

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5069843号  
(P5069843)

(45) 発行日 平成24年11月7日(2012.11.7)

(24) 登録日 平成24年8月24日(2012.8.24)

(51) Int.Cl.

A 61 K 39/395 (2006.01)

F 1

A 61 K 39/395

T

請求項の数 9 (全 74 頁)

(21) 出願番号 特願2004-521625 (P2004-521625)  
 (86) (22) 出願日 平成15年7月11日 (2003.7.11)  
 (65) 公表番号 特表2006-508336 (P2006-508336A)  
 (43) 公表日 平成18年3月9日 (2006.3.9)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2003/021590  
 (87) 國際公開番号 WO2004/008099  
 (87) 國際公開日 平成16年1月22日 (2004.1.22)  
 審査請求日 平成18年6月22日 (2006.6.22)  
 (31) 優先権主張番号 60/396,290  
 (32) 優先日 平成14年7月15日 (2002.7.15)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/480,043  
 (32) 優先日 平成15年6月20日 (2003.6.20)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509012625  
 ジェネンテック、 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ  
 ス サンフランシスコ ディーエヌエー  
 ウエイ 1  
 (73) 特許権者 306021192  
 エフ・ホフマンーラ・ロシュ・アクチエン  
 ゲゼルシャフト  
 スイス、ツェハーハーフツィードル-ゼーフ  
 レンツアッハーシュトラーセ124番  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗ErbB2抗体を用いる処置に応答性ある腫瘍を同定するための方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

癌患者の卵巣癌、乳癌、肺癌又は前立腺癌の治療に用いるための組換えヒト化抗体2C4 (rhumaMab 2C4) を含む医薬であって、rhumaMab 2C4 はそれぞれ配列番号：3 および 4 の可変軽鎖アミノ酸配列及び可変重鎖アミノ酸配列の相補性決定領域(CDR)を含み、420mg の固定用量投与物として 3 週毎に投与される、医薬。

## 【請求項2】

rhumaMab 2C4 がそれぞれ配列番号：3 および 4 の可変軽鎖および可変重鎖アミノ酸配列を含む、請求項1に記載の医薬。

## 【請求項3】

rhumaMab 2C4 がヒト軽鎖及び重鎖IgG1定常領域配列をさらに含む、請求項1または2に記載の医薬。

10

## 【請求項4】

rhumaMab 2C4 がチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞によって発現されたものである請求項1または2に記載の医薬。

## 【請求項5】

rhumaMab 2C4 の 840mg の負荷用量投与が、rhumaMab 2C4 の固定用量投与に先行する、請求項1または2に記載の医薬。

## 【請求項6】

卵巣癌の治療に用いるための、請求項1に記載の医薬。

20

**【請求項 7】**

乳癌の治療に用いるための、請求項 1 に記載の医薬。

**【請求項 8】**

肺癌の治療に用いるための、請求項 1 に記載の医薬。

**【請求項 9】**

前立腺癌の治療に用いるための、請求項 1 に記載の医薬。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

(発明の分野)

本発明は、抗 E r b B 2 抗体を用いる処置に応答性である腫瘍を同定する方法、ならびにこのような腫瘍に罹患している患者を処置する方法に関する。 10

**【背景技術】****【0002】**

(発明の背景)

レセプターチロシンキナーゼの E r b B ファミリーは、細胞の増殖、分化および生存の重要なメディエーターである。このレセプターファミリーは、上皮増殖因子レセプター ( E G F R または E r b B 1 ) 、 H E R 2 ( E r b B 2 または p 1 8 5 n e u ) 、 H E R 3 ( E r b B 3 ) および H E R 4 ( E r b B 4 または t y r o 2 ) を含む、4 つの異なったメンバーを含む。 20

**【0003】**

e r b B 1 遺伝子によってコードされる E G F R は、ヒトの悪性疾患において原因として関連付けられている。特に、 E G F R の上昇した発現は、乳癌、膀胱癌、肺癌、頭部癌、頸部癌および胃癌ならびに神経芽細胞腫において観察されている。上昇した E G F R レセプター発現はしばしば、自己分泌刺激経路によるレセプター活性化を生じる、同じ腫瘍細胞による、 E G F R リガンドであるトランスフォーミング増殖因子 ( T G F - ) の増加した産生と関連している。 B a s e l g a および M e n d e l s o h n 、 P h a r m a c . T h e r . 6 4 : 1 2 7 - 1 5 4 ( 1 9 9 4 ) 。さらに、 1 5 8 3 塩基対の c D N A フラグメントクローニングがマウス E G F R および短縮型ラット E G F R に対して 9 0 % ~ 9 5 % の配列相同性を有する上皮増殖因子レセプター関連タンパク質 ( E R R P ) が記載されている ( 米国特許第 6,399,743 号 ; および米国公開第 2 0 0 3 / 0 0 9 6 3 7 3 号 ) 。 E G F R またはそのリガンドである T G F - および E G F に対するモノクローナル抗体は、このような悪性疾患の処置における治療薬剤として評価されている。例えば、 B a s e l g a および M e n d e l s o h n . , 前出 ; M a s u i ら、 C a n c e r R e s e a r c h 4 4 : 1 0 0 2 - 1 0 0 7 ( 1 9 8 4 ) ; ならびに W u ら、 J . C l i n . I n v e s t . 9 5 : 1 8 9 7 - 1 9 0 5 ( 1 9 9 5 ) を参照のこと。 30

**【0004】**

E r b B ファミリーの第 2 のメンバーである p 1 8 5 n e u は最初に、化学的に処置されたラットの神経芽細胞腫からのトランスフォーミング遺伝子の産物として同定された。活性化された形態の n e u プロトオンコジーンは、コードされるタンパク質の膜貫通領域における点変異 ( バリンからグルタミン酸へ ) から生じる。 n e u のヒトホモログ ( H E R 2 ) の増幅は、乳癌および卵巣癌において観察され、そして乏しい予後に相關する ( S l a m o n ら、 S c i e n c e , 2 3 5 : 1 7 7 - 1 8 2 ( 1 9 8 7 ) ; S l a m o n ら、 S c i e n c e , 2 4 4 : 7 0 7 - 7 1 2 ( 1 9 8 9 ) ; および米国特許第 4,968,603 号 ) 。今日までに、 n e u プロトオンコジーンにおける点変異と類似した点変異はヒト腫瘍について報告されていない。 E r b B 2 の過剰発現 ( 頻繁にであるが均一に ) というわけではなく、遺伝子増幅に起因する ) もまた、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、脾臓および膀胱の癌を含めて、他の癌において観察されている。とりわけ、 K i n g ら、 S c i e n c e , 2 2 9 : 9 7 4 ( 1 9 8 5 ) ; Y o k o t a ら、 L a n c e t : 1 : 7 6 5 - 7 6 7 ( 1 9 8 6 ) ; F u k u s h i g i ら、 M o l C e l l 40

