(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5796269号
(P5796269)

(45)発行日　平成27年10月21日(2015.10.21)　(24)登録日　平成27年8月28日(2015.8.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 16/22	(2006.01)	C07K	16/22	
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	N
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	
A61P 9/00	(2006.01)	A61P	9/00	

請求項の数 27　(全 43 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-504543 (P2011-504543)
(86)(22)出願日　平成21年4月17日(2009.4.17)
(65)公表番号　特表2011-518554 (P2011-518554A)
(43)公表日　平成23年6月30日(2011.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/GB2009/050389
(87)国際公開番号　WO2009/127881
(87)国際公開日　平成21年10月22日(2009.10.22)
審査請求日　平成24年3月26日(2012.3.26)
(31)優先権主張番号　0807018.7
(32)優先日　平成20年4月17日(2008.4.17)
(33)優先権主張国　英国(GB)

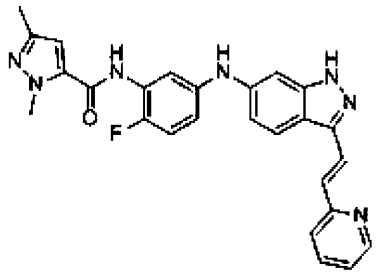
(73)特許権者　506180073
フージョン　アンティボディーズ　リミテッド
イギリス，　ベルファスト　ビーティー１７　Ｏキューエル，　ダンマリー，　ペンブローク　ループ　ロード，　スプリングバンク　インダストリアル　エステート
(74)代理人　100107456
弁理士　池田　成人
(74)代理人　100148596
弁理士　山口　和弘
(74)代理人　100123995
弁理士　野田　雅一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＡＲＥＧ／ＨＢ－ＥＧＦ抗体と治療

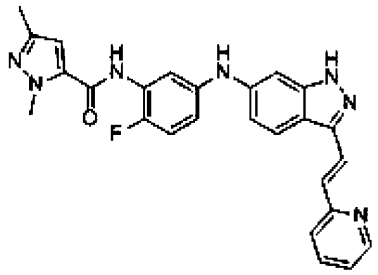
(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヘパリン結合ＥＧＦ（ＨＢＥＧＦ）及びアンフィレギュリン（ＡＲＥＧ）に結合する抗体分子であって、配列番号７に示すＶＨドメインの３つのＣＤＲ、及び配列番号８に示すＶＬドメインの３つのＣＤＲを有し、それらのＣＤＲは、配列番号７に示すＶＨドメイン、及び配列番号８に示すＶＬドメインの各ＣＤＲの位置に対応する位置に配置されている、抗体分子。
【請求項２】
配列番号１に示すアミノ酸配列を有するＡＲＥＧの抗原フラグメント、及び配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＨＢＥＧＦの抗原フラグメントに結合する、請求項１に記載の抗体分子。
【請求項３】
モノクローナル抗体である、請求項１又は２に記載の抗体分子。
【請求項４】
配列番号７に示すＶＨドメイン、及び／又は配列番号８に示すＶＬ配列を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体分子。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子をコードする核酸分子。
【請求項６】
請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子を含む

薬剤。
【請求項７】
請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子を含む、新生物性疾患の治療に使用するための薬剤。
【請求項８】
請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子を含む、血管新生に関連する疾患又は障害の治療に使用するための薬剤。
【請求項９】
化学療法剤と組み合わせる、請求項７に記載の薬剤。
【請求項１０】
化学療法剤が、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、及び植物アルカロイドからなる群から選択される、請求項９に記載の薬剤。
【請求項１１】
前記新生物性疾患が、結腸直腸癌、乳癌、及び肺癌からなる群から選択される、請求項７、９及び１０のいずれか一項に記載の薬剤。
【請求項１２】
血管新生阻害剤と組み合わせる、請求項７～１１のいずれか一項に記載の薬剤。
【請求項１３】
血管新生阻害剤が、Ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、Ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ、ｖａｔａｌａｎｉｂ、ａｘｉｔｉｎｉｂ、ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ及びａｆｌｉｂｅｒｃｅｐｔ、下記式で表わされるＡＧ－１３９５８、ＶＥＧＦのｓｉＲＮＡ、ｓｑｕａｌａｍｉｎｅ、ａｎｅｃｏｒｔａｖｅ、及びＣｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎからなる群から選択される、請求項１２に記載の薬剤。
【化１】

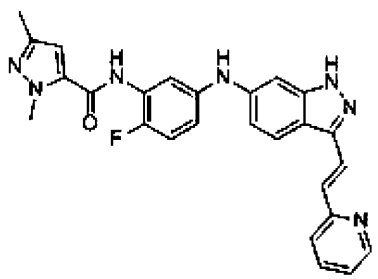


【請求項１４】
対象における新生物性疾患を治療するための薬剤の製造のための、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子の使用であって、前記薬剤が前記抗体分子、又は前記核酸分子の有効量を含む、使用。
【請求項１５】
薬剤が化学療法剤の有効量をさらに含む、請求項１４に記載の使用。
【請求項１６】
化学療法剤が、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、及び植物アルカロイドからなる群から選択される、請求項１５に記載の使用。
【請求項１７】
前記新生物性疾患が、結腸直腸癌、乳癌、及び肺癌からなる群から選択される、請求項１４～１６のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１８】
対象における血管新生に関連する疾患又は障害を治療するための薬剤の製造のための、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子の使用であって、前記薬剤が前記抗体分子、又は前記核酸分子の有効量を含む、使用。
【請求項１９】
薬剤が血管新生阻害剤の有効量をさらに含む、請求項１４～１８のいずれか一項に記載

の使用。
【請求項２０】
血管新生阻害剤が、Ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、Ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ、ｖａｔａｌａｎｉｂ、ａｘｉｔｉｎｉｂ、ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ及びａｆｌｉｂｅｒｃｅｐｔ、下記式で表わされるＡＧ－１３９５８、ＶＥＧＦのｓｉＲＮＡ、ｓｑｕａｌａｍｉｎｅ、ａｎｅｃｏｒｔａｖｅ、及びＣｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎからなる群から選択される、請求項１９に記載の使用。
【化２】



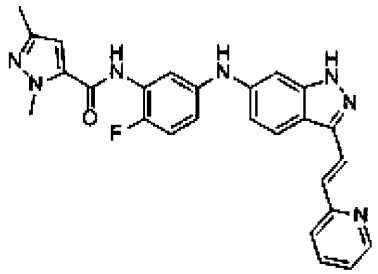
【請求項２１】
請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子を含む医薬組成物。
【請求項２２】
化学療法剤及び／又は血管新生阻害剤をさらに含む、請求項２１に記載の医薬組成物。
【請求項２３】
同時、逐次、又は別々に投与する、（ｉ）請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体分子、又は請求項５に記載の核酸分子、並びに（ｉｉ）化学療法剤、及び／又は血管新生阻害剤を含むキット。
【請求項２４】
前記化学療法剤が、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、及び植物アルカロイドからなる群から選択される、請求項２２に記載の医薬組成物。
【請求項２５】
前記化学療法剤が、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、及び植物アルカロイドからなる群から選択される、請求項２３に記載のキット。
【請求項２６】
血管新生阻害剤が、Ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、Ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ、ｖａｔａｌａｎｉｂ、ａｘｉｔｉｎｉｂ、ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ及びａｆｌｉｂｅｒｃｅｐｔ、下記式で表わされるＡＧ－１３９５８、ＶＥＧＦのｓｉＲＮＡ、ｓｑｕａｌａｍｉｎｅ、ａｎｅｃｏｒｔａｖｅ、及びＣｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎからなる群から選択される、請求項２２又は２４に記載の医薬組成物。
【化３】



【請求項２７】
血管新生阻害剤が、Ｓｏｒａｆｅｎｉｂ、Ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ、ｖａｔａｌａｎｉｂ、

ａｘｉｔｉｎｉｂ、ｖａｎｄｅｔａｎｉｂ及びａｆｌｉｂｅｒｃｅｐｔ、下記式で表わされるＡＧ－１３９５８、ＶＥＧＦのｓｉＲＮＡ、ｓｑｕａｌａｍｉｎｅ、ａｎｅｃｏｒｔａｖｅ、及びＣｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎからなる群から選択される、請求項２３又は２５に記載のキット。

【化４】



【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【０００１】

［発明の分野］

本発明は癌治療に関する。特に、本発明は、抗癌剤に対する耐性への感受性を決定する方法、こうした耐性を克服する方法、及び癌治療用の併用療法に関する。

【０００２】

［発明の背景］

癌は、西洋諸国において主要な死亡原因である。癌を治療すべく、過去５０年間に多くの化学療法剤が開発された。化学療法剤の大半は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、及び抗腫瘍剤の群の１つに分類できる。これらの薬剤すべてが細胞分裂又はＤＮＡの合成に影響を及ぼし、何らかの形で機能する。

【０００３】

特定の化学療法剤の有効性は、癌の間で、患者の間で、個々の患者における時間経過により異なる。化学療法剤に曝露された癌細胞は、こうした作用薬に対する耐性を生じ、他の数種の抗新生物剤に対しても同様に交差耐性を生じることがかなり多い。さらに、多くの化学療法剤は治療指数が低いため、その使用はさらに制限される。したがって、第１又は第２選択療法が、十分に有効でないか、十分に有効ではなくなった場合は、癌患者の治療変更が必要となる場合が多い。多くの場合、特定の治療の組合せが、特に有効であることが分かっている。

【０００４】

これらの５－Ｆｕを含む化学療法剤は、単独で使用できるが、通常、併用で臨床療法に組み込まれる。実際、併用化学療法は、異なる経路を介して腫瘍に作用し、患者での奏功率を改善することにより、有望な結果を示している。にもかかわらず、患者の多くは後天的又は先天的な薬剤耐性を有するため、いまだこれらの療法により治療できない。

【０００５】

さらに、化学療法の選択は、癌の種類、例えば、癌がｐ５３変異と関連するかどうかにより、さらに複雑となる。例えば、国際公開第２００５／０５３７３９号パンフレットに記載の通り、白金に基づく化学療法と抗Ｆａｓ抗体との組合せが、野生型ｐ５３を伴う腫瘍において相乗的な細胞毒性効果を有することが示されているが、こうした相乗効果は、ｐ５３変異細胞においては見られなかった。

【０００６】

５－Ｆｕ、ＣＰＴ－１１、及びオキサリプラチンは、依然として第一線の治療法であるが、非応答性腫瘍又は化学療法耐性癌の発生は、今もって化学療法の奏効に対する主要な

障害のままである。癌の早期治療の重要性により、特定の療法が、単独で又は併用で、個々の患者の特定の腫瘍に対して有効であるかどうか予測できるツールには、明らかなニーズが存在する。さらに、医師が使用できる治療レパートリーを増加させる新規の治療法に対するニーズが依然として存在する。

【０００７】

本発明者らの同時係属国際出願ＰＣＴ／ＧＢ２００７／０５０６２３に記載されているように、本発明者らは、異なるクラスの化学療法による治療に応答してアップレギュレートされるタンパク質を調査し、驚くべきことに、上皮増殖因子（ＥＧＦ）ファミリーのペプチド増殖因子をコードする各種遺伝子が、異なるクラスの化学療法での異なる生理的に適切な用量を、ｉｎ　ｖｉｖｏで投与した後に、いくつもの異なる種類の癌由来のいくつもの異なる癌の腫瘍細胞株モデルにおいて過剰発現することを示した。

【０００８】

本発明者らは、異なるＥＧＦの阻害剤の併用により、単一のＥＧＦの阻害剤を試験した場合の低下と比較して、腫瘍細胞の成長及び増殖が驚くほど劇的に低下することも示した。

【０００９】

［発明の概要］

本発明者らは、２つ以上の異なるＥＧＦに特異的に結合する多重特異性抗体の開発によって、２つ以上のＥＧＦの標的化を採用する化学療法戦略の使用をさらに開発した。また、化学療法治療の後に、腫瘍細胞への抗体の結合が強化されることが見出された。異なるＥＧＦが異なる癌でアップレギュレートされていると予測される。したがって、２つ以上のＥＧＦと結合できる多特異性抗体の開発は、臨床、及び研究での利用に大きな利点をもたらす。二重特異性抗体の開発は、癌の様々な特徴を標的とすることができる。例えば、ＨＢＥＧＦは、細胞運動性及び増殖、さらには血管新生に関連があることが示されている。ＡＲＥＧの発現により細胞浸潤が増加している。したがって、ＨＢＥＧＦとＡＲＥＧの両方をターゲットとする抗体は、これらの特性に著しい効果を有する可能性がある。

【００１０】

したがって、本発明の第１の態様では、少なくとも２つ、例えば、３つ又は４つの異なるＥＧＦ分子に結合する多特異性抗体を提供する。一実施形態において、抗体は、ＨＢ－ＥＧＦ、ＡＲＥＧ、ＥＲＥＧ、ＢＴＣ又はＴＧＦαから選択されるＥＧＦの２つ、３つ又は４つに特異的に結合する。

【００１１】

一実施形態において、抗体分子は、２つのＥＧＦそれぞれに対して、少なくとも10^{-7}Ｍ、例えば、少なくとも10^{-8}Ｍ又はそれ以上、例えば10^{-9}Ｍ又はそれ以上の親和性を有する。

【００１２】

一実施形態において、抗体分子は二重特異性である。

そのような多特異性抗体は、当技術分野において知られるいかなる方法を使用して産生してもよい。二重特異性抗体を産生する１つの方法は、化学的橋架、ハイブリドーマ細胞の融合、又は分子遺伝学的技術によって産生された人工の抗体が、第１の抗原に対する結合特異性を有する重鎖と軽鎖のペア１つと、第２の抗原に対する結合特異性を有する重鎖と軽鎖の第２のペアを有するように操作する方法である。そのような実施形態では、２つの標的の抗原決定基は一般に関連していない。しかしながら、本発明者らは２つのＥＧＦ、例えばＨＢＥＧＦとＡＲＥＧのペプチド配列の保存領域を選択する戦略を採用し、前記領域に対するモノクローナル抗体を産生した。この技術を使用することにより、エンジニアリングを必要とせず、複数の特異性を備えた抗体を産生できる。この方法を用いると、費用効率が高く、タイムリーな方法を用いた機能的抗体の開発につながる。

【００１３】

したがって、本発明の一実施形態において、多特異性抗体は単一の抗原に対して産生したモノクローナル抗体である。一実施形態において、単一の抗原は、結合する各ＥＧＦの

対応配列と、少なくとも７０％、例えば、少なくとも８０％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％の配列同一性があるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、好ましくは、このポリペプチドからなる。

【００１４】

本発明の一実施形態において、多特異性抗体はＨＢＥＧＦとＡＲＥＧへの結合特異性を有する二重特異性抗体である。一実施形態において、抗体分子は、ＥＲＥＧ、ＢＴＣ、又はＴＧＦαの１つ又は複数に結合しない。特定の実施形態において、抗体分子は、ＥＲＥＧ、ＢＴＣ、又はＴＧＦαのいずれにも結合しない。

【００１５】

そのような１つの実施例では、本発明の多特異性抗体分子は、配列番号１に示すアミノ酸配列を有するＡＲＥＧの抗原フラグメント、及び配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＨＢＥＧＦの抗原フラグメントに結合する。

【００１６】

配列番号１

KKNPCNAEFQNFCIHGECKYIEHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKS

配列番号２

KRDPCLRKYKDFCIHGECKYVKELRAPSCICHPGYHGERCH

【００１７】

実施例に記載されているように、この領域由来の抗原フラグメントに対して産生した抗体には、ＡＲＥＧとＨＢ－ＥＧＦのどちらにも特異性を有することが見出された。

【００１８】

本発明の一実施形態において、多特異性の、例えば二重特異性の、抗体分子は、ＨＢ－ＥＧＦとＡＲＥＧへの結合特異性を示し、図９にＥＬＩＳＡ法の結果を示す。

【００１９】

一実施形態において、二重特異性抗体は４Ｇ９抗体である。別の実施形態において、抗体は５Ｅ４　１Ｃ８抗体である。別の実施形態において、抗体は５Ｅ４　２Ｂ２抗体である。別の実施形態において、抗体は８Ｄ６抗体である。別の実施形態において、抗体は８Ｄ７抗体である。

【００２０】

本発明の一実施形態において、多特異性の、例えば二重特異性の、抗体は、ＨＢ－ＥＧＦとＡＲＥＧへの結合特異性を示し、図１０にＥＬＩＳＡ法の結果を示す。

【００２１】

したがって、一実施形態において、抗体は４ｇ９　２ｃ４　１ｄ４抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　１ｆ５　２ｄ５抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　１ｇ７　２ｅ３抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　１ｆ６　２ｂ１０抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　１ｃ８　２ｂ１０抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　２ｃ２　２ｄ７抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　１ｆ５　１ｄ６抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　１ｆ５　１ｅ１１抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　１ｇ７　１ｆ２抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　１ｇ７　２ａ３抗体である。別の実施形態において、抗体は４ｇ９　２ｂ６　１ｆ９抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　１ｃ８　１ｇ９抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　２ｃ２　１ｄ１１抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ７　２ｃ２　１ｇ１１抗体である。

【００２２】

本発明の一実施形態において、多特異性の、例えば二重特異性の抗体は、ＨＢ－ＥＧＦとＡＲＥＧへの結合特異性を示し、図１１にＥＬＩＳＡ法の結果を示す。

【００２３】

したがって、一実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｂ７　１ｄ９抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｂ７　１ｇ９抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｂ７　２ｅ１０抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｂ７　２ｇ１０である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｃ７　２ｂ６抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｃ７　２ｃ２抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｃ７　２ｆ９抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　１ｃ７　２ｇ６抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　２ｂ４　ｌｆ６抗体である。別の実施形態において、抗体は８ｄ６　２ｂ４　１ｇ８抗体である。

【００２４】

８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９抗体、８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、及び８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３抗体の個々のＶＨ配列及びＶＬ配列は、本発明者らにより決定されており、以下の通りである。

【００２５】

８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９　ＶＨ配列（配列番号５）

MEWSWVILFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDSY
IHWVNQRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSS
LTSEDTAVYYCVSASYRYGFSYWGQGTLVTVSAAKTTPPSVYPWVPGSLX

８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９　ＶＬ配列（配列番号６）

XADXISISCRSNKSLLHTNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDR
FSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRXX

８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７　ＶＨ配列（配列番号７）

MKCSWIIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDSY
IHWVNQRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSS
LTSEDTAVYYCVSASYRYGFSYWGQGTLVTVSAAKTTPPPVYPLAPGSL

８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７　ＶＬ配列（配列番号８）

MRAPAQFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSNKSLLHT
NGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSKLG

８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３　ＶＨ配列（配列番号９）

MKCSWVMFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDSY
IHWVNQRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQGKASITADTSSNTAYLQLSS
LTSEDTAVYYCVSASYRYGFSYWGQGTLVTVSAAKTTPPPVYPLAPGSL

