、目的のTNFレセプターに対する親抗体から得られた配列を含み得る。2つのTNFレセプターを組合せて、活性化することのできる二官能性構築物は、2つの別個のTNFレセプターを活性化する能力を実体化することで、2つの抗体を1つの医薬混合物にまとめる煩わしさといった医薬製造の観点からの複雑な製法をさけるため、これら構築物は新しい方法を提供する。

【0090】

1つの実施形態において、レセプターカッピング剤は、TNFファミリーレセプターのアゴニストからなる多価構築物であり、レセプターカッピング剤は各レセプターに結合することができ、かつ活性化シグナルを誘導することができる少なくとも2つのドメインを含む。本発明の抗体構築物は、TNFファミリーレセプターへの結合に特異的な抗原認識部位を構成する1つ以上の可変領域を含む重鎖およびTNFファミリーレセプターに特異的な抗原認識部位を構成する2つ以上の可変領域を含む軽鎖を含むことができる。抗体構築物は、別個のTNFファミリーレセプターへの結合に特異的なCDRを含む2つ以上の可変領域を含む重鎖または軽鎖のみを含むように構築してもよい。1つの実施形態において、多価抗体はTRAIL-R2およびLT-Rに結合することができる抗原結合部位または結合部分を含む。

【0091】

1つの態様において、本発明は、LT-RおよびTRAIL-R2アゴニスト等の、しかし、これらに限定されないTNFレセプターアゴニストである多価抗体構築物を提供す

10

20

30

40

50

る。1つの実施形態において、多価抗体構築物はLT-Rエピトープに特異的な少なくとも1つの抗原認識部位を含む。別の実施形態において、多価抗体構築物はTRL-R2エピトープに特異的な少なくとも1つの抗原認識部位を含む。ある実施形態では、抗原認識部位の少なくとも1つがscFv領域内に置かれるが、別の実施形態では、すべての抗原認識部位がscFv領域に置かれる。

【0092】

ある実施形態において、レセプターカップリング剤は二特異性である。他の実施形態において、構築物は、LT-RエピトープおよびTRL-R2エピトープ等の、しかし、これらに限定されないレセプターのTNFファミリーの少なくとも2つのメンバーに特異的である。多特異的構築物のいずれにおいても、少なくとも1つの抗原認識部位はscFvドメインに置かれてよく、ある実施形態では、すべての抗原認識部位はscFvドメインに置かれてよい。さらに別の実施形態において、本発明の抗体構築物は配列番号5および配列番号7(LT-BS1構築物)に記載されたポリヌクレオチド配列を含む。10

【0093】

抗原認識部位または全可変領域を含む結合特異性または結合特異部分は1つ以上の親抗体に由来するものであってよい。親抗体としては、天然の抗体または抗体フラグメント、天然の抗体から改作された抗体または抗体フラグメント、抗体の配列を用いて新たに構築された抗体またはLT-ベータレセプターに特異的であることが知られている抗体フラグメントを挙げることができる。親抗体に由来し得る配列として、重鎖および/軽鎖可変領域および/またはCDR、フレームワーク領域またはその他の部分が挙げられる。本発明の1つの実施形態において、レセプターカップリング剤を生成するために使用される親抗体は、抗TRL-R2抗体(例えば、14A2)および抗LT-R抗体(例えば、CB11)である。20

【0094】

多価の多特異的抗体は、2つ以上の可変領域を含む重鎖および/または1つ以上の可変領域を含む軽鎖を含み得、該可変領域の少なくとも1つはLT-ベータレセプター上の異なるエピトープを認識する。

【0095】

多価抗TNFレセプター抗体を含むレセプターカップリング剤は、ネズミまたはヒト化BHA10(WO04/002431; Brownningら、(1995)J. Immunol. 154:33; Brownningら、(1996)J. Exp. Med. 183:867も参照)、ネズミまたはヒト化CB11(それぞれ米国特許第6,312,691号およびWO02/30986)および/または親抗TRL-R2ネズミまたはキメラ14A2(配列番号1および配列番号3を参照)等の親抗LT-R抗体に由来する多様な異なる配列を用いて多様な異なる方法で作ってよい。30

【0096】

本発明のレセプターカップリング剤のために用いることのできるネズミの抗LT-R抗体の例として、BKA11、CDH10、BCG6、AGH1、BDA8、CB11およびBHA10が挙げられる。抗体構築物配列が由来する抗LT-R抗体を生成するためには、モノクローナル抗LT--R抗体を產生する下記のハイブリドーマ細胞株を用いてよく、これら細胞株はブタペスト条約の規則にしたがって既にアメリカンタイプカルチャコレクション(ATCC)に寄託されており、以下に示すATCC受託番号が付与されている:40

【0097】

【数1】

| <u>細胞株</u> | <u>mAb名</u> | <u>受託番号</u> |
|----------------|-------------|-------------|
| a) AG.H1.5.1 | AGH1 | HB 11796 |
| b) BD.A8.AB9 | BDA8 | HB 11798 |
| c) BC.G6.AF5 | BCG6 | B 11794 |
| d) BH.A10 | BHA10 | B 11795 |
| e) BK.A11.AC10 | BKA11 | B 11799 |
| f) CB.E11.1 | CBE11 | B 11793 |
| g) CD.H10.1 | CDH10 | B 11797 |

10

20

30

本発明と併せて用いることのできるヒト化抗LT-R抗体の例として、ヒト化CB E 1 1 およびヒト化B H A 1 0 が挙げられる。抗体構築物配列が由来する抗LT-R抗体を生成するために下記ハイブリドーマ細胞株を用いてよく、これら細胞株はブタペスト条約の規則にしたがって既にアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)に寄託されており、以下に示すATCC受託番号が付与されている：PTA - 3357 および 3765 (ヒト化CB E 1 1 ; WO 02 / 30986 を参照) および PTA - 4726 (ヒト化B H A 1 0 ; WO 04 / 002431 を参照)。

【0098】

本発明のレセプターカップリング剤と適合性のある抗TNFレセプター抗体の他の例は、デスドメインを含むTNFレセプターに対する抗体に由来するものであってよい。多くの抗体がデスドメインを含むTNFレセプターに対して生成されており、当該分野で公知である。そのような抗体として、抗TNF - R 1 モノクローナル抗体 (R & D Systems抗TNF - R 1 ; Tularik mAb # 985 、米国特許第6,110,690号、第6,437,113号) 、抗FasレセプターmAb CH - 11 (米国特許第6,312,691号; WO 95 / 10540) 、抗DR3抗体 (米国特許第5,985,547号; Johnson, et al. , (1984) Immunobiology of HLA , ed. Dupont, B.O. , Springer , New York ; 米国特許第6,462,176号、第6,469,166号) および抗TRAIL - R抗体 (米国特許第5,763,223号、第6,072,047号、第6,284,236号、第6,521,228号、第6,569,642号、第6,642,358号および米国特許第6,417,328号) が挙げられる。

【0099】

多くの抗体が組織分化に関与するTNFレセプターに対しても生成されており、当該分野で公知である。組織分化に関与するTNFレセプターに特異的な抗TNFレセプター抗体の例として、抗RANKモノクローナル抗体 (Immunex - 米国特許第6,562,948号、第6,537,763号、第6,528,482号、第6,479,635号、第6,271,349号、第6,017,729号; Komeda - WO 03 / 080671) 、抗EDARポリクローナル (抗ヒト) およびモノクローナル (抗マウス) 抗体 (R & D Systems - MAB 745 、 BAF 157 ; Elomaaら (2001) Human Molecular Genetics . 10 : 953) 、抗XEDARモノクローナルおよびポリクローナル抗体 (R & D Systems - MAB 1093 および AF 1093) 、抗Fn14モノクローナル抗体 (Nakayamaら (2003) J. Immunology 170 : 341 ; eBioscience から入手可能なITEM - 1 、ITEM - 2 およびITEM - 4 クローン) 、抗TROY抗体 (Sigma - Aldrich から入手可能なT3323) および抗NGFR (抗げっ歯類) 抗体 (Chemicon米国) が挙げられる。

40

50

【0100】

多くの抗体が免疫調節に関するTNFレセプターに対しても生成されており、当該分野で公知である。免疫調節に関するTNFレセプターに特異的な抗TNFレセプター抗体の例として、免疫調節レセプターに対して生成された多くの他の抗体のなかでも、抗HVE M抗体(HGS I - WO 03 / 086301)、抗CD40抗体(Biogen-WO 97 / 20063; Chiron-米国特許第5,677,165号、第5,874,082号、第6,004,552号、第6,056,959号、第6,315,998号;米国出願公開第2002 / 0106371号;米国出願公開第2003 / 0059427号、第US20030118588A1号、第2003 / 0211100A1号、第US2002020142358A1号;米国特許第US6312693号、第US6051228号; Fanslowら-US5801227)、抗4-1BB(PCT公開第WO 03 / 084999; EP0948353;米国特許第6210669号; Genecraft-WO 03 / 083069)および抗BAFF-R抗体(ウサギポリクローナル-ProSciカタログ#3097)が挙げられる。

【0101】

TNFレセプターに対する多価構築物は、例えば、PCT国際出願第PCT / US 86 / 02269号、欧洲特許出願第184,187号、欧洲特許出願第171,496号、欧洲特許出願第173,494号、PCT国際公開第WO 86 / 01533号、米国特許第4,816,567号、欧洲特許出願第125,023号; Betterら、(1988)Science 240:1041-1043; Liuら、(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liuら、(1987)J. Immunol. 139:3521-3526; Sunら(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimuraら、(1987)Cancer Res. 47:999-1005; Woodら(1985)Nature 314:446-449; Shawら、(1988)J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559); Morrison(1985)Science 229:1202-1207; Oiら、(1986)Biotechniques 4:214; 米国特許第5,225,539号; Jonesら、(1986)Nature 321:552-525; Verhoevenら、(1988)Science 239:1534; Beidlerら、(1988)J. Immunol. 141:4053-4060; ならびにWinterおよびMilstein、(1991)Nature 349:293-99)に記載のように慣用の組換えDNA技術を用いて当業者によって開発されてもよい。好ましくは、非ヒト抗体は、非ヒト抗原結合ドメインをヒト定常ドメインに連結することにより「ヒト化」される(例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号; Morrisonら(1984)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81:6851-55)。

【0102】

多価抗TNFレセプター抗体構築物を調製するために用いてよい他の方法は、下記刊行物: Ghetieら(2001)Blood 97:1392-1398; Wolffら(1993)Cancer Research 53:2560-2565; Ghetieら(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. 94:7509-7514; Kimら(2002)Int. J. Cancer 97(4):542-547; Todorovskaら(2001)Journal of Immunological Methods 248:47-66; Colomarら(1997)Nature Biotechnology 15:159-163; Zuoら(2000)Protein Engineering(補遺)13(5):361-367; Santosら(1999)Clinical Cancer Research 5:3118s-3123s; Presta(2002)Current Pharmaceutical Biotechnology 3:237-256; van Sprielら(2000)Review Immunology Today 21(8)391-397に記載されてい

10

20

30

40

50

る。

【0103】

(B. TNFリガンド)