Biol. , 6 : 955 - 958 (1986) ; Geurinら、Oncogene Res. , 3 : 21 - 31 (1988) ; Cohenら、Oncogene , 4 : 81 - 88 (1989) ; Yonemuraら、Cancer Res. , 51 : 1034 (1991) ; Borstら、Gynecol. Oncol. , 38 : 364 (1990) ; Weinerら、Cancer Res. , 50 : 421 - 425 (1990) ; Kernら、Cancer Res. , 50 : 5184 (1990) ; Parkら、Cancer Res. , 49 : 6605 (1989) ; Zhaiら、Mol. Carcinog. , 3 : 354 - 357 (1990) ; Aaslandら、Br. J. Cancer , 57 : 358 - 363 (1988) ; Williamsら、Pathobiology , 59 : 46 - 52 (1991) ; および McCannら、Cancer , 65 : 88 - 92 (1990) を参照のこと。erbB2は、前立腺癌において過剰発現され得る (Guら、Cancer Lett. 99 : 185 - 189 (1996) ; Rossら、Hum. Pathol. 28 : 827 - 33 (1997) ; Rossら、Cancer , 79 : 2162 - 2170 (1997) ; および Sadasivanら、J. Urol. 150 : 126 - 131 (1993) )。erbB2の過剰発現は、erbB2またはerbB2ホモダイマーのリガンド依存性活性化を介した腫瘍増殖をもたらし得る。

#### 【0005】

ラットp185neuおよびヒトerbB2タンパク質産物に対する抗体は、記載されている。Drebinおよび共同実験者は、ラットneu遺伝子産物であるp185neuに対して抗体を惹起させた。例えば、Drebinら、Cell , 41 : 695 - 706 (1985) ; Myersら、Meth. Enzym. , 198 : 277 - 290 (1991) ; およびWO94/22478を参照のこと。Drebinら、Oncogene , 2 : 273 - 277 (1988) は、p185neuの2つの異なる領域と反応性の抗体の混合物が、ヌードマウス中に移植した、neuで形質転換したNIH-3T3細胞に対して相乗的な抗腫瘍効果をもたらすことを報告する。1998年10月20日に発行された米国特許第5,824,311号もまた参考のこと。

#### 【0006】

Hudziakら、Mol. Cell. Biol. 9 (3) : 1165 - 1172 (1989) は、ヒト乳腫瘍細胞株SK-BR-3を用いて特徴付けされた抗erbB2抗体のパネルの作製を記載する。この抗体に対する曝露後のSK-BR-3細胞の相対的細胞増殖は、72時間後に、単層のクリスタルバイオレット染色によって決定された。このアッセイを用いて、細胞増殖を56%阻害した、4D5と呼ばれる抗体を用いて最大阻害が得られた。このパネルにおける他の抗体は、このアッセイにおいて、より低い程度まで細胞増殖を減少させた。抗体4D5はさらに、erbB2を過剰発現する乳房腫瘍細胞株を、TNF- の細胞傷害性効果に対して感作することが見出された。1997年10月14日に発行された米国特許第5,677,171号もまた参考のこと。Hudziakら、に考察される抗erbB2抗体は、Fendlyら、Cancer Research 50 : 1550 - 1558 (1990) ; Kotttsら、In Vitro 26 (3) : 59A (1990) ; Sarupら、Growth Regulation 1 : 72 - 82 (1991) ; Shepardら、J. Clin. Immunol. 11 (3) : 117 - 127 (1991) ; Kumarら、Mol. Cell. Biol. 11 (2) : 979 - 986 (1991) ; Lewisら、Cancer Immunol. Immunother. 37 : 255 - 263 (1993) ; Pietrasら、Oncogene 9 : 1829 - 1838 (1994) ; Vitettaら、Cancer Research 54 : 5301 - 5309 (1994) ; Sliwkowskiら、J. Biol. Chem. , 269 (20) : 14661 - 14665 (1994) ; Scottら、J. Biol. Chem. 266 : 14300 - 5 (1991) ; D'souzaら、Proc. Natl. Acad. Sci. , 91 : 7202 - 7206 (1994) ; Lewisら、Cancer Research 56 : 1457 - 1465 (1996) ; および Schaeferら、Oncogene 15 : 1385 - 1394 (1996) を参考のこと。

997)においてさらに特徴付けられる。

【0007】

組換えヒト化版のマウス抗Erbb2抗体4D5(huMAb4D5-8、rhuma b HER2またはHERCEPTIN(登録商標)；米国特許第5,821,337号)は、以前に多量の抗癌治療を受けた、Erbb2を過剰発現する転移性乳癌を有する患者において臨床的に活性である(Baselgaら、J.Clin.Oncol.14:737-744(1996))。HERCEPTIN(登録商標)は、Food and Drug Administrationから1998年9月25日に、腫瘍がErbb2タンパク質を過剰発現する転移性乳癌を有する患者の処置についての販売認可を受けた。しかし、Erbb2を過剰発現する腫瘍の全てが、HERCEPTIN(登録商標)に応答するわけではない(Brockhoffら、Cytometry, 44:338-48(2001))。さらに、前臨床データは、HERCEPTIN(登録商標)が、非小細胞肺癌(NSCLC)を処置する際に治療的に有効であり得ることを示唆する。HER2タンパク質は、再切除されたNSCLC腫瘍の20~66%において過剰発現され、そして複数のシリーズにおいて患者の乏しい結果を予測することが示された(Azzoli, C.G.ら、Semin.Oncol., 29(補遺4):59-65(2002))。

【0008】

種々の特性を有する他の抗Erbb2抗体が以下に記載される：Tagliabueら、Int.J.Cancer, 47:933-937(1991)；McKenzieら、Oncogene, 4:543-548(1989)；Maierら、Cancer Res., 51:5361-5369(1991)；Bacusら、Molecular Carcinogenesis, 3:350-362(1990)；Stancovskiら、PNAS(USA), 88:8691-8695(1991)；Bacusら、Cancer Research, 52:2580-2589(1992)；Xuら、Int.J.Cancer, 53:401-408(1993)；WO94/00136；Kasprzykら、Cancer Research, 52:2771-2776(1992)；Hancockら、Cancer Res., 51:4575-4580(1991)；Shawverら、Cancer Res., 54:1367-1373(1994)；Arteagaら、Cancer Res., 54:3758-3765(1994)；Harwerthら、J.Biol.Chem., 267:15160-15167(1992)；米国特許第5,783,186号；およびKlapperら、Oncogene, 14:2099-2109(1997)。モノクローナル抗体2C4は、WO01/00245に記載されており、これは、本明細書中に参考として援用される。2C4は、他のErbb2レセプターファミリーメンバーとのHER2の二量体化を破壊することが示されている(WO01/00245)。

【0009】

相同性スクリーニングによって、Erbb2レセプターファミリーの2つの他のメンバー(ErbB3(米国特許第5,183,884号および同第5,480,968号、ならびにKrausら、PNAS(USA), 86:9193-9197(1989))およびErbB4(EP特許出願番号599,274号；Plowmanら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:1746-1750(1993)；およびPlowmanら、Nature, 366:473-475(1993))が同定された。これらのレセプターは両方とも、少なくともいくつかの乳癌細胞株に対して発現の増加を提示する。