８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３　ＶＬ配列（配列番号１０）

MRPPLSFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSNKSLLHT
NGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVE
AEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSKLG

【００２６】

本発明の一実施形態において、抗体分子は、８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９抗体のＣＤＲを有する抗体、８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７抗体のＣＤＲを有する抗体、及び８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３抗体のＣＤＲを有する抗体からなる群から選択される抗体分子である。

【００２７】

抗体のＣＤＲのアミノ酸配列は、当技術分野において知られる任意のシステム、例えば、Ｋａｂａｔシステム（Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、米国保健社会福祉省、公衆衛生局、国立衛生研究所、ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　Ｎｏ．９１～３２４２、１９９１、及びオンラインｗｗｗ．ｋａｂａｔｄａｔａｂａｓｅ．ｃｏｍ　ｈｔｔｐ：／／ｉｍｍｕｎｏ．ｂｍｅ．ｎｗｕ．ｅｄｕ）、又は、ＩＭＧＴシステム（Ｂｒｏｃｈｅｔ，Ｘ．ら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ、第３６巻：Ｗ５０３－５０８頁、２００８）を使用して同定してもよい。

【００２８】

一実施形態において、抗体分子は、配列番号５に示すＶＨ配列のＣＤＲの少なくとも１つ、例えば２つ、又は３つ、及び／又は配列番号６に示すＶＬ配列のＣＤＲの少なくとも１つ、例えば２つ、又は３つを含む抗原結合ドメインを含む。

【００２９】

別の実施形態において、抗体分子は、配列番号７に示すＶＨ配列のＣＤＲの少なくとも１つ、例えば２つ、又は３つ、及び／又は配列番号８に示すＶＬ配列のＣＤＲの少なくとも１つ、例えば２つ、又は３つを含む抗原結合ドメインを含む。

【００３０】

さらに別の実施形態において、抗体分子は、配列番号９に示すＶＨ配列のＣＤＲの少なくとも１つ、例えば２つ、又は３つ、及び／又は配列番号１０に示すＶＬ配列のＣＤＲの少なくとも１つ、例えば２つ、又は３つを含む抗原結合ドメインを含む。

【００３１】

特定の実施形態において、抗体分子は、配列番号５に示すＶＨ配列のＣＤＲの３つすべて、及び／又は配列番号６に示すＶＬ配列からなる群のＣＤＲの３つすべてを含む抗原結合ドメインを含む。

【００３２】

特定の実施形態において、抗体分子は、配列番号７に示すＶＨ配列のＣＤＲの３つすべて、及び／又は配列番号８に示すＶＬ配列からなる群のＣＤＲの３つすべてを含む抗原結合ドメインを含む。

【００３３】

特定の実施形態において、抗体分子は、配列番号９に示すＶＨ配列のＣＤＲの３つすべて、及び／又は配列番号１０に示すＶＬ配列からなる群のＣＤＲの３つすべてを含む抗原結合ドメインを含む。

【００３４】

特定の実施形態において、抗体分子は、配列番号５に示すＶＨドメイン、及び／又は配列番号６に示すＶＬ配列を含む。

【００３５】

特定の実施形態において、抗体分子は、配列番号７に示すＶＨドメイン、及び／又は配列番号８に示すＶＬ配列を含む。

【００３６】

特定の実施形態において、抗体分子は、配列番号９に示すＶＨドメイン、及び／又は配列番号１０に示すＶＬ配列を含む。

【００３７】

本発明の第２の態様において、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子をコードする核酸分子を提供する。

【００３８】

一実施形態において、抗体分子は、特異性を有する各標的に対して、少なくとも10^{-7}Ｍ、例えば、少なくとも10^{-8}Ｍ又はそれ以上、例えば、10^{-9}Ｍ又はそれ以上の親和性を有する。

【００３９】

本発明の抗体分子又は核酸分子を、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、又はｅｘ　ｖｉｖｏのいずれかにおける治療薬又は診断薬として使用してもよい。

【００４０】

したがって、本発明の第３の態様において、医薬に使用するための、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子、又は本発明の第２の態様による核酸分子を提供する。

【００４１】

一実施形態において、多特異性抗体分子を血管新生に関連する疾患又は障害の治療に使用してもよい。そのような症状には新生物性疾患、様々な炎症性障害、腫瘍、様々な自己免疫障害、いくつかの遺伝性障害、及び眼障害がある。

【００４２】

したがって、本発明の第４の態様において、血管新生に関する疾患の治療に使用するための、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子、又は本発明の第２の態様による核酸分子を提供する。

【００４３】

したがって、血管新生に関する疾患を治療する薬剤の調製に、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子、又は本発明の第２の態様による核酸分子を使用することも、本発明の第４の態様の範囲内にさらに含まれる。

【００４４】

本発明の第５の態様において、対象における血管新生に関する疾患を治療する方法であって、前記対象に、本発明の第１の態様による多特異性抗体、又は本発明の第２の態様による核酸分子の有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【００４５】

本発明の特定の実施形態では、抗体及び核酸を、新生物性疾患を治療するために使用する。

【００４６】

したがって、第６の態様において、新生物性疾患の治療に使用する、本発明の第１の態様による多特異性抗体、又は本発明の第２の態様による核酸分子を提供する。

【００４７】

本発明の第６の態様の範囲内には、新生物性疾患を治療する薬剤の調製における、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子、又は本発明の第２の態様による核酸分子の使用も含まれる。

【００４８】

本発明の第７の態様において、対象における新生物性疾患を治療する方法であって、前記対象に、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子、又は本発明の第２の態様による核酸分子の有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【００４９】

本発明の方法を使用して、任意の新生物性疾患を治療してもよい。特定の実施形態において、新生物性疾患は癌である。例えば、本発明の抗体、核酸、組成物及び方法を使用して治療し得る新生物性疾患は、結腸直腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、肝細胞癌、リンパ種、白血病、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、腎臓癌、甲状腺癌、黒色腫、癌腫、頭頚部癌、及び皮膚癌を含むがこれらに限定されない。

【００５０】

特定の一実施形態において、新生物性疾患は、結腸直腸癌である。

【００５１】

別の一実施形態において、新生物性疾患は、乳癌である。

【００５２】

別の一実施形態において、新生物性疾患は、肺癌である。

【００５３】

本発明者らは、ｐ５３野生型腫瘍と同様に、ｐ５３変異腫瘍細胞においても、特定のＥＧＦが、化学療法によってアップレギュレートされることを示した。これは、かつて、化学療法に対する耐性が、ｐ５３の状態に大きく依存すると示されていたことを踏まえれば、特に驚くべきことである。したがって、特定の実施形態において、新生物性疾患は、ｐ５３変異を含む癌である。

【００５４】

本発明の第８の態様において、本発明の第１の態様による多特異性抗体分子、又は本発明の第２の態様による核酸分子を含む医薬組成物を提供する。

【００５５】

本発明の抗体分子、又は実際には、前記抗体分子をコードする核酸分子を、新生物性疾患の治療のための単独療法として使用してもよい。しかしながら、本明細書に記載されるように、本発明者らは、ＥＧＦ阻害剤を様々な化学療法と併用することで、各阻害剤単独

の効果から予測され得るよりも大幅に、腫瘍細胞増殖が減弱することを示した。

【００５６】

したがって、一実施形態において、本発明の抗体分子、又は前記抗体分子をコードする核酸分子は、他の活性作用薬、例えば化学療法剤、及び／又は血管新生阻害剤を使用する併用治療レジメンでの使用を考慮してもよい。

【００５７】

したがって、本発明の１つの態様では抗体分子、又は核酸分子を、治療レジメンにおいて、化学療法剤及び／又は血管新生阻害剤と同時に、別々に又は逐次、使用してもよい。

【００５８】

本発明の抗体分子と一緒に使用してもよい化学療法剤には、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、アントラサイクリン、及び植物アルカロイドがあるが、これらに限定されない。

【００５９】

一実施形態において、化学療法剤はトポイソメラーゼＩ阻害剤である。本発明のこれらの態様では、任意のトポイソメラーゼ阻害剤を使用してもよい。特定の実施形態において、トポイソメラーゼ阻害剤は、ＣＰＴ－１１である。別の実施形態において、トポイソメラーゼ阻害剤は、ＣＰＴ－１１の活性代謝物、例えば、ＳＮ－３８である。

【００６０】

一実施形態において、本発明の抗体分子と、血管新生を阻害する作用薬、例えば血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）を阻害する作用薬を使用する併用療法を使用してもよい。

【００６１】

本発明では、任意の適切な血管新生阻害剤を使用してもよい。しかしながら、特定の実施形態において、血管新生阻害剤は、Ｓｏｒａｆｅｎｉｂ（Ｂａｙｅｒ／ｏｎｙｘ）、Ｓｕｎｉｔｉｎｉｂ（Ｐｆｉｚｅｒ）、ＰＴＫ７８７（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＡＧ０１３６７６（Ｐｆｉｚｅｒ）、ＺＤ６４７４（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）及びＶＥＧＦ－Ｔｒａｐ（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、ＡＧ－１３９５８（Ｐｆｉｚｅｒ）、Ｃａｎｄ５等のＶＥＧＦのｓｉＲＮＡ、ｓｑｕａｌａｍｉｎｅ（エビゾン（Ｅｖｉｚｏｎ）（商標））、ａｎｅｃｏｒｔａｖｅ（レターヌ（Ｒｅｔａａｎｅ）（商標））、及びＣｏｍｂｒｅｔａｓｔａｔｉｎからなる群から選択される。

【００６２】

特定の実施形態において、少なくとも１つの本発明の抗体分子と、２つ、３つ又はそれ以上の作用薬とを併用する併用療法を使用してもよい。例えば、化学療法剤と血管新生阻害剤を含む組合せを使用してもよい。

【００６３】

上述のように、本発明の一実施形態において、多特異性抗体には、ＡＲＥＧへの結合特異性に加えて、少なくともう１つのＥＧＦへの結合特異性がある。こうした一実施形態において、使用してもよい抗体分子は、抗体６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６に由来する第１の重鎖及び第１の軽鎖、並びに、第２のＥＧＦに対する結合特異性を有する別の抗体の重鎖及び軽鎖を有し、第１の重鎖と第１の軽鎖は前記第２のＥＧＦと結合しない。

【００６４】

６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６抗体のＶＨ配列及びＶＬ配列は、本発明者らにより決定されており、以下の通りである。

【００６５】

６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６　ＶＨ配列（配列番号３）

MECNWILPFILSVTSGVYSQVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTRYW
MQWIKQRPGQGLEWIGAIYPGNGDIRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS
LASEDSAVYYCARGTTPSSYWGQGTLVTVSAAKTTAPSVYPLAPVCGDTTGS
SVTLGCLVKGYF

６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６　ＶＬ配列（配列番号４）

MMSPAQFLFLLVLWIRETSGDVVMTQTPLTLSVSIGQPASISCKSSQSLLDS

DGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVE
AEDLGVYYCWQGTHFPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS
VVCFLNNFYPK

【００６６】

本発明の一実施形態において、本発明の、及び本発明で使用するＡＲＥＧと第２のＥＧＦに対する結合特異性を有する抗体分子は、６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６のＶＨ領域の少なくとも１つのＣＤＲ、及び／又は６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６のＶＬ領域の少なくとも１つのＣＤＲを含み、第２のＥＧＦに対する結合特異性があるＣＤＲを有する抗体分子である。

【００６７】

本発明の抗体分子は、アッセイ、例えば診断アッセイに使用してもよい。

【００６８】

したがって、第９の態様では、細胞中の１つ又は複数のＥＧＦの存在を同定する方法であって、本発明の第１の態様の抗体分子と前記細胞を接触させること、及び前記抗体分子と前記細胞の間の結合の有無を判定することを含む方法を提供する。

【００６９】

本発明者らが、ＥＧＦ発現が、様々な化学療法、例えば、トポイソメラーゼ阻害剤による治療に応じてアップレギュレートされることを実証したが、これは、これらの化学療法による治療の療法効果が、患者によっては、ＥＧＦのアップレギュレーションにより損なわれ得ることを示唆する。

【００７０】

したがって、本発明は、化学療法剤による治療が、特定の患者において有効であるかどうかを判定するアッセイにおいて使用してもよい。

【００７１】

したがって、本発明の第１０の態様では、化学療法剤による治療に対するｉｎ　ｖｉｖｏでの腫瘍細胞の応答を予測するために、化学療法剤の存在に対する対象由来の腫瘍細胞の応答を評価するｉｎ　ｖｉｔｒｏの方法であって、（ａ）前記化学療法剤に曝露された対象由来の腫瘍細胞試料を提供すること、（ｂ）前記腫瘍細胞試料の一部分を本発明の抗体分子に曝露すること、及び（ｃ）前記抗体の結合を、前記化学療法剤に曝露されていない前記試料の対照部分における結合と比較することを含み、前記化学療法剤に曝露された試料の一部における結合の増強を、前記化学療法剤に対する感受性の低下の指標とする方法が提供される。

【００７２】

本発明はさらに、腫瘍に苦しむ対象の予後診断、及び診断用のツールとなる。予後診断では、化学療法による治療の前後におけるＥＧＦの発現レベルを測定すれば、対象が、併用療法の手法に応答するかどうかが確認されるであろう。診断では、化学療法に対する腫瘍のＥＧＦの細胞表面発現プロファイルによって、どの併用療法が、その腫瘍に対して最も有効であるか確認することができる。

【００７３】

したがって、本発明の第１１の態様は、化学療法剤とＥＧＦ阻害剤、例えば本発明の抗体分子とを含む併用療法に対する患者の応答を評価するための予後診断の方法であって、（ａ）前記化学療法による治療の前に、対象から得た腫瘍細胞を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ試料のＥＧＦに対する、本発明の抗体分子の結合を判定すること、（ｂ）前記化学療法による治療の後に対象から得た腫瘍細胞を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ試料中の前記ＥＧＦへの前記抗体分子の結合を判定すること、及び（ｃ）（ａ）での結合と（ｂ）での結合を比較することを含み、（ａ）と比較して（ｂ）の結合が増強しており、これによって患者が、化学療法剤と前記ＥＧＦの阻害剤とを含む併用療法から利益を受け得ることが示される方法を提供する。

【００７４】

本発明の多特異性の抗体を使用すれば、単一の集団の同一抗体を使用して、２つ以上の

ＥＧＦの発現をアッセイできる。

【００７５】

本発明の実施形態において、前記化学療法剤に曝露された試料中のＥＧＦへの抗体分子の結合は、前記化学療法剤に曝露されていない前記試料の対照部分のＥＧＦへの結合に比べて、少なくとも１．５倍、好ましくは少なくとも２倍、より好ましくは少なくとも５倍である場合に、結合は増強されたと考えられる。

【００７６】

文脈による別段の要請がない限り、化学療法剤及び／又は血管新生阻害剤、並びにＥＧＦ調節物質、例えば本発明の第１の態様の抗体分子、に言及する本出願において、化学療法剤、血管新生阻害剤、及びＥＧＦ調節物質は、異なる作用薬である。一般的に、化学療法剤及び血管新生阻害剤は、ＥＧＦ調節物質とは異なる作用モードを有する。一実施形態において、化学療法剤はＥＧＦを阻害しない。

【００７７】

本発明の各態様の好ましい及び代替的な特徴は、文脈による別段の要請がない限り、必要な変更を加えて、他の各態様にも当てはまる。

【００７８】

［発明の詳細な説明］

本発明は、２つ以上のＥＧＦ阻害剤の特定の組合せが、腫瘍細胞増殖の減弱において相加的効果を示すこと、さらには、２つ以上のＥＧＦに対する結合特異性を有する多特異性抗体を、ＥＧＦとの効率的な結合のために、且つ診断及び治療方法に使用してもよいという実証に基づいている。

【００７９】

アッセイ

上述のように、一実施形態において、本発明は、例えば、特定の化学療法剤を使用する治療に対する適性を判定するために、ＥＧＦ遺伝子の発現、又はポリペプチドについて、腫瘍細胞を含む試料をスクリーニングする方法に関する。

ペプチド増殖因子のＥＧＦファミリーは、ＥｒｂＢ受容体（ＥｒｂＢ１つまりＥＧＦ受容体、ＥｒｂＢ２つまりＨｅｒ２、ＥｒｂＢ３、及びＥｒｂＢ４）に選択的に結合する能力を有する１０のメンバーからなる。

【００８０】

本発明の一実施形態において、ＥＧＦは、ＥｒｂＢ－１のリガンド、例えば、アンフィレギュリン（ＡＲＥＧ）、ＴＧＦ、エピレギュリン（ＥＲＥＧ）、又はＢＴＣである。

【００８１】

別の実施形態において、ＥＧＦは、ＥｒｂＢ－４のリガンド、例えば、ＮＲＧ３である。

【００８２】

これらの各遺伝子については、以下の受託番号細目が提供される。

【００８３】

【表１】

遺伝子	受託番号
BTC	NM_001729
HB-EGF	: NM_001945
AREG	NM_001657
TGFA	NM_003236
EREG	NM_001432
NRG3	NM_001010848

【００８４】

対象ＥＧＦをコードする任意の遺伝子発現を判定してもよい。

例えば、ＥＧＦがＡＲＥＧである場合、Ａｒｅｇ遺伝子は、ＮＭ＿００１６５７であり得る。

【００８５】
本発明の特定の実施形態において、本発明で使用される多特異性抗体分子にはＡＲＥＧ、及びＨＢ－ＥＧＦに対する特異性がある。ＡＲＥＧをコードする遺伝子の一例は、受託番号ＮＭ＿００１６５７である。ＨＢ－ＥＧＦをコードする遺伝子の一例は、受託番号ＮＭ＿００１９４５である。
【００８６】
一実施形態において、本発明のアッセイは、例えば異なる時点における生検試料を使用して、疾患の進行をモニターするために使用してもよい。こうした実施形態では、ＥＧＦに対する結合又はＥＧＦの発現を、前記化学療法剤に曝露されていない対照試料と比較する代わりに、より早い時点、例えば、数日前、数週前、又は数カ月前の同じ組織から得た試料と比較してもよい。
【００８７】
本発明の方法を使用して、化学療法剤、例えばＣＰＴ－１１、又はその類似体を使用した治療が、この治療が適用可能な任意の癌に対して適性であるかどうかを判定してもよい。例えば、本発明の方法を使用して、結腸直腸癌等の消化器癌、頭部癌、及び頸部癌を含むがこれらに限定されない癌の治療に対する感受性、又は耐性を判定してもよい。
【００８８】
本発明の特定の実施形態では、本発明の方法を使用して、結腸直腸癌の治療に対する感受性、又は耐性を判定してもよい。
【００８９】
本発明の別の特定の実施形態では、本発明の方法を使用して、肺癌の治療に対する感受性、又は耐性を判定してもよい。
【００９０】
本発明の別の特定の実施形態では、本発明の方法を使用して、乳癌の治療に対する感受性、又は耐性を判定してもよい。
【００９１】
腫瘍、又は癌の性質により、本発明の方法で使用すべき試料の性質が決定される。試料は、例えば、腫瘍組織生検由来、骨髄生検由来、又は血中などの循環性腫瘍細胞由来の試料でよい。あるいは、例えば、腫瘍が消化管腫瘍である場合、腫瘍細胞は糞便試料から単離してもよい。腫瘍細胞は、血漿、血清、脳脊髄液、尿、間質液、腹水などを由来としてもよい。例えば、固形腫瘍の試料は、抗生物質を含む完全組織培養培地において採取される。細胞は、腫瘍標本から手作業ではがしてもよく、必要な場合は、コラゲナーゼ／ＤＮＡアーゼとのインキュベーションにより酵素を使用して脱凝集させ、適切な培地、例えば、ヒト又は動物血清を含む培地中に懸濁させてもよい。
【００９２】
他の実施形態では、生検試料を単離し、凍結するかホルマリン等の固定剤で固定してもよい。次いで、試料を、後の段階で遺伝子発現レベルについて調査してもよい。
【００９３】
治療の判定においては、癌のｐ５３の状態を判定することが望ましい。例えば、ｐ５３の状態は、特定のＥＧＦタンパク質と併用するべき化学療法の種類を決定し得るため、有用であり得る。ｐ５３の状態は、従来の方法を使用して判定できる。例えば、遺伝子配列決定、又は他のＤＮＡ解析法も使用してもよいが、免疫組織化学法を使用して、ホットスポット変異を同定することができる。この解析は、単離された腫瘍組織に対して適切に実施できる。
【００９４】
抗体分子
上述のように、本発明は、少なくとも２つ、例えば、３つ又は４つの異なるＥＧＦ分子に結合する多特異性抗体分子を提供する。一実施形態において、抗体は、ＨＢ－ＥＧＦ、ＡＲＥＧ、ＥＲＥＧ、ＢＴＣ、又はＴＧＦαから選択される２つ、３つ、又は４つのＥＧＦに特異的に結合する。