本発明のレセプターカッピング剤は、少なくとも2つの慣用のTNFファミリーリガンドをともに結合させる結合特異性も有する。TNFファミリーリガンドの例として、TNF-(NP_000585.2、GI No. 25952111)LT-、(NP_000586.2、GI No. 6806893)、FasL(NP_000630; GenBank GI No. 4557329)、APO-3L(NP-003800、GI No. 4507597; NP_694557、GI No. 23510441)、TRAIL(APO-2L、NP_003801、GI No. 4507593)、RA 10 NKL(TNFSF11、NP_003692、GI No. 4507595; NP_143026、GI No. 14790152)、EDAR1&XEDARリガンド(ED 1、NP_001390、GI No. 4503449; Monrealら(1998)Am J Hum Genet. 63:380)、Fn14リガンド(APO-3L/TWEAK)、Troy/TradeリガンドNGF(NGF-、NP_002497、GI No. 4505391)、NGFファミリー(NGF-2/NTF3、NP_002518、GI No. 4505469; NTF5、NP_006170、GI No. 5453808; BDNF:NP_001700、GI No. 25306267; NP_733927、GI No. 25306235; NP_733928、GI No. 25306253; NP_733929、GI No. 25306257; NP_733930、GI No. 25306261; NP_733931、GI No. 25306264; IFRD1、NP_001541、GI No. 4504607)、TNFR1Iリガンド(TNF、上記)、HVEMリガンド(NP_003798、GI No. 25952144; NP_742011、GI No. 25952147)、CD27L(CD 20 70抗原、NP_001243、GI No. 4507605)、CD30L(CD153、NP_001235、GI No. 4507607)、CD40L(CD154、NP_000065、GI No. 4557433)、4-1BB-L(ILAリガンド、NP_003802、GI No. 4507609)、OX40L(CD134L、NP_003317、GI No. 4507603)、GITRL(AITRL/TL6、NP_005083、GI No. 4827034)およびBAFF(TALL1、NP_006564、GI No. 5730097)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0104】

(C. 抗体/レセプター組合せ)

また、本発明のレセプターカッピング剤として、上記の抗TNFレセプター抗体およびTNFリガンドの組合せも挙げられる。例えば、レセプターカッピング剤は、2つの三量体リガンドと3つの抗体または高次複合体とを有する分子を生成する形におけるTNFファミリーレセプターに対する抗体に結合させたりガンド-Fc構築物の組合せを含み得る。1つの実施形態において、第1の結合特異性は、3つの二量体Fcドメインおよび6つのリガンド分子から共通して形成される少なくとも2つの三量体リガンド-Fc構築物を含む。この場合、第2の結合特異性は3つの抗体分子からなるだろう。また、本発明は、TNFファミリーレセプターの抗体に結合させたTNFファミリーレセプターに対する慣用のリガンド(Ig融合タンパク質ではない)の組合せも含む。

【0105】

(IV. レセプターカッピング剤の製造方法)

TNFレセプターの組合せに向けられたレセプターカッピング剤の有効性は、細胞傷害または増殖阻害を評価するインビトロアッセイ、軟寒天コロニー形成アッセイおよび三次元腫瘍培養系等、標準的なアッセイ(例えば乳癌のために確立したもの等)により評価することができる。有効性はインビオ異種移植片モデルによっても検証することができる。ヒトの肺、肝臓および内皮の初代細胞株の使用は全体の毒性のインビトロ予測を可能にする。通常、誘導されたアポトーシスおよびVCAMまたはICAM等の表面接着分子の

10

20

30

40

50

50

表示は潜在的なマーカーとして働く。例えば、IL-8および/またはIP-10は、有害でありうる炎症促進性プログラムの毒性または誘導の良好なマーカーとして働く。

【0106】

本発明のレセプターカッピング剤を試験するために使用することのできる癌細胞株は当該分野に公知である。結腸直腸癌の標準モデルにしばしば用いられる細胞株の例として、例えば、TNFレセプター活性化剤評価用のHT29細胞株が挙げられる。この細胞株は2つの変異体であるHT29およびWiDrとして存在し、HT29細胞株が、潜在的な新しい化学療法剤のためのスクリーニングパネルにおいて米国立癌研究所により使用されてきた。それ自体として、幾つかの抗癌剤の可能性を評価するのに良好な道具である。他の結腸直腸細胞株の例として、KM20L2、LS174TおよびCACO-2が挙げられる。レセプターカッピング剤の有効性を試験するために使用できる乳癌細胞株の例として、MCF7およびMDA231が挙げられる。レセプターカッピング剤の有効性を試験するために使用できる子宮頸部癌細胞株の例として、HeLaおよびME180が挙げられる。さらに、メラノーマ細胞株の例としてA375が挙げられ、横紋筋肉腫の例としてRDが挙げられ、肉腫細胞株の例はSAOS-2である。

10

【0107】

候補抗体構築物はその活性について多様な公知のアッセイを用いてスクリーニングしてよい。例えば、結合特異性を決定するスクリーニングアッセイはよく知られており、当該分野で慣用的に実施されている。そのようなアッセイの包括的な議論について、Harrowら(編集)、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL; Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1988年、第6章を参照されたい。下記例は、候補抗TRAIL-R2およびLT-Rアゴニスト抗体構築物によるレセプターカッピング剤活性化の有効性を決定するアッセイを提供する。

20

【0108】

上記のレセプターカッピング剤は薬学的組成物としての使用のために適当な純度まで精製してよい。一般的に、精製された組成物は、組成物中に存在するすべての種の約85%を超える1つの種を有するか、存在するすべての種の約85%、90%、95%、99%を超えるかまたはそれ以上の1つの種を有することがある。目的とする種は、本質的な均一(混入種が慣用の検出方法により組成物中に検出することができない)まで精製してよく、つまり、組成物が本質的に单一の種から構成されるまで精製してよい。当業者は、ここでの教示に照らして、タンパク質精製の標準的な技術、例えば、イムノアフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等を用いて本発明のポリペプチドを精製してよい。ポリペプチドの純度は、例えば、アミノ末端アミノ酸配列分析、ゲル電気泳動および質量分光分析等の当業者に公知の多くの方法により決定してよい。

30

【0109】

1つの実施形態において、本発明のレセプターカッピング剤は化学療法剤に連結させ相乗的に腫瘍容積を抑制することができる。本発明の抗体に連結させることのできる例示的な化学療法剤として、放射性複合体(90Y、131I、99mTc、111In、186Rhおよびその他)、腫瘍活性化プロドラッグ(メイタニシノイド類、CC-1065アナログ、クリケアミシン誘導体、アントラサイクリン類、ビンカアルカロイド類およびその他)、リシン、ジフェリア毒素、シュードモナス外毒素が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0110】

一部の実施形態において、本発明のレセプター結合多価抗体および抗体フラグメントは所望の効果を提供するために化学的に修飾してよい。例えば、本発明の抗体および抗体フラグメントのペグ化(pegylation)は、例えば、Focus on Growth Factors 3:4-10(1992); EPO154316; およびEPO401384(これらそれぞれを本明細書中に全体として参考として援用する)の参考文献に記載されているように当該分野で公知のペグ化反応のいずれかにより実施してよい。

50

好ましくは、ペグ化は反応性ポリエチレングリコール分子（または類似性のある反応性水溶性ポリマー）によるアルキル化反応またはアシル化反応により実施される。本発明の抗体および抗体フラグメントのペグ化に好ましい水溶性ポリマーはポリエチレングリコール（PEG）である。ここで用いられる「ポリエチレングリコール」は、モノ（C1-C1O）アルコキシ・またはアリールオキシ・ポリエチレングリコール等、他のタンパク質を誘導体化するために用いられてきたいずれかの形のPEGを包含することを意味する。

【0111】

本発明のペグ化抗体および抗体フラグメントの調製方法は、一般的に、(a)抗体または抗体フラグメントを、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体等のポリエチレングリコールと、抗体または抗体フラグメントが1つ以上のPEG基と結合するようになる条件下で反応させる工程および(b)反応生成物を得る工程からなるだろう。公知のパラメータおよび所望の結果に基づく最適反応条件またはアシル化反応を選択することは当業者に明らかであろう。

【0112】

ペグ化抗体および抗体フラグメントは、ここに記載の抗体および抗体フラグメントの投与により緩和または調節されうる症状を治療するために一般的に用いてよい。一般的に、ペグ化抗体および抗体フラグメントは、非ペグ化抗体や抗体フラグメントと比較して長い半減期を有する。ペグ化抗体および抗体フラグメントは単独、ともに、または他の薬学的組成物と組合せて用いてよい。

【0113】

本発明の他の実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントを、認知されている技術を用いて卵白に連結させる。本発明の別の実施形態において、多価抗体、またはそのフラグメントを修飾して、潜在的なグリコシル化部位を減少または除去する。そのような修飾抗体は「非グリコシル化」抗体としばしば呼ばれる。抗体またはその抗原結合フラグメントの結合親和性を向上させるために、抗体のグリコシル化部位は、例えば、突然変異誘発（例えば、部位特異的変異誘発）により変えることができる。「グリコシル化部位」とは糖残基結合の場所として真核細胞により認識されるアミノ酸残基をいう。オリゴ糖などの炭水化物が結合するアミノ酸は、通常、アスパラギン（N結合）、セリン（O結合）およびスレオニン（O結合）残基である。抗体または抗原結合フラグメント内に潜在的なグリコシル化部位を同定するために、抗体の配列は、例えばCenter for Biological Sequence Analysisにより提供されるウェブサイト（N結合グリコシル化部位を予想するために、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>を参照）およびO結合グリコシル化部位を予想するために、<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>を参照等の公に利用可能なデータベースを用いることにより調べられる。抗体のグリコシル化部位を変えるさらなる方法は米国特許第6,350,861号および第5,714,350号に記載されている。

【0114】

本発明のさらに別の実施形態において、多価抗体またはそのフラグメントであるレセプターカップリング剤を変えて、未修飾抗体に比較して少なくとも1つの定常領域媒介生物エフェクター機能を減少せしめるように抗体の定常領域を修飾することができる。本発明の抗体がFcレセプター(FcR)に対して低下した結合を示すように修飾するために、抗体の免疫グロブリン定常領域セグメントをFcR相互作用に必要な特定の領域において変異できる（例えば、Canfieldら（1991）J.Exp.Med.173:1483；およびLundら、（1991）J.of Immunol.147:2657を参照）。また、抗体のFcR結合能力の低減は、オプソニン化および食作用および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害等のFcR相互作用に依存する他のエフェクター機能も減少せることがある。

【0115】

特定の実施形態において、本発明は、エフェクター分子（例えば、補体またはエフェク

10

20

30

40

50

ター細胞上のレセプター)に結合する能力等の変化したエフェクター機能を有するレセプター結合多価抗体をさらに特徴とする。特に、本発明のヒト化抗体は、変化させた定常領域(例えば、Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸残基が異なる残基または側鎖に置換されることによりFcRに結合する抗体の能力を低減されているFc領域)を有する。また、抗体のFcR結合能力の低減は、オプソニン化および食作用および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害等のFcR相互作用に依存する、他のエフェクター機能も減少させることがある。1つの実施形態において、修飾ヒト化抗体はIgGクラスであり、例えば非修飾のヒト化抗体に比較して、該ヒト化抗体は変化したエフェクター機能を有するように少なくとも1つのアミノ酸残基置換をFc領域に含む。特定の実施形態において、本発明のヒト化抗体は、免疫原性が低くなるように(例えば、望ましくないエフェクター細胞活性、溶解または補体の結合を起こさないように)、および/またはLT-Rに対する特異性は保持しながら、さらに望ましい半減期を有するように変化させられたエフェクター機能を有する。

【0116】

もしくは、本発明は、FcR結合(例えば、Fc-R3結合)を増強するように定常領域を変えたレセプター結合多価ヒト化抗体を特徴とする。そのような抗体は、エフェクター細胞機能を調節するために(例えば、ADCC活性を高めるために)、例えば、特に本発明の癌研究用途での使用のために有用である。ここで用いられる「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「ADCC」とは、FcRを発現する非特異的な細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球およびマクロファージ)が標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介反応をいう。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞はFc-RIIIのみを発現する一方で、単球は、抗体のFc-RI、Fc-RIIおよびFc-RIII、例えば抗体と別の物質もしくは他の抗体との複合体を発現する。