【0010】

Erbb2レセプターは一般に、細胞において種々の組み合わせで見出され、そしてヘテロダイマー形成は、種々のErbb2リガンドに対する細胞応答の多様性を増加させると考えられる(Earpら、Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132(1995))。しかし、これらのレセプターが

凝集する機構およびどのようにしてこれがシグナル伝達に寄与するかは完全には理解されていない (Brennan, P. J. ら, *Oncogene*, 19: 6093-6101 (2000))。EGFRは、以下の6つの異なるリガンドによって結合される：上皮増殖因子 (EGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- $\alpha$ )、アンフィレグリン (amphiregulin)、ヘパリン結合性上皮増殖因子 (HB-EGF)、ベータセルリン (betacellulin) およびエピレグリン (epiregulin) (Groenenら、*Growth Factors*, 11: 235-257 (1994))。単一の遺伝子の選択的スプライシングから生じるヒレグリンタンパク質のファミリーは、Erbb3およびErbb4についてのリガンドである。ヒレグリンファミリーは、

ヒレグリン、ヒレグリンおよびヒレグリン (Holmesら、*Science*, 256: 1205-1210 (1992))；米国特許第5,641,869号；ならびにSchaeferら、*Oncogene*, 15: 1385-1394 (1997))；neu分化因子 (NDF)、グリア増殖因子 (GGF)；アセチルコリンレセプター誘導活性 (ARIA)；ならびに感覚ニューロンおよび運動ニューロン由来因子 (SMDF) を含む。概説について、Groenenら、*Growth Factors*, 11: 235-257 (1994)；Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.*, 7: 247-262 (1996) およびLeeら、*Pharm. Rev.* 47: 51-85 (1995) を参照のこと。近年、3つのさらなるErbbリガンドが同定された；Erbb3またはErbb4のいずれかに結合することが報告されている (Changら、*Nature*, 387: 509-512 (1997))；およびCarrawayら、*Nature*, 387: 512-516 (1997))、ニューレグリン-2 (NRG-2)；Erbb4に結合するニューレグリン-3 (Zhangら、*PNAS (USA)*, 94 (18): 9562-7 (1997))；ならびにErbb4に結合するニューレグリン-4 (Harariら、*Oncogene*, 18: 2681-89 (1999))。HB-EGF、ベータセルリンおよびエピレグリンもまたErbb4に結合する。

#### 【0011】

EGFおよびTGF- $\alpha$ はErbb2に結合しないとはいえ、EGFは、EGFRおよびErbb2を刺激してヘテロダイマーを形成し、これは、EGFRを活性化し、そしてヘテロダイマーにおけるErbb2のトランスリン酸化をもたらす。ダイマー形成および/またはトランスリン酸化は、Erbb2チロシンキナーゼを活性化するようである。Earpら、前出を参照のこと。同様に、ヒレグリンは、Erbb2に結合しないが、Erbb3がErbb2と同時発現された場合、活性なシグナル伝達複合体が形成される (Nagyら、*Cytometry*, 32: 120-31 (1998))。Erbb2に対する抗体は、この複合体を破壊し得る (Slivkowskaら、*J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994))。Erbb3は、チロシンキナーゼ欠損性であり、従ってシグナル伝達能力のためには（好ましくはErbb2との）ヘテロ二量体が必要である (Graus-Portaら、*EMBO J.*, 16: 1647-55 (1995))。さらに、Erbb3のヒレグリン親和性 (HRG) は、Erbb2と同時発現された場合に、より高い親和性状態まで上昇する。Erbb2-Erbb3タンパク質複合体に関して、Leviら、*Journal of Neuroscience*, 15: 1329-1340 (1995)；Morrisseyら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 1431-1435 (1995)；およびLewisら、*Cancer Res.*, 56: 1457-1465 (1996) もまた参考のこと。実際、Erbb2は、EGFRおよびErbb3の両方について好ましいヘテロ二量体化パートナーである (Graus-Portaら、前出)。Erbb4は、Erbb3と同様に、Erbb2と共に活性なシグナル伝達複合体を形成する (CarrawayおよびCantley, *Cell*, 78: 5-8 (1994))。Erbb2とEGFRまたはErbb3とのリガンド依存性ヘテロ二量体化は、Erbb2を発現する腫瘍の増殖を促進し得る。

#### 【0012】

10

20

30

40

50

ErbBレセプターおよびヒレグリンの発現ならびにHER2のリン酸化状態は、原発性乳癌患者由来の腫瘍標本および膀胱癌において調査されている(Esteveら, Pathol. Oncol. Res., 7: 171-177 (2001) Chowら, Clin. Cancer Res., 7: 1957-1962 (2001))。Her2/neuを通した活性なシグナル伝達と、乳癌における臨床病理(clinical pathology, 18: 3230-3239 (2000) および Di Giovannaら, Cancer Res., 62: 6667-6673 (2002) によって報告されている。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

10

【0013】

1つの局面では、本発明は、抗HER2抗体を用いる処置に応答性である腫瘍を同定する方法に関する。好ましくは、抗HER2抗体は、HER2を含むErbBヘテロダイマーのリガンド活性化をブロックする。1つの実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体2C4であり、より好ましくはrhuma b 2C4である。

【0014】

腫瘍のサンプルが入手され、そしてHER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在が、このサンプル中で検出される。腫瘍は、複合体が検出される場合に、抗HER2抗体を用いる処置に応答性であるとして同定される。

20

【0015】

1つの実施形態では、複合体の存在は、HER2を含む任意のタンパク質複合体を、抗HER2抗体を用いて免疫沈降することにより検出される。次いで、この免疫沈降した複合体は、抗HER3抗体、抗HER1抗体および抗HER4抗体からなる群から選択される抗体と接触させられ、そして任意の結合が決定される。HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体は、抗HER3抗体および/または抗HER1抗体および/または抗HER4抗体が、この免疫沈降した複合体に結合するか否かが決定される場合に検出される。

【0016】

30

別の実施形態では、HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在は、腫瘍サンプルを、第1の発蛍光団を含む抗HER2抗体と接触させることにより検出される。次いで、この腫瘍サンプルは、抗HER3抗体および/または抗HER1抗体および/または抗HER4抗体からなる群から選択される抗体に接触させられ、ここで、この抗体は、第2発蛍光団を含む。次いで、蛍光共鳴エネルギー移動を測定することによって、この第1の発蛍光団およびこの第2の発蛍光団が近接しているか否かが決定される。この第1の発蛍光団およびこの第2の発蛍光団が近接していると決定された場合、HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在が検出される。

40

【0017】

なお別の実施形態では、HER2/HER3複合体および/またはHER2/HER1複合体および/またはHER2/HER4複合体の存在は、この腫瘍サンプルを、第1の結合化合物と接触させることにより検出される。この第1の結合化合物は、HER2に特異的に結合する第1の標的結合部分を含む。この第1の標的結合部分は好ましくは、抗HER2抗体または抗体フラグメントである。この第1の結合化合物は、さらに、切断可能なリンカーによってこの第1の標的結合ドメインに連結された検出可能な部分を含む。