【００９５】
このような多特異性抗体は、当技術分野において知られる任意の方法を使用して産生してもよい。多特異性の、例えば二重特異性の、抗体及びフラグメントの産生には、当技術分野において多数の方法が知られている。例えば、こうした方法には、ハイブリドーマの融合、又はＦａｂ’フラグメント連結（例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ及びＬａｃｈｍａｎｎ、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、第７９巻：３１５～３２１頁、１９９０、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、第１４８巻：１５４７～１５５３頁、１９９２を参照されたい）がある。別の実施形態において、二重特異性抗体は、「ダイアボディ」として形成してもよい。
【００９６】
本発明者らが開発した代替戦略においては、多特異性抗体の産生に好ましい抗原の免疫優性保存領域に相当する抗原を産生し、次いで、前記領域に対するモノクローナル抗体を産生する。この技術を使用することにより、エンジニアリングを必要とせずに、複数の特異性を有する抗体を産生できる。
【００９７】
一実施形態において、抗原は、結合する各ＥＧＦの対応配列と、少なくとも７０％、例えば、少なくとも８０％、少なくとも９０％、又は少なくとも９５％の配列同一性があるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含み、また例えば、このポリペプチドからなる。
【００９８】
配列同一性又は「相同性」は、当技術分野において知られる任意の適切な方法を使用して測定してもよい。例えば、配列同一性は、ＢＬＡＳＴ、ＤＯＭＡＩＮ、ＢＥＡＵＴＹ（ＢＬＡＳＴ Ｅｎｈａｎｃｅｄ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｕｔｉｌｉｔｙ）、ＧＥＮＰＥＰＴ、及びＴＲＥＭＢＬパッケージ等のコンピュータープログラムを使用して決定してもよい。相同性は、配列ハイブリダイゼーションという方法で測定してもよく、この方法は当技術分野においてよく知られている。（例えば、「Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ」、Ｈａｍｅｓ，Ｂ．Ｄ．，及びＨｉｇｇｉｎｓ Ｓ．Ｊ．編、１９８５、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、１９８９、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、（第１～３巻）、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．、及びＡｕｓｕｂｅｌら、１９８９、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．を参照されたい）。
【００９９】
本発明者らが使用した二重特異性抗体の開発戦略は、２つ以上のＥＧＦへの結合特異性を有する多特異性抗体の開発には限定されず、多特異性抗体が有用であり得る他の抗原への多特異性抗体の開発に使用してもよい。
【０１００】
したがって、本発明の独立した態様において、２つ以上の標的、例えばポリペプチドに対する、二重特異性等の多特異性の抗体を産生する方法であって、前記方法が、前記２つ以上の標的のアミノ酸配列間の相同領域からなる推定抗原領域を同定することと、前記推定抗原領域を含む組換えタンパク質を産生することと、前記組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生することと、及び場合によっては、前記標的、及び前記組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体の特異性を検査することとを含む方法が提供される。
【０１０１】
一実施形態において、組換えタンパク質は、前記標的の１つには存在するが、他の標的（複数可）には存在しない抗原のアミノ酸配列を含まない。
【０１０２】
本発明の一実施形態において、多特異性抗体は、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦに対する特異性を有する二重特異性抗体である。こうした一実施形態において、本発明の二重特異性抗体

分子は、配列番号１に示すアミノ酸配列を有するＡＲＥＧの抗原フラグメント、及び配列番号２に示すアミノ酸配列を有するＨＢＥＧＦの抗原フラグメントに結合する。

【０１０３】

配列番号１

KKNPCNAEFQNFCIHGECKYIEHLEAVTCKCQQEYFGERCGEKS

配列番号２

KRDPCLRKYKDFCIHGECKYVKELRAPSCICHPGYHGERCH

【０１０４】

この方法で開発され、ＶＨ配列とＶＬ配列が上述されている特定の抗体には、８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９抗体、８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７抗体、及び８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３抗体がある。

【０１０５】

別の実施形態において、本発明で使用する二重特異性抗体分子は、ＡＲＥＧに対する結合特異性を有する抗体６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６に由来する第１の重鎖及び第１の軽鎖、並びに、ＨＢ－ＥＧＦに対する結合特異性を有する別の抗体の重鎖と軽鎖を含んでもよい。一実施形態において、重鎖と軽鎖にはＥＧＦ受容体への結合に関連する、ＨＢ－ＥＧＦの領域に対する結合特異性がある。別の実施形態において、重鎖と軽鎖には、ＥＧＦ受容体への結合に関連しない、ＨＢ－ＥＧＦの領域に対する結合特異性がある。

【０１０６】

抗体のフラグメントは、無処置の抗体が有する結合能力を保持でき、無処置の抗体の代わりに使用されてもよい。したがって、文脈による別段の要請がない限り、本発明の目的のためには、用語「抗体分子」は抗体フラグメントを含むと理解されるべきである。抗体フラグメントには、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、ｄＡｂ、及びＦｖフラグメント、ｓｃＦｖ、二重特異性ｓｃＦｖ、ダイアボディ、直鎖状抗体（米国特許第５，６４１，８７０号、実施例２、Ｚａｐａｔａら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ第８巻１０号：１０５７～１０６２頁、１９９５を参照されたい）、一本鎖抗体分子、並びに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体がある。

【０１０７】

Ｆａｂフラグメントは、軽鎖全体（ＶＬ及びＣＬ）、並びにＶＨ及びＣＨ１からなる。Ｆａｂ’フラグメントは、ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に、抗体ヒンジ領域の１つ又は複数のシステインを含む数残基が付加されている点が、Ｆａｂフラグメントと異なる。Ｆ（ａｂ’）２フラグメントは、ジスルフィド結合した２つのＦａｂフラグメントを含む。

【０１０８】

Ｆｄフラグメントは、ＶＨドメイン及びＣＨ１ドメインからなる。

【０１０９】

Ｆｖフラグメントは、１つの抗体のＶＬドメイン、及びＶＨドメインからなる。

【０１１０】

一本鎖Ｆｖフラグメントは、ｓｃＦｖが抗原結合部位を形成するのを可能にするリンカーで連結されたＶＨドメイン及びＶＬドメインを含む抗体フラグメントである（Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ、Ｔｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、第１１３巻、Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ及びＭｏｏｒｅ編、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、ニューヨーク、２６９～３１５頁、１９９４を参照されたい）。

【０１１１】

ダイアボディは、ＶＨドメインとＶＬドメインの間に短いリンカー（約５～１０残基）を有するｓｃＦｖフラグメント（前の段落を参照されたい）を構築することにより調製される小型の抗体フラグメントであり、Ｖドメインが鎖内ではなく鎖間で対形成され、多価性のフラグメント、即ち２つの抗原結合部位を有するフラグメントが生じている（例えば、欧州特許第４０４０９７号、国際公開第９３／１１１６１号パンフレット、及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，第９０巻：６４４４

～６４４８頁、１９９３を参照されたい）。さらに、個々のＣＤＲもフラグメントに含まれる。

【０１１２】

本発明では、２つ以上のＥＧＦに結合する多特異性抗体を開発した。

【０１１３】

上述したように、本発明の抗体分子は、前記抗体分子のアミノ酸配列を有するＶＨ、ＶＬ、及びＣＤＲを有する抗体分子に限定されず、２つ、３つ、又は４つのＥＧＦ分子への特異的結合を阻害する能力を維持しているそれらの変異体も含む。したがって、このような抗体分子のＣＤＲアミノ酸配列、例えば、図９、図１０、又は図１１の適用において同定され、１つ又は複数のアミノ酸残基が改変されている抗体分子もまた、ＣＤＲ配列として使用してもよい。ＣＤＲ変異体のアミノ酸配列中において改変されたアミノ酸残基は、全ＣＤＲ中、好ましくは３０％以下、より好ましくは２０％以下、最も好ましくは１０％以下である。このような変異体は、本願明細書の教示及び当技術分野において知られる技法を使用して提供されてもよい。ＣＤＲは、抗体の重鎖配列、若しくは軽鎖配列、又はそれらの一部分を含むフレームワーク構造中に保有されてもよい。このようなＣＤＲは、天然のＶＨドメイン及びＶＬドメインのＣＤＲ（複数可）の位置に対応する場所に配置するのが好ましい。このようなＣＤＲの位置は、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、米国保健社会福祉省、公衆衛生局、国立衛生研究所、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２、１９９１に記載のように、及びｗｗｗ．ｋａｂａｔｄａｔａｂａｓｅ．ｃｏｍ ｈｔｔｐ：／／ｉｍｍｕｎｏ．ｂｍｅ．ｎｗｕ．ｅｄｕでオンラインで決定してもよい。

【０１１４】

さらに、可変領域のフレームワーク領域が、代替的に、又は付加的に改変されてもよい。フレームワーク領域のこのような改変により、抗体の安定性を改善し、且つ免疫原性を減少させてもよい。

【０１１５】

本発明の又は本発明で使用する抗体分子には、抗体フラグメント、及び、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が、特定の種に由来するか、又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同であり、一方、その鎖（複数可）の残りの部分が、別の種に由来するか、又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びに所望の生物活性を示す限りにおいて、このような抗体のフラグメントが含まれる（米国特許第４，８１６，５６７号、及びＭｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、第８１巻：６８５１～６８５５頁、１９８４を参照されたい）。本明細書において対象となるキメラ抗体には、非ヒト霊長類動物（例えば、旧世界ザル、類人猿など）に由来する可変ドメイン抗原結合配列、及びヒトの定常領域配列を含む「霊長類化」抗体がある。

【０１１６】

本発明で使用する抗体及び抗体フラグメント等の抗体分子は、天然又は合成のいずれかの任意の適切な方法で産生することができる。こうした方法には、例えば、従来のハイブリドーマ法（Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５，Ｎａｔｕｒｅ、第２５６巻：４９５～４９９頁）、組換えＤＮＡ法（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい）、又は抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ法（例えば、Ｃｌａｃｋｓｏｎら，１９９１、Ｎａｔｕｒｅ、第３５２巻：６２４～６２８頁、及びＭａｒｋｓら、１９９２、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、第１０巻：７７９～７８３頁）等がある。他の抗体産生法は、Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ編、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、１９９９に記載されている。

【０１１７】

従来のハイブリドーマ法は、通常、抗原でマウス、又は他の動物を免疫し、抗原に結合

できるリンパ球の産生を引き起こす必要がある。リンパ球は、単離され、骨髄腫細胞株と融合されてハイブリドーマ細胞を形成し、次いで、親骨髄腫細胞の増殖は阻害するが、抗体産生細胞の増殖は可能とする条件において培養される。ハイブリドーマは、遺伝子変異を受けることがあり、これが、産生される抗体の結合特異性を変化させることもあり、変化させないこともある。合成抗体は、当技術分野において知られる技法（例えば、Ｋｎａｐｐｉｋら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２０００，第２９６巻：５７～８６頁、及びＫｒｅｂｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．、２００１、第２１５４号：６７～８４頁を参照されたい）を使用して産生することができる。

【０１１８】

改変は、当技術分野で知られる任意の適切な技法を使用して、抗体分子のＶＨ、ＶＬ、若しくはＣＤＲ、又は実際にＦＲにおいて行うことができる。例えば、可変ＶＨドメイン及び／又はＶＬドメインは、ＣＤＲ、例えば、ＣＤＲ３を、こうしたＣＤＲを欠くＶＨドメイン又はＶＬドメインに導入することにより産生してもよい。Ｍａｒｋｓら、１９９２、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、第１０巻：７７９～７８３頁には、ＣＤＲ３を欠くＶＨ可変ドメインのレパートリーを産生し、次いで、特定の抗体のＣＤＲ３と組み合わせて新規のＶＨ領域を産生する、シャフリング技法についての説明がある。類似の技法を使用して、本発明のＣＤＲ由来の配列を含む新規のＶＨドメイン、及びＶＬドメインを産生してもよい。

【０１１９】

本発明で使用する抗体を産生する代替的な技法には、例えば、エラープローンＰＣＲ（Ｇｒａｍら、１９９２、Ｐ．Ｎ．Ａ．Ｓ．、第８９巻：３５７６～３５８０頁を参照）を使用する、ＶＨ又はＶＬドメインをコードする遺伝子（複数可）のランダム突然変異誘発が含まれてもよい。付加的に、又は代替的に、ＣＤＲは、例えば、Ｂａｒｂａｓら、１９９１、Ｐ．Ｎ．Ａ．Ｓ．、３８０９～３８１３頁、及びＳｃｉｅｒ、１９９６、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、第２６３巻：５５１～５６７頁に記載の分子進化の手法を使用して、突然変異誘発の標的としてもよい。

【０１２０】

本発明で使用する抗体は、「裸の」抗体（又はそのフラグメント）、即ち、「活性治療薬」と結合していない抗体（又はそのフラグメント）でもよい。「活性治療薬」とは、抗体部分（抗体フラグメント、ＣＤＲなどを含む）に結合して複合体を生成する分子、又は原子である。こうした「活性治療薬」には、薬剤、毒素、放射性同位体、免疫調節物質、キレート化剤、ホウ素化合物、色素等がある。

【０１２１】

本発明に使用する抗体分子は、「活性治療薬」に結合した抗体フラグメントを含む、免疫複合体の形態でもよい。治療薬は、化学療法剤、又は別の分子でもよい。

【０１２２】

免疫複合体を産生する方法は、当技術分野でよく知られている。例えば、米国特許第５，０５７，３１３号、Ｓｈｉｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、第４１巻：８３２～８３９頁、１９８８、Ｓｈｉｈら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、第４６巻：１１０１～１１０６頁、１９９０、Ｗｏｎｇ、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｒｏｓｓ－Ｌｉｎｋｉｎｇ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９９１）、Ｕｐｅｓｌａｃｉｓら、「Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｂｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ Ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｂｉｒｃｈら編、１８７～２３０頁（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．、１９９５）、Ｐｒｉｃｅ、「Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ、Ｒｉｔｔｅｒら編、６０～８４頁（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、１９９５）を参照されたい。

【０１２３】
本発明で使用する抗体分子は、さらに改変されてもよい。例えば、抗体分子は、グリコシル化、ペグ化、又はアルブミン若しくは非タンパク質性ポリマーに連結できる。
【０１２４】
化学療法剤
上述のように、本発明のある実施形態において、抗体分子は化学療法剤と併用してもよい。使用してもよい化学療法剤の例としては、チミジル酸シンターゼ阻害薬を含む代謝拮抗剤、ヌクレオシド類似体、白金細胞毒性剤、トポイソメラーゼ阻害剤、又は抗微小管剤がある。本発明において使用してもよいチミジル酸シンターゼ阻害薬の例としては、５－ＦＵ、ＭＴＡ、及びＴＤＸ等がある。使用してもよい代謝拮抗剤の例としては、トムデックス（ＴＤＸ）がある。使用してもよい白金細胞毒性剤の例としては、シスプラチン、及びオキサリプラチン等がある。
【０１２５】
上記に挙げた特定の作用薬に付加的に、又は代替的に本発明で使用できる化学療法剤には、アルキル化剤、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン、メチルアメラミン、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、アンドロゲン、抗副腎物質、葉酸補填剤、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、アムサクリン、ベストラブシル、ビサントレン、エダトラキセート、デホファミン、デメコルシン、ジアジコン、エフロミチン、酢酸エリプチニウム、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、イオニダミン、ミトグアゾン、及びミトキサントロンがある。
【０１２６】
本発明の特定の実施形態において、化学療法剤は、トポイソメラーゼ阻害剤である。本発明では、任意の適切なトポイソメラーゼ阻害剤を使用してもよい。特定の実施形態において、トポイソメラーゼ阻害剤は、トポイソメラーゼＩ阻害剤、例えば、カンプトセシンである。本発明で使用してもよい適切なトポイソメラーゼＩ阻害剤は、イリノテカン（ＣＰＴ－１１）、又はその活性代謝物であるＳＮ－３８である。ＣＰＴ－１１は、細胞周期のＳ期において特異的に作用し、切断又は切断複合体と称する可逆的な共有結合反応中間体を安定化させ、またG_2－Ｍ期における細胞周期の停止も誘導できる。
【０１２７】
本発明の特定の実施形態において、化学療法剤は、フルオロピリミジン、例えば、５－ＦＵである。
【０１２８】
特定の化学療法剤に言及する場合、特定の作用薬の抗腫瘍活性を保持する、生物学的に活性な派生物、及びその実質的な同等物を含む類似体を使用してもよいと理解されたい。
【０１２９】
文脈による別段の要請がない限り、化学療法剤、及びＥＧＦ調節物質、例えば、本発明の第１の態様の抗体分子、に言及する本出願において、化学療法剤とＥＧＦ調節物質は異なる作用薬である。一般に、化学療法剤は、ＥＧＦ調節物質とは異なる作用モードを有する。一実施形態において、化学療法剤はＥＧＦを阻害しない。
【０１３０】
本発明の多特異性抗体を有する治療は、抗体以外の１つ又は複数のＥＧＦ阻害剤を使用する治療に付加的に、又は代替的に組み合わせてもよい。適切な阻害剤には、ＴＧＦ－αを間接的に阻害するチルホスチンＡＧ１４７８（ＥＧＦ－Ｒキナーゼの選択的且つ強力な阻害剤）、及び、卵巣癌細胞におけるＴＧＦ－αの作用を阻害する、上皮増殖因子（ＥＧＦ）受容体特異的チロシンキナーゼ阻害剤であるＺＭ２５２８６８がある。（Ｓｉｍｐｓｏｎら、Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ、第７９巻、７～８号：１０９８～１０３、１９９９）。
【０１３１】
ＨＢ－ＥＧＦの適切な阻害剤には、ＣＲＭ１９７がある。