【0117】

本発明の実施は他に特に示されない限り、当業者の範囲内にある細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の従来技術を用いることがある。そのような技術は文献に記載されている。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 第2版、Sambrook, FritschおよびManiatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989年); DNA Cloning, 第I巻、第II巻(Glover編集、1985年); Oligonucleotide Synthesis(Gait編集、1984年); Mullisら米国特許第4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization(Hames & Higgins編集、1984年); Transcription And Translation(Hames & Higgins編集、1984年); Culture Of Animal Cells(Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987年); Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press, 1986年); Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning(1984); 専門書であるMethods In Enzymology(Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J. H. MillerおよびM. P. Calos編集、1987年、Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology、第154巻、第155巻(Wuら編集), Immunological Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker編集、Academic Press、ロンドン、1987年); Handbook Of Experimental Immunology、第I巻~第IV巻(Weir and Blackwell編集、1986年); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring

10

20

30

40

50

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1986年)を参照されたい。muBHA10およびmuCBE11可変領域、マウス-ヒトBHA10およびCBE11キメラ抗体、作り変えられたBHA10およびCBE11可変領域、hubBHA10およびhubCBE11をコードする発現ベクター、五量体chCBE11抗体の生産ならびにそれらの精製およびアッセイ方法は、参考のためにここにその全体が援用される出願人の同時係属出願PCT公開第WO96/22788号、PCT公開第WO02/30986号、PCT出願第WO04/02431号およびWO04/058191に既に記載されている。

【0118】

(V. 薬学的組成物)

本発明は、上記のレセプターカップリング剤を含む薬学的組成物を提供する。ある実施形態において、薬学的組成物はさらに化学療法剤を含んでよい。1つの態様において、本発明は治療効果のある量の1つ以上の上記化合物を、1つ以上の薬学的に受容可能なキャリア(添加物)および/または希釈剤とともに処方して含む、薬学的に受容可能な組成物を提供する。別の態様のある実施形態において、本発明の化合物はそのまま投与しても、または薬学的に受容可能なキャリアとの混合物で投与してもよく、また他の化学療法剤と併せて投与してもよい。よって、包括(併用)療法は、最初に投与された有効化合物の治療効果が次の有効化合物が投与された時に完全になくならないように、活性化合物の順次投与、同時投与および別々の投与または共同の投与を含む。

【0119】

選択された投与経路には関係なく、適切な水和形で用いてよい本発明の化合物および/または本発明の薬学的組成物は当業者に公知の慣用の方法により薬学的に受容可能な投与形態に処方される。本発明の化合物は単独で投与できるが、この化合物を薬学的処方物(組成物)として投与することが望ましい。本発明による化合物は、他の医薬から類推して、ヒト医薬または動物薬に使用するのに便利な方法で投与されるように処方してよい。

【0120】

以下詳細に説明するように、本発明の薬学的組成物は、(1)経口投与、例えば、ドレンチ(水性溶液もしくは非水性溶液または懸濁液)、錠剤(例えば、顆粒、舌下および全身吸収を目的とする錠剤、ボーラス、粉剤、顆粒、舌投与用ペースト；(2)非経口投与(例えば、滅菌溶液または懸濁液または持続放出処方物として、例えば皮下、筋内、静脈内または硬膜外注射による非経口投与)；(3)皮膚に適用される、例えばクリーム、軟膏または制御放出パッチまたはスプレーとしての局所適用；(4)例えば、ベッサリー、クリームまたはフォームとしての膣内投与または直腸内投与；(5)舌下；(6)眼；(7)経皮的；または(8)鼻等に適合させた薬学的組成物等の固体または液体の形態での投与のために特別に処方してもよい。1つの実施形態において、薬学的組成物は非経口投与用に処方される。1つの実施形態において、薬学的組成物は動脈内注射用に処方される。別の実施形態において、薬学的組成物は全身投与用に処方される。

【0121】

別の場合において、本発明の化合物は1つ以上の酸性官能基を含んでよいため、薬学的に受容可能な塩基と薬学的に受容可能な塩を形成することができる。

【0122】

潤滑剤、乳化剤および滑剤(例えばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム)、ならびに着色剤、離型剤、コーティング剤、甘味料、香味剤および香料、防腐剤および酸化防止剤も組成物中に存在させてよい。

【0123】

本発明の処方物として、経口、鼻、局所(口腔および舌下等)、直腸、膣および/または非経口投与に適する処方物が挙げられる。処方物は便利には単位投与量形で示されてよく、薬学の分野で周知の方法により調製してよい。単一の投与形を生成するためにキャリア材料と組合せてよい活性成分の量は、治療するホスト、投与の特定の態様に基づいて変えられる。単一の投与形を生成するためにキャリア材料と組合せてよい活性成分の量は、

10

20

30

40

50

通常は治療効果を生む化合物の量である。

【0124】

本発明の化合物の経口投与の液体投形として、薬学的に受容可能な乳濁液、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシリル剤が挙げられる。活性成分に加えて、液体投与形は、例えば、水または他の溶媒、溶解補助剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1，3-ブチレングリコール、オイル（特に綿実油、ラッカセイ油、コーンオイル、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ソルビタンのポリエチレングリコールおよび脂肪酸エステル、およびそれらの混合物等の通常この分野で用いられる不活性希釈剤を含んでよい。不活性希釈剤に加えて、経口組成物は、湿潤剤、乳化剤および懸濁化剤、甘味剤、香味剤、着色剤、香料および防腐剤等のアジュバントを含んでもよい。活性化合物に加えて、懸濁液は、例えば、エトキシリ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカント、およびそれらの混合物等の懸濁化剤を含んでよい。10

【0125】

経口投与に適する本発明の処方物は、活性成分として所定量の本発明の化合物をそれぞれ含むカプセル、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ（通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカント等の味をつけた基剤を用いる）、粉剤、顆粒剤の形態であるか、または水性もしくは非水性液体中の溶液または懸濁剤として、または水中油型もしくは油中水型の液体エマルジョンとして、またはエリキシリル剤もしくはシロップとして、またはトローチ（ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアカシア等の不活性基剤を用いる）として、および／またはうがい薬等であってよい。本発明の化合物は大きな丸薬、舐剤またはペーストとして投与してもよい。20

【0126】

経口投与用の本発明の固体投与形（カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、粉剤、顆粒剤等）において、活性成分は、クエン酸ナトリウムまたはリン酸2カルシウム等の1種類以上の薬学的に受容可能なキャリアおよび／または以下のいずれかと混合される：（1）デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸等の充填剤または增量剤；（2）例えば、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアカシア等の結合剤；（3）グリセロール等の保湿剤；（4）寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある種のケイ酸塩および炭酸ナトリウム等の崩壊剤；（5）パラフィン等の溶液緩染剤；（6）四級アンモニウム化合物等の吸収促進剤；（7）例えば、セチルアルコール、グリセロールモノモステアレートおよび非イオン性表面活性剤等の湿潤剤；（8）カオリンおよびベントナイトクレイ等の吸収剤；（9）タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウムおよびそれらの混合物等の滑剤；および（10）着色剤。カプセル、錠剤および丸剤の場合、薬学的組成物は緩衝剤を含んでもよい。類似の種類の固体組成物は、ラクトースまたは乳糖等の賦形剤、ならびに高分子量のポリエチレングリコール等を用いる軟質シェルまたは硬質シェルのゼラチンカプセル中に增量剤として用いてよい。30

【0127】

錠剤は、任意に1つ以上の副成分とともに圧縮または成形により作ってよい。圧縮錠剤は、バインダー（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、防腐剤、崩壊剤（例えば、ナトリウムデンプングリコール酸塩または架橋ナトリウムカルボキシメチルセルロース）、表面活性剤または分散剤を用いて調製してよい。成形錠剤は、不活性な液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を適当な機械で成形することによって作ってよい。錠剤、および本発明の薬学的組成物の他の固形剤型、例えば、糖衣錠、カプセル、丸薬、および顆粒は、コーティングおよびシェル（例えば、40

医薬処方技術分野で周知の腸溶コーティングや他のコーティング)を用いて任意に評価または調製してよい。それらは、希望の放出性、他の重合体マトリクス、リポソームおよび/または小球体を提供するために、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロースを種々の比率で用いて、活性成分の遅いまたは制御された放出を提供するように処方してもよい。迅速な放出のために処方してもよく、例えば凍結乾燥される。例えば、細菌を保持するフィルタによる濾過によるか、または使用の直前に滅菌水または他の注射可能な無菌媒体に溶解してよい無菌の固体組成物の形で殺菌剤を配合することにより滅菌してよい。これらの組成物は任意に不透明化物質を含んでよく、活性成分のみ、または優先的に胃腸管の特定の部分で、任意に遅延して放出する組成を有してもよい。使用してよい包埋組成物の例として、高分子物質および蟻が挙げられる。活性成分は、適当であれば、上記賦形剤の1種類以上を有するマイクロカプセル化された形にあってもよい。

10

20

30

40

50

【0128】

本発明の化合物の局所的または経皮的な投与のための剤型として、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチおよび吸入剤が挙げられる。活性化合物は無菌条件下に薬学的に許容性のあるキャリアおよび必要とされ得る防腐剤、緩衝剤または高圧ガスと混合してよい。軟膏、ペースト、クリームおよびゲルは、本発明の活性化合物に加えて、動物脂肪や植物脂肪、オイル、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛、またはそれらの混合物等の賦形剤を含んでよい。粉末とスプレーは、本発明の化合物に加えて、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末またはこれら物質の混合物等の賦形剤を含むことができる。スプレーはさらに、クロロフルオロハイドロカーボン、およびブタンやプロパン等の揮発性未置換ハイドロカーボン等の慣用の高圧ガスを含むことができる。

【0129】

非経口的投与に適する本発明の薬学的組成物は、糖、アルコール、酸化防止剤、緩衝剤、静菌薬、またはこの処方物を意図する受容者の血液と等張にする溶質、または懸濁剤か増粘剤を含んでよい、1種類以上の薬学的に許容できる無菌等張の水性または非水性溶液、分散液、懸濁液または乳濁液、または使用直前に注射可能な滅菌溶液または分散液に再構築してよい滅菌粉末と組み合わせた本発明の1つ以上の化合物を含む。これらの組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤等のようなアジュバントを含んでもよい。多様な抗菌剤や抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等を包含させることにより本発明の化合物に対する微生物の作用を確実に防止することができるだろう。また、糖、塩化ナトリウム等の等張剤を組成物に含有させるのも望ましいだろう。さらに、注射可能な薬物形の長期の吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅らせる物質を包含されることによりもたらされることがある。

【0130】

いくつかの場合で、医薬の効果を長引かせるために、皮下または筋肉内注射からの医薬の吸収を遅くすることが望ましい。これは、水溶性に乏しい結晶性または無定形材料の液体懸濁物を使用することにより達成できる。医薬の吸収の速度は、従ってその溶解速度に依存し、この溶解速度は結晶サイズと結晶形とに依存することがある。もしくは、非経口投与の医薬形の吸収の遅延は、医薬を油性ビヒクリに溶解または懸濁することにより達成される。注射可能な貯蔵形は、ポリラクチド-ポリグリコリド等の生分解ポリマー中に本発明の化合物のマイクロカプセル化マトリックスを形成することにより生成される。医薬に対するポリマーの比率、および使用される特定のポリマーの性質に基づいて、医薬放出の速度が制御できる。他の生物分解ポリマーの具体例として、ポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)が挙げられる。貯蔵形の注射可能な処方物はまた、体組織に適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョンに医薬を取り込むことによっても調製される。

【0131】

(V I . 投与方法とデバイス)