【0018】

この腫瘍サンプルは、第2の結合化合物と接触させられる。この第2の結合化合物は、好ましくは、HER3またはHER1またはHER4に特異的に結合する第2の標的結合

50

部分を含み、そして好ましくはHER2に結合しない。別の実施形態では、この第2の標的結合部分は、HER3またはHER1に結合し、HER2にもHER4にも結合しない。さらなる実施形態では、この第2の標的結合部分は、抗HER3抗体もしくは抗HER3抗体フラグメントまたは抗HER1抗体もしくは抗HER1抗体フラグメントまたは抗HER4抗体または抗HER4抗体フラグメントを含む。この第2の結合化合物は、活性化されると、第1の結合化合物における切断可能なリンカーを切断し得、従って、この第1の結合化合物と第2の結合化合物とが近接している場合、遊離の検出可能な部分を生じる。HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在は、この遊離の検出可能な部分の存在が同定された場合に検出される。1つの実施形態では、この遊離の検出可能な部分は、キャピラリー電気泳動によって同定される。

#### 【0019】

別の実施形態では、この第1の結合化合物は、HER1またはHER3またはHER4に特異的に結合する第1の標的結合ドメインを含み、そしてこの第2の結合化合物は、HER2を特異的に結合する第2の標的結合ドメインを含む。

#### 【0020】

なお別の実施形態では、HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在、ならびに得られるHER2活性化は、例えば、HER2タンパク質の免疫沈降、続いてホスホチロシンのウェスタンプロット免疫検出により、Erbbレセプターのリン酸化を評価することにより検出される。

#### 【0021】

HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在について分析される腫瘍サンプルは、好ましくは、この腫瘍を罹患している患者から得られる。このサンプルは、例えば、生検によって得られ得る。別の実施形態では、このサンプルは、循環している腫瘍細胞を患者から精製することにより得られる。なお別の実施形態では、このサンプルは、この患者からこの腫瘍を除去するための手術の間に得られる。

#### 【0022】

なお別の実施形態では、この腫瘍のサンプルは、この腫瘍をもともと発症した患者以外の哺乳動物から得られる。好ましくは、このサンプルは、マウスまたは他の齧歯動物から得られる。より好ましくは、この腫瘍は、異種移植された腫瘍である。異種移植された腫瘍は、好ましくは、ヒト腫瘍のフラグメントをマウスまたは他の齧歯動物に移植することにより生成される。

#### 【0023】

1つの実施形態では、この腫瘍は肺腫瘍であり、より好ましくは非小細胞肺癌細胞である。別の実施形態では、この腫瘍は、乳房腫瘍である。

#### 【0024】

別の局面では、本発明は、HER2とErbbレセプターファミリーの別のメンバーとの会合を阻害する抗体を用いる処置に応答性であるとして腫瘍細胞を同定するための方法に関する。この方法は、(a) HER2陽性腫瘍細胞を含む生物学的サンプルを提供する工程；および(b)この生物学的サンプルにおいてErbbレセプターのリン酸化を検出する工程を包含し、ここで、このリン酸化は、この腫瘍細胞が、この抗体を用いる処置に応答性であることを示す。1つの実施形態では、Erbb2(HER2)レセプターのリン酸化が検出される。

#### 【0025】

ちょうど上記と同様に、HER2と会合する他のメンバーは、HER3、HER1および/またはHER4(例えば、HER2および/またはHER1)である。この方法は、本質的に上記と同様に、HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の存在を

10

20

30

40

50

検出する工程をさらに含み得る。

【0026】

別の局面では、本発明はさらに、HER2とErbbレセプターファミリーの別のメンバーとの会合を阻害する抗体を用いる処置に対する、HER2陽性腫瘍を有すると診断された被験体の応答性を予測するための方法に関する。この方法は、HER2陽性腫瘍細胞を含む、この被験体から得た生物学的サンプル中での、HER2/HER3タンパク質複合体および/またはHER2/HER1タンパク質複合体および/またはHER2/HER4タンパク質複合体の形成ならびに/あるいはErbbレセプターのリン酸化を検出することによる。このようなタンパク質複合体の存在および/またはこのリン酸化は、この抗体を用いる処置に対してこの被験体が応答する可能性があることを示す。1つの実施形態では、Erbb2(HER2)レセプターのリン酸化の検出は、この被験体が、この抗体を用いる処置に対して応答性である可能性があることを示す。

【0027】

なお別の実施形態では、本発明は、抗HER2抗体を用いる処置に対して応答性である被験体を同定するための方法に関する。この方法は、この被験体の循環している腫瘍細胞中のErbbレセプターのリン酸化を検出することによる。このようなリン酸化の存在は、この被験体が抗HER2抗体を用いる処置に対して応答性である可能性があることを示す。1つの実施形態では、Erbb2(HER2)リン酸化が検出される。別の実施形態では、この被験体はヒトである。なお別の実施形態では、この方法は、この被験体を抗HER2抗体(好ましくはrhUMAb 2C4)で処置する工程をさらに包含する。

【0028】

別の局面では、本発明は、HER2を結合する抗体を含む容器、およびこの抗体を腫瘍に罹患している患者に投与するための指示書を含む製造品を提供する。好ましくは、この腫瘍は、HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーを含むと決定されている。

【0029】

1つの実施形態では、この容器は、HER2を含むErbbヘテロダイマーのリガンド活性化をブロックする抗体を含む。別の実施形態では、この容器は、モノクローナル抗体2C4(より好ましくはrhUMAb 2CA)を含む。

【0030】

さらなる局面では、本発明は、HER2を結合する抗体の治療有効量を患者に投与する工程を包含する、患者を処置する方法を提供する。好ましくは、この患者は、HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーを含むと決定されている腫瘍に罹患している。

【0031】

1つの実施形態では、この抗体は、HER2を含むErbbヘテロダイマーのリガンド活性化をブロックする。別の実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体2C4(より好ましくはrhUMAb 2CA)である。

【0032】

別の局面では、本発明は、HER2を結合する抗体の治療有効量を患者に投与する工程を包含する、患者を処置する方法を提供する。好ましくは、この患者は、リン酸化されたErbbレセプターを有すると決定されている腫瘍に罹患している。

【0033】

1つの実施形態では、このリン酸化されたErbbレセプターは、HER2である。別の実施形態では、この抗体は、HER2を含むErbbヘテロダイマーのリガンド活性化をブロックする。なお別の実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体2C4(より好ましくはrhUMAb 2CA)である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

10

20

30

40

50

本発明は、抗HER2抗体rhuma b 2C4に対する応答性が、腫瘍細胞における、HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーの存在、ならびに/あるいはEr b Bレセプターのリン酸化と相関するという実験的知見に部分的に基づく。従って、腫瘍は、HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーの存在、ならびに/あるいはEr b Bレセプターのリン酸化に基づいて、抗HER2抗体（特に、抗HER2抗体2C4の生物学的活性のうちの1以上を有する抗HER2抗体）を用いる処置に対して応答性であるとして同定され得る。HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマー、ならびに/あるいはEr b Bレセプターのリン酸化は、当該分野で公知の任意の方法によって同定され得る。抗HER2抗体を用いる処置に対して応答性である特定の腫瘍および腫瘍型を同定することにより、このような処置から最も利益を受ける可能性のある患者が同定され得る。さらに、患者は、モノクローナル抗体2C4を用いる治療により利益を受ける可能性がない患者が同定され得る。10

