

(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2015-512877

(P2015-512877A)

(43) 公表日 平成27年4月30日(2015.4.30)

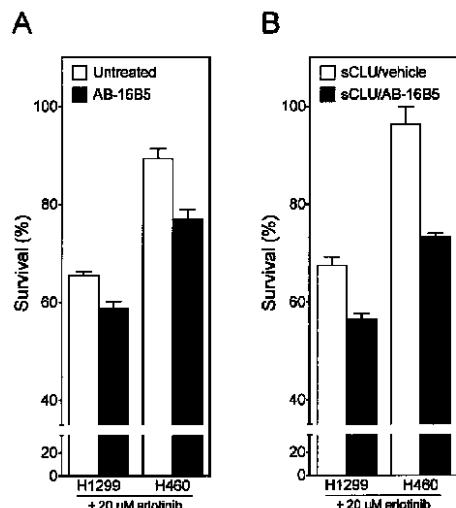
(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
A 61 K 45/06 (2006.01)	A 61 K 45/06	Z N A	4 C 084	
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1	4 C 085	
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	D	4 C 086	
A 61 K 31/5377 (2006.01)	A 61 K 39/395	N	4 H 045	
A 61 K 31/517 (2006.01)	A 61 K 31/5377			
				審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2014-557950 (P2014-557950)	(71) 出願人	507196491 アレシア・バイオセラピューティクス・イ ンコーポレーテッド カナダ・H 2 X · 1 Y 4 · ケベック・モン トリオール・S B - 5 1 O O · アヴィニュ ・プレジダン-ケネディ · 1 4 1	
(86) (22) 出願日	平成25年2月22日 (2013. 2. 22)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦	
(85) 翻訳文提出日	平成26年10月20日 (2014. 10. 20)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武	
(86) 國際出願番号	PCT/CA2013/000167	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆	
(87) 國際公開番号	W02013/123588	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉	
(87) 國際公開日	平成25年8月29日 (2013. 8. 29)			
(31) 優先権主張番号	61/601, 786			
(32) 優先日	平成24年2月22日 (2012. 2. 22)			
(33) 優先権主張国	米国 (US)			
				最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌を治療するためのクラステリン阻害剤とEGFR阻害剤の併用

(57) 【要約】

上皮成長因子受容体 (EGFR) 発現およびリン酸化は、抗クラステリン抗体で処理した癌細胞において増大する。このような処理はまた、癌細胞表面でのE-カドヘリン発現の増大によって決定されるように、癌細胞の上皮表現型の再現も伴う。従って、クラステリン阻害剤は、上皮間葉表現型の逆転を誘導すると共に、EGFR阻害剤に対する癌細胞の感受性も回復し得る。ゆえに、本発明によって、クラステリン阻害剤とEGFRの併用、並びに癌治療におけるそれらの使用が提供される。

Figure 7



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

クラステリン阻害剤およびEGFR阻害剤を含む併用薬剤。

【請求項 2】

前記クラステリン阻害剤が、上皮間葉移行を阻害することができる、請求項1に記載の併用薬剤。

【請求項 3】

前記クラステリン阻害剤が、抗クラステリン抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項1または2に記載の併用薬剤。

【請求項 4】

前記抗クラステリン抗体またはその抗原結合性フラグメントが、ヒトクラステリンのサブユニットのC末端部分のアミノ酸421～443に結合する、請求項3に記載の併用薬剤。

【請求項 5】

前記EGFR阻害剤が、チロシンキナーゼ阻害剤または抗EGFR抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである、請求項1～4のいずれか1項に記載の併用薬剤。

【請求項 6】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブ、エルロチニブ、イマチニブ、ラパチニブまたはセマジニブである、請求項5に記載の併用薬剤。

【請求項 7】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブである、請求項5に記載の併用薬剤。

【請求項 8】

前記抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、またはメツズマブである、請求項5に記載の併用薬剤。

【請求項 9】

癌を有するか、または癌を有することが疑われる個体に、クラステリン阻害剤およびEGFR阻害剤を投与することを含む、癌の治療方法。

【請求項 10】

前記クラステリン阻害剤が、上皮間葉移行(EMT)を阻害することができる、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記クラステリン阻害剤が、抗クラステリン抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項9または10に記載の方法。

【請求項 12】

前記抗クラステリン抗体またはその抗原結合性フラグメントが、ヒトクラステリンのサブユニットのC末端部分のアミノ酸421～443に結合する、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記EGFR阻害剤が、チロシンキナーゼ阻害剤または抗EGFR抗体もしくはその抗原結合性フラグメントである、請求項9～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブ、エルロチニブ、イマチニブ、ラパチニブまたはセマジニブである、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記チロシンキナーゼ阻害剤が、ゲフィチニブである、請求項13に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、またはメツズマブである、請求項13に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗クラステリン阻害剤及び前記EGFR阻害剤が、逐次投与される、請求項9に記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 18】

前記抗クラステリン阻害剤が、前記EGFR阻害剤の前に投与される、請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗クラステリン阻害剤が、前記EGFR阻害剤と同時に投与される、請求項9に記載の方法。

【請求項 20】

前記EGFR阻害剤の投与前に、癌細胞の上皮間葉表現型の逆転について試験することを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項 21】

前記癌が、前立腺癌、乳癌、子宮内膜癌、卵巣癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、肺癌、胰臓癌または腎臓癌である、請求項9～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 22】

前記乳癌が、トリプルネガティブ乳癌または基底細胞型乳癌である、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記肺癌が、非小細胞肺癌である、請求項21に記載の方法。

【請求項 24】

前記癌が、EGFR阻害剤に対し耐性であるものとして特性決定された細胞を含む、請求項9～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 25】

前記癌が、EMTマーカを発現する細胞を含む、請求項9～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗体またはその抗原結合性フラグメントが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49または配列番号50に記載の相補性決定領域を含む、請求項9～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗体またはその抗原結合性領域が、配列番号1に示すCDRH1、配列番号2に示すCDRH2、および配列番号3に示すCDRH3を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗体またはその抗原結合性領域が、配列番号45に示すCDRH1、配列番号46に示すCDRH2、および配列番号47に示すCDRH3を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 29】

前記抗体またはその抗原結合性領域が、配列番号4に示すCDRL1、配列番号5に示すCDRL2、および配列番号6に示すCDRL3を含む、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 30】

前記抗体またはその抗原結合性領域が、配列番号48に示すCDRL1、配列番号49に示すCDRL2、および配列番号50に示すCDRL3を含む、請求項27または28に記載の方法。

【請求項 31】

癌の治療を目的とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の併用薬剤の使用。

【請求項 32】

癌の治療のための薬剤の製造における、請求項1～9のいずれか1項に記載の併用薬剤の使用。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

クラステリン阻害剤およびEGFR阻害剤を含む、キット。

【請求項34】

前記クラステリン阻害剤が、抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項33に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌の治療に用いるためのクラステリン阻害剤と上皮成長因子受容体（EGFR）の阻害剤の併用に関する。より具体的には、本発明は、EGFR阻害剤に対する癌細胞の感受性を回復する、またはEGFR阻害剤の作用を増強することを目的とする、抗クラステリン抗体などのクラステリン阻害剤の使用を包含する。10

【背景技術】

【0002】

化学療法に対する耐性の発生、および他の二次部位への浸潤は、悪性固形腫瘍に共通する特徴である。化学療法薬に対する耐性の発生は、薬物に含まれるタンパク質の過剰発現およびアポトーシス耐性によって引き起こされることはよく知られている。また、浸潤プロセスについても文献にかなり詳しく記載されている。腫瘍浸潤は、癌細胞の運動性増加と、細胞外マトリックス中のタンパク質分解を引き起こす遺伝子の発現によって起こる。化学療法薬に対する耐性および腫瘍浸潤は、上皮間葉移行（EMT）と呼ばれる生物学的プロセスを通して共通の開始点を有し得るという証拠が次々と上がっている。近年の研究によって、トランスフォーミング増殖因子（TGF）は、EMTの決定的メディエータであり得ることが証明された。こうした進歩にもかかわらず、化学療法耐性の発生および他の器官への癌の広がりを阻害するために利用できる治療手段はほとんどない。また、近年の文献に、EMTを経た特定の腫瘍細胞が、脱分化して、幹細胞様特性を呈する（癌幹細胞またはCSC）ことが明らかにされている。正常な幹細胞の場合と同様に、CSCは、本来的に化学療法および放射線療法に対して耐性である。従って、EMTおよびCSC維持の特定の調節因子をターゲティングすることは、化学療法薬に対する応答を高めて、癌の再発を予防する非常に有望な治療戦略を提供する。20