本発明の薬学的組成物は、皮下注射器、多室注射器、ステント、カテーテル、経皮パッチ、マイクロニードル、マイクロアブレーダーおよび移植可能な制御放出デバイスを含む多様な医薬送達デバイスを用いて投与してもよい。1つの実施形態において、医薬送達デバイスは、少なくとも有効量のレセプターカップリング剤を含むか、またはそれを装填することができる。そのようなデバイスは送達前にデバイス内に抗体構築物の凍結乾燥形を再構成する能力を有することがある。一部の実施形態において、医薬送達デバイスは、少なくとも有効量のレセプターカップリング剤と有効量の化学療法剤を含むか、またはそれらを装填することができる。デバイスは、一部の実施形態において、レセプターカップリング剤と化学療法剤を同時に送達もしくは投与できるものであってよい。デバイスはこのデバイスによる投与前に抗体構築物と化学療法剤を混合する能力を有することがある。さらに別の実施形態において、デバイスはアゴニスト抗体構築物および化学療法剤を連続的に投与できることがある。

10

20

【0132】

1つの医薬送達デバイスは注射前に2つの化合物を混合またはそれらを順次に送達することのできる多室のシリンジである。典型的な二室シリンジと、前充填されたそのようなシリンジの自動化製造方法は、 Neue Verpackung, No. 3, 1988, p. 50 - 52; Drugs Made in Germany, Vol. 30, pag. 136 - 140 (1987); Pharm. Ind. 46, Nr. 10 (1984) p. 1045 - 1048 および Pharm. Ind. 46, Nr. 3 (1984) p. 317 - 318 に開示されている。シリンジタイプのアンプルは、ニードル取付け用フロントボトルタイプ、2つのピストン、および前室内の凍結乾燥粉剤を後部室内の再構成用液体と混合するための外側のバイパスを有する二室デバイスである。記載されたプロセスは、シリンジ容器を洗浄、シリコン処理し、複数の容器を搬送トレイに入れ、滅菌し、中間ピストンを容器後端から導入し、トレイをひっくり返し、粉末溶液を前部の開口から導入し、乾燥粉末になるまで凍結乾燥し、凍結乾燥室にあるうちに前部の開口を閉じ、トレイを回転させ、再構成液体を容器後端から導入し、後部ピストンを挿入し、トレイから生成物を取り出し、最終的な調節と包装をする主要な工程を含む。多様な成分を前充填したアンプルはシリンジを用いる使用のために製造してよい。

20

30

【0133】

別の実施形態において、多室シリンジは Lyo-ject システム (Vetter Pharma Turm, Yardley, ペンシルベニア州) である。Lyo-Ject により、使用者は、迅速な再構築および注射のために希釈剤が詰められたシリンジ中で医薬を直接凍結乾燥することができる。それは米国特許第 4,874,381 号および第 5,080,649 号に記載されている。

30

40

【0134】

別の実施形態において、化合物は、2つの分離したシリンジ、カテーテル、マイクロニードル、または注射を達成することのできる他のデバイスを用いて投与される。

40

【0135】

本発明の薬学的組成物は、侵された組織または血流中、またはその近く、さもなければそれに連通して置かれたミクロスフィア、リポソーム、他の微粒子送達システムまたは持続放出処方物を用いて投与してもよい。持続放出キャリアの適当な例として、坐剤またはマイクロカプセル等の造形品の形の半透性ポリマー・マトリックスが挙げられる。移植可能であるか、または微粒子の持続放出マトリックスとして、ポリラクチド (米国特許第 3,773,319 号; EP 58,481)、L-グルタミン酸とガンマ-L-グルタミン酸エチルとの共重合体 (Siddmanら、(1985) Biopolymers, 22: 547 - 56) ; ポリ (2-ヒドロキシエチル-メタクリレート) またはエチレン酢酸ビニル (Langerら、(1981) J. Biomed. Mater. Res. 15: 167 - 277; Langer, (1982) Chem. Tech., 12: 98 - 105) が挙げられる。

50

【0136】

本発明の組成物は扱われる特定の臨床症状を治療するために効果的な投与量で投与されることがある。好ましい医薬処方物および所与の適用のための治療有効性のある投薬レジメンの決定は、例えば、患者の状態と体重、望まれる治療の程度および治療に対する患者の耐性を考慮すれば十分に当該分野の範囲内にある。

【0137】

経皮パッチは本発明の化合物の体への制御送達を提供する別の利点を有する。そのような剤形は化合物を適当な媒体に溶解または分散させることにより生成することができる。吸収促進薬は化合物の経皮膚の流れを高めるように用いることもできる。そのような流れの速度は速度調節膜を提供するか、もしくは化合物をポリマーマトリックスまたはゲル中に分散させることにより制御することができる。

10

【0138】

(VII. 治療方法)

したがって、本発明は、任意に上記の送達デバイスを用いて、有効量の薬学的組成物を被験体に投与することを包含する癌を治療する新規な治療方法をさらに提供する。本発明の方法は固形腫瘍の治療等の、しかし、これらに限定されない癌の治療に用いてよい。本発明の化合物により治療することのできる固形腫瘍の例として、乳、精巣、肺、卵巣、子宮、頸部、膵臓、非小細胞肺(N S C L C)、結腸、ならびに前立腺、胃(gastric)、皮膚、胃(stomach)、食道および膀胱癌等が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態において、本方法は有効量の本発明の薬学的組成物を被験体に非経口的に投与することを包含する。1つの実施形態において、本方法はこの組成物を被験体に動脈内投与することを包含する。別の実施形態において、本方法は有効量のこの組成物を被験体の腫瘍の動脈血液供給に直接投与することを包含する。1つの実施形態において、本方法はカテーテルを用いて有効量のこの組成物を癌性腫瘍の動脈血液供給に直接投与することを包含する。カテーテルを用いてこの組成物を投与する実施形態において、カテーテルの挿入は蛍光透視または当該分野で公知のカテーテル挿入を案内または観察する他の方法により観察および/または案内してよい。別の実施形態において、本方法は化学塞栓形成を含む。例えば、化学塞栓形成は、樹脂様材料をオイル基剤(例えば、エチオドール中のポリビニルアルコール)および1つ以上の化学療法剤に混合して構成される組成物によって、癌性腫瘍に供給する血管をロックすることを包含しえる。さらに別の実施形態において、本方法は被験体へのこの組成物の全身投与を包含する。

20

【0139】

一般的に、本発明の薬学的組成物を利用する化学塞栓形成術または直接の動脈内または静脈内注射治療は、注射部位に関わらず通常は類似の方法で実施される。簡単に説明すれば、X線写真が撮られる際、塞栓を起こさせる領域の血管造影法(血管の道筋)またはさらに具体的にはある実施形態においては動脈造影法を、まず挿入されたカテーテルにより放射不透明性造影剤を(塞栓を起こさせるか、または注射する部位に基づいて)動脈または静脈に注入することにより、実施してよい。カテーテルを経皮的または手術により挿入してよい。次に、血流が止まることが観察されるまで、本発明の薬学的組成物をカテーテルを通して還流することにより血管に塞栓を起こさせてよい。血管造影を繰り返すことにより閉塞を確認してよい。直接の注入が用いられる実施形態では、次に血管に本発明の薬学的組成物が所望の投与量で注入される。

30

【0140】

一般的に、塞栓形成療法は、結果的に、阻害剤を含む組成物を治療すべき腫瘍または血管塊の間隙の至るところに分布させる。動脈腔を詰まらせる塞栓性粒子の物理的な大きさは血液供給の閉塞をもたらす。この効果に加えて、抗脈管形成因子の存在は、腫瘍または血管塊に供給する新しい血管の形成を妨げて、血液供給を切断するという活力低下効果を増強する。一般的に、直接的な動脈内または静脈内注射も同じく、結果的に、阻害剤を含む組成物を治療すべき腫瘍または血管塊の間隙の至るところに分布させる。しかし、通常は、血液供給がこの方法で閉塞されるとは予測されない。

40

【0141】

50

本発明の1つの態様内において、肝臓または他の組織の原発腫瘍および二次性腫瘍は、塞栓形成または直接の動脈内または静脈内注射療法を利用して治療してよい。簡単に説明すれば、カテーテルを大腿動脈または上腕動脈を経て、蛍光透視の案内に基づいて動脈系を通して走査することにより肝臓動脈に進める。このカテーテルは、正常な構造に供給を行うできるだけ多くの動脈枝を傷付けないようにしながら、腫瘍に供給する血管の完全な閉塞を可能とするのに必要である限り肝臓動脈樹内に進める。理想的には、これは肝臓動脈の分節的な分岐であるが、胃十二指腸動脈の基点より遠位の全肝臓動脈、または複数の別々の動脈でさえもが腫瘍の程度およびその個々の血液供給に基づいてブロックされる必要がある可能性が在る。望ましいカテーテルの位置がいったん達成されたら、遮断すべき動脈の流れが止まるまで、好ましくはなおも5分間の観察後に、(上記のように)組成物を動脈カテーテルを通して注入することにより動脈を閉塞する。動脈の閉塞は、放射不透明性造影剤をカテーテルを通して注入し、蛍光透視またはX線フィルムによって、造影剤で以前満たされた血管がもはやそうではないことを示すことにより確認してよい。直接的な注入が用いられる実施形態において、(上記のように)組成物を動脈カテーテルを通して所望の用量で注入することにより動脈に注ぎ込む。同じ操作を、閉塞すべき各栄養動脈で繰り返してよい。

10

20

30

40

50

【0142】

ほとんどの実施形態において、本発明の組成物は、患者に治療効果のある量の配合治療剤または他の物質を予防上または治療上の処置の一部として投与するのに十分な量で送達されるように単一または複数の物質を配合してよい。粒子内の活性化合物の望ましい濃度は、医薬の吸収、不活性化および排泄率ならびに化合物の送達速度に依存することがある。用量値は緩和すべき障害の重症度によっても変わることに注意されたい。特定の被験体のために、特定の投薬レジメンは個々の必要性、および組成物を投与するかまたは組成物投与を管理する人の専門的な判断力にしたがって経時的に調節しなければならないことにもさらに理解されるべきである。典型的には、投与量は当業者に公知の技術を用いて決定される可能性がある。選択された用量レベルは、使用される本発明の特定の化合物またはそのエステル、塩またはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される特定の化合物の排出率または代謝、治療時間、他の医薬、使用される特定の化合物と組合せて用いられる化合物および/または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康および前の病歴、および医学分野で周知の類似の因子等の多様な因子に基づくことがある。

【0143】

用量は患者の体重1kgあたり組成物の量に基づく。他の量は当業者に公知であり、容易に決定され得る。もしくは、本発明の用量は組成物の血漿濃度を参照して決定してもよい。例えば、最大血漿濃度(Cmax)および時間0から無限までの血漿濃度-時間曲線下面積(AUC(0-4))を用いてもよい。本発明の用量として、CmaxおよびAUC(0-4)について上記値を生じる用量およびこれらのパラメータに対して大きいか、小さい値をもたらす他の用量が挙げられる。

【0144】

通常の技量を有する医師または獣医は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる。例えば、医師または獣医は、薬学的組成物に使用される本発明の化合物の投与量を、所望の治療効果を達成するために必要とされるよりも低いレベルから始めて、所望の効果が達成されるまで用量を徐々に上げることができよう。

【0145】

一般的に、本発明の化合物の適当な1日用量は、治療効果を生むのに有効な最も低い投与量である化合物の量になる。一般に、そのような効果的な投与量は上記因子に依存する。所与の患者において最も効果的な治療を生む投与の正確な時間および任意の特定化合物の量は、特定化合物の活性、薬物動態学および生物利用性、患者の生理学的状態(年齢、性別、障害のタイプおよび段階、一般的な健康状態、所定の用量に対する応答性および薬物療法のタイプ等)、投与経路等に依存することがある。ここで紹介する指針は、治療を最適化するため(例えば最適時間および/または投与の量を決定するため)に用いてよく