#### 【0035】

##### （定義）

「Er b Bレセプター」は、Er b Bレセプターファミリーに属するレセプタータンパク質チロシンキナーゼであり、そしてこれには、EGFR（Er b B1）レセプター、ERRPレセプター、Er b B2レセプター、Er b B3レセプターおよびEr b B4レセプターならびに将来同定されるであろうこのファミリーの他のメンバーが含まれる。Er b Bレセプターは、一般に細胞外ドメインを含み、これは、Er b Bリガンド；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびいくつかのチロシン残基（これはリン酸化され得る）を保有するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインに結合し得る。Er b Bレセプターは、「ネイティブ配列」のEr b Bレセプターまたはその「アミノ酸配列変体」であり得る。好ましくは、Er b Bレセプターは、ネイティブ配列のヒトEr b Bレセプターである。従って、「Er b Bレセプターファミリーのメンバー」は、EGFR（Er b B1）、Er b B2、Er b B3、Er b B4、または現時点で公知であるか将来同定される任意の他のEr b Bレセプターである。好ましくは、このメンバーは、EGFR（Er b B1）、Er b B2、Er b B3、またはEr b B4である。20

#### 【0036】

用語「Er b B1」、「上皮増殖因子レセプター」、「EGFR」、および「HER1」は、本明細書中で互換可能に使用され、そして例えば、Carpenterら、Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987)に開示されるようなEGFRをいい、これは、天然に存在するその変異体形態（例えば、Humphreyら、PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)におけるような欠失変異体EGFR）を含む。er b B1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子をいう。HER1に対する抗体は、例えば、Murthyら、Arch. Biochem. Biophys. 252:549-560 (1987)およびWO95/25167に記載されている。30

#### 【0037】

用語「ERRP」、「EGFレセプター関連タンパク質」、「EGFR関連タンパク質」、および「上皮増殖因子レセプター関連タンパク質」は、本明細書中で交換可能に使用され、例えば、米国特許第6,399,743号および米国出願公報2003/0096373号に開示されるようなERRPをいう。

#### 【0038】

表現「Er b B2」および「HER2」は、本明細書中で互換可能に使用され、そして例えば、Sembal、PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985)およびYamamotoら、Nature 319:230-234 (1986)に記載され40

るヒトHER2タンパク質(Gene bank登録番号X03363)をいう。用語「erbB2」は、ヒトerbB2をコードする遺伝子をいい、そして「neu」は、ラットp185neuをコードする遺伝子をいう。好ましいerbB2は、ネイティブ配列のヒトerbB2である。

【0039】

「erbB3」および「HER3」は、例えば、米国特許第5,183,844号および同第5,480,968号ならびにKraussら、PNAS(USA)86:9193-9197(1989)に開示されるようなレセプターポリペプチドをいう。erbB3に対する抗体は、当該分野で公知であり、例えば、米国特許第5,183,884号、同第5,480,968号、およびWO97/35885に記載されている。

10

【0040】

本明細書中の用語「erbB4」および「HER4」は、例えば、欧州特許出願第599,274号；Plowmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750(1993)；およびPlowmanら、Nature, 366:473-475(1993)に開示されるようなレセプターポリペプチドをいい、これは、例えば、WO99/19488(1999年4月22日公開)に開示されるようなそのアイソフォームを含む。HER4に対する抗体は、例えば、WO02/18444に記載されている。

【0041】

erbBレセプターに対する抗体は、多くの販売元(例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USAが挙げられる)から市販されている。

20

【0042】

「erbBリガンド」は、erbBレセプターに結合し、そして/またはerbBレセプターを活性化するポリペプチドを意味する。erbBリガンドは、以下のようなネイティブ配列ヒトerbBリガンドである：上皮増殖因子(EGF)(Savageら、J. Biol. Chem., 247:7612-7621(1972))；トランスホーミング増殖因子(TGF-)(Marquardtら、Science 223:1079-1082(1984))；シュワン細胞腫またはケラチノサイトオートクライン増殖因子としても公知であるアンフィレグリン(Shoyabら、Science 243:1074-1076(1989)；Kimuraら、Nature, 348:257-260(1990)；およびCookら、Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557(1991))；セルリン(Shingら、Science, 259:1604-1607(1993))；およびSasadaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173(1993))；ヘパリン結合上皮増殖因子(HB-EGF)(Higashiyamaら、Science, 251:936-939(1991))；エピレグリン(Toyodaら、J. Biol. Chem. 270:7495-7500(1995))；およびKomurasakiら、Oncogene 15:2841-2848(1997))；ヒレグリン(以下を参照のこと)；ニューレグリン-2(NRG-2)(Carrawayら、Nature, 387:512-516(1997))；ニューレグリン-3(NRG-3)(Zhangら、Proc. Natl. Acad. Sci., 94:9562-9567(1997))；ニューレグリン-4(NRG-4)(Harariら、Oncogene, 18:2681-2689(1999))；またはクリプト(crypto)(CR-1)(Kannanら、J. Biol. Chem. 272(6)3330-3335(1997))。EGFRと結合するerbBリガンドとしては、EGF、TGF-、アンフィレグリン、セルリン、HB-EGFおよびエピレグリンが挙げられる。erbB3と結合するerbBリガンドとしては、ヒレグリンが挙げられる。erbB4と結合し得るerbBリガンドとしては、セルリン、エピレグリン、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4およびヒレグリンが挙げられる。erbBリガンドはまた、合成erbBリガンドであり得る。こ

30

40

50

の合成リガンドは、特定の ErbB レセプターに特異的であり得るか、または特定の ErbB レセプター複合体を認識し得る。合成リガンドの例は、合成ヒレグリン / e g f キメラバイレグリン（例えば、Jonesら、FEBS Letters, 447: 227-231 (1999) を参照のこと；この文献を参考として援用する）である。

#### 【0043】

本明細書中で使用する場合、「ヒレグリン」(HRG)は、米国特許第5,641,869号またはMarchionniら、Nature, 362: 312-318 (1993)において開示されるようなヒレグリン遺伝子産物によりコードされるポリペプチドをいう。ヒレグリンの例としては、以下が挙げられる：ヒレグリン-、ヒレグリン-1、ヒレグリン-2およびヒレグリン-3 (Holmesら、Science, 256: 1205-1210 (1992)；および米国特許第5,641,869号)；neu分化因子(NDF) (Pelešら、Cell, 69: 205-216 (1992))；アセチルコリンレセプター誘導活性(ARIA) (Fallisら、Cell, 72: 801-815 (1993))；グリア増殖因子(GGF) (Marchionniら、Nature, 362: 312-318 (1993))；感覚および運動ニューロン由来因子(sensory and motor neuron derived factor) (SMDF) (Hoら、J. Biol. Chem. 270: 14523-14532 (1995))；-ヒレグリン (Schaeferら、Oncogene, 15: 1385-1394 (1997))。この用語は、そのEGF様ドメインフラグメント（例えば、HRG 1117-224）のような、ネイティブ配列のHRGポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントおよび/またはアミノ酸配列改変体を含む。