【0003】

EMTのモデルとして十分に特性決定された細胞株を使用して、EMTの誘導時に上方調節されるタンパク質が同定された。これらの1つである、クラステリン（sCLU）と呼ばれる分泌タンパク質は、EMTの間に刺激されることが判明し、自然にEMTプロセスを促進することができる（Lenferink et al., 2009）。sCLUと相互作用する複数の高親和性抗体を作製して、それらがEMTを阻止する能力について細胞ベースアッセイで試験したところ、EMTを中和した抗体はすべて、sCLUタンパク質の同じ重要なアミノ酸配列に結合した。この発見によって、sCLUの特定の領域が、EMT促進活性を担っていることが証明された。sCLUのEMTエピトープをブロックすることにより、抗体、とりわけ16B5と称する抗体は、癌細胞とインキュベートすると、上皮細胞マーカーであるE-カドヘリンの膜発現の維持によって例証されるように、EMTを阻止することができた。さらに、前立腺癌および肺がん腫瘍を用いた異種移植片動物試験により、腫瘍関連sCLUの活性をブロックすると、腫瘍増殖の有意な低減によって測定されるように、ドセタキセルおよびゲムシタビンなどの標準的化学療法薬に対する応答の増大が起こることが判明した。まとめると、これらの結果は、sCLUの特定の領域と相互作用することができる抗体でEMTを阻止することにより、腫瘍増殖阻害および細胞傷害性薬物に対する応答の増加が起こることを証明した（国際公開第2007/030930号パンフレットの下、公開された国際出願第PCT/CA2006/001505号明細書および国際公開第2011/063523号パンフレットの下、公開された国際出願第PCT/CA2010/0001882号明細書を参照）。3040

【0004】

肺癌は、最も一般的な癌の1つで、世界的に死因の第1位であり、毎年百万を超える患50

者が診断され、非小細胞肺癌（N S C L C）は全肺癌の80%超を占めている。診断および治療手法が近年向上したにもかかわらず、患者の大部分は、進行性N S C L Cと診断され、その生存期間中央値は低いままである（Adamo et al., 2009）。

【0005】

N S C L Cの最も重要な標的の1つは、受容体チロシンキナーゼのE r b Bファミリーのメンバーである上皮成長因子受容体（E G F R）であるが、これは、癌細胞の増殖および生存に重要な役割を果たす細胞膜受容体である。これは、E G F の受容体および複数の別の内在性リガンドとして作用する大きな膜貫通糖タンパク質である。これは、細胞外領域、膜貫通ドメイン、および細胞内チロシンキナーゼ（T K）ドメインからなる3つのドメインを有する。機能的に、E G F Rに結合するリガンドは、受容体二量体化を誘導し、これは、細胞内T Kドメインの自己リン酸化および活性化を促進する構造変化を引き起す。その結果、E G F R活性化は、R a s / R a f / マイトジエン活性化タンパク質キナーゼ（M A P K）およびホスファチジルイノシトール-3'-キナーゼ（P I 3 K）/A k t 経路などの複数の下流シグナル伝達経路に影響を与え、これらの経路は、細胞増殖、浸潤性、死亡率、生存期間およびアポトーシスに影響を与える（Shigematsu et al., 2005）。

10

【0006】

E G F Rは、偏在的に発現されるが、多くの場合、腫瘍細胞において改変される。これらの改変には、遺伝子増幅、リガンドおよび/または受容体の過剰発現ならびに突然変異の活性化が含まれる。E G F Rもしくはその一次リガンドの過剰発現または異常調節は、肺癌などの多くのヒト固体腫瘍に特徴的である。N S C L Cの場合、腫瘍の43~83%がE G F Rを過剰発現する（Adamo et al., 2009）。細胞外ドメインまたは小細胞をターゲティングするモノクローナル抗体などのE G F Rに対するいくつかの薬剤が、T K活性を阻害することができる。

20

【0007】

転移性N S C L CにおけるE G F Rの状態および化学療法薬に対する応答は、多くの論議の主題である。腫瘍が高比率でE G F Rの発現増大を呈するにもかかわらず、臨床研究の中には、これは、第1選択治療の応答の不十分な予測因子であることを示すものもあった（Barr et al., 2008）。さらに、化学療法単独の場合と比較して、シスプラチン、ビノレルビンおよびセツキシマブ（E G F Rモノクローナル抗体）と併用して第1選択治療を実施した患者に穏やかではあるが有意な応答があったにもかかわらず、セツキシマブとE G F R過剰発現との間に相関はなかった（Mirshahidi and Hsueh, 2010）。全体として、N S C L CにおいてE G F R阻害剤を用いた圧倒的量の臨床結果から、受容体の状態は第1選択治療には重要ではないことが示されたが、近年の研究によって、セツキシマブと化学療法による治療を受けた高E G F R発現の患者が、化学療法単独の場合と比較して、生存期間全体に増加を示したことを明らかにする結果が報告された（Pirkner et al., 2012）。これらの結果から、E G F R阻害剤に対するN S C L C患者の応答に影響を与える、腫瘍におけるE G F Rに関連する他の機序があることが明らかである。

30

【0008】

阻害剤の応答に影響を与えると考えられるE G F Rの別の特性は、小分子と受容体のT K活性の結合を可能にするものである。癌適応（cancer indication）のために数種が開発され、承認されており、例えば、ゲフィチニブおよびエルロチニブが挙げられるが、これらは、この領域へのA T P結合を模倣することにより、細胞内シグナル伝達を阻止する2つの小分子である。これらの阻害剤のいずれも、第1選択治療においてN S C L Cで活性であることは見出されていないが、有意な臨床上の応答が第2および第3選択療法で達成された（Mirshahidi and Hsueh, 2010）。興味深いことに、E G F R過剰発現は、患者の応答に影響を及ぼさないが、E G F Rおよび特定の他の遺伝子における活性化突然変異は重大であることが見出された。例えば、活性化突然変異は、ゲフィチニブで治療した患者における無増悪生存期間の有意な増加をも

40

50

たらすことが判明した (Costanzo et al., 2011)。さらに、KRA Sと呼ばれる遺伝子にも突然変異を有する、エルロチニブで治療したNSCLC患者は、全く応答を示さなかった (Herbst and Sandler, 2008)。従って、患者の選択は、彼らがEGFR TK阻害剤に対してレスポンダーであるか否かを理解しようとする試みにとって決定的である。

【0009】

上に記載したように、EMTは、腫瘍細胞が治療に応答する様式に甚だしい影響をもたらす可能性があり、癌細胞が上皮細胞であることを維持する能力はこの応答にとって決定的である。細胞ベース研究において、上皮細胞マーカーであるE-カドヘリンの発現が増大した細胞は、EGFR阻害剤に対して感受性がより高い (Barr et al., 2008)。これらの知見と一致して、E-カドヘリン発現とエルロチニブに対する感受性との間には相関があった (Yauch et al., 2005)。腫瘍レベルでは、E-カドヘリン発現の回復が、EGFR阻害剤に対する感受性を高めることが判明した (Witt et al., 2006)。しかしながら、今日まで、臨床試験においてEMTとEGFR状態の関連は、明確には調査されていない。それでも、EGFR過剰発現とEGFR阻害剤に対する応答の間の相関の欠如、並びにそれらの応答に対する活性化EGFR突然変異の影響を仮定すると、恐らく、EMTのような別の影響が、NSCLC患者におけるEGFR阻害剤の効力を高めるのに直接関与していると考えられる。

10

【0010】

本出願は、EGFRを発現する腫瘍においてSCLUを阻害することによる、EMTをブロックする抗体を用いた治療方法を提供する。これらの腫瘍におけるEGFR状態は、EGFR遺伝子増幅またはEGFRリガンドの増幅を含み得る。さらに、腫瘍細胞は、EGFRとEGFRタンパク質パートナーによる自己分泌シグナル伝達の増大を含み得る。EGFR状態はまた、受容体に増大した活性を呈示させるEGFRの突然変異活性化も含み得る。別の実施形態において、腫瘍は、EGFRに対するモノクローナル抗体または、EGFRの活性を無効にする小分子阻害剤などのEGFR阻害剤に対して感受性でも耐性でもあり得る。さらに、EGFR状態は、EGFRを再取得した、EGFR発現について先駆的に陰性であった腫瘍も含み得る。

20

【0011】

SCLUを発現するNSCLC細胞株を抗クラステリン抗体に曝露すると、EGFRの発現および活性化の両方が増大する。同時に、抗クラステリン抗体によるEMT阻害のために、NSCLC細胞株は、E-カドヘリン発現の増大も呈示する。これらを総合すると、EGFR阻害剤と併用したクラステリン阻害剤により治療したNSCLC患者は、EGFR阻害剤に対する応答の増大を示すと考えられる。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、概して、癌治療のためのクラステリン阻害剤とEGFR阻害剤の併用に関する。

40

【0013】

本発明の方法は、必要とする個体に、上皮間葉移行(EMT)を阻害することができるクラステリン阻害剤とEGFR阻害剤を投与することを含む。EGFR阻害剤はまた、クラステリン阻害剤と個別に、同時にまたは逐次投与してもよい。

【0014】

クラステリン阻害剤は、特に、EGFR耐性が認められた、検出された、または疑われる場合に投与してよい。

【0015】

本発明の方法は、EGFR耐性を予防するために、またはEGFR阻害剤に対して癌細胞を敏感にするためにクラステリン阻害剤を投与することも含む。

【図面の簡単な説明】

50

【0016】

【図1】肺癌細胞株は、クラステリンを発現する。この図は、NSCLC由来の複数の細胞株におけるクラステリンmRNA発現のRT-PCR分析を示す（上方パネル）。対照として、各反応での等量の出発材料を確実にするように、アクチンからのmRNAも増幅した（下方パネル）。

【図2】肺癌細胞株は、クラステリン（sCLU）を発現する。この図は、肺癌細胞系により分泌されるsCLUの定量を示す。これらの量は、sCLU特異的ELISAで測定し、ng/mlで表示する。