【０１３２】
別の実施形態において、ＥＧＦの発現を阻害する核酸調節物質を使用してもよい。こうした核酸分子調節物質には、アンチセンス分子、短鎖干渉核酸（ｓｉＮＡ）、例えば短鎖干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ、短鎖ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）、核酸センサー分子、アロザイム、酵素性核酸分子、及び三重オリゴヌクレオチド、並びに、配列特異的な方法でＲＮＡ干渉「ＲＮＡｉ」又は遺伝子サイレンシングの媒介に使用できる他の任意の核酸分子を含むが、これらに限定されない（例えば、Ｂａｓｓ、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、第４１１巻：４２８～４２９頁、Ｅｌｂａｓｈｉｒら、２００１、Ｎａｔｕｒｅ、第４１１巻：４９４～４９８頁、国際公開第００／４４８９５号パンフレット、国際公開第０１／３６６４６号パンフレット、国際公開第９９／３２６１９号パンフレット、国際公開第００／０１８４６号パンフレット、国際公開第０１／２９０５８号パンフレット、国際公開第９９／０７４０９号パンフレット、及び国際公開第００／４４９１４号パンフレット、Ａｌｌｓｈｉｒｅ、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２９７巻：１８１８～１８１９頁、Ｖｏｌｐｅら、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２９７巻：１８３３～１８３７頁、Ｊｅｎｕｗｅｉｎ、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２９７巻：２２１５～２２１８頁、Ｈａｌｌら、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２９７巻：２２３２～２２３７頁、Ｈｕｔｖａｇｎｅｒ及びＺａｍｏｒｅ、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２９７巻：２０５６～２０６０頁、ＭｃＭａｎｕｓら、２００２、ＲＮＡ、第８巻：８４２～８５０頁、Ｒｅｉｎｈａｒｔら、２００２、Ｇｅｎｅ＆Ｄｅｖ、第１６巻：１６１６～１６２６頁、並びにＲｅｉｎｈａｒｔ及びＢａｒｔｅｌ、２００２、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２９７巻：１８３１頁を参照されたい）。

【０１３３】
「アンチセンス核酸」とは、ＲＮＡ－ＲＮＡ間、又はＲＮＡ－ＤＮＡ間、又はＲＮＡ－ＰＮＡ間（タンパク質核酸、Ｅｇｈｏｌｍら、１９９３、Ｎａｔｕｒｅ、第３６５巻：５６６頁）相互作用により標的ＲＮＡに結合し、この標的ＲＮＡの活性を変化させる非酵素性核酸分子（総説としては、Ｓｔｅｉｎ及びＣｈｅｎｇ、１９９３、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２６１巻、１００４頁、及びＷｏｏｌｆら、米国特許第５，８４９，９０２号を参照されたい）である。アンチセンス分子は、アンチセンス分子の単一の近接配列に沿って標的配列に相補的であってもよく、また、特定の実施形態では、基質に結合し、基質、アンチセンス分子、又はその両者が結合し、アンチセンス分子がループを形成し、アンチセンス分子が２つ以上の非近接基質配列と相補的であり得るか、若しくは、アンチセンス分子の２つ以上の非近接配列部分が標的配列と相補的であり得るか、又はその両方であってもよい。アンチセンス法の詳細は、当技術分野で知られており、例えば、Ｓｃｈｍａｊｕｋら、１９９９、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、第２７４巻：２１７８３～２１７８９頁、Ｄｅｌｉｈａｓら、１９９７、Ｎａｔｕｒｅ、第１５巻：７５１～７５３頁、Ｓｔｅｉｎら、１９９７、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ　Ｎ．Ａ．Ｄｒｕｇ．Ｄｅｖ．、第７巻：１５１頁、Ｃｒｏｏｋｅ、２０００、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．、第３１３巻：３～４５頁、Ｃｒｏｏｋｅ、１９９８、Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｇｅｎｅｔ．Ｅｎｇ．Ｒｅｖ．、第１５巻：１２１～１５７頁、Ｃｒｏｏｋｅ、１９９７、Ａｄ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．、第４０巻：１～４９頁を参照されたい。

【０１３４】
「三重核酸」又は「三重オリゴヌクレオチド」とは、配列特異的な方法で二本鎖ＤＮＡに結合して、三本鎖らせんを形成するポリヌクレオチド、又はオリゴヌクレオチドである。こうした三重らせん構造の形成により、標的遺伝子の転写が調節されることが示されている（Ｄｕｖａｌ－Ｖａｌｅｎｔｉｎら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、第８９巻：５０４頁）。

【０１３５】
アプタマーとは、特異的な分子標的に強く結合する核酸（ＤＮＡ及びＲＮＡ）高分子である。アプタマーは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏセレクション法を繰り返し行う、例えばＳＥＬＥＸ（指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化）法により迅速に産生することができ、

小分子、タンパク質、核酸など各種の分子標的に結合できる（Ｅｌｌｉｎｇｔｏｎ及びＳｚｏｓｔａｋ、Ｎａｔｕｒｅ、第３４６巻、第６２８７号：８１８～８２２頁、１９９０、Ｔｕｅｒｋ及びＧｏｌｄ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２４９巻、第４９６８号：５０５～５１０頁、１９９０、米国特許第６，８６７，２８９号、米国特許第５，５６７，５８８号、米国特許第６，６９９，８４３号を参照されたい）。

【０１３６】

アプタマーは、顕著な特異性を示すことに加え、一般的には極めて高い親和性でその標的に結合し、抗タンパク質アプタマーの大半は、ピコモル濃度（ｐＭ）から低ナノモル濃度（ｎＭ）の範囲における平衡解離定数（Ｋｄｓ）を有する。アプタマーは、化学合成により容易に産生でき、所望の貯蔵特性を有し、治療へ応用した場合、ほとんど又はまったく免疫原性を誘発しない。

【０１３７】

非改変アプタマーは、主にヌクレアーゼ分解、及び腎クリアランスにより、数分間から数時間の半減期で血流から迅速に排泄されるが、これは、アプタマーが元来低分子量であるからである。しかし、当技術分野において知られている通り、２’－フッ素置換ピリミジン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）連結等の改変を用いて、必要に応じて分子の半減期を数日間又は数週間に調整することができる。

【０１３８】

ペプチドアプタマーとは、細胞内部の他のタンパク質の相互作用に干渉するように設計されたタンパク質である。ペプチドアプタマーは、タンパク質骨格の両端に結合する可変ペプチドループからなる。この二箇所での構造的な制約により、ペプチドアプタマーの結合親和性は、抗体の結合親和性に匹敵するレベル（ナノモル濃度範囲）にまで大きく上昇する。可変ループ長は、通常１０～２０個のアミノ酸からなり、骨格は、良好な溶解度特性及び緻密度特性を有する任意のタンパク質であってもよい。アプタマーは、任意のデオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又は、リンに結合した非架橋リガンドの１つとしての酸素の代わりに硫黄を有するデオキシチオホスホスフェート（又はホスホロチオエート）等の、これら塩基の改変を含み得る。モノチオホスフェートαＳは、１つの硫黄原子を有し、したがって、リン中心の周囲においてキラルである。ジチオホスフェートは、両方の酸素が置換され、したがって、非キラルである。ホスホロチオエートヌクレオチドは、市販されており、また、当技術分野において知られる異なるいくつかの方法により合成することができる。

【０１３９】

治療

「治療」又は「療法」とは、ヒト又は非ヒト動物に有益な任意の療法を含む。治療は、すでにある症状に対するものであっても、又は予防的（予防的治療）であってもよい。治療には、治癒効果、緩和効果、又は予防効果がある。

【０１４０】

本発明の抗体分子、核酸、及び組成物を、血管新生によって引き起こされた、又は、血管新生に関連する他の障害の治療に使用してもよい。このような状態としては、様々な炎症性障害、腫瘍、様々な自己免疫障害、いくつかの遺伝性障害、及び眼障害が挙げられる。

【０１４１】

本発明の抗体分子及び方法は、リウマチ性関節炎、変形性関節炎等の様々な形態の関節炎を含む血管新生に関連する炎症の治療、並びに、潰瘍性大腸炎、クローン病、バルトネラ症、及びアテローム性動脈硬化症等の慢性炎症性の症状の治療に使用してもよい。

【０１４２】

本発明を使用できる、血管新生が引き起こす障害には他に、血管腫、固形腫瘍、白血病、転移、毛細血管拡張、乾癬、強皮症、化膿性肉芽腫、心筋の血管新生、クローン病、プラーク血管新生、冠状動脈側枝、脳側枝、動静脈奇形、虚血肢血管新生、角膜疾患、水晶体後線維増殖、関節炎、糖尿病性血管新生、消化管潰瘍、ヘリコバクターの関連する疾患

、骨折、ケロイド、及び血管発生がある。

【０１４３】

本発明を使用できる、血管新生が引き起こす眼障害には、以下に挙げる障害がある。黄斑変性、眼球新生血管疾患、角膜移植片拒絶反応、損傷又は感染症に伴う血管新生、ルベオーシス、糖尿病網膜症、水晶体後線維増殖及び血管新生緑内障、角膜疾患と黄斑変性、糖尿病網膜症、未熟児網膜症、角膜移植片拒絶反応、血管新生緑内障と水晶体後線維増殖、角膜内血管新生に関連する疾患で、以下の疾患に限定されないが、流行性角結膜炎、ビタミンＡ欠乏症、アトピー性角膜炎、上輪部角結膜炎、翼状片、乾性角膜炎、類天疱瘡放射状角膜切開術、網膜／脈絡膜血管新生に関連する疾患で、以下の疾患に限定されないが、黄斑変性、推定近視、視窩、慢性型網膜剥離、過粘稠度症候群、外傷及びレーザー後合併症、ルベオーシス（隅角部の血管新生）に関連する疾患、及び血管結合組織又は繊維組織の異常増殖によって引き起こされた疾患である、増殖硝子体網膜症、血管新生緑内障、網膜芽腫、水晶体後線維増殖、ルベオーシス、ブドウ膜炎、及び移植角膜血管新生の全形態、他の眼炎症疾患、眼腫瘍、虹彩血管新生に関連する疾患。

【０１４４】

「新生物性疾患又は癌の治療」は、癌性増殖及び／又は血管新生により引き起こされる症状の治療を含み、新生物性増殖又は腫瘍の治療を含む。本発明を利用して治療することのできる腫瘍には、例えば、骨肉腫及び軟部肉腫を含む肉腫（ｓａｒｃｏｍａ）、胸部肉腫、肺肉腫、膀胱肉腫、甲状腺肉腫、前立腺肉腫、結腸肉腫、直腸肉腫、膵臓肉腫、胃肉腫、肝肉腫、子宮肉腫、前立腺肉腫等の肉腫（ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、子宮頸癌及び卵巣癌、非小細胞性肺癌、肝細胞癌、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫等のリンパ腫、神経芽細胞腫、黒色腫、骨髄腫、ウィルムス腫瘍、並びに、急性リンパ芽球性白血病及び急性骨髄芽球性白血病を含む白血病、星状細胞腫、神経膠腫、及び網膜芽細胞腫がある。

【０１４５】

本発明は、既存の癌の治療、及び初期治療の後又は手術後における癌の再発予防に特に有用であり得る。

【０１４６】

医薬組成物

本発明による医薬組成物、及び、本発明に従い使用される医薬組成物は、活性成分、例えば、多特異性抗体分子、及び／又はこのような抗体分子をコードする核酸分子に加えて、薬剤的に許容可能な賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、又は当業者によく知られている他の物質を含んでもよい。（例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、第２１版、Ｇｅｎｎａｒｏ ＡＲら編、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ、２００５を参照されたい）。こうした物質には、酢酸、トリス、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸等の緩衝液、抗酸化剤、防腐剤、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシンなどのアミノ酸、炭水化物、キレート化剤、等張化剤、及び界面活性剤等がある。

【０１４７】

医薬組成物は、治療対象である特定の徴候に対して必要に応じて選択される１つ又は複数の活性化合物を、好ましくは本発明の組成物の活性に有害な影響を与えない相補的な活性状態で含んでもよい。例えば癌の治療においては、多特異性抗体分子に加えて、製剤又はキットには、抗体分子が結合するＥＧＦ以外の標的、例えば特定の癌の増殖に影響する成長因子に対する抗体等の追加の成分が含まれていてもよい。

【０１４８】

活性成分は、マイクロスフェア、マイクロカプセル、リポソーム、他の微粒子送達システムを介して投与してもよい。例えば、活性成分は、例えば、コアセルベーション法又は界面重合法により調製し得るマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースの

マイクロカプセル、若しくはゼラチンマイクロカプセル、及びポリメタクリル酸メチルのマイクロカプセルそれぞれに、コロイド薬物輸送システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）に、又はマクロエマルジョンに封入し得る。さらなる詳細については、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ、ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、第２１版、Ｇｅｎｎａｒｏ ＡＲら編、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ、２００５を参照されたい。

【０１４９】

活性作用薬の送達には、徐放性製剤を使用してもよい。適切な徐放性製剤の例には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスがあり、マトリックスは成型品の形態、例えば、フィルム、坐薬、又はマイクロカプセルである。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とエチル－Ｌ－グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、及びポリ－Ｄ（－）－３－ヒドロキシ酪酸等がある。

【０１５０】

上述のように、治療法には、核酸を使用してもよい。本発明で使用する核酸は、当技術分野で知られる任意の適切な技法を使用して、対象の細胞に送達してもよい。核酸（場合によっては、ベクターに含まれる）は、ｉｎ ｖｉｖｏ又はｅｘ ｖｉｖｏの技法を使用して、患者の細胞に送達してもよい。ｉｎ ｖｉｖｏ技法の場合、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス１型、又はアデノ随伴ウイルス等）、及び脂質ベースのシステム（脂質を介する遺伝子導入に有用な脂質は、例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、及びＤＣ－Ｃｈｏｌ）によるトランスフェクションを使用してもよい（例えば、Ａｎｄｅｒｓｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、第２５６巻：８０８～８１３頁、１９９２を参照されたい。また、国際公開第９３／２５６７３号パンフレットも参照されたい）。

【０１５１】

ｅｘ ｖｉｖｏ技法の場合、直接に、又は患者に植め込む多孔質膜内に封入（例えば、米国特許第４，８９２，５３８号、及び第５，２８３，１８７号を参照されたい）するなどして患者に投与する改変細胞により、患者の単離された細胞内に核酸を導入する。生細胞内に核酸を導入するのに使用される技法には、レトロウイルスベクター、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、リン酸カルシウム沈澱法等がある。

【０１５２】

活性作用薬は、腫瘍部位、又は他の所望の部位に局所的方法で投与してもよく、又は、活性作用薬が腫瘍、又は他の細胞を標的とする方法で送達してもよい。抗体、又は細胞特異的リガンド等の標的システムを用いる標的療法を使用して、活性作用薬をより特異的に特定の型の細胞に送達してもよい。標的化は、様々な理由、例えば、作用薬が許容できないほどに毒性である場合、又は別の方法では極めて高用量を要する場合、又は別の方法では標的細胞に侵入できない場合に望ましいであろう。

【０１５３】

投与

本発明の抗体分子を第２の作用薬、例えば化学療法剤と併用する本発明の実施形態において、抗体は、第２の作用薬と同時に、個別に、又は逐次投与してもよい。個別に又は逐次投与する場合、抗体と第２の作用薬は、互いに任意の適切な時間以内、例えば、１、２、３、６、１２、２４、４８、又は７２時間以内に投与してもよい。好ましい実施形態において、抗体と第２の作用薬は、互いに６時間以内、好ましくは２時間以内、より好ましくは１時間以内、最も好ましくは２０分以内に投与される。

【０１５４】

用量

本発明の、及び本発明に使用する、抗体分子、又は前記抗体分子をコードする核酸分子、及び、場合によって化学療法剤は、「治療上有効な量」で個体に適切に投与され、個体に利益をもたらすことが十分証明されている。実際の投与レジメンは、治療される症状、その重症度、治療される患者、使用される作用薬を含む多数の因子に依存し、医師の裁量下にある。

【０１５５】

２つ以上の活性作用薬を併用する、本方法の一実施形態において、作用薬は、効果を高める比率をもたらす用量において投与される。

【０１５６】

本発明の文脈における「効果を高める比率」という用語は、２つの成分、例えば、抗体分子、化学療法剤等が、それぞれの成分単独の細胞障害活性、又はそれらを併用した時に個々の成分の活性に基づいて予測される相加的活性が有する細胞毒性活性よりも、併用での細胞毒性活性が大きくなるような比率で存在することを示す。

【０１５７】

したがって、効果を高める比率において、個々の成分は相乗効果的に作用する。

【０１５８】

相乗作用は、いくつかの方法を使用して定義できる。

【０１５９】

一方法において、相乗効果は、Ｃｈｏｕ及びＴａｌａｙの方法による組合せ指数（ＣＩ）を算出することにより判定してもよい。ＣＩ値が１、＜１、及び＞１の場合、それぞれ、相加効果、相乗効果、及び相殺効果を示す。

【０１６０】

本発明の一実施形態において、ＥＧＦ抗体と化学療法剤は、０．８５未満等の、１未満のＣＩをもたらすのに十分な濃度で存在する。同様に、本発明の別の実施形態において、第１のＥＧＦ抗体と第２のＥＧＦ阻害剤は、０．８５未満等の、１未満のＣＩをもたらすのに十分な濃度で存在する。

【０１６１】

相乗効果は、Ｒｏｍａｎｅｌｉ（１９９８年ａ、ｂ）によって改変されたＫｅｒｎの方法を使用して、１よりも大きいＲＩとして定義することが好ましい。ＲＩは、細胞の生存の予測値（Ｓｅｘｐ、成分Ａ単独で観察される生存と、成分Ｂ単独で観察される生存との積として定義される）の、ＡとＢとの併用での細胞の生存の観察値（Ｓｏｂｓ）に対する比として計算される（ＲＩ＝Ｓｅｘｐ／Ｓｏｂｓ）。したがって、相乗効果は、１より大きいＲＩとして定義できる。