#### 【0044】

本明細書中の「ErbBヘテロオリゴマー」は、少なくとも2つの異なるErbBレセプターを含む非共有結合したオリゴマーをいう。「ErbBダイマー」は、2つの異なるErbBレセプターを含む、非共有結合により会合したオリゴマーである。このような複合体は、2つ以上のErbBレセプターを発現する細胞がErbBリガンドに曝される場合に形成し得る。ErbBオリゴマー（例えば、ErbBダイマー）は、例えば、Sliwkowskiら、J. Biol. Chem., 269 (20): 14661-14665 (1994)に記載されるように、免疫沈降により単離され得、そしてSDS-PAGEにより分析され得る。このようなErbBヘテロオリゴマーの例としては、EGFR-ErbB2 (HER1/HER2とも称される)、ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3)、およびErbB3-ErbB4 (HER3/HER4)の複合体が挙げられる。さらに、ErbBヘテロオリゴマーは、異なるErbBレセプター（例えば、ErbB3、ErbB4またはEGFR (ErbB1)）と組み合わされた2つ以上のErbB2レセプターを含み得る。サイトカインレセプターサブユニットのような他のタンパク質（例えば、gp130）がヘテロオリゴマーに含まれ得る。

#### 【0045】

「ErbBレセプターのリガンド活性化」は、目的のErbBレセプターを含むErbBヘテロオリゴマーへのErbBリガンドの結合により媒介されるシグナル伝達（例えば、ErbBレセプターまたは基質ポリペプチド中のチロシン残基をリン酸化するErbBレセプターの細胞内キナーゼドメインにより引き起こされるシグナル伝達）を意味する。一般に、これは、ヘテロオリゴマー中の1つ以上のErbBレセプターのキナーゼドメインを活性化し、そしてこれにより1つ以上のErbBレセプター中のチロシン残基のリン酸化および/またはさらなる基質ポリペプチド中のチロシン残基のリン酸化を生じる、ErbBリガンドのErbBヘテロオリゴマーへの結合を含む。ErbBレセプターの活性化は、種々のチロシンリン酸化アッセイを使用して定量され得る。

#### 【0046】

「ネイティブ配列」ポリペプチドは、天然に由来するポリペプチド（例えば、ErbBレセプターまたはErbBリガンド）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドである。このようなネイティブ配列ポリペプチドは、天然から単離され得るかまたは組換え手段も

しくは合成手段により生成され得る。従って、ネイティブ配列ポリペプチドは、天然に存在するヒトポリペプチド、マウスポリペプチドまたは任意の他の哺乳動物種由来のポリペプチドのアミノ酸配列を有し得る。

【0047】

用語「アミノ酸配列改变体」は、ネイティブ配列ポリペプチドとある程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。通常は、アミノ酸配列改变体は、ネイティブE<sub>r</sub>b<sub>B</sub>リガンドの少なくとも1つのレセプター結合ドメインまたはネイティブE<sub>r</sub>b<sub>B</sub>レセプターの少なくとも1つのリガンド結合ドメインと少なくとも約70%の相同性を有し、そして好ましくは、これらは、このようなレセプターまたはリガンド結合ドメインと少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%相同である。アミノ酸配列改变体は、ネイティブアミノ酸配列のアミノ酸配列内の特定の部分において、置換、欠失および/または挿入を有する。

【0048】

「相同性」は、相同性の最大パーセントを達成するために配列を整列させそしてギャップを導入した後に同一である、アミノ酸配列改变体中の残基の百分率として定義される。この整列化のための方法およびコンピュータープログラムは、当該分野で周知である。1つのこのようなコンピュータープログラムは、Genentech, Inc. により著された「Align 2」であり、これは、United States Copyright Office, Washington, DC 20559にユーザー説明書と共に提出された(1991年12月10日)。

【0049】

本明細書中の用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、そして特に、インタクトなモノクローナル抗体、インタクトなポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)およびインタクトな抗体フラグメント(これらのフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り)を包含する。

【0050】

本明細書中で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団(すなわち、その集団を含む個々の抗体は、少量で存在し得る、天然に存在する可能性のある変異を除いて同一である)から得られる抗体をいう。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対する。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、これらが抗原上の単一の決定基に対する。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体が混入せずに合成され得る点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体の集団から得られるという抗体の特徴を示し、そして任意の特定の方法によるこの抗体の產生を必要とするとは解釈されない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256: 495(1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製され得るか、または組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)により作製され得る。「モノクローナル抗体」はまた、例えばClacksonら、Nature, 352: 624-628(1991)およびMarksら、J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)に記載される技術を使用して、ファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

【0051】

本明細書中のモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体ならびにそのような抗体のフラグメント(これらが、所望の生物学的活性を示す限り)を含み、ここでは、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスも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であるかまたは相同であり、一方、その鎖の残りが、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスも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であるかまたは相同である(米国特許第4,816,567号およびMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851

10

20

30

40

50

- 6855 (1984)。本明細書中の目的のキメラ抗体は、非ヒト靈長類（例えば、Old World Monkey、Apeなど）由来の可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常領域配列を含む「靈長類化（primatized）」抗体を含む。

【0052】

「抗体フラグメント」は、好ましくは抗原結合領域またはその可変領域を含む、インタクトな抗体の一部を含む。抗体フラグメントの例としては、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、およびFvフラグメント；ダイアボディ（diabody）；直鎖状抗体；単鎖抗体分子；なら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挙げられる。

【0053】

「インタクトな」抗体は、抗原結合可変領域ならびに軽鎖定常ドメイン（CL）および重鎖定常ドメイン（CH1、CH2およびCH3）を含む抗体である。定常ドメインは、ネイティブ配列定常ドメイン（例えば、ヒトネイティブ配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列改変体であり得る。好ましくは、インタクトな抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有する。

【0054】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（ネイティブ配列Fc領域またはFc領域のアミノ酸配列改変体）に起因しうる抗体の生物学的活性をいう。抗体のエフェクター機能の例としては、C1q結合；補体依存性細胞傷害性；Fcレセプター結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）；食作用；細胞表面レセプター（例えば、B細胞レセプター；BCR）の下方制御などが挙げられる。

【0055】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、インタクトな抗体は、異なる「クラス」に分類され得る。5つの主なクラスのインタクトな抗体（IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM）が存在し、そしてそれらのいくつかは、さらに「サブクラス」（アイソタイプ）（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgA2）に分類され得る。それらの異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、各々、γ、α、ε、δ、およびμと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造および三次元立体配置は、周知である。

【0056】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「ADCC」は、Fcレセプター（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が、標的細胞上の結合抗体を認識しそして引き続きその標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介性反応をいう。ADCCの媒介についての主要な細胞であるNK細胞は、FcRⅠⅠⅠのみを発現するが、単球は、FcRⅠ、FcRⅠⅠおよびFcRⅠⅠⅠを発現する。造血細胞上のFcR発現は、RavetchおよびKinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991)の464頁の表3に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号および同第5,821,337号に記載されるようなインビトロADCCアッセイが実施され得る。このようなアッセイのための有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。あるいは、またはさらに、目的の分子のADCC活性は、インビボ（例えば、Clynesら、PNAS(USA), 95: 652-656 (1998)において開示されるような動物モデルにおいて）で評価され得る。