【図3】h16B5は、肺癌細胞株のE-カドヘリン発現を増大させる。この図は、sCLU阻害剤、h16B5と一緒にインキュベートしたときの、A549 NSCLC細胞の上皮特性の増大を示す。左側パネルは、対照IgGと一緒に48時間インキュベートした細胞を示し、右側パネルは、同一条件下で、h16B5と一緒にインキュベートした細胞を示す。

【図4】h16B5でのNSCLCの処理により、EGFR発現の増大が起こる。対照ビヒクルまたはh16B5の存在下でのEGFR発現は、A549またはH226細胞のいずれかから調製した全細胞溶解物のEGFR特異的抗体を用いて測定した。

【図5】h16B5でのNSCLCの処理により、EGFRリン酸化の増大が起こる。対照ビヒクルまたはh16B5の存在下でのEGFRリン酸化は、A549またはH226細胞のいずれかから調製した全細胞溶解物のホスホチロシン特異的抗体を用いて測定した。

【図6】h16B5でのNSCLCの処理により、EGFRリン酸化の増大が起こる。対照ビヒクル、h16B5または対照IgGの存在下でのEGFRリン酸化は、A549またはH226細胞のいずれかから調製した全細胞溶解物のホスホチロシン特異的抗体を用いて測定した。

【図7】h16B5とエルロチニブの併用により、抗腫瘍効果の増大が起こる。組換えクラステリンの存在または非存在下で、h16B5とエルロチニブを併用して、H1299およびH460癌細胞の生存を判定した。

【発明を実施するための形態】

【0017】

上皮成長因子受容体（EGFR）は、複数のタイプの上皮癌に過剰発現する。EGFR遺伝子改変の存在が、腫瘍をEGFR阻害剤に対してより感受性にすると考えられる。しかし、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）に対して初期応答を有する患者は、平均1年内に再発する。EGFRエキソン9またはL858R突然変異の欠失によって、好ましい臨床結果が得られることがわかっているが、突然変異T790M、L747Sおよび/またはD761Yなどの二次分子イベントは、耐性および腫瘍再発に関連する。MET受容体の増幅およびIGFRシグナル伝達の活性化は、いずれもEGFRとは独立にPI3/AKT経路を活性化するが、これらも二次耐性を駆動することが判明した。

【0018】

出願人は、EGFR発現およびリン酸化が、クラステリン阻害剤で処理した癌細胞において増大するという予想外の発見をするに至った。また、クラステリン阻害剤による癌細胞の処理は、細胞表面でのE-カドヘリン発現の増大によって示されるように、癌細胞の上皮表現型の再現も伴う。

【0019】

このように、クラステリン阻害剤は、EMT表現型の逆転を誘導するだけではなく、EGFR阻害剤に対する癌細胞の感受性も回復し得る。

【0020】

本発明は、概して、癌治療に用いるためのクラステリン阻害剤とEGFR阻害剤の併用に関する。

【0021】

併用薬剤（pharmaceutical combinations）は、特に、薬

10

20

30

40

50

学的に許容される担体と結合したクラステリン阻害剤と、薬学的に許容される担体と結合したE G F R 阻害剤とを含んでよい。

【0022】

本発明の方法は、必要とする個体に、クラステリン阻害剤およびE G F R 阻害剤を投与することを含む。E G F R 阻害剤は、クラステリン阻害剤と個別に、同時にまたは逐次投与してよい。

【0023】

クラステリン阻害剤は、特に、E G F R 耐性が認められた、検出された、または疑われる場合に投与してよい。

【0024】

本発明の方法は、E G F R 耐性を予防するために、またはE G F R 阻害剤に対して癌細胞を敏感にするためにクラステリン阻害剤を投与することも含む。

10

【0025】

本発明の一態様において、クラステリン阻害剤は、E G F R 阻害剤の前に投与してよい。例えば、クラステリン阻害剤は、E G F R 阻害剤の投与の数時間～数日前または数ヵ月前に投与してよい。別の態様では、クラステリン阻害剤は、E G F R 阻害剤による各治療と同時（例えば、同じ日）に、またはE G F R 阻害剤による各治療の間に投与してもよい。

【0026】

本発明によれば、クラステリン阻害剤は、E G F R 阻害剤の投与前に複数用量で、例えば、毎日、隔日、週1回、週2回などで投与してもよい。

20

【0027】

本方法はまた、E G F R 阻害剤の投与前に、癌細胞の上皮間葉表現型の逆転についての試験も含み得る。EMT状態は、例えば、E - カドヘリン、R A B 2 5 、インテグリン6、ビメンチン、Z E B 1 およびS I P 1 から選択される1つまたは複数の遺伝子 / タンパク質の発現レベルを測定することにより、判定することができる。

【0028】

クラステリン阻害剤は、それらが、クラステリン発現、分泌またはクラステリン活性を弱める能力によって同定することができる。

30

【0029】

クラステリン阻害剤の例示的実施形態としては、例えば、分泌クラステリン(s C L U)またはT G F - のEMT促進作用を妨害する能力によって同定されるものが挙げられる。例えば、癌細胞（例えば、4 T 1 : 乳癌細胞、D U 1 4 5 : 前立腺癌細胞など）を、T G F - またはs C L Uの存在下、推定クラステリン阻害剤で処理してから、EMTのマーカを以下に記載するように評価することができる。上皮細胞マーカの発現を増大する、および / または間葉系細胞マーカの発現を低減することができる推定化合物を、好適なクラステリン阻害剤として同定することができる。

【0030】

あるいは、推定クラステリン阻害剤の存在下で癌細胞の運動性を評価してもよい。例えば、P C T / C A 2 0 0 6 / 0 0 1 5 0 5号明細書に記載されているように、T G F - またはs C L Uの存在下で、癌細胞を推定クラステリン阻害剤で処理してから、外傷治癒アッセイまたは黒インク運動アッセイ(black ink motility assay)を実施してもよい。これらのタイプのアッセイにおいて癌細胞の運動性を阻害または低減することができる推定化合物を、好適なクラステリン阻害剤として同定することができる。好適なクラステリン阻害剤を同定するために、他の方法を用いてもよいことは理解すべきである。

40

【0031】

特に本発明に含まれるクラステリン阻害剤としては、例えば、抗クラステリン抗体またはその抗原結合性フラグメントが挙げられる。

【0032】

50

本発明によれば、クラステリン阻害剤には、EMT（例えば、癌細胞において）を阻害することができる抗クラステリン抗体またはその抗原結合性フラグメントが含まれる。

【0033】

一般に用いられるEMTの分子マーカとしては、例えば、E-カドヘリン、サイトケラチンおよび-カテニン（膜内）の発現の低減、および／またはSnail、Slug、Twist、ZEB1、ZEB2、N-カドヘリン、ビメンチン、-平滑筋アクチン、マトリックスマタロプロテイナーゼなどの発現の増大がある（例えば、KalluriおよびWeinberg, The Journal of Clinical Investigation, 119(6), p1420-1428; 2009; Fassina et al., Modern Pathology, 25; p86-99; 2012; Lee et al., JCB; 172; p973-981; 2006）。EMT表現型はまた、遊走、浸潤の能力の増大、またはアノイキス／アポトーシスに対する抵抗性によっても識別することができる。上皮間葉転移を被った細胞は、したがって、上皮マーカの低減および間葉マーカまたはEMT表現型の出現によって検出することができる。

10

【0034】

マーカの発現は、一般に、別の状態に対して、ある状態の細胞発現のレベル（遺伝子レベルまたはタンパク質レベル（例えば、細胞表面発現など）を比較することにより、判定することができる。例えば、1つまたは複数の特定のマーカの発現のレベルは、非癌細胞と比較して、癌細胞において判定することができる。あるいは、1つまたは複数の特定のマーカの発現のレベルは、EGFR阻害剤に対して敏感な癌細胞と比較して、EGFR阻害剤に対して耐性の癌細胞において判定することができる。さらに、1つまたは複数の特定のマーカの発現のレベルは、統計的に、対照に典型的な値に対して評価することもできる。

20

【0035】

このような治療から利益を受ける個体としては、前立腺癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブまたは基底細胞型）、子宮内膜癌、卵巣癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、膵臓癌、腎細胞癌等（これらの癌の進行または転移形態を含む）などの癌（すなわち、上皮性癌）を有する者が挙げられる。

30

【0036】

本発明を実施するために用いることができる抗クラステリン抗体の例示的実施形態としては、ヒトクラステリンのサブユニットのC末端部分のアミノ酸421および443に結合することができるものがある。本発明に含まれる抗体または抗原結合性フラグメントのより具体的実施形態としては、国際公開第2007/030930号パンフレットの下、公開された国際出願第PCT/CA2006/001505号明細書および国際公開第2011/063523号パンフレットの下、公開された国際出願第PCT/CA2010/0001882号明細書に記載されているものが挙げられる。

【0037】

本発明は、特に、16B5、21B12、20E11、16C11および11E2として同定される抗体のものと同一の少なくとも1つの相補性決定領域（CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2および／またはCDRL3）を含む抗体および抗原結合性フラグメントを包含する。より具体的には、本発明は、特に、16B5、21B12、20E11、16C11および11E2として同定されるもの（また、PCT/CA2006/001505号明細書を参照）またはヒト化16B5(h16B5)、ヒト化21B12(h21B12)、h16B5VLコンセンサス1、h16B5VLコンセンサス2、h16B5VLコンセンサス3、h16B5VHコンセンサス1、h16B5VHコンセンサス2、h16B5VHコンセンサス3、h21B12VLコンセンサス1、h21B12VLコンセンサス2、h21B12VHコンセンサス3、h21B12VHコンセンサス1、h21B12VHコンセンサス2もしくはh21B12VHコンセンサス3として同定されるもの（PCT/CA2010/0001882号明細書も参