、これらは被験体のモニタリング、用量の調節および／または時間的調節からなる慣用的な実験を必要とするだけである。

【0146】

被験体が治療されている間、関連する指標の1つ以上を一定の時点で24時間測定することにより患者の健康をモニタリングしてよい。サプリメント、量、投与時間および処方等の治療はそのようなモニタリングの結果にしたがって最適化してよい。患者は同じパラメータを測定することにより改善の程度を決定するために定期的に再評価してよく、そのような最初の再評価は通常は治療の開始から4週間の終わりに行い、その後の再評価は治療中の4～8週間毎に、さらにその後は3ヶ月間毎に行う。治療は数ヶ月間からさらに数年間続けてもよく、最低1ヶ月間がヒトの通常の治療期間である。投与される物質の量の調節および場合により投与時間の調節をこれらの再評価に基づいて行ってよい。

10

【0147】

治療は化合物の最適な投与量よりも低い小用量から始めてよい。その後、最適な治療効果が得られるまで用量を少しづつ増加させてよい。

【0148】

異なる成分の効果の発現およびその効果の継続期間は相補的なものであるため、本発明の幾つかの化合物の併用もしくは他の化学療法剤の使用では、個々の成分の必要とされる用量を減らしてもよい。そのような併用療法において、異なる有効物質と一緒にまたは別々に、1日以内に同時にまたは異なる時に送達してよい。本発明の化合物の毒性および治療有効性は、例えばLD50およびED50を決定するために細胞培養または実験動物での標準的な薬学操作により決定してよい。大きな治療指標を示す組成物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を使用してよいが、副作用を低減するために、化合物を所望の部位に向けさせる送達システムを設計するように注意しなければならない。

20

【0149】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを用いて、ヒト使用ために広い用量を処方してよい。任意のサプリメントの用量もしくはサプリメント内の任意の成分の用量は、好ましくは、毒性がほとんどないか全くないED50を含む循環濃度の範囲内にある。用量は使用される投薬形態および利用される投与経路に基づきながら、この範囲内で変化させてよい。本発明の物質に関して、治療効果のある投与量は、最初に細胞培養アッセイから予想してよい。投与量は、細胞培養で決定されたIC50（すなわち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように動物モデルで処方してよい。そのような情報はヒトにおいて有用な投与量をさらに正確に決定するために用いてよい。血漿中のレベルは例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定してよい。

30

【0150】

（VII. レセプターカップリング剤の併用療法での使用）

一部の実施形態において、本発明は、癌を治療し、および／または腫瘍増殖を阻害するために、化学療法剤と組み合わせたレセプターカップリング剤の使用をさらに提供する。同様に、多様な化学療法剤のいずれもを、本発明の方法に使用しても、または該方法に使用するために試験してもよい。そのような化学療法剤として、代謝拮抗剤、アルキル化剤、白金系製剤、アントラサイクリン類、抗生物質製剤、トポイソメラーゼ阻害剤等が挙げられる。化学療法剤および／または他の生物活性剤の多様な形態を用いてよい。これらには、限定するものではないが、腫瘍に移植、注入、さもなければ挿入された場合に生物活性化される非電荷分子、分子複合体、塩、エーテル、エステル、アミド等の形態が含まれる。

40

【0151】

本発明のレセプターカップリング剤と組み合わされて用いられるか、複合体（例えば、免疫毒素複合体）の形で用いられる化学療法剤は、それらが癌細胞内でどのように特定の化学物質に影響を与えるか、どの細胞活性またはプロセスに医薬が干渉するか、および細胞周期のどの特定の相に医薬が影響を与えるかに基づいて幾つかの種類に分けることがで

50

きる。

【0152】

ある実施形態では、化学療法剤は、DNA合成を中断させる物質である。1つの実施形態において、DNA合成を中断させる物質はスクレオシドアナログ化合物である。ある実施形態では、スクレオシドアナログ化合物はゲムシタビンである。別の実施形態において、DNA合成を中断させる物質はアントラサイクリン化合物であり、ある実施形態では、アントラサイクリン化合物はアドリアマイシンである。

【0153】

他の実施形態において、化学療法剤はトポイソメラーゼI阻害剤である。ある実施形態において、トポイソメラーゼI阻害剤はCampotosarである。

10

【0154】

他の実施形態における化学療法剤はアルキル化剤であってよい。アルキル化剤は直接DNAに作用して癌細胞が再生するのを妨げる。薬物群として、これらの物質は期に特有でない（言い換えると、それらは細胞周期のすべての期で作用する）。アルキル化剤は、慢性白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫、および肺、胸（乳）および卵巣のある種の癌に対して一般に活性がある。アルキル化剤の例として、ブスルファン、シスプラチン、カルボプラチニン、クロラムブシリ、シクロホスファミド、イフオスファミド、ダカルバジン（DTIC）、メクロレタミン（ナイトロジエンマスター）およびメルファランが挙げられる。1つの実施形態において、アルキル化剤はプラチナ化合物であり、ある実施形態においてカルボプラチニンとシスプラチニンからなる群から選択してよい。ある実施形態では、プラチナ化合物はシスプラチニンである。

20

【0155】

さらに他の実施形態において、化学療法剤は植物アルカロイドであってよい。1つの実施形態において、植物アルカロイドはタキサンであり、ある実施形態においてタキソールであってよい。

【0156】

腫瘍の阻害が起こることを決定するために化学療法剤と組み合わせて候補レセプターカップリング剤を試験する方法は、参考としてその全体がここに援用される出願人の同時係属中のPCT出願第PCT/US03/41243号に教示されている。

30

【0157】

別の態様において、本発明は、細胞毒、医薬または放射性同位元素等の別の治療的部分に複合体化させた修飾抗体および抗体複合体またはそれらのフラグメントを特徴とする。修飾抗体という用語はまた、例えば、抗体の一部を欠失、付加または置換することにより修飾したモノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体などの抗体を含むことも意図する。例えば、定常領域を欠失させ、それを抗体の半減期、例えば、血清半減期、安定性または親和性を増加するように意図された定常領域に置換することにより抗体を修飾することができる。

【0158】

例示的な放射性同位元素として、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹²³I、¹¹¹In、¹⁰⁵Rh、¹⁵³Sm、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹⁶⁶Ho、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、および¹⁸⁸Reが挙げられる。放射性核種は、核DNA中に複数のストランド破壊を引き起こして、細胞死を導く電離放射線を生成することによって作用する。治療複合体を生成するために用いられる同位元素は、通常、短い経路の長さを有する高エネルギーまたは粒子を生成する。そのような放射性核種はそれが近接する細胞、例えば、複合体が付着したか、またはそれが入った新生細胞を殺す。それらは非局所化された細胞にほとんどまたは全く影響を与えない。放射性核種は本質的には非免疫原性である。

40

【0159】

本発明と組合せた放射線標識複合体の使用について、本発明のポリペプチドを（例えばヨウ素化により）直接標識してもよく、またはキレート剤の使用により間接的に標識してもよい。本明細書に使用されるように、「間接的な標識」と「間接的な標識アプローチ」

50

との語句はともにキレート剤が抗体に共有結合し、少なくとも1つの放射性核種がキレート剤に会合していることを意味する。そのようなキレート剤はポリペプチドと放射性同位元素の両方に結合するので、通常は二官能性キレート剤と呼ばれる。特に好ましいキレート剤は、1-イソチオシクマトベンジル-3-メチルジオチレントリアミンペニンタ酢酸（「MX-DTPA」）とシクロヘキシリジエチレントリアミンペニンタ酢酸（「CHX-DTPA」）誘導体を含む。他のキレート剤はP-DOTAとEDTA誘導体を含む。間接的な標識に特に好ましい放射性核種として¹¹¹Inと⁹⁰Yが挙げられる。

【0160】

細胞毒に複合化すると、これらの抗体複合体は「免疫毒素複合体」と呼ばれる。細胞毒または細胞傷害薬として、細胞に有害である（例えば、殺す）か、細胞の増殖を阻害する任意の物質が挙げられる。具体例として、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、マイトイマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、腫瘍活性化プロドラッグ（例えば、メイタンシノイド類（例えば、米国特許6,441,163号に記載されているDM-1）、ピューロマイシンとそのアナログまたはホモログ、ドラスタチン10またはそのアナログ（例えば、オーリスタチンE（AE）またはモノメチルオーリスタチンE（MMAE））が挙げられる。また、治療薬として、例えば代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデルカルバジン）、アルキル化剤、（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド（cyclothosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾシン、マイトイマイシンCおよびシス-ジクロロジアンミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン類（例えば、ダウノルビシン（旧名、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧名、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））、抗分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン）、CC-1065アナログ、クリケアミシン（clinicalcin）誘導体、アントラマイシン類、ビンカアルカロイド等）、リシン、ジフェリア毒素およびシードモナス外毒素も挙げられる。本発明の抗体に複合化できる治療的細胞毒素の他の例としてカリケアミシン類とデュオカルミシン類が挙げられる。

【0161】

特定の実施形態において、本発明のヒト抗体はメイタンシノイドまたはその誘導体と複合化することにより免疫毒素複合体を形成する。米国特許6,441,163号は、ジスルフィド化学を用いて、メイタンシノイド類およびメイタンシノイド類の誘導体を抗体に複合化する方法を記載する。簡単に説明すれば、複合体を生成する1つの方法において、ジスルフィド部分を有する過剰量のメイタンシノイド化合物を水溶液中で抗体と混合する。反応物を過剰なアミンで急冷し、抗体複合体をゲルろ過により精製する。

【0162】

本発明の抗体複合体は所定の生物学的応答を修正するために用いることができ、医薬の部分は伝統的な化学治療剤に限定されると解釈されるべきでない。例えば、医薬の部分は所望の生物活性をプロセシングするタンパク質またはポリペプチドであってよい。そのようなタンパク質として、例えば、酵素的に活性のある毒素またはその活性のあるフラグメント（例えば、アブリン、リシンA、シードモナス外毒素、破傷風トキソイドまたはジフェリア毒素）；タンパク質（例えば腫瘍壊死因子またはインターフェロン-）；または生物学的反応修飾物質（例えばリンフォカイン類、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）；顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）；または他の成長因子）が挙げられることがある。診断用途のため

10

20

30

40

50

に、抗体は簡単な単離または検出のために、ある部分（例えば、ビオチン、蛍光部分、放射活性部分、ヒスチジンタグまたは他のペプチドタグ）を含んでよい。抗体はその血清半減期を延ばすことのできる部分、例えば、ポリエチレンギリコール（PEG）部分および免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーまたはそのフラグメント（例えば、ヒトIgG1重鎖定常領域の一部、例えば、ヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域）を含んでもよい。

【0163】

抗体に対するそのような治療的部分の複合体化技術は周知である（例えば、Arnonら、“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら（編）, pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、“Antibodies For Drug Delivery”, Controlled Drug Delivery (第2版), Robinsonら（編）, pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら（編）, pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら（編）, pp. 303-16 (Academic Press 1985) およびThorpeら、“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982) を参照されたい。

【0164】

(IX. キット)

本発明は多様な癌を治療するためのキットを提供する。例えば、キットは1つ以上の上記の薬学的組成物と任意にそれらの使用説明書を含んでよい。さらに別の実施形態において、本発明は、1つ以上の薬学的組成物およびそのような組成物の投与を達成するための1つ以上のデバイスを含むキットを提供する。例えば、本発明のキットは薬学的組成物および組成物の癌性腫瘍への直接的な動脈内注入を達成するためのカテーテルからなってよい。他の実施形態において、本発明のキットは、送達デバイスとの使用のために任意に医薬として処方されるか、または凍結乾燥されたレセプターカップリング剤の前もって充填されたアンプルを含む。