【０１６２】

本発明の一実施形態において、ＥＧＦ抗体と化学療法剤は、１．５を超えるＲＩ、例えば２．０及び２．２５を超えるＲＩ等をもたらすのに十分な濃度で提供される。

【０１６３】

したがって、一実施形態において、併用した薬剤は腫瘍細胞の治療に使用される場合、相乗効果をもたらす。

【０１６４】

二重特異性抗体が使用される、本発明の一実施形態において、二重特異性抗体が結合特異性を有するＥＧＦの中で異なるＥＧＦ１つにそれぞれ特異性を有する別々の２つの抗体の期待効果に対して、超相加的／相乗効果を十分に示せる濃度で、二重特異性抗体が提供されてもよい。そのような実施形態では、上記で定義された方法を、二重特異性抗体は併用されている、例えばＡ＋Ｂ、とみなし、個々の（つまり非二重特異性）抗体は個々の成分、例えば成分Ａと成分Ｂとみなすように修正して、相乗効果を評価してもよい。

【０１６５】

最適用量は、年齢、性別、体重、治療される症状の重症度、投与される活性成分、及び投与経路等を含む多数のパラメータに基づき、医師により決定され得る。

【０１６６】

ここから、以下に述べる非限定的な実施例を用いて、添付の図面を参照しながら、本発明をさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【０１６７】

【図１】ｓｉＲＮＡによるＡＲＥＧ／ＨＢ－ＥＧＦサイレンシング後の、ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞増殖の相乗的な減弱を示す。ＡＲＥＧのｓｉＲＮＡ（１０ｎＭ）、ＨＢ－ＥＧＦのｓｉＲＮＡ（１０ｎＭ）、又はモック対照を細胞にトランスフェクトした。トランスフェクション／化学療法の４８時間後に、ＭＴＴアッセイにより細胞増殖を解析した。

【図２】ｓｉＲＮＡによるＨＢ－ＥＧＦサイレンシング及び／又はＡＲＥＧ抗体による処置後のＨＣＴ１１６細胞の増殖を示す。ＨＢ－ＥＧＦのｓｉＲＮＡ（５０ｎＭ）、又は対照ｓｉＲＮＡ（５０ｎＭ）を細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの７２時間後に、ＭＴＴアッセイにより細胞増殖を解析した。

【図３】ＭＴＴ細胞生存率アッセイによって算出した、ＨＢＥＧＦのｓｉＲＮＡとＡＲＥＧ抗体に応じたＲＩ値を示す。ＲＩ値は、生存の予測値（薬剤Ａ単独で観察される生存と、薬剤Ｂ単独で観察される生存との積として定義されるＳｅｘｐ）の、ＡとＢとの併用での生存の観察値（Ｓｏｂｓ）に対する比として計算される。（ＲＩ＝Ｓｅｘｐ／Ｓｏｂｓ）相乗効果は、ＲＩ＞１と定義される。

【図４】ＥＧＦ様ファミリーメンバーの配列比較を示す。ＨＢＥＧＦ、ＡＲＥＧ、ＥＲＥＧ、ＢＴＣ、及びＴＧＦ－αが比較された。黄色の残基は、５つの全メンバー間の相同性を示す。青色は２つ以上のファミリーメンバー間の相同性を示す。

【図５】ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦのタンパク質配列の配列比較を示す。この配列比較は、２つのタンパク質の相同領域を示す（灰色で強調）。図内では、抗原を産生した領域を下線で示す。

【図６】ＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦフラグメントのクローニングを示し、ａ）はｃＤＮＡライブラリーからのＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧフラグメントの増幅を示す。フラグメントを心臓ｃＤＮＡから増幅し、ＰＣＲ反応を、臭化エチジウムにより染色した１．５％アガロースゲル上で解析した。ｂ）ＰＣＲ増幅を、コロニーで実施し、発現ベクター内でＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦフラグメントのクローニングが成功したコロニーを同定した。ＰＣＲ反応は、臭化エチジウムで染色した１．５％アガロースゲル上で解析した。任意の陽性コロニーを、配列及び発現解析用に選択した。

【図７】ａ）は、培養液量５００ｍｌからの抗原精製の溶出プロファイルを示す。培養液由来のペレットは、８Ｍ尿素中に再懸濁させ、次いで、６×ヒスチジンタグを融合させ精製した。溶出試料を回収し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により解析した（図Ｂ）。ゲルは、クーマシーブルーにより染色した。

【図８】二重特異性クローンのスクリーニングのための異なったＡＲＥＧフラグメントを示す。

【図９】自家製のＡＲＥＧ及びＨＢＥＧＦの組換えタンパク質、並びにＲ　ａｎｄ　Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓのヒトＡＲＥＧとヒトＨＢＥＧＦの組換えタンパク質に対するＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧモノクローナル抗体のＥＬＩＳＡ法によるスクリーニングを示す。モノクローナル抗体は、類似の方法により産生した陰性対照タンパク質に対してもスクリーニングした（各抗体において左から右へ、ＨＢＥＧＦ、ＡＲＥＧＦｇｔ５、陰性、Ｒｅｃ　ｈｕｍ　ＨＢ－ＥＧＦ、Ｒｅｃ　ｈｕｍ　ＡＲＥＧ）。

【図１０】自家製のＡＲＥＧ及びＨＢＥＧＦの組換えタンパク質、並びにＲ　ａｎｄ　Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓのヒトＡＲＥＧとヒトＨＢＥＧＦの組換えタンパク質に対するＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧモノクローナル抗体のＥＬＩＳＡ法によるスクリーニングを示す。モノクローナル抗体は、類似の方法により産生した陰性対照タンパク質に対してもスクリーニングした（各抗体において左から右へ、ＨＢＥＧＦ、ＡＲＥＧｆｇ５、ｒＡＲＥＧ、ＮＥＧ）。

【図１１】自家製のＨＢＥＧＦの組換えタンパク質、並びにＲ　ａｎｄ　Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓのヒトＨＢＥＧＦの組換えタンパク質に対するＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧモノクローナル

抗体のＥＬＩＳＡ法によるスクリーニングを示す。モノクローナル抗体は、類似の方法により産生した陰性対照タンパク質に対してもスクリーニングした。
【図１２】結腸直腸細胞株であるＨＣＴ１１６及びＨＴ２９、並びに乳癌細胞株ＭＤＡ－ＭＢ２３１由来の全細胞溶解物に対する、ＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦモノクローナル抗体のウエスタンブロット解析を示す。ＨＣＴ１１６及びＨＴ２９細胞株に由来する全細胞溶解物を調製し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で泳動した。ブロットをＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦモノクローナル抗体に反応させた。
【図１３】ＦＩＴＣ標識ＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦとＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦモノクローナル抗体８Ｄ７を使用した免疫蛍光染色の結果を示す。ＣＰＴ１１無処置（ａ及びｂ）並びにＣＰＴ１１で処置したＨＣＴ１１６（ｃ及びｄ）の両方で陽染色を示している。
【図１４ａ】４８時間にわたり２．５μＭイリノテカンを添加して又は添加せずに処置した、ＨＣＴ１１６結腸直腸癌細胞株のＦＡＣＳ解析を示す。処置後、ＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧモノクローナル抗体により細胞を染色し、ＦＡＣＳにより解析した。
【図１４ｂ】４８時間にわたり２．５μＭイリノテカンを添加して又は添加せずに処置した、ＨＣＴ１１６結腸直腸癌細胞株のＦＡＣＳ解析を示す。処置後、ＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧモノクローナル抗体により細胞を染色し、ＦＡＣＳにより解析した。
【図１５】ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞とＨＣＴ１１６細胞のリガンド刺激によるＥＧＦＲのリン酸化の抑制を示す。細胞は抗体とリガンドを添加する前に血清不足とした。細胞への添加の前に、交差特異性抗体（８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」）を組換えＨＢＥＧＦで１時間プレインキュベートした。細胞可溶化物の調製の前に２０分細胞を刺激した。タンパク質３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに負荷して、ニトロセルロース膜に移した。細胞膜を抗ｐＥＧＦＲ（Ｔｙｒ^{1068}）に反応させた。
【図１６】ＬｏＶｏ細胞でのリガンド刺激によるＥＧＦＲのリン酸化の抑制を示す。細胞は抗体とリガンドを添加する前に血清不足とした。細胞への添加の前に、交差特異性抗体（８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」）を組換えＨＢＥＧＦで１時間プレインキュベートした。細胞可溶化物の調製の前に２０分間細胞を刺激した。タンパク質３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルに負荷して、ニトロセルロース膜に移した。細胞膜を抗ｐＥＧＦＲ（Ｔｙｒ^{1068}）に反応させた。
【図１７】組換えＨＢＥＧＦと交差特異性抗体（８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９、つまり「１Ｅ９」）で処置した後の細胞増殖を表すグラフを示す。細胞に添加する前に、異なった濃度の交差特異性抗体をリガンドと一緒に１時間プレインキュベートした。細胞生存率は、処置の４８時間後に、ＭＴＴアッセイにより評価した。
【図１８】化学療法と併用したＨＢＥＧＦ／ＡＲＥＧ交差特異性抗体で処置した後の癌細胞増殖を表す棒グラフを示す。１００ｎＭのアイソタイプ対照、又は１００ｎＭの交差特異性抗体（８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」、又は８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３、つまり「２Ｂ３」）単独で、若しくは１０μＭのｃｐｔ１１との併用で細胞を処置した。細胞を処置の７２時間後にＭＴＴアッセイにより分析した。＊＊は統計的に有意であるＰ＜０．００１を示す。２Ｂ３のＲＩ値は０．９９であるため相加的効果がある。２Ｆ７のＲＩ値は１．１であるため、（わずかに）相乗効果がある。
【図１９】市販のセツキシマブ「ｃ２２５」と交差特異性抗体（８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」）の比較を表す棒グラフを示す。抗体を、２０μｇ／ｍｌと４０μｇ／ｍｌの濃度で、単独及び化学療法と併用して、細胞へ添加した。細胞生存率は、処置の７２時間後に、ＭＴＴアッセイにより評価した。＊＊はｎｔ　Ｐ＜０．００１を示す。＊はＰ＜０．０５を示す。
【図２０】ＭＤＡ－２３１乳癌細胞株での浸潤アッセイの結果を示す。５００ｎＭの交差特異性モノクローナル抗体（８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９つまり「１Ｅ９」、８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」、又は８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３、つまり「２Ｂ３」）と陰性対照（ｉｓｏ－１）抗体の存在下で、マトリゲルを通したＭＤＡ－２３１細胞の浸潤性を評価した。細胞をＨｏｅｓｃｈｔで染色されるまで２４時間放置し、１視野当たりの浸潤された細胞の数を数えた。パネルａは各抗体での結果を要約する棒グラフであり、パネル

ｂは、陰性対照抗体と２Ｂ３抗体を使用して得られた代表的な画像を示す。＊＊は、Ｐ＜０．００１を示す。＊は、Ｐ＜０．０５を示す。
【図２１】ＭＤＡ－２３１乳癌細胞株での遊走アッセイの結果を示す。３００ｎＭの交差特異性モノクローナル抗体（８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」、若しくは８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９、つまり「１Ｅ９」）又はアイソタイプ対照の存在下で評価した。アッセイを１７時間続け、傷の幅を測定した。右側のパネルは、処置なし、及び８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３、つまり「２Ｂ３」がある状態で得られた代表的な画像を示す。
【図２２】５００ｎＭの二重特異性モノクローナル抗体（８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７、つまり「２Ｆ７」、又は８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９、つまり「１Ｅ９」）、及び陰性対照抗体の存在下でのマトリゲルを通したＨＵＶＥＣ細胞の浸潤アッセイの結果を示す。細胞をＨｏｅｓｃｈｔ染色されるまで２４時間放置し、１視野当たりの浸潤された細胞の数を数えた。
【図２３】交差特異性抗体のチューブアッセイ解析を示す。マトリゲルでコートされたウェルに、交差特異性抗体又は対照抗体の存在下でＨｕｖｅｃ細胞を播種した。１７時間後にチューブ構造を解析した。画像を取得し、ノードのまわりの分岐ポイントを数えた。下のパネルは代表的な画像を示し、上のパネルは、無処置の細胞、対照抗体で処置した細胞、及び８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７抗体で処置した細胞のノード周囲の分岐ポイントの数を棒グラフの形式で示す。
【図２４】ボイデンチャンバーアッセイを使用した、５００ｎＭの交差特異性モノクローナル抗体と陰性対照抗体の存在下でのＨＵＶＥＣ細胞の遊走アッセイの結果を示す。細胞をＨｏｅｓｃｈｔ染色前に２４時間放置し、１視野当たりの浸潤された細胞の数を数えた。＊ｐ＜０．０５、＊＊ｐ＜０．００１８ｄ７　１ｃ８　１ｅ９抗体、８ｄ７　１ｆ６　２ｆ７抗体及び８ｄ７　１ｆ６　２ｂ３
【実施例】
【０１６８】
方法
細胞株と培養条件
ＭＤＡ－ＭＢ２３１ヒト乳癌細胞株とＨＴ２９ヒト結腸直腸癌細胞株をダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＫ）で維持した。ＨＣＴ１１６（ｐ５３野生型）ヒト結腸直腸腺癌細胞株をＭｃＣｏｙｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＫ）で維持した。すべての培地は、１０％ＦＣＳ標準（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＫ）又は透析済みＦＣＳ（Ａｕｔｏｇｅｎｅ　Ｂｉｏｃｌｅａｒ、ＵＫ）、１％ペン／ストレップ（ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐ）、１％Ｌ－グルタミン（すべてＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＵＫ）を含む。
【０１６９】
ＲＮＡ干渉法
ＡＲＥＧ、ＨＢ－ＥＧＦ及び対照ｓｉＲＮＡ、並びにＤｈａｒｍａｆｅｃｔ４トランスフェクション試薬はＤｈａｒｍａｃｏｎ（Ｌａｆａｙｅｔｔｅ，ＣＯ、ＵＳＡ）から入手した。
【０１７０】
細胞を、９６ウェルプレートに１ウェル当たり５０００個、又は６ウェルプレートに１ウェル当たり5×10^5個を播種した。細胞をトランスフェクションの前に２４時間培養した。ｓｉＲＮＡは、無血清ＤＭＥＭ培地中で１００ｎＭに調製し、室温で５分間放置した。Ｄｈａｒｍａｆｅｃｔトランスフェクション試薬もまた、無血清ＤＭＥＭ培地中で調製し、室温で５分間インキュベートした。トランスフェクション試薬をｓｉＲＮＡに添加し、室温で２０分間インキュベートした。培地をプレートウェルから除去し、抗生物質無添加ＤＭＥＭをウェルに添加した。２０分後、ｓｉＲＮＡをウェルに滴下により添加した。プレートを３７℃で４８時間インキュベートした。
【０１７１】
ＭＴＴアッセイ

３－（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド（ＭＴＴ、Ｓｉｇｍａ）アッセイ（Ｍｏｓｍａｎｎ、１９８３）により、細胞生存率を評価した。化学療法／ｓｉＲＮＡの相互作用を評価するために、９６ウェルプレートに１ウェル当たり５０００個の細胞を播種した。２４時間後、細胞にｓｉＲＮＡをトランスフェクトし、異なる濃度の様々な化学療法剤により処置した。４８時間後、各ウェルにＭＴＴ（１．０ｍｇ／ｍｌ）を添加し、細胞を３７℃で２時間インキュベートした。培養培地を除去し、ホルマザン結晶をＤＭＳＯ２００μｌに溶解させた。マイクロプレートリーダー（Ｔｅｃａｎ　Ｓｕｎｒｉｓｅ、Ｂｉｏｒａｄ、ＵＫ）を使用して、５７０ｎｍにおける各ウェルの吸光度を読み取ることにより、細胞生存率を測定した。

【０１７２】

クローニング

遺伝子特異的プライマー（図６ｂ）を使用して、ｃＤＮＡライブラリーからＰＣＲにより、ＨＢＥＧＦタンパク質をコードするＤＮＡ配列を増幅した。ＨＢＥＧＦ遺伝子を、細菌発現ベクターｐＲＳＥＴａ内にクローニングし、組換えタンパク質のＮ末端にヘキサヒスチジンタグを組み込んだ。次いで、このコンストラクトを使用して、コンピテントＢＬ２１　ＤＥ３　Ｅ．ｃｏｌｉ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を形質転換した。多重クローニング部位（図６ｂ）に隣接するベクター特異的プライマーを使用して、コロニーＰＣＲにより、陽性形質転換細胞を選択した。

【０１７３】

組換えＨＢＥＧＦタンパク質の発現

アンピシリンを５０μＭ添加したルリアーベルターニ（ＬＢ）培地５ｍｌで、３７℃で一晩、陽性クローンを増殖した。この培養物の３００μｌ分を二次培養液の接種用に保管し、試料の残部をＱｉａｇｅｎミニプレップキットを使用してミニプレップし、ＤＮＡ配列決定により配列を確認した。

【０１７４】

３つの二次培養液を接種して、タンパク質発現を可視化した。培養液が、それぞれ０．２、０．５及び１．０のＯＤ（A_{550}）の時、ＩＰＴＧ（最終濃度１ｍＭ）で培養液を誘導し、３７℃で４時間放置した。次いで、４０００ｒｐｍで１５分間遠心分離して細胞を回収し、リソナーゼを１μｌ添加したＰＢＳ／０．１％Ｉｇｅｐａｌ１ｍｌ中にペレットを再懸濁した。次いで、試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥ法とウエスタンブロット法で解析し、タンパク質の発現を確認した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルをクーマシーブルーで一晩染色し、翌日脱色した。

【０１７５】

次いで、二次培養液を接種液として使用し、培養液が最適光学濃度に達したらＩＰＴＧで誘導して、アンピシリンを添加した５００ｍｌのＬＢ培地中で、組換えＨＢＥＧＦタンパク質を発現させた。培養液を、５０００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、タンパク質精製用にペレットを保管した。

【０１７６】

タンパク質精製

誘導された組換えタンパク質は、８Ｍ尿素緩衝液（尿素４８０ｇ、塩化ナトリウム２９ｇ、リン酸二水素ナトリウム（二水和物）３．１２ｇ、イミダゾール０．３４ｇ）５０ｍｌ中で一晩溶解させた。溶液を６０００ｒｐｍで１時間遠心分離した後、精製前に上清を、０．８μｍジャイロディスクフィルターを使用して濾過した。

【０１７７】

タンパク質は、Ｎ末端ヘキサヒスチジンタグにより精製し、固定化金属アフィニティクロマトグラフィーによるカラム内でのリフォールディング法を使用してリフォールディングさせた。Ａｋｔａｐｒｉｍｅに装填する前に、１００ｍＭ硫酸ニッケルを使用してＣｈｅｌａｔｉｎｇ　ｈｉ－ｔｒａｐカラム（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）にチャージした。８Ｍ尿素緩衝液を５ｍＭイミダゾール洗浄緩衝液（塩化ナトリウム２９ｇ、リン酸二水素ナトリウム（二水和物）３．１２ｇ、イミダゾール０．３４ｇ、ｐＨ８