40

50

照)と同一の軽鎖および/または重鎖を有する抗体および抗体結合性フラグメントを包含する。

【0038】

20E11、16C11および11E2として同定される抗体の軽鎖および/または重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号62～67に示され、ここで、推定相補性製決定領域は太字で示す。

【0039】

抗体および抗原結合性フラグメントの他の例示的実施形態としては、本明細書で同定される抗体と競合し得るものが挙げられる。

【0040】

本発明は、本明細書に記載する特徴を有するモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体(単離された)ならびに本明細書に記載の特徴を有する抗原結合性フラグメントを包含する。また、モノクローナル、キメラ、ヒト化もしくはヒト抗体同士の軽鎖および/または重鎖の並び替えを含む抗体または抗原結合性フラグメントも本発明に含まれる。

【0041】

本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、従って、ヒト抗体のヒト定常領域のアミノ酸および/またはフレームワークアミノ酸を含み得る。

【0042】

用語「抗体」は、無傷抗体、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。用語「抗体」はまた、二重特異的抗体などの多重特異的抗体を包含する。ヒト抗体は、通常、2つの軽鎖と2つの重鎖から成り、それぞれ可変領域および定常領域を含む。軽鎖可変領域は、本明細書においてフレームワーク領域の側面に位置するCDRL1、CDRL2およびCDRL3として同定されている3つのCDRを含む。重鎖可変領域は、本明細書においてフレームワーク領域の側面に位置するCDRH1、CDRH2およびCDRH3として同定される3つのCDRを含む。

【0043】

本明細書において用語「抗原結合性フラグメント」は、抗原に結合する能力を保持している1つまたは複数のフラグメント(例えば、K_{AAG1}、K_{AAG1}の分泌形態、またはその変異体)を指す。抗体の抗原結合機能は、無傷抗体のフラグメントによって実施され得ることが明らかにされてきた。抗体の「抗原結合性フラグメント」という用語に包含される結合性フラグメントの例としては、(i)Fabフラグメント、即ちV_Lドメイン、V_Hドメイン、C_LドメインおよびC_{H1}ドメインからなる1価のフラグメント、(ii)F(ab')₂フラグメント、即ちヒンジ領域におけるジスルフィド架橋を介して連結される2つのFabフラグメントを含む2価のフラグメント、(iii)V_HドメインおよびC_{H1}ドメインからなるFdフラグメント、(iv)抗体の單一群(single arm)のV_LドメインおよびV_HドメインからなるFvフラグメント、(v)V_HドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)、ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)、例えば、V_HCDR3が挙げられる。更にまた、Fvフラグメントの2つのドメイン(V_LおよびV_H)は、別々の遺伝子によってコードされるが、組み換え方法を用いて、合成リンカーにより、これらを单一ポリペプチド鎖とすることができます、この单一ポリペプチド鎖内でV_L領域とV_H領域が対合することによって1価分子が形成される(一本鎖Fv(scFv)として知られる; 例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883)を参照のこと)。そのような一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合性フラグメント」という用語に包含されるように意図されたものである。更にまた、抗原結合性フラグメントは、(i)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合された結合ドメインポリペプチド(例えば、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、またはリンカーペプチドを介して軽鎖可変領域に融合された

10

20

30

40

50

重鎖可変領域)と、(i i) ヒンジ領域に融合された免疫グロブリン重鎖 C H 2 定常領域と、(i i i) C H 2 定常領域に融合された免疫グロブリン重鎖 C H 3 定常領域と、を含んでなる結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質を含む。ヒンジ領域は、1つまたは複数のシスティン残基をセリン残基で置換することによって、二量体化が防止されるように修飾してもよい。そのような結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は更に、米国特許出願公開第2003/0118592号明細書および米国特許出願公開第2003/0133939号明細書に開示されている。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を使用して取得され、これらのフラグメントは、無傷抗体と同じ方法で、利用のためにスクリーニングされる。

【0044】

10

典型的な抗原結合部位は、軽鎖免疫グロブリンと重鎖免疫グロブリンとを対にして形成された可変領域から構成される。抗体可変領域の構造は非常に整合性がとれており、極めて類似した構造を呈する。これらの可変領域は典型的に、相補性決定領域 (C D R) と呼ばれる 3 つのハイパー可変領域で離間された比較的相同意的なフレームワーク領域 (F R) から構成される。抗原結合性フラグメントの全般的な結合活性は多くの場合、 C D R の配列によって指令される。 F R は、往々にして、最適な抗原結合のために、 C D R の 3 次元での適切な位置決めおよびアライメントにおいてある役割を果たす。

【0045】

20

本発明の抗体および / または抗原結合性フラグメントは、例えば、マウス、ネズミもしくは他のいずれかの哺乳動物、または他の供給源 (組み換えDNA技術によるものなど) に由来するものであってよい。

【0046】

他のクラステリン阻害剤としては、例えば、限定されないが、 s i R N A (例えば、標的クラステリン R N A) およびアンチセンス (例えば、標的クラステリン R N A) を挙げることができる。

【0047】

30

アンチセンスの例示的実施形態として、例えば、米国特許第7,569,551号明細書 (その全内容を参照として本明細書に組み込む) に記載されているものがあり、特に、 O G X - 011 (クスチルセンナトリウムとしても知られる ; O n c o G e n e x 、 配列番号 61 も参照のこと) が挙げられる。

【0048】

E G F R 阻害剤の例示的実施形態として、例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブ、イマチニブ、ラパチニブまたはセマジニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。 E G F R 阻害剤のその他の例示的実施形態としては、例えば、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、またはメツズマブなどのモノクローナル抗体がある。

【0049】

本発明の併用薬剤による治療の利益を受け得るその他の個体としては、1つまたは複数の E G F R 阻害剤に対して耐性の腫瘍を有する者が挙げられる。このような個体は、併用薬剤の投与の前に選択することができる。

【0050】

40

E G F R 耐性は、腫瘍再発などの臨床パラメータを評価するか、または耐性の分子マーカ、例えば、 E G F R もしくは E G F R 経路における突然変異、増幅 (R A S / M A P K 、ホスホリバーゼ C 、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ / A K T 、 S R C / F A K 経路など) および / または E M T マーカを測定することにより、決定することができる。

【0051】

従って、 E G F R 阻害剤に対する耐性についての試験は、 E G F R における突然変異 (例えば、チロシンキナーゼドメインでの突然変異、短縮型変異、挿入) の存在の判定、 E G F R 増幅の判定を含んでよい。

【0052】

50

更に、本明細書において使用される「薬学的に許容可能な担体」または「医薬担体」は当該技術分野において公知であり、0.01～0.1Mもしくは0.05Mのリン酸バッファー、または0.8%生理食塩水を包含するが、これらに限定されない。加えて、そのような薬学的に許容可能な担体は、水性または非水性溶液、懸濁液、およびエマルジョンであってもよい。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体としては、水、アルコール／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液（生理食塩水および緩衝媒体を含む）が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液または固定油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、流体および栄養補充液、電解質補充液、例えばリンガーデキストロース系、およびこれらに類するものが挙げられる。保存料および他の添加剤、例えば、抗菌剤、酸化防止剤、照合剤、不活性ガス、およびこれらに類するものもまた、存在し得る。

10

【0053】

本明細書に記載する実験は、16B5のヒト化形態（h16B5）を用いて実施した。

【実施例】

【0054】

実施例1

NSCLC細胞株はsCLUを発現する

クラステリンが、NSCLC腫瘍由来の細胞株に発現されたか否かの判定を試みた。第1ステップとして、各細胞株から全RNAを用意し、これをテンプレートとして用いて、ランダムプライムドオリゴヌクレオチドによりcDNAを作製した。ヒトクラステリン遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用いて、当業者には公知の方法によりRT-PCRを実施した。5'-プライマー（ogs1788）は、配列番号57に示す配列によりコードされ、3'-プライマー（ogs1721）は、配列番号58に示す配列によりコードされる。PCR産物は、長さ1412bpである。各反応における全RNAの量のコントロールとして、ヒトハウスキーピング遺伝子アクチンに特異的なオリゴヌクレオチドを用いてパラレルRT-PCR反応を実施した。5'-プライマー（ogs387）は、配列番号59に示す配列によりコードされ、3'-プライマー（ogs965）は、配列番号60に示す配列によりコードされる。PCR産物は、長さ746bpである。図1に示すように、分析したNSCLC細胞株は、1つを除くすべてが、クラステリンをコードするmRNAを含んでおり、これは、それぞれ異なるレベルで検出された。予想したように、すべてのRNAサンプルにアクチンが存在していたが、これは、各RT-PCR反応においてほぼ当量の出発全RNAが存在したことを示している。この分析に用いた細胞株は、次の通りである：レーン1、A549；レーン2、EKVX；レーン3、HOP-62；レーン4、HOP-92；レーン5、H322M；レーン6、H226；レーン7、H23；レーン8、H460；およびレーン9、H522。