「ヒトエフェクター細胞」は、1つ以上のFcRを発現しそしてエフェクター機能を果たす白血球である。好ましくは、この細胞は、少なくともFcRⅠⅠⅠを発現し、そしてADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられ；PBMCおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、そのネイティブな供給源から（例えば、本明細書中に記載されるように血液またはPBMCか

10

20

30

40

50

ら) 単離され得る。

【0057】

用語「F c レセプター」または「F c R」は、抗体のF c 領域に結合するレセプターを記載するために使用される。好ましいF c Rは、ネイティブ配列ヒトF c Rである。さらに、好ましいF c Rは、Ig G抗体(レセプター)を結合するF c Rであり、そしてこれらとしては、F c R I 、F c R I I およびF c R I I I サブクラスのレセプター(これらのレセプターの対立遺伝子改変体および選択的スプライシングされた形態を含む)が挙げられる。F c R I I レセプターとしては、F c R I I A(「活性化レセプター」)およびF c R I I B(「阻害レセプター」)が挙げられ、これらは、そのレセプターの細胞質ドメイン中で主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化レセプター(F c R I I A)は、その細胞質ドメイン中に免疫レセプターチロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害レセプター(F c R I I B)は、その細胞質ドメイン中に免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を含む。(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15: 203-234 (1997) 中の総説M.を参照のこと)。F c Rは、RavetchおよびKinet, Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991); Capelら、Immunomethods 4: 25-34 (1994); ならびにde Haasら、J. Lab. Clin. Med., 126: 330-41 (1995) に概説される。他のF c R(将来同定されるF c Rを含む)が、本明細書中の用語「F c R」により包含される。この用語はまた、胎児への母性Ig Gの移行を担う新生児レセプター(F c Rn)を含む(Guyerら、J. Immunol., 117: 587 (1976) およびKimら、J. Immunol., 24: 249 (1994))。

【0058】

「補体依存性細胞傷害性」または「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解する分子の能力をいう。補体活性化経路は、同族抗原と複合体化された分子(例えば、抗体)への、補体系の第1の成分(C1q)の結合により開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods, 202: 163 (1996) に記載されるようなCDCアッセイが行われ得る。

【0059】

「ネイティブ抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖および2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有ジスルフィド結合により重鎖に連結されるが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変化する。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔の空いた鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、一方の末端において、可変ドメイン(VH)とそれに続く多くの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端において可変ドメイン(VL)を、そしてそのもう一方の末端において定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと共に整列され、そして軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の境界を形成すると考えられる。

【0060】

用語「可変」とは、可変ドメインの特定の部分が、抗体間で広範にわたって配列が異なり、そして各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性において使用されるという事実をいう。しかし、可変性は、抗体の可変ドメインの全体にわたり均等には分布しない。可変性は、軽鎖および重鎖の可変ドメインの両方における超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中する。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。各々のネイティブ重鎖および軽鎖の可変ドメインは、4つのFRを含み、それらのFRは、大部分がシート構造をとり、3つの超可変領域に連結され、これらの超可変領域は、シート構造に連結するループを形成し、そして場合によっては、このシート構造の一部を形成する。各鎖中の超可変領域は、FRによって互いに近位に保持され、そして、他の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成

10

20

20

30

40

50

に寄与する。(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能(例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)における抗体の関与)を示す。

#### 【0061】

本明細書中で使用される場合、用語「超可変領域」は、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24-34(L1)、残基50-56(L2)および残基89-97(L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の残基31-35(H1)、残基50-65(H2)および残基95-102(H3); Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))ならびに/または「超可変ループ」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26-32(L1)、残基50-52(L2)および残基91-96(L3)ならびに重鎖可変ドメイン中の残基26-32(H1)、残基53-55(H2)および残基96-101(H3); ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987))を含む。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書中で規定するように、超可変領域の残基以外の可変ドメインの残基である。

#### 【0062】

抗体のパパイン消化は、「Fab」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメント(各々、単一の抗原結合部位を有する)および残りの「Fc」フラグメント(この名前は、その容易に結晶化する能力を反映する)を生成する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有するF(ab')2のフラグメントを生じ、そしてこれは、依然として抗原を架橋し得る。

#### 【0063】

「Fv」は、完全な抗原認識部位および抗原結合部位を含む、最小の抗体フラグメントである。この領域は、密接に非共有結合した、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この立体配置において、各可変ドメインの3つの超可変領域は、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を規定するために相互作用する。集団的に、この6つの可変領域は、抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、1つの可変ドメイン(または抗原に対して特異的な3つの超可変領域のみを含むFvの半分)でさえも、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識および結合する能力を有する。

#### 【0064】

Fabフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1定常ドメイン(CH1)を含む。Fab'フラグメントは、抗体のヒンジ領域に由来する1つ以上のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端における数残基の付加により、Fab'フラグメントとは異なる。Fab'-SHは、その定常ドメインのシステイン残基が、少なくとも1つの遊離チオール基を有するFab'についての本明細書中の名称である。F(ab')2抗体フラグメントは、本来、その間にヒンジシステインを有するFab'フラグメントの対として生成された。抗体フラグメントの他の化学結合もまた公知である。

#### 【0065】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明確に区別される型(カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる)のうちの1つに割り当てられ得る。

#### 【0066】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体フラグメントは、抗体のVHおよびVLドメインを含み、ここでこれらのドメインは、一本のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、

この Fv ポリペプチドは、この scFv が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする、 VH ドメインと VL ドメインとの間のポリペプチドリンクーをさらに含む。 scFv の総説については、 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies , 第 113巻 , Rosenburg および Moore 編 , Springer - Verlag , New York , 269 - 315 頁 ( 1994 ) 中の Plueckthun を参照のこと。抗 ErbB2 抗体 scFv フラグメントは、 WO 93/16185 ; 米国特許第 5,571,894 号 ; および米国特許第 5,587,458 号に記載される。

#### 【 0067 】

用語「ダイアボディ」は、 2 つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントをいい 10 、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖 ( VH - VL ) 中に可変鎖ドメイン ( VL ) に連結されている可変重鎖ドメイン ( VH ) を含む。同じ鎖上のこの 2 つのドメイン間で対形成させるには短すぎるリンクーを使用して、これらのドメインを別の鎖の相補ドメインと対形成させ、そして 2 つの抗原結合部位を作製する。ダイアボディは、例えば、 EP 404,097 ; WO 93/11161 ; および Hollinger ら、 Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 90 : 6444 - 6448 ( 1993 ) に、より完全に記載される。