．０）と交換してリフォールディングを生じさせ、５００ｍＭイミダゾール溶出緩衝液（塩化ナトリウム２９ｇ、リン酸二水素ナトリウム（二水和物）３．１２ｇ、イミダゾール３４ｇ）を使用してタンパク質を溶出させる。精製組換えタンパク質の溶出プロファイルを記録し、図７ａに示した。

【０１７８】

溶出画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を行い、溶出画分中の組換えタンパク質の存在を確認した。ゲルをクーマシーブルーで一晩染色し、その後脱色して、ＨＢＥＧＦタンパク質（図７ｂ）を含む画分を測定した。

【０１７９】

抗体産生

リフォールディングしたタンパク質を免疫抗原として使用し、モノクローナル抗体を産生した。ＢＡＬＢ／Ｃマウス５匹を、精製組換えタンパク質１５０μｇで３週間間隔で免疫し、３回目と５回目のブースト後に、抗体力価を解析した。各動物から試験血液を取得し、１：１０００の希釈度で１００ｎｇの抗原に対しウエスタンブロット法で検査した。ブロットは、３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）を使用して発色させた。

【０１８０】

５回目のブースト後に、マウスから脾臓を摘出し、標準的なプロトコールに従い、抗体産生Ｂ細胞と、ＳＰ２骨髄腫細胞とを融合した。ハイブリドーマ融合後１１日目に、細胞増殖についてプレートを検査した。クローンを、ＥＬＩＳＡ法により組換えタンパク質に対してスクリーニングし、選択された陽性ハイブリドーマを、限界希釈により２回クローニングした。

【０１８１】

ＥＬＩＳＡ法

モノクローナル抗体をＥＬＩＳＡ法によりをスクリーニングして、増殖すべきクローンを決定した。スクリーニング抗原を含むコーティング緩衝液（緩衝液Ａ：炭酸水素ナトリウム０．４２ｇ／水１００μｌ、緩衝液Ｂ：炭酸ナトリウム０．５３ｇ／水１００μｌ、ｐＨ９．５）１００μｌを各ウェルに添加して（１００ｎｇ／ｗｅｌｌ）、Ｍａｘｉ Ｓｏｒｂ ９６ウェルプレートを組換え抗原でコートした。対照抗原も使用し、非特異性のクローンを除去した。プレートを３７℃で１時間インキュベートして、抗原をウェルに結合させ、次いで、ＰＢＳ／３％ＢＳＡ２００μｌを各ウェルに添加することにより、室温で１時間にわたりプレートをブロックした。

【０１８２】

プレートからブロッキング溶液を除去し、ハイブリドーマ上清の１００μｌを陽性抗原ウェルと対照抗原ウェルに添加した。スクリーニングプレートを上清と一緒に、ロッカーを使って、室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄し、その後、ヤギ抗マウスＨＲＰ標識二次抗体１００μｌ（１：３０００）を各ウェルに添加し、室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳ－Ｔで３回洗浄し、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）１００μｌを各ウェルに添加し、３７℃で５分間インキュベートした。呈色により陽性のウェルが示され、１ＭのＨＣＬ５０μｌを添加し反応を止めた。分光光度計が４５０ｎｍでプレートを測定し、スクリーニングウェルで陽性（＋）を示し、対照ウェルで陰性（－）を示す試料をこの後の作業のために選択した。元のウェルに由来する細胞を２４ウェルプレートに移し、増殖させた。

【０１８３】

ウエスタンブロット法

ハイブリドーマ細胞株に由来する上清をウエスタンブロット法により解析し、モノクローナル抗体が癌細胞株の範囲で、組換えタンパク質、及び内因性の天然タンパク質の両方を検出する能力を判定した。ＨＣＴ１１６、ＨＴ２９、及びＭＤＡ全細胞溶解物（～３０μｇ／ｍｌ）、又は組換えタンパク質の一定量をＳＤＳ－ＰＡＧＥ法により分離し、Ｈｙｂｏｎｄ－Ｃ Ｅｘｔｒａニトロセルロース膜（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上に移した。膜をＰＢＳ／５％ｍａｒｖｅｌ中で室温で１時間インキュベーション

してブロックし、その後ＰＢＳ中で短時間すすいだ。モノクローナル抗体を１：５００又は１：２５０の希釈度でＰＢＳに溶かし、４℃で一晩、穏やかに揺動させながら膜上でインキュベートした。次いで、ブロットをＰＢＳ／１％ｍａｒｖｅｌと０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０で３回すすぎ、次いで、１：３０００の希釈度のヤギ抗マウスＨＲＰ標識二次抗体で室温で１時間、振動させながらインキュベートした。次いで、ブロットをＰＢＳ／１％ｍａｒｖｅｌと０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０溶液で３回すすぎ、次にＰＢＳで短時間すすいだ。ブロットを、ＥＣＬ　ｐｌｕｓ基質（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｃｅｎｃｅｓ）で室温で５分間インキュベートした後、Ｋｏｄａｋ　ｉｍａｇｅｒで分析した。

【０１８４】

フローサイトメトリー分析

ＨＣＴ１１６細胞を、２．５μＭイリノテカンを添加して、又は添加せずに４８時間処置した。４８時間後、ＰＢＳで細胞を洗浄した。５ｘ１０^{5}個の細胞を、ＡＲＥＧ抗体、又はアイソタイプ対照と一緒に２時間インキュベートし、ＰＢＳで洗浄した。細胞をＦＩＴＣ標識ヤギ抗マウス抗体で１時間インキュベートし、ＰＢＳで洗浄後、ＢＤ　ＦＡＣＳ　ｃａｎｔｏで分析した。

【０１８５】

チューブアッセイ

滅菌した１２ウェルプレートを冷凍庫に入れ、また、マトリゲルを冷蔵庫で氷上に一晩置き解凍した。１２ウェルプレートを氷上に置き、マトリゲルでコートした。１ｘＰＢＳ１ｍｌを使用して、ウェルに水分を補給した。次いで、ＰＢＳを除去し、マトリゲル７０μｌを滴下によりプレートに添加した。プレートを平らな面に置き、室温で５～１０分間インキュベートし、次いで、３７℃で４５分～１時間インキュベートした。細胞をトリプシン処理しカウントした。１ウェル当たり、細胞１ｘ１０^{5}個を使用した。適正濃度まで抗体を調製し、細胞に添加した。細胞がよく拡がるように、細胞と抗体を滴下によりウェルに添加した。プレートを３７℃で一晩インキュベートした。ウェルの画像を取得し、分岐解析を実施した。

【０１８６】

浸潤アッセイ

８μｍ孔膜を備えた改変されたボイデンチャンバーを使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの浸潤アッセイを実施した。上部の膜表面を１５０μｌマトリゲル（１ｍｇ／ｍｌ）でコートし、３７℃で５時間インキュベートして、マトリゲルのゲルを形成した。適切な抗体が所定の濃度で存在する状態で細胞を追加した（無血清培地２５０μｌ中２．５×１０^{5}細胞）。上記の対応するウェルに適用したのと同じ濃度の抗体を添加した、新たな完全培地を下部チャンバ（７５０μｌ）に添加した。アッセイをすべて２セット実行し、浸潤プレートを５％CO_2、３７℃で２４時間インキュベートした。

【０１８７】

膜の上部表面に残っている細胞を綿棒で拭いて除去し、浸潤した細胞を１５分間カルノア固定液で固定した。乾燥後、浸潤した細胞の核を、ＰＢＳ中Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８（５０ｎｇ／ｍｌ）で室温で３０分間染色した。チャンバーの内容物をＰＢＳで２度洗浄し、ＰｅｒｍａＦｌｕｏｒ封入剤に取り付け、浸潤した細胞を、蛍光顕微鏡で観察した。２回の繰り返しのアッセイそれぞれの膜の代表的な視野のディジタル像を１０枚、ｘ２０の拡大率で取得した。１視野当たりの浸潤した細胞の数を数え、数値は対照に対する相対で表した。

【０１８８】

創傷遊走アッセイ

ＭＤＡ－ＭＢ２３１細胞を５ｘ１０^{5}個、６ウェルプレートのカバーガラス上に播種し、一晩放置し、培養密度９０％まで増殖させた。細胞から培地を除去し、ピペットチップを使用して、細胞に傷をつけた。ＰＢＳで細胞をすすぎ、適正濃度の抗体とマイトマイシンＣ５μｇ／ｍｌを含む培地を添加した。傷が閉じるまで１７時間放置し、その後、細胞をＰＢＳ中４％ＰＦＡで２０分間固定した。細胞を固定したカバーガラスを顕微鏡のスラ

イドガラス上に載せ、傷の画像を取得し傷の幅を測定した。

【０１８９】

ボイデンチャンバー遊走アッセイ

８μm孔膜を備えた改変されたボイデンチャンバーを使用して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの遊走アッセイを実施した。適切な抗体が所定の濃度で存在する状態で細胞を追加した（無血清培地２５０μｌ中２．５×１０^{5}細胞）。上記の対応するウェルに適用したのと同じ濃度の抗体を添加した、新たな完全培地を下部チャンバ（７５０μｌ）に添加した。アッセイをすべて２セット実行し、浸潤プレートを５％CO_2、３７℃で２４時間インキュベートした。

【０１９０】

膜の上部表面に残っている細胞を綿棒で拭いて除去し、浸潤した細胞を１５分間カルノア固定液で固定した。乾燥後、浸潤した細胞の核を、ＰＢＳ中Ｈｏｅｃｈｓｔ３３２５８（５０ｎｇ／ｍｌ）で室温で３０分間染色した。チャンバーの内容物をＰＢＳで２度洗浄し、ＰｅｒｍａＦｌｕｏｒ封入剤に取り付け、浸潤した細胞を、蛍光顕微鏡で観察した。２回のアッセイそれぞれの膜の代表的な視野のディジタル像を１０枚、ｘ２０の拡大率で取得した。１視野当たりの浸潤した細胞の数を数え、数値は対照に対する相対で表した。

【０１９１】

リン酸化アッセイ

１．５ｘ１０^{6}個の細胞を、１０ｃｍ^{3}シャーレの血清１０％を含む培地に播種した。細胞を播種した２４時間後、血清を４時間欠乏させた。抗体を、組換えＨＢＥＧＦ３０ｎｇ／ｍｌで１時間プレインキュベートし、細胞へ添加し、２％血清で２０分間インキュベートした。細胞をホスファターゼ阻害剤を含むＰＢＳで３回洗浄し、こすり落とした。細胞をペレット状とし溶解させた。タンパク質濃度を測定し、ウエスタンブロット解析を行うため、タンパク質３０μｇをＳＤＳ－ＰＡＧＥ上に流した。ブロットをｐＥＧＦＲ（Ｔｙｒ^{1068}）抗体に反応させた。

【０１９２】

３ＬＬルイス肺転移モデル

６～８週齢の雌のＣ５７ｂｌ／６マウスに、尾静脈から３ＬＬ細胞５ｘ１０^{5}個を静脈注射した。この細胞は、対数増殖期の培養物から新たに回収し、ハンクス緩衝生理食塩水（ＨＢＳＳ）中で再度懸濁させた。治療群当たり最低８匹のマウスを使用した。動物を、抗体又はアイソタイプ対照の投与量範囲で治療する。調査を終了し、２５日目でマウスを安楽死させる。肺を摘出し、マクロ分析を実施し可視のリンパ節腫瘍数を数える。次いで、組織学的検査のために肺をホルマリン固定しパラフィン包埋する。リンパ節腫瘍数をＨ＆Ｅ切片を顕微鏡分析して数え、腫瘍領域もニコンカメラソフトウエアを使用して測定する。治療群間の転移性肺リンパ節の数において観察された差異の統計的有意性を評価する。

【０１９３】

ＨＣＴ１１６異種移植モデルと単一抗体薬

６～８週齢のＢＡＬＢ／ｃ　ｎｕ／ｎｕ雌マウスの側腹部皮下に、ＨＣＴ１１６細胞１×１０^{6}個を移植する。細胞は、対数増殖期の培養物から新たに回収し、移植に先立って、ＨＢＳＳ／ＢＤ基底膜マトリゲルを１対１で混合した混合物に再懸濁させた。特定病原体除去の条件下でマウスを維持する。下記の式を使用して、腫瘍の体積を測定する：体積（mm^3）＝０．５ｘ（最小径^{2}ｘ最大径）。腫瘍が１００mm^3の平均体積に到達した時に、マウスを治療群へ分類する。治療群当たり最低８匹のマウスを使用した。動物を、抗体又はアイソタイプ対照の投与量範囲で治療する。体重と腫瘍体積を毎週３回測定する。腫瘍が１０００mm^3の平均体積に到達した時に、調査を終了する。安楽死にあたり、組織学的検査のために腫瘍とマウスのすべての臓器を摘出しホルマリン固定する。腫瘍体積の上昇をグラフにプロットし、また、二元分散分析を、治療群間の統計的有意性を測定するために実施した。

【０１９４】

ＨＣＴＩｌ６結腸直腸異種移植モデルと化学療法併用療法

このモデルで、抗体＋化学療法併用療法の有効性を評価する。６～８週齢のＢＡＬＢ／ｃ　ｎｕ／ｎｕ雌マウスの側腹部皮下に、ＨＣＴ１１６細胞１×１０^{6}個を移植する。細胞は、対数増殖期の培養物から新たに回収し、移植に先立って、ＨＢＳＳ／ＢＤ基底膜マトリゲルを１対１で混合した混合物に再懸濁させた。特定病原体除去の条件下でマウスを維持する。下記の式を使用して、腫瘍の体積を測定する：体積（ｍｍ^{3}）＝０．５ｘ（最小径^{2}ｘ最大径）。腫瘍が１００ｍｍ^{3}の平均体積に到達した時に、マウスを治療群へ分類する。治療群当たり最低８匹のマウスを使用した。動物を、抗体又はアイソタイプ対照の投与量範囲で、化学療法との併用で治療する。体重と腫瘍体積を毎週３回測定する。腫瘍が１０００ｍｍ^{3}の平均体積に到達した時に、調査を終了する。安楽死にあたり、組織学的検査のために腫瘍とマウスのすべての臓器を摘出しホルマリン固定する。腫瘍体積の上昇をグラフにプロットし、また、二元分散分析を、治療群間の統計的有意性を測定するために実施した。

【０１９５】

同系（４Ｔｌ）乳癌転移モデル

このモデルを使用して、抗体が、同所性の乳房脂肪体腫瘍からマウスの肝臓、肺、骨組織及び脳への転移を防ぐ能力を評価する。

【０１９６】

６～８週齢のＢＡＬＢ／ｃ雌マウスの乳房脂肪体に、４Ｔｌ細胞１×１０^{5}個を、同所移植した。細胞は、対数増殖期の培養物から新たに回収し、ＨＢＳＳで再懸濁させた。下記の式を使用して、腫瘍の体積を測定する：体積（ｍｍ^{3}）＝０．５ｘ（最小径^{2}ｘ最大径）。７日後に、腫瘍体積測定を行いマウスを治療群へ分類する。治療群当たり最低８匹のマウスを使用した。動物を、抗体又はアイソタイプ対照の投与量範囲で（化学療法と併用し／併用せずに）治療する。体重と原発腫瘍の体積を毎週３回測定し記録する。原発腫瘍の体積が１０００ｍｍ^{3}の平均体積に到達した時に、調査を終了する。安楽死にあたり、組織学的検査のために原発腫瘍とマウスのすべての臓器を摘出し、ホルマリン固定する。肝臓の転移性腫瘍細胞コロニーを数え（肝臓当たり４視野）、すべての治療群でコロニーの平均数を比較した。治療群間の転移性肝臓コロニーの数において観察された差異の統計的有意性を評価する。

【０１９７】

ＭＤＡ－２３１－Ｌｕｃ乳癌転移モデルと単一抗体薬

このモデルを使用して、薬剤が、同所性の乳房脂肪体腫瘍からリンパ節への転移を防ぐ能力を評価する。（このモデルは、腫瘍細胞の血流から肺、膵臓、及び脾臓への転移を防ぐ薬剤の能力を評価するために使用してもよい。）腫瘍細胞をルシフェラーゼで標識するため、バイオイメージャーを使用して、蛍光によって、腫瘍転移を追跡することができる。

【０１９８】

６～８週齢のＢＡＬＢ／ｃ　ｎｕ／ｎｕ雌マウスの側腹部皮下に、ＭＤＡ－２３１－Ｌｕｃ細胞５×１０^{6}個を移植する。細胞は、対数増殖期の培養物から新たに回収し、移植に先立って、ＨＢＳＳ／ＢＤ基底膜マトリゲルを１対１で混合した混合物に再懸濁させた。特定病原体除去の条件下でマウスを維持する。治療を１４日目に始める。動物をこのステージで治療群へ分類する。治療群当たり最低８匹のマウスを使用した。動物を、抗体又はアイソタイプ対照の投与量範囲で（化学療法と併用し／併用せずに）治療する。体重と腫瘍体積を毎週３回測定する。下記の式を使用して、腫瘍の体積を測定する：体積（ｍｍ^{3}）＝０．５ｘ（最小径^{2}ｘ最大径）。移植後６～７週目で生体イメージングを行い、リンパ節への腫瘍細胞の転移を検出する。生体イメージング（１５分）に先立ち、マウスに、尾静脈からルシフェリンを静脈注射した。動物全体をイメージングし、ｅｘ　ｖｉｖｏイメージングのために選択した組織を摘出する。組織も、組織学的検査のためにホルマリン固定する。原発腫瘍の増殖と転移の範囲を評価する。データをすべて解析するために適切な統計検定を適用する。