20

30

【0055】

並行して、NSCLC細胞株によりsCLUが分泌されるか否かを判定した。A549、H226、H292、H460およびH1299細胞をATCC（Manassas, VA）から購入し、製造業者の指示に従って培養した。培養して数日が経過し、細胞が密集状態（confluence）に達したら、各細胞株からの順化培地を分析のために回収した。ヒトクラステリンを測定するように設計された市販のELISAキット（BioVendor LLC, Candler, NC）を取得し、製造業者の指示に従って分析を実施した。図2の表に示すように、5つの培地サンプルは、10ng/mlを下回るレベルであったH226細胞株を除いて、すべてが、13.6ng/mlから100ng/mlを超える範囲のsCLUレベルを含んでいた。

40

【0056】

総合すると、これらの結果は、NSCLCを有する患者からの癌細胞株は、sCLUを多量に分泌し、sCLUのEMT誘導活性を阻害するh16B5などの抗体に応答する可

50

能性があることを示している。

【0057】

実施例2

*h16B5*とのNSCLC細胞のインキュベーションは、上皮細胞マーカ、E-カドヘリンの発現増大を引き起こす

また、免疫蛍光法を用いて、A549細胞の表面での発現をモニターすることにより、E-カドヘリンの発現も調べた。手短には、細胞をカバーガラスに接種し、10 μg / mlの対照IgGまたは*h16B5*のいずれかと一緒に48時間インキュベートした。このインキュベーション後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定してから、マウス抗ヒトE-カドヘリン抗体（製造業者）と一緒に1時間インキュベートした。洗浄後、E-カドヘリンで染色した細胞をローダミンレッド-Xに結合させた二次抗体と一緒にインキュベートした。スライドを取り付け、特異的E-カドヘリン染色を蛍光顕微鏡により視覚化した。図3に示すように、A549細胞は、その細胞表面でのE-カドヘリン発現は低く、非特異的IgGと48時間のインキュベーションによってそのタンパク質のレベルは増加しなかった（左側パネルを参照）。これに対し、*h16B5*と細胞のインキュベーションでは、A549細胞の表面でのE-カドヘリン染色の強度に顕著な増加が起きた（右側パネルを参照）。これは、細胞の上皮特性が非常に高いことを示している。

【0058】

実施例3

*h16B5*によるsCLUの阻害は、NSCLC細胞におけるEGFR発現およびリン酸化の増大を引き起こす

この実施例では、*h16B5*を用いてEMTを阻害することによって、NSCLC細胞株におけるEGFRの状態に何らかの作用が起こるか否かを調べた。この問題に取り組むため、これらの細胞における受容体の発現およびリン酸化を測定するために条件を最適化した。EGFRは、EGFなどのそのリガンドへの曝露後、極めて急速にリン酸化することがわかっている。このリン酸化と並行して、この受容体は、内在化され、再循環されるため、その存在は細胞表面から消失する。比較的高レベルのsCLUを分泌する2つの細胞株、A549およびH226をこの分析のために選択した。細胞をマルチウェルプレート内に接種し、10 μg / mlの*h16B5*、10 μg / mlの対照IgGまたはビヒクルのPBSで48時間処理した。このインキュベーション後、細胞をEGF（10 ng / ml）で処理し、細胞を様々な時点で採取して、細胞溶解物に変換した。これらの溶解物をSDS-PAGEにより電気泳動させ、タンパク質をナイロン膜に転移させた後、ウエスタンプロットに用いることにより、EGFRの発現またはリン酸化を調べた。EGFRの発現を測定するために、クローン1005と称する市販の抗体（Santa Cruz, Biotech, Santa Cruz, CA）を使用し、また、EGFRのリン酸化は、クローン4G10と称する抗ホスホチロシン抗体（Millipore, Etobicoke, ON）を用いてモニターした。図4に示すように、ビヒクル対照で48時間、その後EGFRで処理したA549細胞は、予想通り、EGFR発現の低減を示したが、10分後に急速に回復する（上方パネル：レーン1とレーン2を比較）。対照的に、*h16B5*抗sCLU抗体で処理したA549細胞は、受容体のEGF誘導による分解から細胞を防御した（上方パネル：レーン5とレーン6を比較）。各レーンのタンパク質の量を照査するため、膜に抗アクチン抗体（クローンAC-15、Sigma, Oakville, ON）を再プロッティングし、上記抗体を、ゲル上で分離した各サンプルに等しく発現させた。同じ手法を用いて、他のNSCLC細胞株H226を調べたところ（下方パネル）、観察された結果は、A549細胞で認められたものと類似していた。この場合、細胞を対照で48時間処理すると、EGFRのEGF誘導分解はさらに顕著であった（下方パネル、レーン1～4）。*h16B5*で処理した細胞の場合、EGFRの減少は見られなかった（下方パネル、レーン5～8）。これもまた、抗体によるsCLUの阻害によって、EGFR発現の維持がもたらされることを示すものであった。従って、これらの知見から、細胞が、EGFR阻害剤に対する感受性の増大を呈示することが示唆される。

10

20

30

40

50

【0059】

これらの細胞におけるEGFRの活性化も調べた。この場合、受容体のチロシン・リン酸化形態としか相互作用しない抗体を膜にプロッティングした。予想したように、A549細胞において、EGFの非存在下でEGFRのリン酸化は認められなかつた(図5参照、上方パネル、レーン1およびレーン5)。しかし、細胞をEGFで処理したところ、2分後であつても、リン酸化チロシン残基の出現が検出された(上方パネル、レーン2およびレーン6)。h16B5で48時間処理した細胞は、非処理のまま放置した細胞と比較して、EGFRに、より多量のリン酸化チロシン残基を示した。EGFRのリン酸化のこのような相違は、H226細胞でも再現された(図5参照、下方パネル、レーン2~4をレーン6~8と比較)。追加の対照として、EGFに曝露する前に、A549細胞を対照抗体でも48時間処理した(図6)。ここでもやはり、EGFRのリン酸化量の変化は、h16B5で処理した細胞でしか認められなかつた(レーン2、3(対照)および8、9(IgG)とレーン5、6(h16B5)を比較)。

10

【0060】

総合すると、以上の結果から、肺癌細胞におけるEMTのブロッキングは、これらの細胞のEGFR状態に影響を与えることがわかる。特に、h16B5などのモノクローナル抗体によるSCLU EMT誘導活性の阻害は、これらの細胞におけるEGFR状態が停止される機序の1つである。本発明者らは、h16B5で処理した肺癌細胞は、E-カドヘリンの発現を増大させたことから、これらがより上皮細胞性であることを証明した。EGFR感受性の増大と、抗体でSCLUをブロックすることによるEMTの阻害との組合せは、EGFR阻害剤の効力を高めると考えられる。最後に、EGFRを発現し、EMTを経たあらゆる癌細胞が、肺癌細胞と同様に、モノクローナル抗体などのSCLUの阻害剤に応答すると考えられる。

20

【0061】

実施例4

h16B5の存在下でEGFR阻害剤に対する癌細胞の感受性を増大する方法

抗クラステリン抗体でSCLUをブロックすることにより癌細胞のEMTを阻害すると、細胞表面でのEGFR発現の増大もしくはEGFRリン酸化の増大、またはその両方が起こる。従って、EGFRの阻害剤は、EMTがクラステリン阻害剤で阻害される条件下で、増大した効力を有すると考えられる。

30

【0062】

例えば、癌細胞株をマルチウェルプレートに接種し、集密状態に近づいたら、細胞を抗クラステリン抗体(例えば、h16B5)で処理することにより、EMTを阻害する。実験的に、SCLU、TGF、EGFなどのEGFRのリガンド、またはその他の類似分子などの公知の誘導物質で、EMTを誘導するのが有用な場合もある。

【0063】

EGFR阻害剤(例えば、受容体に対するリガンド結合をブロックするか、またはEGFRの二量体化を阻止するモノクローナル抗体、TK阻害剤など)も、抗クラステリン抗体と一緒に、またはその後に(例えば、数時間後)ウェルに添加する。場合により、EGFR阻害剤は、抗クラステリン抗体の前に、ウェルに添加してもよい。

40

【0064】

EGFR阻害剤は、1fモル/L~100マイクロモル/Lの範囲の様々な濃度で添加してよい。h16B5でSCLUを阻害したとき、EGFR阻害剤の細胞傷害性が増大するか否かを判定するために、残った細胞の数を、増殖アッセイ、浸潤アッセイ、アポトーシスアッセイまたは遊走アッセイなどの標準プロトコルを用いて決定する。このアッセイに適した癌細胞としては、EGFR阻害剤に耐性の癌細胞、または野生型EGFR、活性突然変異を含むEGFR、EGFR遺伝子増幅およびEGFRの状態を改変しうるその他の状態を発現する癌細胞が挙げられる。

【0065】

クラステリン阻害剤とEGFR阻害剤の併用については、十分に確立された癌のモデル

50

において *in vivo* で試験することもできる。例えば、EGFR を発現するヒト癌細胞株を免疫不全マウスに注射し、腫瘍異種移植片が移植されるまで、増殖させる。EMT をブロックするために、EGFR 阻害剤（同時または逐次投与）と併用して、抗クラステリン抗体（例えば、16B5、h16B5 など）で動物を処理する。カリパスなどの計器を用いた直接サイズ測定を含む様々な方法により、腫瘍の増殖をモニターする。腫瘍増殖を測定するのに用いられる他の方法としては、蛍光または生物発光が挙げられ、その場合、腫瘍細胞は、蛍光または生物発酵を発現するように遺伝子改変される。別の例では、腫瘍増殖は、ポジトロン断層法（PET）またはコンピュータ断層撮影（CT）スキャン手法を用いてモニターすることもできる。これらのアッセイにおいて、クラステリン阻害剤および EGFR 阻害剤は、静脈内、皮下、筋内、腫瘍内または経口などの様々な経路により反復して投与することができる。典型的用量は、1マイクログラム / kg ~ 100 mg / kg の範囲である。