【0165】

本発明を、限定すべきと見なされるべきではない下記実施例によりさらに説明する。本出願に全体にわたり引用されるすべての参考文献、特許および公開された特許出願ならびに図面および配列表の内容を、参考のためにここに援用する。

【実施例】

【0166】

(実施例1：腫瘍細胞死を誘導する多価抗TNFアゴニスト物質の有効性)

複数の抗TNFレセプター抗体を同時に用いて結腸癌細胞に細胞死を引き起こして、2つの別個のTNFファミリーレセプターの活性化がレセプターアゴニスト物質の有効性を向上するかどうか決定した。その結果は、複数の抗体が、腫瘍細胞の殺傷に対して単一の種類の抗TNF抗体の投与に比べて、より効果的であることを示す。

【0167】

10

20

30

40

50

TNFファミリーレセプターTRAIL-R2およびLT-Rそれぞれに対するアゴニスト抗体14A2およびCBE11をアッセイに用いた。モノクローナルマウス抗LT-R抗体CBE11はPCT公開WO96/22788および米国特許第6,312,691号に既に記載されており、ヒト化CBE11はWO02/30986に記載されている。

【0168】

抗TRAIL-R2抗体はTNF分野で周知であり、14A2に類似した抗TRAIL-R2モノクローナル抗体(mAb)が記載されている(Ichikawa, K.ら, (2001) Nat Med 7:954; Chontharapai, A.ら, (2001) J Immunol 166:4891)。抗体14A2を得るために、簡単には、ヒトTRAIL-R2-Ig融合タンパク質によるマウスの免疫化による標準的なハイブリドーマ技術により抗ヒトTRAIL-R2 mAbを作った。続いて、ハイブリドーマをTRAIL-R2部分に対する結合に関してスクリーニングした。そのような1つの抗TRAIL-R2ハイブリドーマである14A2がFACS分析でWiDr結腸直腸腺癌細胞に結合した。14A2は、抗マウスIgFcドメイン捕捉抗体を経てプラスチック表面上に固定化された場合に腫瘍細胞死を誘導しうるmAbと同定された(図1b、黒四角を参照)。

【0169】

TNFレセプターであるTRAIL-R2およびLT-Rを活性化する併用効果を決定するために、結腸癌WiDr細胞を、可溶性マウス抗体CBE11のみ、14A2のみ、およびCBE11と14A2の組み合わせに曝した。WiDr細胞を、80U/mLのIFNを用いる4日のMTTアッセイに用いた。WiDr細胞を、培養培地に加えられた抗LT-R mAb CBE11(Browning, J. L.ら, (1996) J Exp Med 183:867)または14A2とともに培養した場合に、細胞増殖の比較的制限された阻害が観察された。しかし、表2aに示されるように、抗TNFレセプターマウス抗体CBE11および14A2の組み合わせはさらに効果的であった。同様に、抗CBE11は同様なアッセイでTNF活性を増強することができた(Mackay, F.ら, (1997) J Immunol 159:3299)。よって、2つのTNFファミリーレセプターを同時に活性化するときのマウス抗体CBE11および14A2の組み合わせは抗体単独よりも腫瘍細胞の死滅にさらに効果的であった。

【0170】

(実施例2:二重特異性TNFレセプターカップリング剤の構築)

少なくとも2つの別個のTNFレセプターを活性化させるカップリング剤が個々の活性化部分よりも改良された有効性を有するかどうかを決定するために、2つの別個のTNFファミリーレセプター、例えば、TRAIL-R2およびLT-Rに結合する二重特異性多価抗体の形のレセプターカップリング剤が生成された。CBE11および14A2エピトープ結合ドメインを含む二重特異性多価抗体を構築した。

【0171】

抗hu TRAILR2 / 抗hu LT-R二重特異性抗体(LT-B51と命名)は下記のように構築した。14A2免疫グロブリン重鎖および軽鎖の抗体可変領域は14A2ハイブリドーマを用いるPCRにより決定した。次に、可変領域を定常ヒト軽鎖領域に結合して完全なキメラマウス-ヒト14A2軽鎖を形成した。キメラ14A2軽鎖を、ヒト定常領域に融合させたマウス軽鎖の可変領域を用いて構築した。次に、-軽鎖を二重特異性抗体の構築に用いた。重鎖可変領域を、CBE11のC末端Fvフラグメントを有するヒトIgG1重鎖の非可変領域に結合させた。単鎖Fvタイプのヒト化CBE11の構築はPCT/US03/41393(WO04/058191)に既に記載されている。したがって、Hercules LT-B51重鎖は、C末端に融合した改変huCBE11 scFvを有する抗huTRAILR2 14A2-huIgG1重鎖(配列番号1および配列番号2)を含み、一方でHercules軽鎖はキメラ14A2-hu軽鎖である(配列番号3および配列番号4)。LT-B51 Hercule構

10

20

30

40

50

築物の配置図を図9に示す。LT-B S 1抗体構築物のヌクレオチド配列とアミノ酸配列を配列番号5～8に示す。

【0172】

CHO細胞の重鎖と軽鎖の共発現は、ここでは単純にLT-B S 1と呼ばれる14A2/CBE11二重特異性分子(LT-R/TRAIN-R2二重特異性-1)の産生をもたらした。LT-B S 1を培養上清からプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。サイズ排除クロマトグラフィーにより検出可能な凝集体は存在しなかった。

【0173】

(実施例3：二重特異性TNF-レセプターカップリング剤の腫瘍細胞死を誘導する有効性) 10

図1に示されるように、元のマウス14A2およびCBE11の両モノクローナル抗体(mAb)はプラスチックに固定化(捕捉)された場合にHT29細胞増殖を阻害することができた。しかし、溶液中の両抗体ともに弱い有効性を示しただけであった。2つの個々のmAbとしてともに結合させた場合、LT-RおよびTRAIL-R2の同時活性化は増殖阻害活性を図2aに示すように増強した。したがって、両抗体を2つの別個のTNFファミリーレセプターに結合させることにより達成された高い効力が存在した。

【0174】

LT-B S 1構築物は、図2bに示されているように、2つの個々のmAbの組み合わせと同じく効力があった。2つのmAbは1つの分子的存在へと結合させたときでも活性があり、さらなる利点のために抗レセプタ-mAbsを2つの別個のTNFファミリーメンバーに結合させる原理を明らかにしていることがLT-B S 1構築物により示された。 20

【0175】

二重特異性LT-B S 1抗体の効力をさらに調べるために、精製LT-B S 1を、標準的なプロトコールにしたがってHT29またはWiDrの3～4日増殖アッセイに用いた。WiDrは類似の挙動を有するHT29変異系である。LT-B S 1は、LT-Rに向けられた多価抗体と並行してWiDr細胞中で調べた。使用された抗LT-R抗体はLL-MS1(CBE11抗原認識部位を含む一重特異的抗体)およびLL-B S 1(CBE11およびBHA10抗原認識部位を含む二重特異性抗体)であった。LL-MS1およびLL-B S 1構築物の説明と配列は、参考のためにここに援用される本出願人の同時係属PCT出願WO04/058191に記載されている。図3に示されているように、LT-B S 1はWiDr結腸癌細胞において細胞死を誘導することができ、結腸癌細胞においてLL-MS1とLL-B S 1構築物の効力に匹敵する効力を示した。 30

【0176】

興味深いことに、LT-B S 1と、CBE11/14A2組み合わせとを比較して類似の結果が得られたWiDr結腸癌細胞株での増殖試験とは対照的に、LT-B S 1は、LT174T結腸癌細胞株で細胞死を誘導するのにCBE11/14A2組み合わせよりも効果的であった。図4に示されるように、マウスCBE11と14A2の組み合わせのみが細胞死にほとんど効果を持たなかった一方で、IFNと組み合わされたLT-B S 1またはLT-B S 1への曝露は細胞の生存に著しい減少をもたらした。 40

【0177】

2つの別々のマウスマAbの組み合わせよりも改良されたLT-B S 1の効力を表1および図5～8に示されるように多様な細胞株を用いてさらに調べた。増殖アッセイは、標準的な4日のMTT増殖アッセイプロトコールにしたがって可溶性抗体を用いる80U/mLのIFNの存在下または非存在下で実施した。子宮頸癌や乳癌細胞株を含む一連の腫瘍タイプを調べた。

【0178】

その結果は、LT-B S 1は親mAbであるCBE11および14A2のみまたはそれらの組み合わせよりも広い範囲の腫瘍に対して効果的であったことを示している。LT-B S 1の活性は、HT29およびWiDR腫瘍系等の一部の細胞株においてINFの存 50

在に依存し、これはこの細胞タイプによるTNFファミリーレセプター活性化に特有であった。しかし、一部の腫瘍タイプに対する有効性はIFN添加に依存しなかった。WiDr/HT29によってでさえIFNが要求されることは絶対的ではなく、例えば、良好な抗腫瘍有効性が、外因性のIFNが完全に存在しないインビボ異種移植片腫瘍モデルでのHT29中の抗LTBRmAbにより観察された(Brownningら(1996)J. Exp. Med. 183:867)。LT-BS1の抗腫瘍活性の増強範囲は、TNFファミリーレセプターの多様な組み合わせが独自の活性を有しうるとの原理を示している。この増強活性は個々の親mAbの活性からは予想されないだろう。

【0179】

【表1】

| 腫瘍系 | タイプ | 4日MTT増殖アッセイでの感受性 | | | | | |
|--------|----------|------------------|---------------|-----------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | | CBE11 +IFNg | 14A2 +IFNg | CBE11 + 14A2 +IFNg | LT-BS1 +IFNg | LT-BS1 IFNgなし | LL-BS1 +IFNg |
| WiDr | 結腸直腸 | + | + | +++ | - | +++ | +++ |
| HT29 | 結腸直腸 | + | + | ++ | - | 不検出 | +++ |
| KM20L2 | 結腸直腸 | 不検出 | 不検出 | +++ | +++ | +++ | +++ |
| LS174T | 結腸直腸 | - | - | +++ | - | - | +++ |
| CACO-2 | 結腸直腸 | 不検出 | 不検出 | +++ | 不検出 | 不検出 | +/- |
| MCF7 | 乳房 | - | - | - | 不検出 | 不検出 | +/- |
| MDA231 | 乳 | - | - | - | 不検出 | 不検出 | - |
| HeLa | 頸部 | - | - | - | 不検出 | 不検出 | - |
| ME180 | 頸部 | +/- | +/- | - | +++ | +++ | +/- |
| A375 | メラノーマ | 不検出 | 不検出 | - | 不検出 | 不検出 | - |
| RD | 横紋筋肉腫 | 不検出 | 不検出 | +/- | 不検出 | 不検出 | +/- |
| SAOS-2 | 肉腫 | 不検出 | 不検出 | - | 不検出 | 不検出 | - |
| 293E | 正常な線維芽細胞 | 不検出 | 不検出 | - | 不検出 | 不検出 | - |
| WI-38 | 正常な線維芽細胞 | 不検出 | 不検出 | - | 不検出 | 不検出 | - |

陰になっているものはCBE11pまたは他の結合体に対して実質的な応答なしにLT-BS1に応答した細胞を示す。
+++、++、+のスコアは主要な濃度依存性を示さずに対応された死の程度を示す。

CBE11 抗LTBR (マウス)
CBE11p 五量体形
LL-BS1 二重特異性抗LTBR
14A2 抗TRAIL-R2 (マウス)
LT-BS1 LTBR/TRAIL-R2二重特異性

表1:

ME180およびMDA231は反応性の異なるパターンを示す頸部細胞株と乳癌細胞株を示す。両腫瘍細胞株はCBE11または14A2mAbのいずれか単独に対しても、もしくは強力なLT-Rアゴニスト五量体CBE11(CBE11p)にも応答しなかつ

た；しかし、二重特異性LT-B S 1は、図5(ME180頸部細胞株)および6(MDA321乳癌細胞株)に示されているように、インビトロ培養で増殖を低減するのに非常に効果的であった。LT-B S 1活性はME180頸部細胞株でIFNにより増強したが、乳癌細胞株MDA231での効力はIFNの存在により達成されなかった。

【0180】

HeLa子宮頸部細胞癌細胞も図7に示されているように分析した。HeLa細胞を用いて、LT-B S 1構築物は細胞死を誘導するのにマウスCBE11か14A2単独またはそれらの組み合わせよりも効力があることを示した。

【0181】

細胞株の異なるタイプおよびそれぞれの細胞株におけるLT-B S 1の有効性の比較を、CBE11の五量体形(PCT出願第PCT/US03/41393、WO04/058191に記載されたCBE11p)に比較して図8に示す。要約すれば、LT-B S 1はCBE11pよりもはるかに有効であった。

【0182】

上記の結果に基づけば、二重特異性構築物LT-B S 1は、腫瘍細胞内で細胞死を誘導するのに、各抗体のみを組み合わせて導入するよりも効果的であった。いずれかのレセプターの二量体化は不十分であったため、二重特異性構築物は新規なシグナル変換事象を導き、および/またはレセプターの1つの位置を変えてシグナル伝達をより効果的にするのであろう。二重特異性LT-B S 1構築物の向上した有効性は新規な事象が誘導されたことを示している。

【0183】

個々のmAbである14A2およびCBE11よりも高いLT-B S 1の有効性は上記の機構(すなわち、新規なシグナル変換複合体の組み立てまたはレセプターの改変配置)から生じえる。別の可能性のある機構はLT-B S 1のオリゴマー化/凝集から起こりえて、それ自体として、有効性(感受性細胞による)を高めたCBE11五量体形またはオリゴマー14A2抗TRAIL-R2mAbに似ている。精製LT-B S 1の生化学的分析は、それがフリーザーからの新しいものでも、4で5ヶ月後のものでも検出可能な高分子量形を有さないことを示した。

【0184】

(実施例4: TNFレセプターの架橋)

2つのレセプター間の架橋、すなわち、レセプターカップリング剤を用いて両レセプターを組み合わせることが活性を高めることを示すために、レセプター-免疫グロブリン(Ig)融合タンパク質をレセプターカップリング剤LT-B S 1と前もって混合して、レセプター-Ig融合物がLT-B S 1活性をプロックするかどうかを決定した。LTBR-IgまたはTRAIL-R2-IgのいずれかをLT-B S 1に前もって混合して構築物の一面を中和することが活性を同様にプロックすることを予想した。実験は3種類の腫瘍系WiDr、ME180およびMDA231を用いて実施した。すべての3例で、両レセプター-Ig融合物(LT-RまたはTRAIL-R2)がLT-B S 1活性の効果的なブロッカーであった。さらに、溶液中の単一のmAbは不活性であった(ただし、可溶性のCBE11のみがWiDrに対して比較的弱い活性を有し、これがこのmAbを臨床研究のために選択するための基礎とした)。この実験は、レセプターカップリング剤による2つのTNFレセプターの架橋は増強活性をもたらすことを示す。

【0185】

(実施例5:さらなるTNF-ファミリーレセプター対の設計と試験)

結合レセプター剤の別の例は、TWEAKのレセプターであるヒトFn14レセプターに対する物質である。ヒトFn14レセプターに対する抗体は野生型マウス、またはFn14レセプター欠損マウスまたは他の種の、組換えFn14-Fc融合タンパク質または可溶性Fn14による免疫化により調製する。ハイブリドーマは慣用の方法で調製し、Fn14結合に関してスクリーニングを行う。

【0186】

10

20

30

40

50

作動性 TNFmAb は NFk 活性化の分析により同定する。Fn14 の場合、NFk 活性化は IL-8 または他のケモカインの放出を導き、これが単純な細胞ベースのスクリーニング方法を形成する。抗体がアゴニスト性であるかどうかを決定するために、モノクローナル抗体を溶液に加えるか、プラスチックに固定化する。抗体を加えると、ケモカインの放出がレセプター活性化を示す。もしくは、NFk 活性化をモニターするための広い範囲のレポーター細胞株が現在市販されており、または容易に構築できる。抗体が活性化するかどうかを決定する別の方法として、死のプログラムの誘導を試験するために通常用いられる細胞増殖および細胞死およびカスパーゼ活性化のアッセイが挙げられる。

【0187】

アゴニスト抗体が標準的なスクリーニング技術により同定されたら、Ig 分子をコードする RNA の配列決定を行い、これらの mAb の組換え形を設計することができる。CB E11 scFv 構築物を作動性 Fn14 mAb 配列の C 末端に付加し、そのような二重特異性な形の抗 Fn14 - 抗 LTB R 組み合わせを発見させて、プロテイン A クロマトグラフィーにより単離する。元のマウス Fc を用いるか、または元の抗 Fn14 mAb をヒト IgG Fc ドメインを有するキメラ mAb に変換する。もしくは、作動性抗 Fn14 scFv を設計し、キメラ形の抗 LTB R、例えば CB E11 に付加する。

【0188】

Fn14 および LTB R 等の 2 つの別個の TNF レセプターに向けられた二重特異性抗体が構築されたら、得られたタンパク質を、両レセプターを発現する腫瘍系に対する活性に関してインビトロで試験する。相加または相乗活性を、異種移植片移植における腫瘍に対する二重特異性のインビオ試験を用いて確認する。そのようなレセプターペアリングが適当な頻度、すなわち集団中で 5 ~ 30 % を超えて起こるのかどうかを決定するためにヒト腫瘍データベースをスクリーニングする。適当な頻度で腫瘍を標的化する上記のような活性物質がヒト試験のための候補物である。

【0189】

(実施例 6 : 腫瘍治療のための潜在的な TNF ファミリーレセプター対の選択)

特定の腫瘍タイプ、例えば管状浸潤性乳癌上に発現するこれらのレセプターを発見するために既存の公の遺伝子発現データベースに対してクエリーを行う。レセプター（例えば LTR および RANK ）の腫瘍特異的な対が選択され、微小血管系および肝臓細胞等の重大な細胞種に豊富に発現していないレセプターは優先順位が低い。

【0190】

インビトロアッセイを用いて予測法をさらに検証する。例えば、LT-B S1 構築物は上で規定するように MDA231 等の腫瘍細胞を殺しうる。別の例において、LT-B S1 を初代内皮細胞の培養物に加え、次に内皮活性化の証拠を幾つかの方法で調べる。最初に、これらの細胞からのケモカイン放出はシグナル伝達能力の指標として役立つため、これを調べる。内皮細胞の炎症促進性活性化は、白血球付着および交換を促進する多様な付着分子の誘導された表示をともなう。E セレクチン、VCAM および ICAM はそのような分子であり、それらの誘導後に FACS 分析を行う（例えば、Hochmna (1995) J. Inflammation 46 : 220 を参照）。LT-B S1 は内皮細胞を効率的に活性化しないようである。対照的に、TNF は強力な炎症促進性シグナルであり、それはこれら 3 種類のすべての分子の発現を上方調節する。チップ技術を用いる遺伝子発現分析も有效地に使用して、これらの新規な二重特異性抗体が特異で潜在的に有害な結果を有するかどうかのさらに詳細な状況を得る。上皮活性化および上皮細胞または肝細胞の細胞死は負の指標である。

【0191】

内皮細胞または肝細胞上の減少した発現に関して有利な予測と結び付けられる独自の腫瘍指向性のレセプター組み合わせを発見するためのプロファイリングを用いることにより、選択プロセスを最適化する。選択物はインビトロ腫瘍増殖アッセイならびに内皮活性化と生存性とのアッセイを使用することにより検証する。

【0192】

10

20

30

40

50

(等価物)

当業者は、詳細な発明の説明で記載された発明は本発明の精神と範囲から離れることなく多くの修正と変更を行ってよいことを認識する。ここに提供される実施例は単に例示であって、添付の請求の範囲に示された発明の範囲を限定するものと見なされるべきではない。

【0193】

ここに示された全ての出版物や特許はそれら個々の出版物や特許が具体的かつ個々に示されて参考のために援用されているかのごとくそれら全体が参考のためにこの明細書に援用される。

【図面の簡単な説明】

10

【0194】

【図1】図1は、WiDr細胞4日増殖アッセイの結果をグラフで示す。結果は、抗TRAIL-R2抗体14A2および抗LT-R抗体CB11がともにアゴニスト活性によりWiDr死を誘導できたことを示す。

【図2】図2は、WiDr結腸癌細胞における4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。結果は、二重特異性LT-R/TRAIL-R2抗体(LT-B51)が個々の親抗体CB11と14A2(図2a)よりも高い細胞死活性(図2b)を有することを示す。

【図3】図3は、LT-R/TRAIL-R2二重特異性抗体(LT-B51)を4価LT-R二重特異性抗体LL-B51(抗体CB11およびBHA10)およびLL-M51(抗体CB11)と比較した、WiDr結腸癌細胞における80U/mLのIFNを用いる4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。

20

【図4】図4は、LS174T腫瘍細胞における80U/mLのIFNを用いるか、用いない4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。その結果は、レセプターカップリング剤LT-B51および抗体14A2およびCB11の結腸癌細胞(LS174T腫瘍細胞)増殖を阻害する有効性を示す。

【図5】図5は、ME180腫瘍細胞における80U/mLのIFNを用いるか、用いない4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。その結果は、レセプターカップリング剤LT-B51および抗体14A2およびCB11の子宮頸部癌細胞(ME180腫瘍細胞)増殖を阻害する有効性を示す。

30

【図6】図6は、MDA213腫瘍細胞における80U/mLのIFNを用いるか、用いない4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。その結果は、レセプターカップリング剤LT-B51および抗体14A2およびCB11の乳癌細胞(MDA231腫瘍細胞)増殖を阻害する有効性を示す。

【図7】図7は、HeLa腫瘍細胞における80U/mLのIFNを用いるか、用いない4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。その結果は、レセプターカップリング剤LT-B51および抗体14A2および抗体CB11のHeLa頸部癌細胞増殖を阻害する有効性を示す。

【図8】図8は、乳癌、頸部癌および直腸癌を含む一連の腫瘍細胞株における80U/mLのIFNを用いる4日MTT増殖アッセイの結果をグラフで示す。その結果は、レセプターカップリング剤LT-B51および五量体CB11抗体の乳(A、B)、頸部(C)および結腸(D)を含む多様な種類の癌細胞の増殖を阻害する有効性を示す。