【０１９９】
あるいは、腫瘍細胞（２×１０^{6}）を、尾静脈から静脈に移植してもよい。このモデルについては、治療を１４日目に始める。動物に上記の治療を６週間行う。肺、膵臓、及び脾臓の転移性信号を検出する生体イメージングを、８～１０週目に行う。
【０２００】
結果
ＡＲＥＧのｓｉＲＮＡ／抗体とＨＢＥＧＦのｓｉＲＮＡの併用による細胞増殖の減弱
細胞生存率アッセイ（図１）を実施し、細胞増殖に対するＲＮＡ干渉による、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの発現のノックダウン効果を調査した。ＡＲＥＧのｓｉＲＮＡにより細胞増殖が５０％減少し、ＨＢＥＧＦのｓｉＲＮＡ単独では、２０％減少するという効果が観察された。両ｓｉＲＮＡが併用して細胞へ添加された場合、細胞増殖が８５％減少することが観察された。これは、癌にあるこれらの２つのＥＧＦ様リガンドを標的とすることにより、細胞増殖が減弱できることを示唆する。
【０２０１】
ＡＲＥＧモノクローナル抗体を産生し、ＨＢＥＧＦのｓｉＲＮＡと併用して使用し、細胞増殖において同様の効果が観察されるかどうか調査した。細胞生存率の結果により、６Ｅ１１　１Ｅ９　２Ｄ８／６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６単独とＨＢＥＧＦ単独では、増殖が５０％減少することが示された。併用して添加された場合、細胞生存率が１０％～３０％の間で減少することが観察された（図２）。観察された効果が相乗効果であるかどうかを調査するためにＲＩ値を算出した。ＲＩ値は、生存の予測値（薬剤Ａ単独により観察される生存と、薬剤Ｂ単独により観察される生存との積として定義されるＳ$_{exp}$）の、ＡとＢとの併用での生存の観察値（Ｓ$_{obs}$）に対する比として計算される（ＲＩ＝Ｓ$_{exp}$／Ｓ$_{obs}$）。相乗効果はＲＩ＞１と定義される。ＨＢＥＧＦのｓｉＲＮＡと併用したＡＲＥＧ抗体に対するＲＩ値は、６Ｅ１１　１Ｅ９　２Ｄ８では２、６Ｅ１１　１Ｅ９　１Ｃ６では５として算出された。まとめると、これらの結果から、結腸直腸癌細胞の治療においてＨＢＥＧＦとＡＲＥＧの両方を標的とすることで、細胞増殖の減弱に相乗効果が生じることが示される。
【０２０２】
ＡＲＥＧ／ＨＢＥＧＦ二重特異性抗体の開発と性質決定
ＥＧＦ様リガンド５つの配列比較により、ＥＧＦドメインで見出され、リガンド結合に関連すると考えられている保存された６つのシステイン残基を除き、リガンド間には相同性がほとんどないことが示された（図４）。図４は、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの配列比較を示し、抗体産生のために選択された領域をさらに示す。ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの両方を標的にする１つの抗体を産生できると考えられる。この領域の組換えタンパク質を大腸菌中で産生し、マウスを免疫するために使用した。
【０２０３】
組換えタンパク質にマウスのモノクローナル抗体パネルを産生させて、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、及びウエスタンブロットによって特徴を調べた。モノクローナル抗体を、自家製及び市販（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）の組換えＨＢＥＧＦタンパク質及び組換えＡＲＥＧタンパク質に対するＥＬＩＳＡ法によってスクリーニングした。陰性対照も類似の方法で産生した。
【０２０４】
ＥＬＩＳＡ法の結果を図９～１１に示す。陰性対照と比較した場合、抗体がＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの両方に特異的であることが示されている。これらの抗体をウエスタンブロット法により調査し、図１２に示すように内在性タンパク質が検出できる。
【０２０５】
図１３は、二重特異性抗体を使用した、蛍光免疫染色法の結果を示す。
【０２０６】
二重特異性抗体を使用したＦＡＣＳ分析では、二重特異性抗体が細胞の表面に結合し、結合性は化学療法とともに上昇することが示される（図１４ａ及び１４ｂ）。

【０２０７】
交差特異性抗体による、リガンド刺激によるＥＧＦＲリン酸化の抑制
ＥＧＦＲ経路上のＡＲＥＧとＨＢＥＧＦに対する交差特異性抗体の効果を、ＥＧＦＲのリン酸化を調査することで評価した。細胞に添加する前に、抗体をＨＢＥＧＦリガンドでプレインキュベートした。交差特異性抗体が、ＨＢＥＧＦ刺激によるＥＧＦＲのチロシン１０６８のリン酸化を抑制することが明らかに観察される。
【０２０８】
図１５は、ＭＤＡ－ＭＢ２３１乳癌細胞株と結腸直腸癌細胞株ＨＣＴ１１６でのリガンド刺激によるリン酸化の抑制を示す。抗体濃度１０００ｎＭ（図１５、レーン５）でのＨＣＴ１１６におけるリン酸化の減少は、基礎レベルを下回るようである（図１５、レーン１）。図１６は、異なった結腸直腸癌培養細胞株、ＬｏＶｏにおける同様の結果を示す。
【０２０９】
交差特異性抗体による、リガンド刺激による増殖の抑制
組換えＨＢＥＧＦリガンドが、結腸直腸癌細胞株ＬｏＶｏの増殖を約６０％刺激した。細胞に添加する前に、アイソタイプ対照と交差特異性抗体を組換えＨＢＥＧＦと共に１時間プレインキュベートした。アイソタイプ対照抗体には、ＨＢＥＧＦによる増殖刺激作用に効果はなかった。交差特異性抗体（１Ｅ９）は、用量依存的な方法（図１７）でリガンドが引き起こす増殖を阻止できた。交差特異性抗体が３００ｎＭである場合、ＨＢＥＧＦによる細胞増殖に対するいかなる刺激も妨げている。この結果により、抗体はリガンドに結合して、リガンドの機能を妨げていることが示される。
【０２１０】
交差特異性抗体による細胞増殖の減弱
交差特異性抗体を濃度１００ｎＭで単独で細胞に添加する場合、細胞増殖が４０％減少することが観察された（図１８）。抗体を、１０μＭのｃｐｔ－１１と併用して添加した場合、増殖はさらに減弱した（図１８）。細胞増殖は、アイソタイプ対照と化学療法とを併用した場合、増殖の４０％まで減少した。これにより、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの二重の標的化が、単独で、及びの従来の化学療法との併用で、結腸直腸癌などの癌の細胞増殖に著しい効果があることが示される。
【０２１１】
交差特異性抗体を、ＥＧＦＲを抑制し、結腸直腸癌での使用が承認されているヒト化抗体であるセツキシマブ（Ｃ２２５）と比較した。細胞増殖アッセイにおいて、交差特異性抗体をＣ２２５に対して推奨されるのと同じ濃度で使用した場合、細胞増殖が２５％減少することが観察されたが、Ｃ２２５では有意な効果は観察されなかった（図１９）。抗体を５μＭ（ＩＣ３０）の投与量でｃｐｔ－１１と併用した。交差特異性抗体の場合のみ、細胞増殖が著しい減少を示した。交差特異性抗体を化学療法と併用した場合、Ｃ２２５及びアイソタイプ対照抗体と比較して、細胞増殖が４３％減少することが観察された。Ｃ２２５では、アイソタイプ対照抗体と比較して、効果が示されなかった。これらの結果より、ＥＧＦＲが関係するリガンド活性も抑制することがないため、リガンドを標的とすることが受容体を標的とするよりも有益であることが示唆される。
【０２１２】
交差特異性抗体による、癌細胞浸潤と遊走の減少
ＭＤＡ－ＭＢ２３１乳癌細胞株における細胞浸潤と遊走を、ボイデンチャンバー浸潤アッセイと創傷遊走アッセイにより調査した。図２０ａは、ボイデンチャンバー浸潤アッセイの結果を示す。交差特異性抗体では、アイソタイプ対照と比較して浸潤細胞の数が著しく減少した。抗体により、細胞浸潤は３０％～５０％減少した。図２０ｂは、浸潤細胞の画像を示し、アイソタイプ抗体と交差特異性抗体との間の明らかな差異を確認できる。
【０２１３】
創傷遊走アッセイにより、傷は、アイソタイプ対照よりも交差特異性抗体で閉じにくいことが示された。交差特異性抗体での傷の幅はアイソタイプ対照での幅よりも３００％広かった。無処置細胞の傷は完全に閉じた。これらの結果により、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの

二重の標的化が、細胞増殖だけでなく癌の別の特徴に効果があることが示唆される。

【０２１４】

ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの二重の標的化より血管新生が抑制される

ＨＵＶＥＣ細胞株を使用して、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの両方の標的化が血管新生に効果があるかどうか調査した。ボイデンチャンバーとＨＵＶＥＣ細胞を用いる浸潤アッセイを使用した。交差特異性抗体により、アイソタイプ対照抗体と比較して、浸潤細胞数が３０％減少した（図２２）。

【０２１５】

別の血管新生アッセイには、チューブアッセイを使用した。ＨＵＶＥＣ細胞をウェルに播種すると、図２３の無処置の画像に示すようなチューブ様構造を形成する。交差特異性抗体では、血管新生阻害反応が観察されたが、この反応は画像中のチューブ構造の崩壊として確認できる（図２３）。ノード周囲の分岐ポイントを数えて、グラフに表した（図２３）。１及び２分岐ポイント数が増加し、３及び４分岐ポイント数が減少した場合、血管新生阻害の効果が観察される。この効果は、アイソタイプ対照抗体及び無処置の場合と比較して、交差特異性抗体でははっきり確認される。

【０２１６】

交差特異性抗体が、ＨＵＶＥＣ遊走アッセイにおいて著しい結果を示した。ボイデンチャンバーにおける細胞遊走数は、アイソタイプ対照抗体と比較して２０％減少した。これらの結果はすべて、交差特異性抗体が血管新生を著しく減少させることを示唆する。

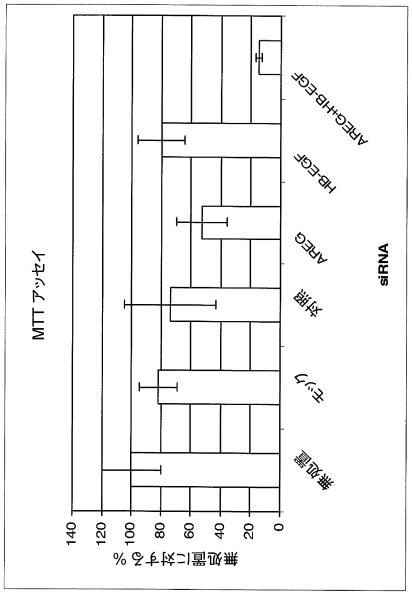
【０２１７】

本発明者らは、ＡＲＥＧとＨＢＥＧＦの両方に結合するモノクローナル抗体パネルを作製した。これらの抗体が、細胞増殖、細胞浸潤、及び細胞遊走における阻害効果を示す、及び阻害効果を示すと予想される。

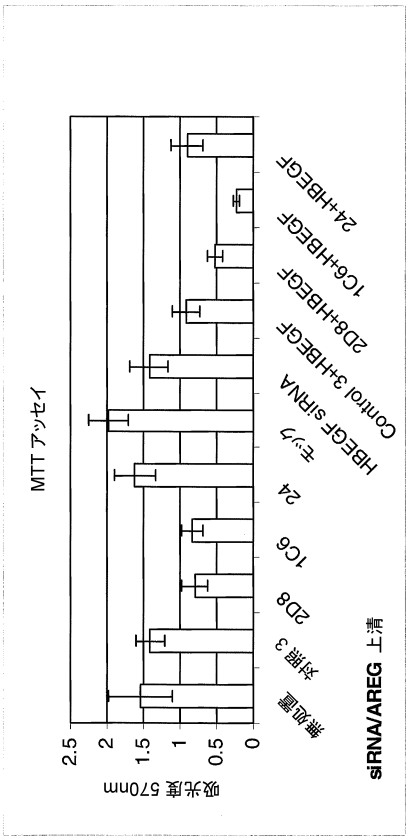
【０２１８】

本明細書において参照されるすべての文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明を、特定の好ましい実施形態との関係で説明してきたが、特許請求に係る発明は、こうした特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことを理解されたい。実際、本発明を実施するために説明された様態の、当業者には明らかな各種の変更は、本発明によって包含されるものとする。

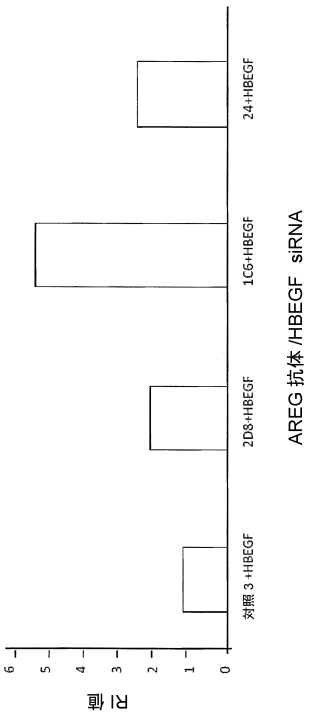
【図１】


MTT アッセイ
無処置に対する %
0
20
40
60
80
100
120
140
無処置
キシリ
対照
AREG
HB-EGF
AREG+HB-EGF
siRNA

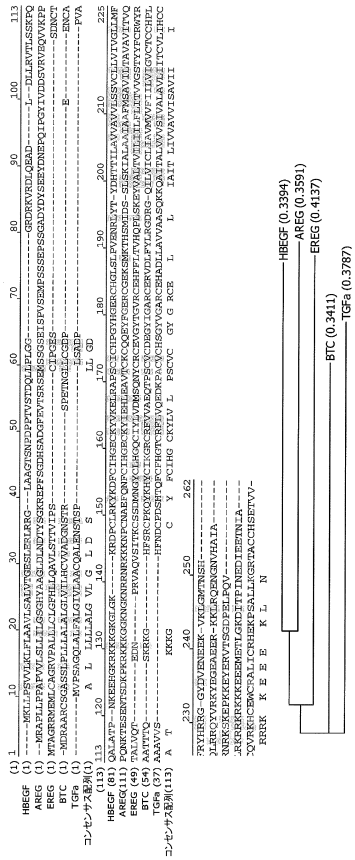
【図２】


MTT アッセイ
吸光度 570nm
0
0.5
1
1.5
2
2.5
無処置
対照 3
2D8
1C6
24
キシリ
HBEGF siRNA
Control 3+HBEGF
2D8+HBEGF
1C6+HBEGF
24+HBEGF
siRNA/AREG 上清

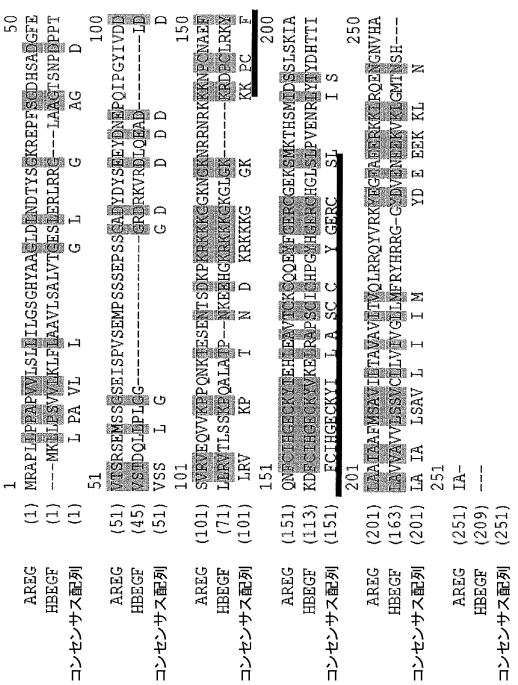
【図３】


RI値
0
1
2
3
4
5
6
対照 3 +HBEGF
2D8+HBEGF
1C6+HBEGF
24+HBEGF
AREG 抗体 /HBEGF siRNA

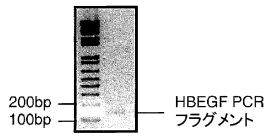
【図４】


HBEGF (0.3394)
AREG (0.3591)
EREG (0.4137)
BTC (0.3411)
TGFa (0.3787)

【図５】



【図６ａ】



【図６ｂ】

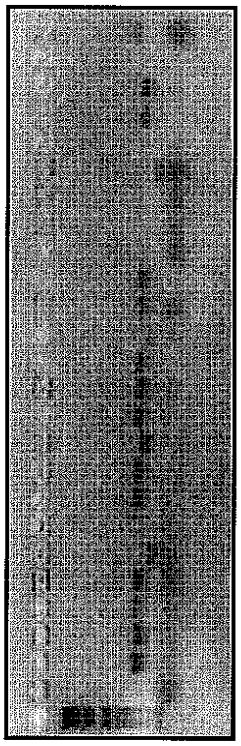
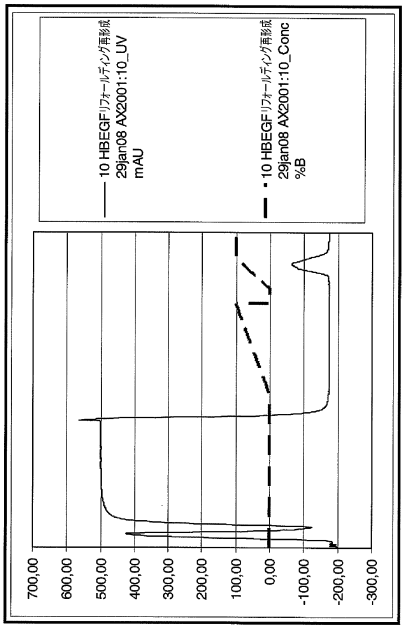


Figure 6b

【図７ａ】



【図７ｂ】

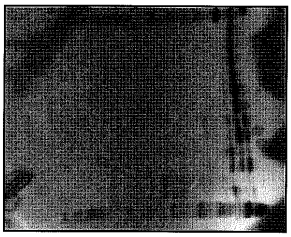
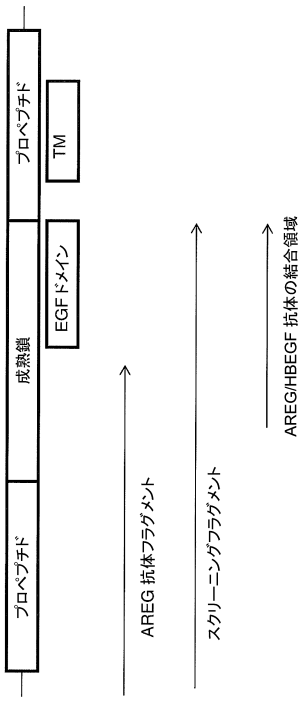
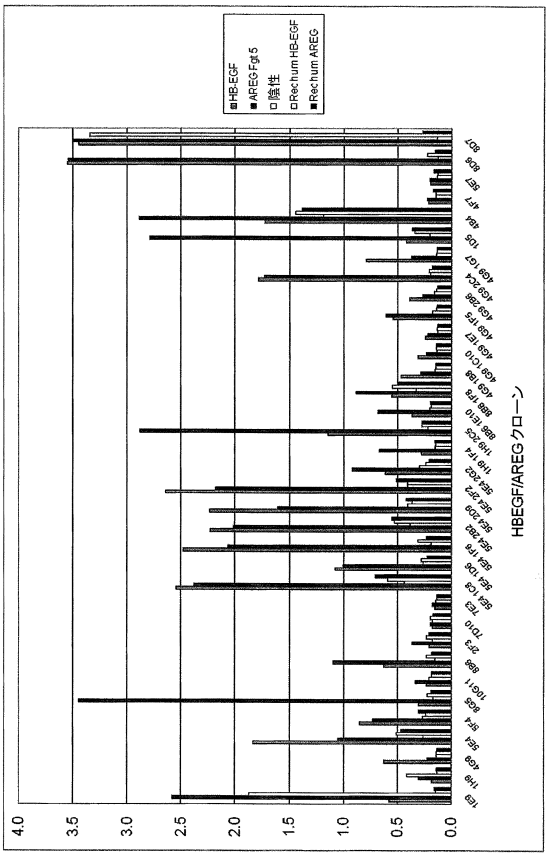