10

【0066】

この方法の適用に基づき、EGFR 阻害剤と併用した、EMT をブロックする薬剤（例えば、16B5、h16B5 など）での治療により、個別に投与するいずれかの薬剤と比較して、増強した抗腫瘍効果が得られる。

【0067】

この実施例では、EGFR 阻害剤に対する癌細胞の応答は、h16B5 などの sCLU の阻害剤と並行して投与したとき、増大し得ることを実証する。野生型 EGFR を発現することがわかっている 2 つの NCSLC 細胞株、H1299 および H460 (Akashi et al., 2008) を、sCLU (0.25 μg / ml)、TGF (2 nM) のいずれか、または 2 つのタンパク質の組合せで、48 時間処理することにより、EMT を刺激した。この誘導後、エルロチニブ (20 μM) で 96 時間処理した後、Cell Titter-Glo (登録商標) Luminous Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI) を用いて、細胞の数を決定した。対照として、別の細胞は、sCLU または TGF で誘導しなかった。図 7A に示すように、H1299 細胞は、H460 細胞よりエルロチニブに対して感受性が高かった。エルロチニブと h16B5 の併用によって、細胞数はさらに減少した (H1299 および H460 細胞はそれぞれ 10.2% および 13.8% 減少) が、これは、内在的に発現した sCLU の活性 (図 2 参照) をブロックすることにより、エルロチニブが、EGFR 陽性肺癌細胞を殺傷する能力が増大したことを見ている。また、sCLU または TGF のいずれかで、EMT を経るよう誘導した細胞でのエルロチニブに対する応答も比較した。図 7B に示すように、EMT の刺激によって、エルロチニブに対する細胞の応答性は変化しなかった。しかし、細胞数の減少は、EMT を経ていない細胞と比較し、これらの条件下で、h16B5 の存在下の方が大きかった (H1299 および H460 細胞についての 16.1% および 24.0%)。これは、エルロチニブ応答の増大は、EMT が阻害された細胞でより大きいことを示している。注目すべきことに、エルロチニブ応答性の増加は、この EGFR 阻害剤に対し、より耐性である H460 細胞で、より大きいことが認められた。この最後の結果は、EGFR 阻害剤に対して耐性になった肺癌患者を治療する戦略として、h16B5 による sCLU 阻害の可能性を示すものである。

20

【0068】

実施例 5

他の癌適応での使用を目的とする併用薬剤

トリプルネガティブ（すなわち、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体の発現の欠乏、ならびに HER2 発現の非存在）または基底細胞型であることがわかっている乳癌細胞株 MDA-MB-231 を、ゲフィチニブと併用した抗クラステリン抗体またはゲフィチニブ単独で治療した。細胞増殖を標準アッセイにより数日の期間にわたって測定した。