40

【図9】図9は、抗TRAIL-R2抗体14A2およびLT-R scFv抗体CB11からなるレセプターカップリング剤LT-B51構築物(縞模様)の概略図を示す。

【図1】

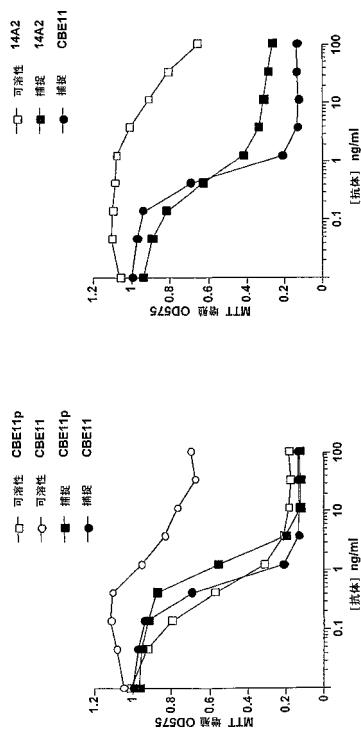


Figure 1b

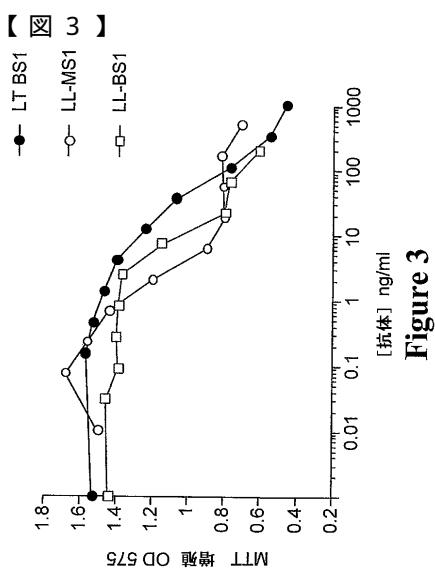


Figure 3

【図2】

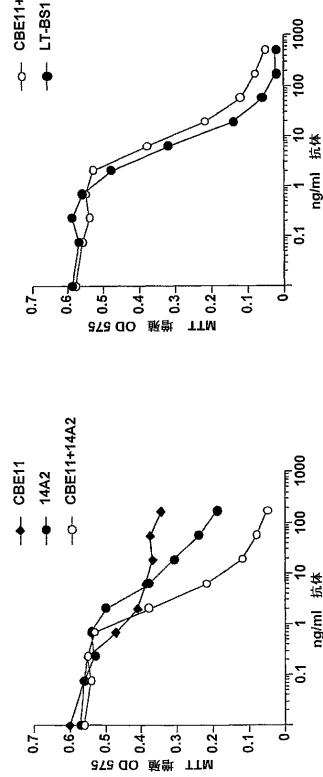


Figure 2b

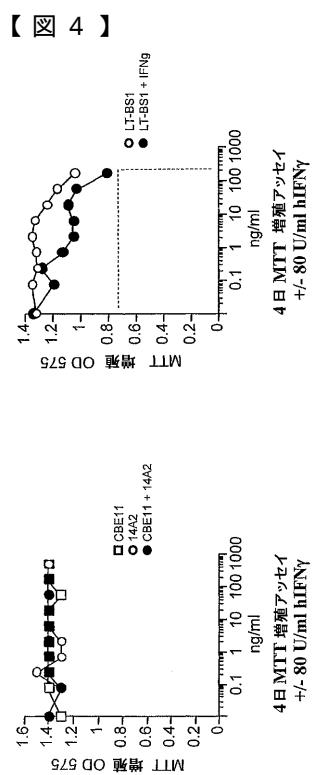


Figure 4a

【図4】

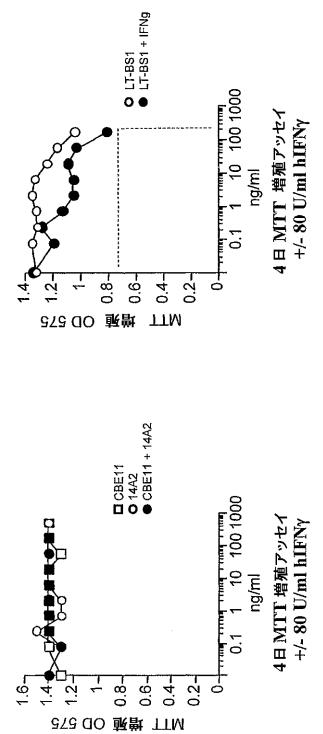


Figure 4b

【図5】

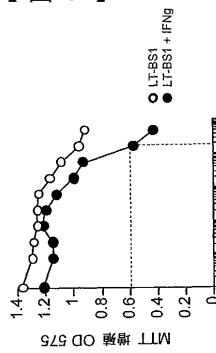


Figure 5b

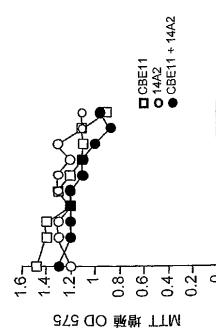


Figure 5a

【図7】

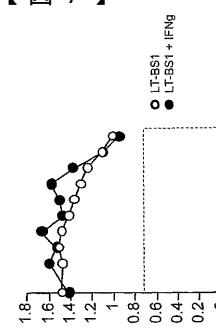


Figure 7b

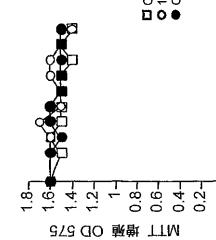


Figure 7a

【図6】

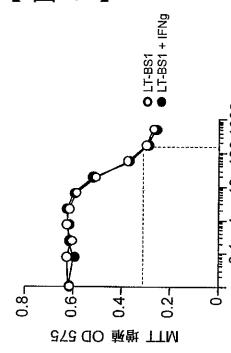


Figure 6b

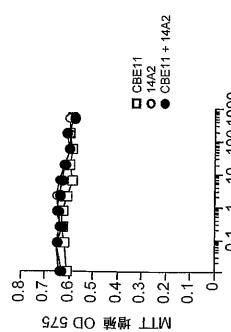


Figure 6a

【図8】

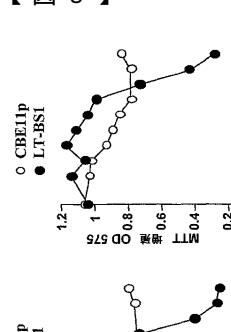


Figure 8b

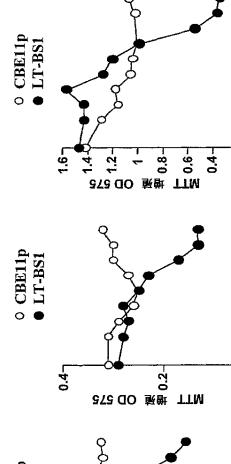


Figure 8c

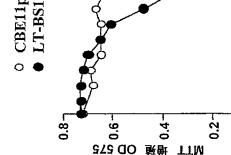
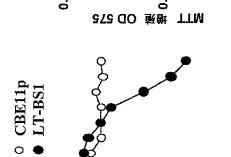
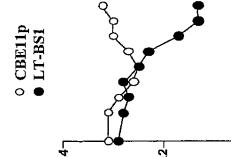
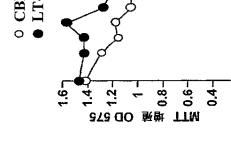


Figure 8d



【図9】

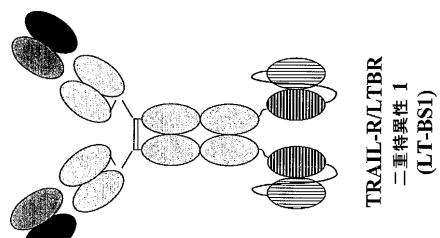


Figure 9

【配列表】

2007530588000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/US2005/009967 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/28 C07K16/46 | | |
| 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) IPC 7 C07K | | |
| 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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 94/20625 A (GENENTECH, INC; WONG, GRACE, H., W) 15 September 1994 (1994-09-15)</p> <p>page 14, line 31 - page 16, line 23 page 17, line 29 - line 31 page 24, line 27 - line 29 page 3, line 31 - line 40 page 4, line 7 - line 14 claims 12-15, 25, 26</p> <p>----- -/-</p> | 1-11, 14-17, 24-27, 32-39 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"8" document member of the same patent family</p> | | |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 18 July 2005 | 03/08/2005 | |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Irion, A | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/009967

| C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|------------------------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>WO 02/066516 A (ZYMOGENETICS, INC) 29 August 2002 (2002-08-29)</p> <p>page 2, line 30 - line 36 page 4, line 1 - line 16 page 51; example 1 page 27, line 22 - page 29, line 16 page 38, line 14 - line 29 page 50, line 30 - line 32</p> <p>-----</p> <p>WO 02/085946 A (IMMUNEX CORPORATION; LYNCH, DAVID, H) 31 October 2002 (2002-10-31)</p> <p>abstract page 2, line 1 - line 11 page 11, line 30 - page 12, line 10 page 13, line 13 - line 15 page 21; example 2 page 25; example 5 page 4, line 32 - page 5, line 12 page 8, line 11 - line 15 page 10, line 1 - line 14 page 14, line 21 - page 15, line 11</p> <p>-----</p> <p>MUPPIDI JAGAN R ET AL: "Ligand-independent redistribution of Fas (CD95) into lipid rafts mediates clonotypic T cell death." NATURE IMMUNOLOGY, vol. 5, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 182-189, XP002336485 ISSN: 1529-2908 the whole document</p> <p>-----</p> | 1-11, 14-17, 24-27, 32-39 |
| X | | 1-42 |
| A | | 32 |

| | | |
|--|--|---|
| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | In international application No. PCT/US2005/009967 |
| Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet) | | |
| 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the International search was carried out on the basis of: | | |
| a. type of material | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> a sequence listing <input type="checkbox"/> table(s) related to the sequence listing | | |
| b. format of material | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> in written format <input checked="" type="checkbox"/> in computer readable form | | |
| c. time of filing/furnishing | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> contained in the International application as filed <input checked="" type="checkbox"/> filed together with the International application in computer readable form <input type="checkbox"/> furnished subsequently to this Authority for the purpose of search | | |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. | | |
| 3. Additional comments: | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In international application No.
PCT/US2005/009967

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.: 32–37 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(iv) PCT – Method for treatment of the human or animal body by therapy
2. 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. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/009967

| Patent document cited in search report | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|----|-------------------------|------------------|
| WO 9420625 | A 15-09-1994 | AU | 685095 B2 | 15-01-1998 |
| | | AU | 6357894 A | 26-09-1994 |
| | | CA | 2157010 A1 | 15-09-1994 |
| | | DE | 69427290 D1 | 28-06-2001 |
| | | DE | 69427290 T2 | 31-10-2001 |
| | | EP | 0689600 A1 | 03-01-1996 |
| | | IL | 108776 A | 30-11-1999 |
| | | JP | 8507684 T | 20-08-1996 |
| | | WO | 9420625 A1 | 15-09-1994 |
| | | ZA | 9401422 A | 01-09-1995 |
| WO 02066516 | A 29-08-2002 | CA | 2438682 A1 | 29-08-2002 |
| | | EP | 1362061 A2 | 19-11-2003 |
| | | JP | 2004533997 T | 11-11-2004 |
| | | WO | 02066516 A2 | 29-08-2002 |
| | | US | 2003012783 A1 | 16-01-2003 |
| WO 02085946 | A 31-10-2002 | US | 2002155109 A1 | 24-10-2002 |
| | | WO | 02085946 A1 | 31-10-2002 |

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 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 1 1 7 A 6 1 P 43/00 1 2 1 C 1 2 N 15/00 A | |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,L,U,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ブラウニング , ジェフリー エル .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 , ケンブリッジ , コンコルド アベニュー
2 5 0

(72)発明者 バイリー , ベロニク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 1 9 , ボックスバーロウ , クーリッジ フーム
ロード 4 4

(72)発明者 ガーバー , エレン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 - 1 3 5 2 , ケンブリッジ , ドンネル スト
リート 1 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA63 BA80 CA01 CA09 CA11 CA20 HA01 HA11
4C084 AA01 AA02 AA03 AA17 AA20 BA44 DA24 MA02 NA05 NA14
ZB261 ZB271 ZC021 ZC511 ZC751
4C085 AA13 AA37 BB01 BB31 CC03 CC22 EE01 EE03
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 EA20 EA60 FA71