Figure 7b

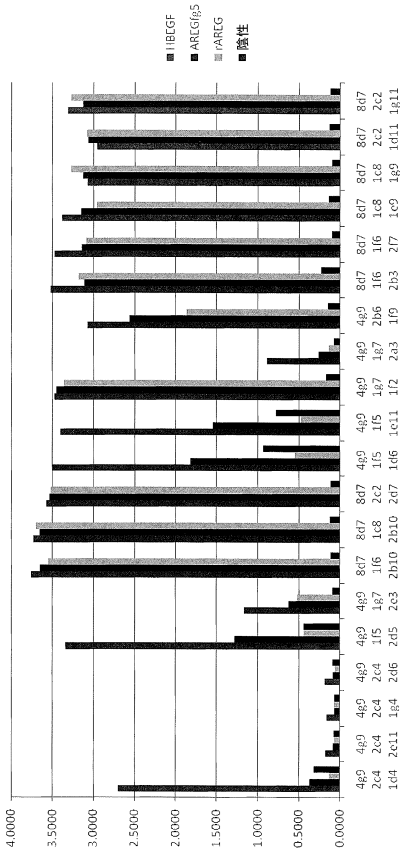
【図８】



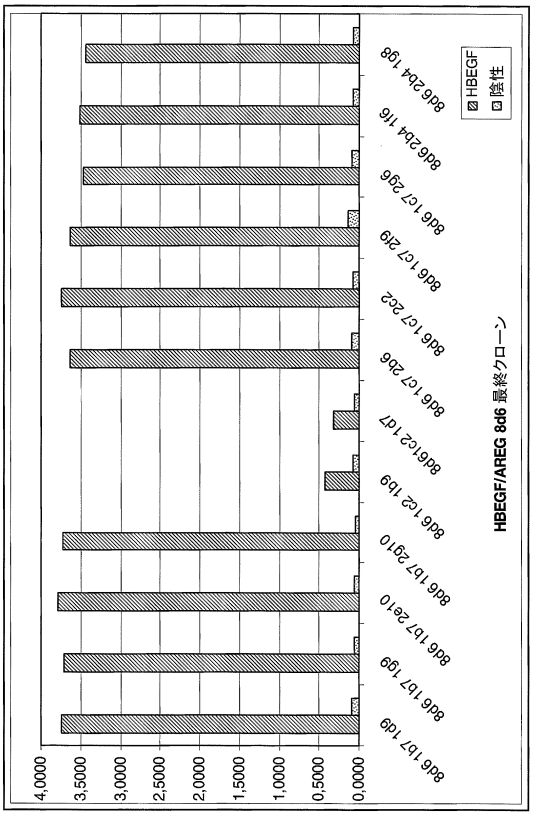
【図９】



【図１０】



【図１１】



【図１２】

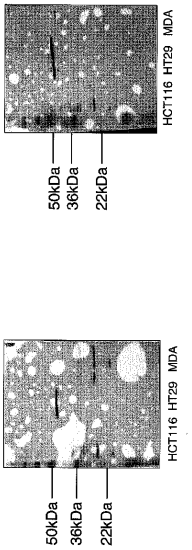
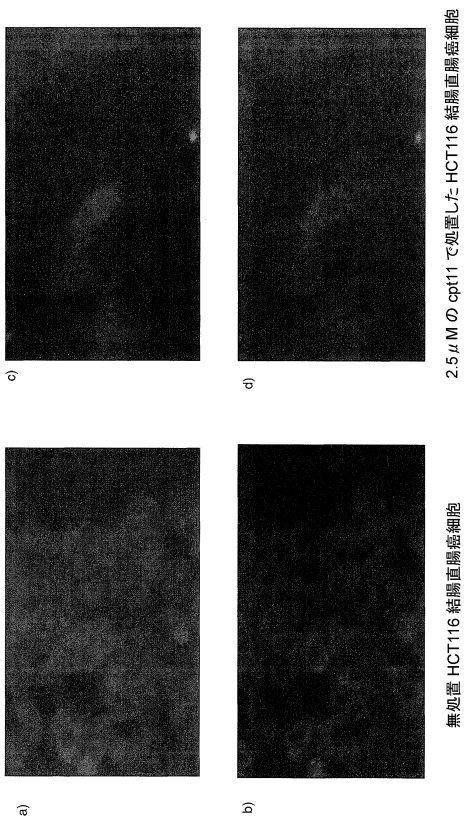
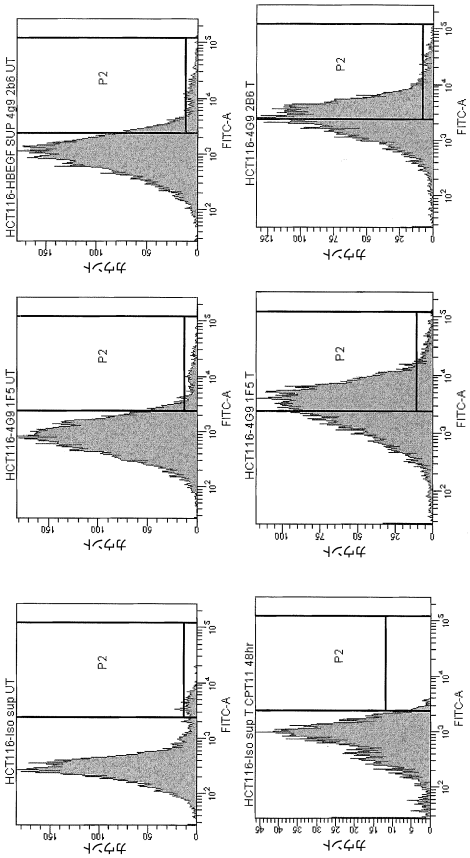


Figure 12

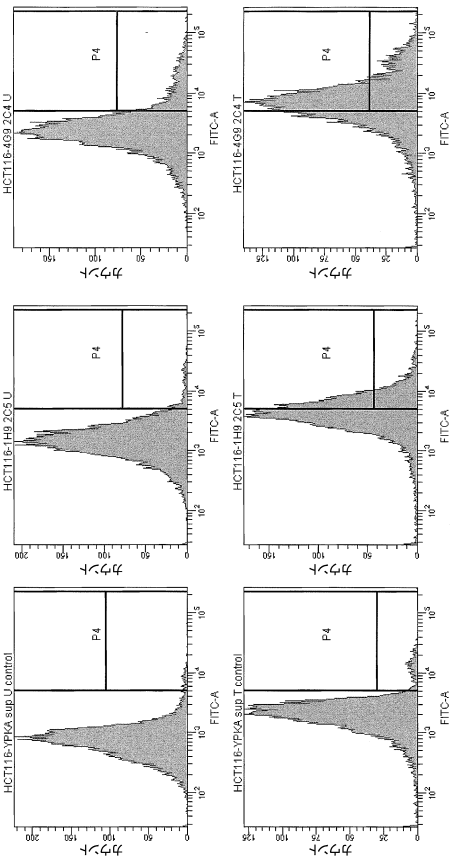
【図１３】



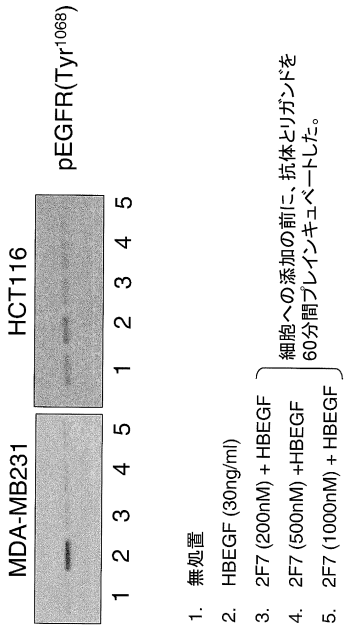
【図１４ａ】



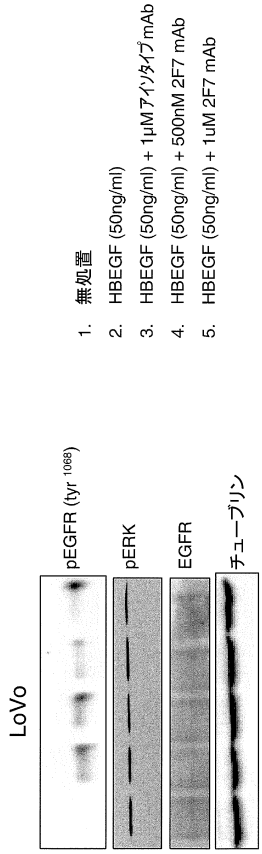
【図１４ｂ】



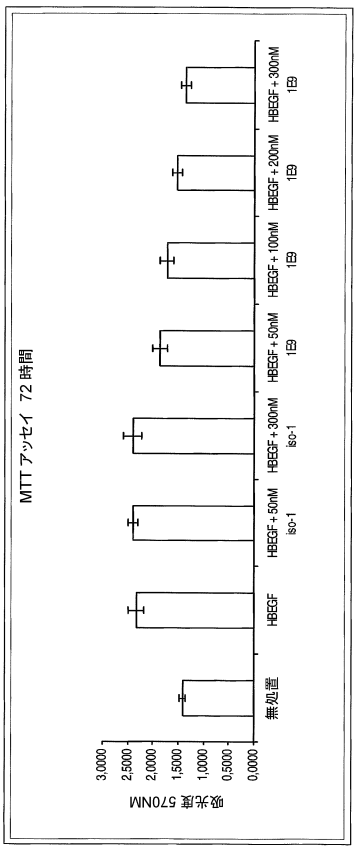
【図１５】



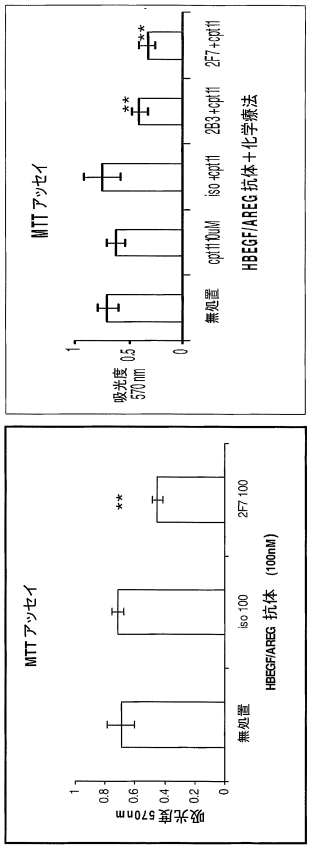
【図１６】



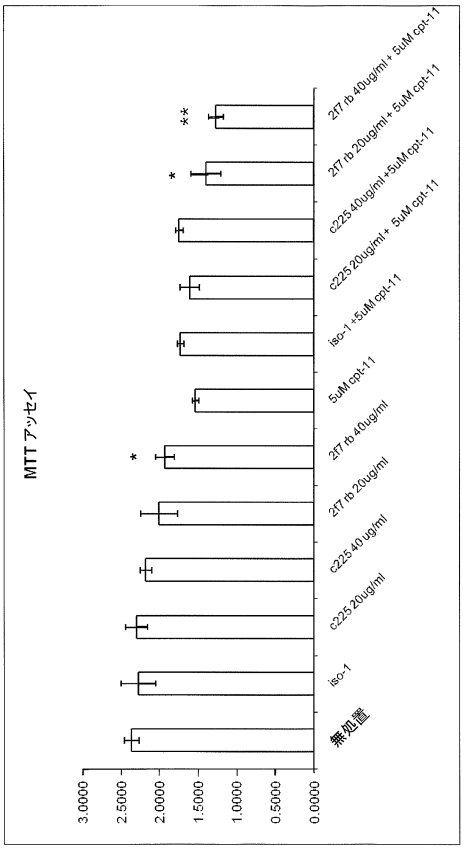
【図１７】



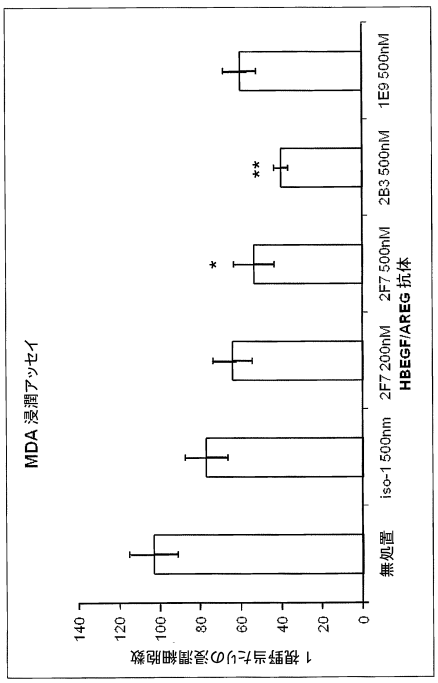
【図１８】



【図１９】



【図２０ａ】



【図２０ｂ】

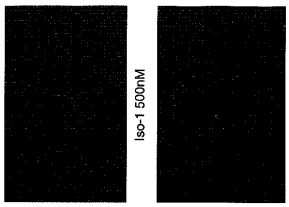
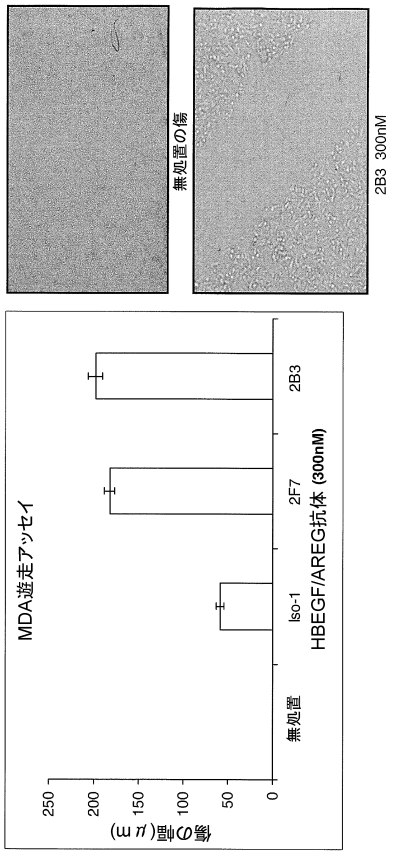
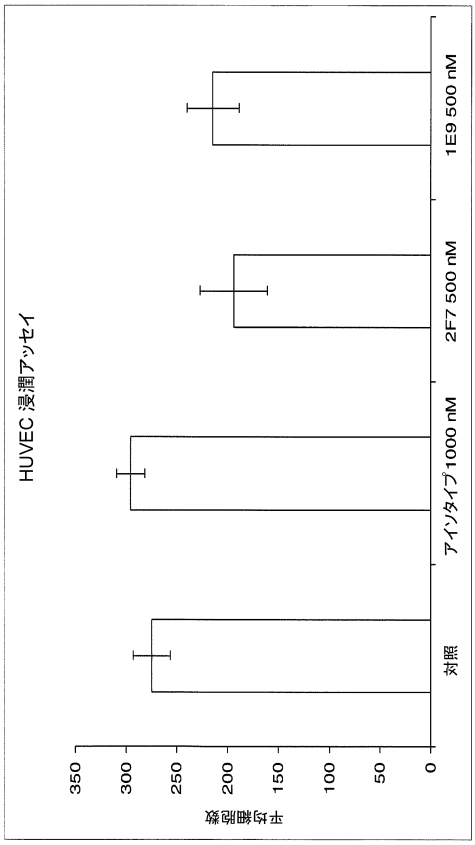


Figure 20b

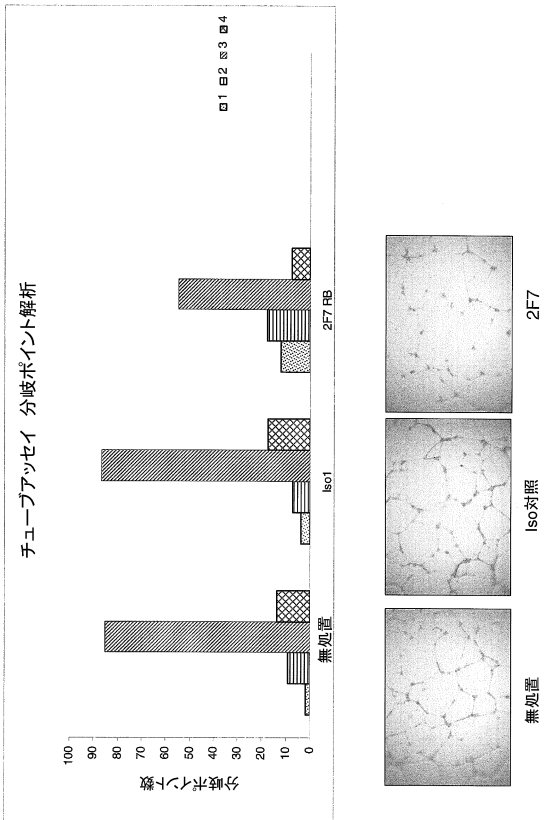
【図２１】



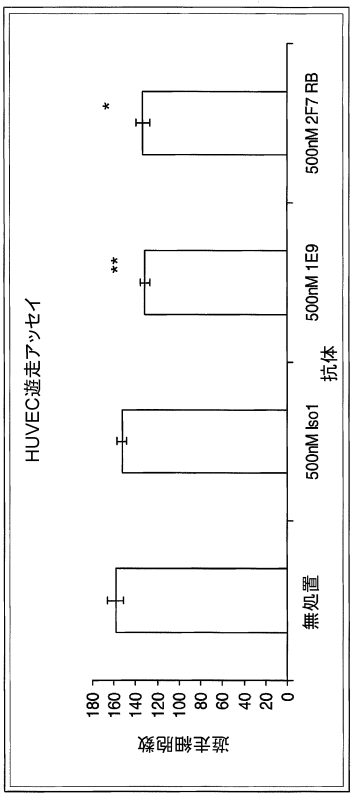
【図２２】



【図２３】



【図２４】



* p< 0.05
** p< 0.001

【配列表】
0005796269000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. FI
Ａ６１Ｐ 35/00 (2006.01) Ａ６１Ｐ 35/00

(72)発明者 キャスウェル, ジル
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド
(72)発明者 オルウィル, シェイン
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド
(72)発明者 ジョンストン, ジェームズ
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド
(72)発明者 ビュイック, リチャード
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド
(72)発明者 ジャカン, トーマス
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド
(72)発明者 ドハーティー, デクラン
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド
(72)発明者 スコット, クリストファー
イギリス, ベルファスト ビーティー１７ ０キューエル, ダンマリー, ペンブローク ループ ロード, スプリングバンク インダストリアル エステート, フージョン アンティボディーズ リミテッド

審査官 中根 知大

(56)参考文献 米国特許第０５８３０９９５（ＵＳ，Ａ）
国際公開第２００９／０４０１３４（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
ＭＥＤＬＩＮＥ／ＣＡ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ／ＰＩＲ／ＧｅｎｅＳｅｑ