30

【0069】

抗クラステリン抗体とゲフィチニブの併用は、腫瘍細胞増殖を阻害する上で、ゲフィチニブ単独の場合より有効であった（データは示していない）。

50

【0070】

実施例1～5に記載したものと同様の方法を用いて、他の抗クラステリン抗体および/またはEGFR阻害剤の組合せを試験してもよい。

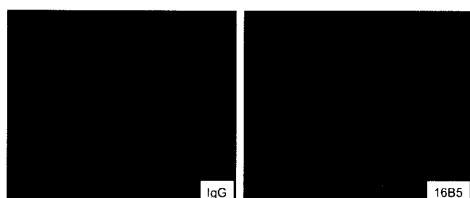
【図2】

細胞株	[sCLU] (ng/ml)
A549	71.9
H226	<10
H292	40.8
H460	103
H1299	13.6

図2

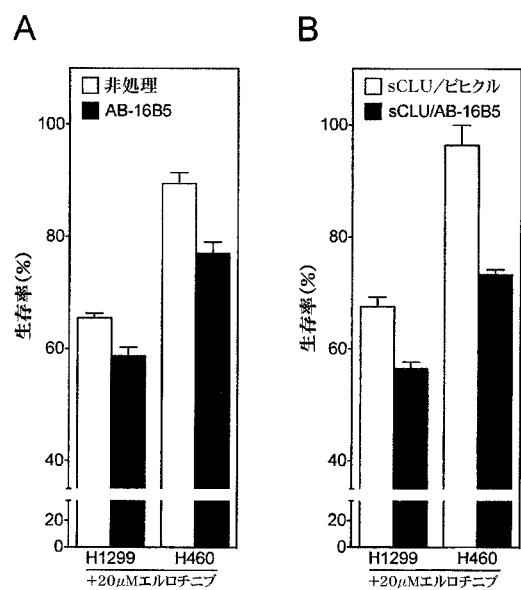
【図3】

Figure 3



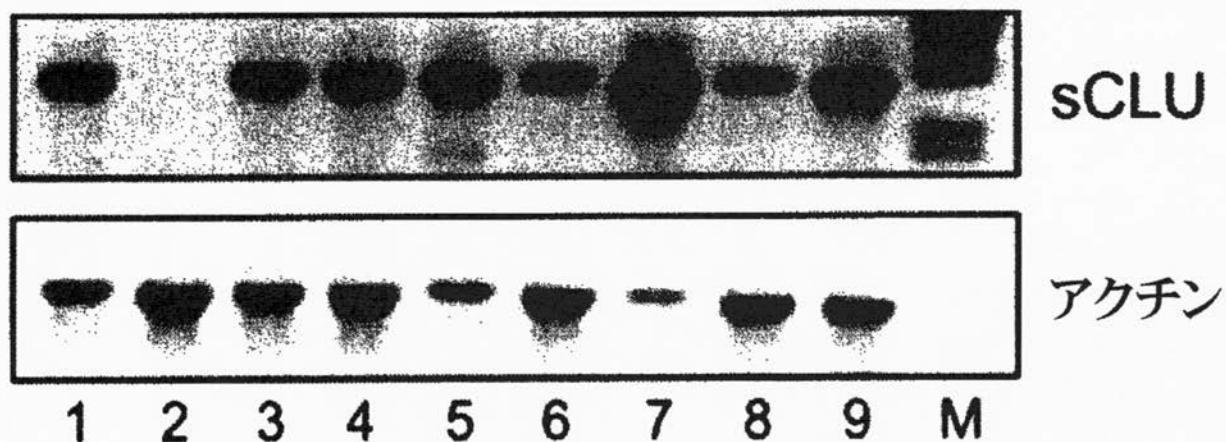
【図7】

図7



【図1】

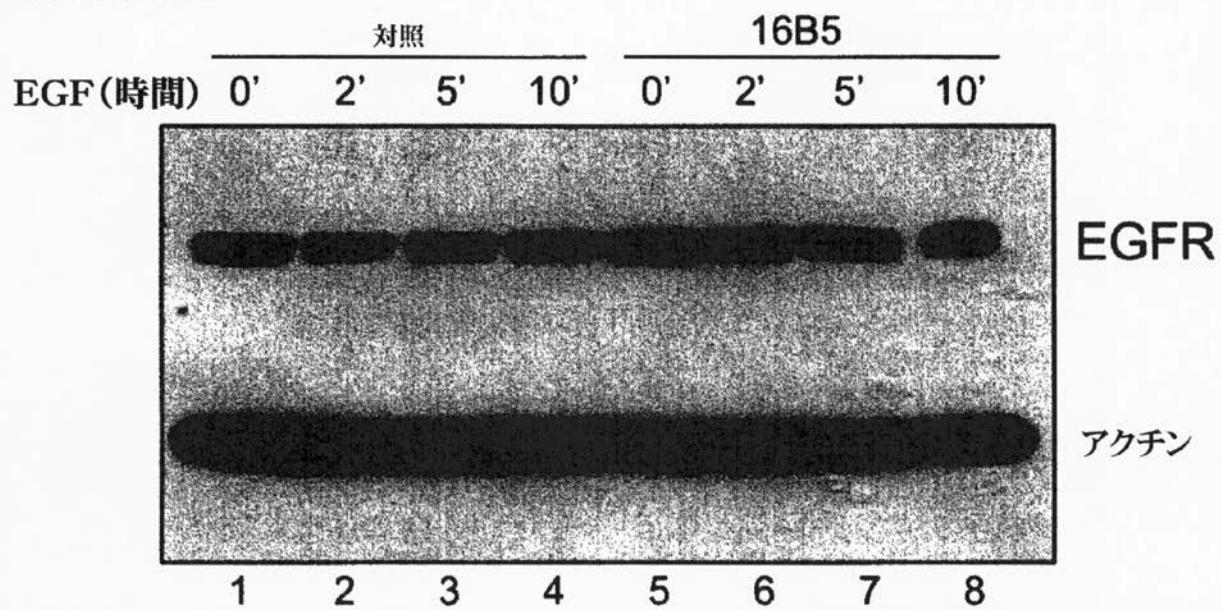
図1



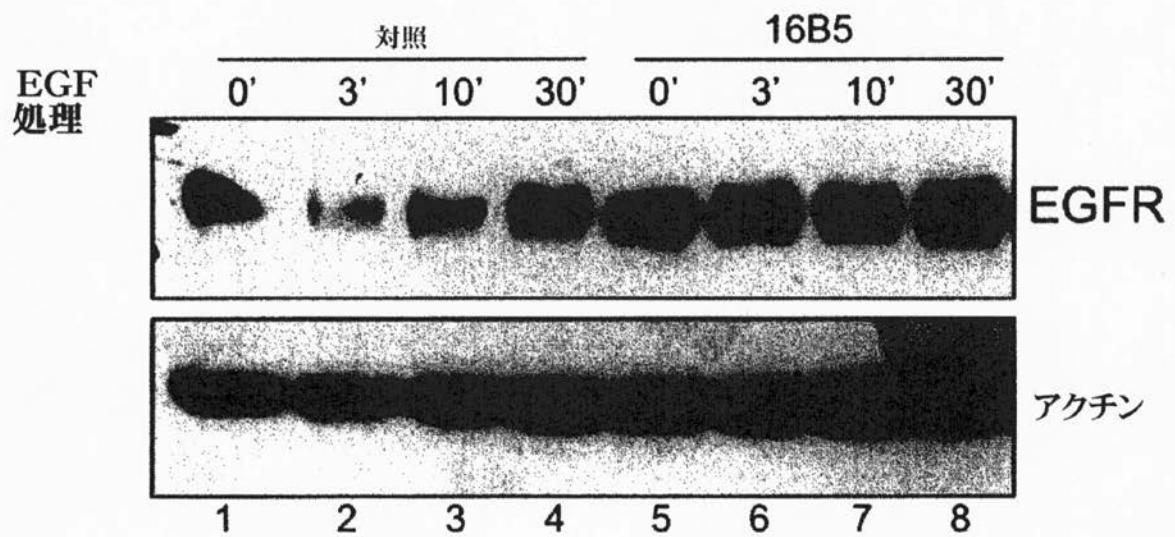
【図4】

図4

A549細胞



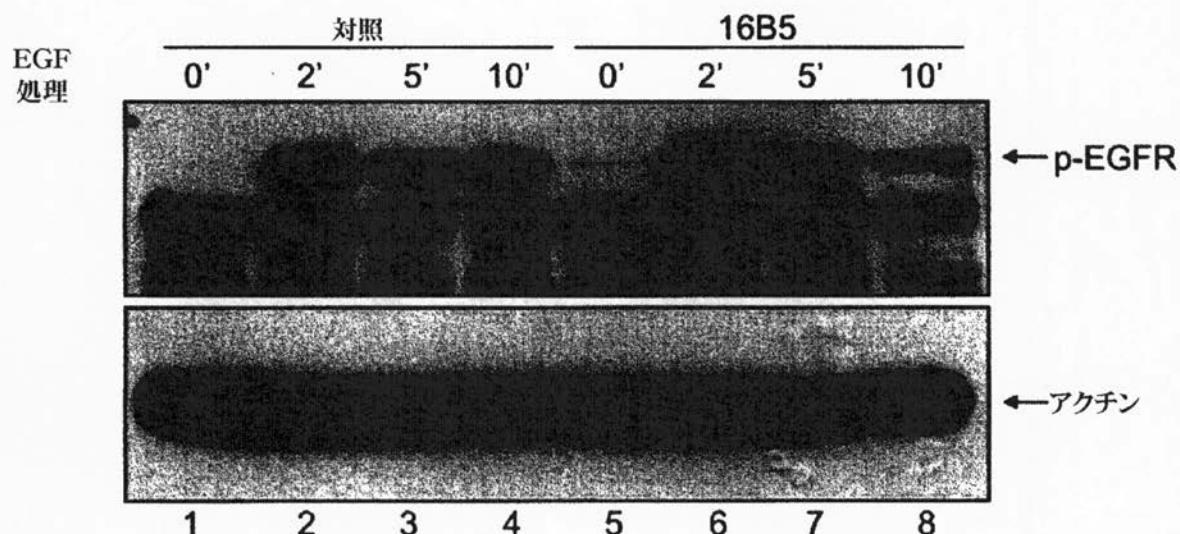
H226細胞



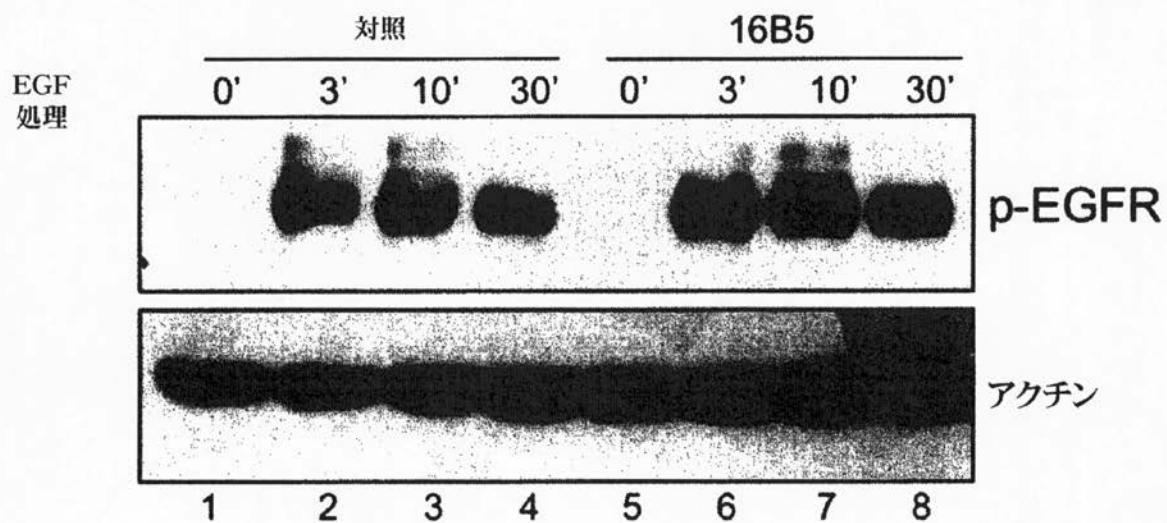
【図5】

図5

A549細胞



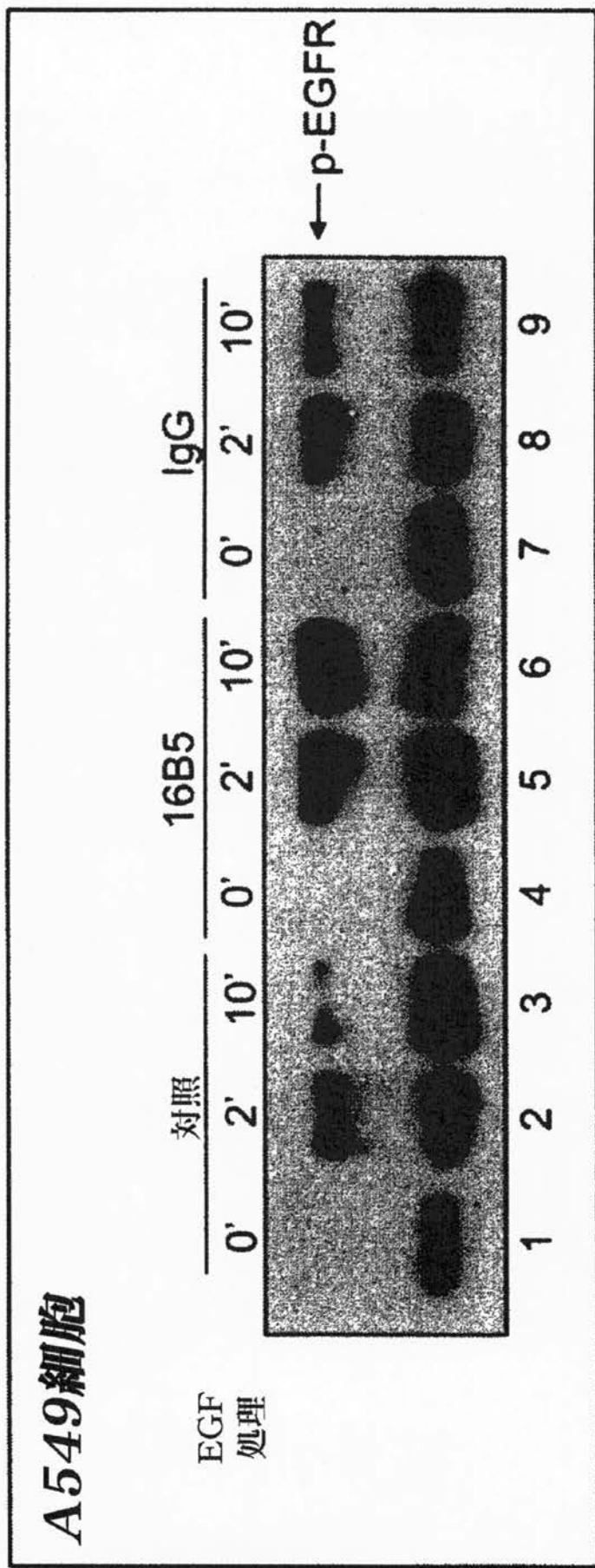
H226細胞



【図6】

図6

A549細胞



【配列表】

2015512877000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2013/000167																				
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/395 (2006.01), A61K 31/5377 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																						
<p>B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: A61K 39/395 (2006.01), A61K 31/5377 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01)</p>																						
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>																						
<p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: TotalPatent, EspaceNet, CAplus, Google Scholar, Genome Quest, Scopus and Pubmed. Keywords: clusterin, TRPM2, SGP2, apolipoprotein, EGFR, ErbB, HER, inhibitor, antibody, epithelial, mesenchymal, transition, Filion, Viau, Tremblay, tyrosine and kinase.</p>																						
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2006/056054 A1 (GLEAVE, M & ZUPL, G) 1 June 2006 (01-06-2006)</td> <td>1, 2, 5, 8 - 10, 13, 16 - 19, 21 and 31 - 33</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>(paragraphs 15 - 17 and 31 - 56)</td> <td>3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2007/030930 A1 (O'CONNOR-MCCOURT MD et al.) 22 March 2007 (22-03-2007) (pages 1, 7 - 14, 18 and 19)</td> <td>3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2006/056054 A1 (GLEAVE, M & ZUPL, G) 1 June 2006 (01-06-2006)	1, 2, 5, 8 - 10, 13, 16 - 19, 21 and 31 - 33	Y	(paragraphs 15 - 17 and 31 - 56)	3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34	Y	WO 2007/030930 A1 (O'CONNOR-MCCOURT MD et al.) 22 March 2007 (22-03-2007) (pages 1, 7 - 14, 18 and 19)	3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34								
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																				
X	WO 2006/056054 A1 (GLEAVE, M & ZUPL, G) 1 June 2006 (01-06-2006)	1, 2, 5, 8 - 10, 13, 16 - 19, 21 and 31 - 33																				
Y	(paragraphs 15 - 17 and 31 - 56)	3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34																				
Y	WO 2007/030930 A1 (O'CONNOR-MCCOURT MD et al.) 22 March 2007 (22-03-2007) (pages 1, 7 - 14, 18 and 19)	3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34																				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" 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 application or patent 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 application or patent 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 application or patent 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	Date of mailing of the international search report																					
31 May 2013 (31-05-2013)	04 June 2013 (04-06-2013)																					
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Authorized officer Jacinth Abraham (819) 934-7598																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2013/000167
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:		
a. (means) <input type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form		
b. (time) <input type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input checked="" type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search		
2. <input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing 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 : Sequence listing received on 21 May 2013 (21-05-2013).		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/CA2013/000167
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)	
<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 checked="" type="checkbox"/> Claim Nos. : 9 - 30 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely : Claims 9 - 30 are directed to methods for treatment of the human or animal body, which the International Search Authority is not required to search. Nevertheless, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the inhibitors defined in claims 9 - 30. 2. <input type="checkbox"/> Claim 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 type="checkbox"/> Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 	
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
<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 claim 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 claim Nos. : <p>Remark on Protest <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.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2013/000167
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/063523 A1 (TREMBLAY, GB et al.) 3 June 2011 (03-06-2011) (Whole document)	3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34
Y	PINES, G. et al. Oncogenic Mutant Forms Of EGFR: Lessons In Signal Transduction And Targets For Cancer Therapy. FEBS LETT 18 June 2010 (18-06-2010) Vol. 584, pages 2699 - 2706 ISSN 0014-5793 (sections "Tyrosine kinase inhibitors" and "Monoclonal anti-receptor antibodies")	3, 4, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 20, 22 - 30 and 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2013/000167

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date	
WO2006056054A1	01 June 2006 (01-06-2006)	AU2003237616B2 AU2005309274A1 AU2005309274B2 CA2469685A1 CA2469685C CA2584646A1 DE60322509D1 DK1465995T3 EP1465995A1 EP1465995B1 EP1814595A1 EP1814595A4 ES2307942T3 HU0402543A2 HU0402543A3 IL162540A IL162540D0 JP2005514948A JP4491240B2 JP2008520591A JP4980919B2 KR20110026023A KR101166214B1 NO20043401A NO333017B1 NZ533126A US2008261912A1 US7928082B2 US2006122141A1 US7973017B2 US2011196019A1 US8252765B2 US2012077861A1 US8389491B2 US2003158143A1 US2008014198A1 US2010267808A1 US2011142827A1 US2011190382A1 US2012220646A1 WO03062421A1	15 August 2008 (15-08-2008) 05 July 2007 (05-07-2007) 01 June 2006 (01-06-2006) 21 July 2011 (21-07-2011) 31 July 2003 (31-07-2003) 12 March 2013 (12-03-2013) 01 June 2006 (01-06-2006) 11 September 2008 (11-09-2008) 20 October 2008 (20-10-2008) 13 October 2004 (13-10-2004) 30 July 2008 (30-07-2008) 08 August 2007 (08-08-2007) 15 April 2009 (15-04-2009) 01 December 2008 (01-12-2008) 29 March 2005 (29-03-2005) 28 September 2012 (28-09-2012) 30 June 2011 (30-06-2011) 20 November 2005 (20-11-2005) 26 May 2005 (26-05-2005) 30 June 2010 (30-06-2010) 19 June 2008 (19-06-2008) 18 July 2012 (18-07-2012) 14 March 2011 (14-03-2011) 16 July 2012 (16-07-2012) 13 October 2004 (13-10-2004) 18 February 2013 (18-02-2013) 28 April 2006 (28-04-2006) 23 October 2008 (23-10-2008) 19 April 2011 (19-04-2011) 08 June 2006 (08-06-2006) 05 July 2011 (05-07-2011) 11 August 2011 (11-08-2011) 28 August 2012 (28-08-2012) 29 March 2012 (29-03-2012) 05 March 2013 (05-03-2013) 21 August 2003 (21-08-2003) 17 January 2008 (17-01-2008) 21 October 2010 (21-10-2010) 16 June 2011 (16-06-2011) 04 August 2011 (04-08-2011) 30 August 2012 (30-08-2012) 31 July 2003 (31-07-2003)	15 August 2008 (15-08-2008) 05 July 2007 (05-07-2007) 01 June 2006 (01-06-2006) 21 July 2011 (21-07-2011) 31 July 2003 (31-07-2003) 12 March 2013 (12-03-2013) 01 June 2006 (01-06-2006) 11 September 2008 (11-09-2008) 20 October 2008 (20-10-2008) 13 October 2004 (13-10-2004) 30 July 2008 (30-07-2008) 08 August 2007 (08-08-2007) 15 April 2009 (15-04-2009) 01 December 2008 (01-12-2008) 29 March 2005 (29-03-2005) 28 September 2012 (28-09-2012) 30 June 2011 (30-06-2011) 20 November 2005 (20-11-2005) 26 May 2005 (26-05-2005) 30 June 2010 (30-06-2010) 19 June 2008 (19-06-2008) 18 July 2012 (18-07-2012) 14 March 2011 (14-03-2011) 16 July 2012 (16-07-2012) 13 October 2004 (13-10-2004) 18 February 2013 (18-02-2013) 28 April 2006 (28-04-2006) 23 October 2008 (23-10-2008) 19 April 2011 (19-04-2011) 08 June 2006 (08-06-2006) 05 July 2011 (05-07-2011) 11 August 2011 (11-08-2011) 28 August 2012 (28-08-2012) 29 March 2012 (29-03-2012) 05 March 2013 (05-03-2013) 21 August 2003 (21-08-2003) 17 January 2008 (17-01-2008) 21 October 2010 (21-10-2010) 16 June 2011 (16-06-2011) 04 August 2011 (04-08-2011) 30 August 2012 (30-08-2012) 31 July 2003 (31-07-2003)
WO2007030930A1	22 March 2007 (22-03-2007)	AU2006291990A1 AU2006291990B2 CA2621363A1 EP1937815A1 EP1937815A4 JP2009507476A US2009104215A1 US8044179B2 US2011033471A1 US2012071635A1	22 March 2007 (22-03-2007) 31 May 2012 (31-05-2012) 22 March 2007 (22-03-2007) 02 July 2008 (02-07-2008) 17 March 2010 (17-03-2010) 26 February 2009 (26-02-2009) 23 April 2009 (23-04-2009) 25 October 2011 (25-10-2011) 10 February 2011 (10-02-2011) 22 March 2012 (22-03-2012)	
WO2011063523A1	03 June 2011 (03-06-2011)	AU2010324506A1 CA2776513A1 CN102666585A EP2504363A1 US2012282251A1	24 May 2012 (24-05-2012) 03 June 2011 (03-06-2011) 12 September 2012 (12-09-2012) 03 October 2012 (03-10-2012) 08 November 2012 (08-11-2012)	

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
	C 1 2 N 9/99	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, 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, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 ジル・ベルナール・トランブレイ
カナダ・J 5 R・6 N 8・ケベック・ラ・ブレーリー・ドニーズ・ルマイストル・100

(72)発明者 エリザベト・ヴィヨ
カナダ・H 7 H・3 E 2・ケベック・ラヴァル・プロンヴォスト・6032

(72)発明者 マリオ・フィリオン
カナダ・J 4 J・4 M 8・ケベック・ロンゲール・マブル・ストリート・739

F ターム(参考) 4C084 AA20 MA02 NA05 ZB26 ZC75
4C085 AA13 AA14 EE03
4C086 AA01 AA02 BC46 BC50 BC73 GA07 GA08 GA12 MA02 MA04
NA05 ZB26 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 DA50 DA55 DA75 EA20