#### 【 0068 】

非ヒト ( 例えば、げっ歯類 ) 抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。たいていは、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種 ( 例えば、マウス、ラット、ウサギまたは非ヒトげっ歯類 ) ( ドナー抗体 ) の超可変領域由来の残基により置換されているヒト免疫グロブリン ( レシピエント抗体 ) である。ある場合では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域 ( FR ) の残基は、対応する非ヒト残基により置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にもドナー抗体中にも見出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに改良するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも 1 つ、そして代表的には 2 つの可変ドメインの実質的に全てを含み、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応する全て、または実質的に全ての超可変ループおよび FR の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、必要に応じて免疫グロブリン定常領域 ( Fc ) 、代表的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細については、 Jones ら、 Nature , 321 : 522 - 525 ( 1986 ) ; Riechmann ら、 Nature , 332 : 323 - 329 ( 1988 ) ; および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. , 2 : 593 - 596 ( 1992 ) を参照のこと。 20 30

#### 【 0069 】

ヒト化抗 ErbB2 抗体としては、米国特許第 5,821,337 号 ( 本明細書中に参考として明確に援用される ) の表 3 に記載されるような、 huMAb4D5-1 、 huMAb4D5-2 、 huMAb4D5-3 、 huMAb4D5-4 、 huMAb4D5-5 、 huMAb4D5-6 、 huMAb4D5-7 および huMAb4D5-8 ( HERC EPTIN ( 登録商標 ) ) ; 本明細書以下に記載されるような、ヒト化 520C9 ( WO 93/21319 ) およびヒト化 2C4 抗体が挙げられる。 40

#### 【 0070 】

「単離された」抗体は、その天然の環境の成分から同定されそして分離および / または回収された抗体である。その天然の環境の混入物成分は、その抗体についての診断的用途または治療的用途を干渉する物質であり、そしてこれらとしては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様の溶質または非タンパク質様の溶質が挙げられ得る。好ましい実施形態において、抗体は、 ( 1 ) ローリー法によって測定した場合に、 95 重量 % を超える抗体にまで、そして最も好ましくは、 99 重量 % を超えるまでに精製されるか、 ( 2 ) スピニングカップ ( spinning cup ) 配列決定装置の使用により、少なくとも 15 残基の N 末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列を得るに十分な程度に精製されるか、 50

または(3)クーマシーブルーカラーや好ましくは銀染色を使用する、還元条件下または非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一なまでに精製される。単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチューでのその抗体を含む。なぜなら、その抗体の天然環境の少なくとも1つの成分は存在していないからである。しかし、通常には、単離された抗体は、少なくとも1回の精製工程によって調製される。

【0071】

目的の抗原(例えば、Erbb2抗原)を「結合する」抗体は、その抗体が、その抗原を発現する細胞を標的化する際に有用であるような十分な親和性で、その抗原を結合し得る抗体である。抗体が、Erbb2を結合する抗体である場合、この抗体は、通常、他のErbbレセプターとは対照的に、Erbb2を優先的に結合し、そしてEGFR、Erbb3またはErbb4のような他のタンパク質と有意に交差反応しない抗体であり得る。このような実施形態において、この抗体がこれらの非Erbb2タンパク質へ結合(例えば、内因性レセプターへの細胞表面結合)する程度は、蛍光標示式細胞分取(FACS)分析または放射免疫沈降(RIA)によって測定した場合に、10%未満である。時には、この抗Erbb2抗体は、ラットneuタンパク質(例えば、Schechterら、Nature, 312:513(1984)およびDrebinら、Nature 312:545-548(1984)に記載のような)と有意に交差反応しない。

10

【0072】

Erbbレセプターのリガンド活性化を「ブロックする」抗体は、本明細書中上記で定義されたような活性化を減少するかまたは妨げる抗体であり、ここで、この抗体は、モノクローナル抗体4D5よりも実質的により効果的に(例えば、モノクローナル抗体7F3または2C4あるいはそれらのFabフラグメントとほぼ同じぐらい効果的に、そして好ましくは、モノクローナル抗体2C4またはそのFabフラグメントとほぼ同じくらい効果的に)Erbbレセプターのリガンド活性化をブロックし得る。例えば、Erbbレセプターのリガンド活性化をブロックする抗体は、Erbbヘテロオリゴマーの形成のブロックにおいて、4D5よりも約50%~100%より効果的である抗体であり得る。Erbbレセプターのリガンド活性化のブロックは、任意の手段、例えば、以下を干渉することによって生じ得る: Erbbレセプターへのリガンド結合、Erbb複合体形成、Erbb複合体におけるErbbレセプターのチロシンキナーゼ活性および/あるいはErbbレセプター中のまたはErbbレセプターによるチロシンキナーゼ残基のリン酸化。Erbbレセプターのリガンド活性化をブロックする抗体の例としては、モノクローナル抗体2C4および7F3(これらは、Erbb2/Erbb3ヘテロオリゴマーおよびErbb2/Erbb4ヘテロオリゴマーのHRG活性化; EGFR/Erbb2ヘテロオリゴマーのEGF活性化、TGF-活性化、アンフィレグリン活性化、HB-EGF活性化および/またはエピレグリン活性化をブロックする); ならびにL26抗体、L96抗体およびL288抗体(Klapperら、Oncogene, 14:2099-2109(1997))(これらは、EGFR、Erbb2、Erbb3およびErbb4を発現するT47D細胞へのEGF結合およびNDF結合をブロックする)が挙げられる。

20

【0073】

示された抗体(例えば、この示されたモノクローナル抗体2C4)の「生物学的特性」を有する抗体は、同じ抗原(例えば、Erbb2)に結合する他の抗体とその抗体とを区別する、この示された抗体の1以上の生物学的特性を保持する抗体である。例えば、2C4の生物学的特性を有する抗体は、Erbb2およびErbb3、Erbb1またはErbb4を含むErbbヘテロオリゴマーのHRG活性化をブロックし得るか; EGFRおよびErbb2を含むErbbレセプターのEGF活性化、TGF-活性化、HB-EGF活性化、エピレグリン活性化および/もしくはアンフィレグリン活性化をブロックし得るか; MAPKのEGF、TGF-および/もしくはHRG媒介活性化をブロックし得るか; そして/または2C4によって結合されるエピトープ(例えば、モノクローナル抗体2C4のErbb2への結合をブロックする)と同じ、Erbb2の細胞外ドメイン中のエピトープを結合し得る。

30

40

50

## 【0074】

他に示されない限り、表現「モノクローナル抗体2C4」とは、以下の実施例のマウス2C4抗体の、またはそれに由来する、抗原結合残基を有する抗体をいう。例えば、モノクローナル抗体2C4は、マウスモノクローナル抗体2C4またはその改変体（例えば、ヒト化抗体2C4）であり得、その改変体は、マウスモノクローナル抗体2C4の抗原結合アミノ酸残基を保持する。ヒト化2C4抗体の例は、本明細書中およびWO01/00245（本明細書中でこの全体が参考として援用される）において提供される。他に示されない限り、本明細書中で使用される場合、表現「rhuma b2C4」は、ヒト軽鎖および重鎖IgG1（非Aアロタイプ）定常領域配列と融合された、それぞれ配列番号3および配列番号4の可変軽鎖（V<sub>L</sub>）配列および可変重鎖（V<sub>H</sub>）配列を含む抗体をいい、これは、必要に応じて、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞によって発現される。

10

## 【0075】

他に示されない限り、用語「モノクローナル抗体4D5」とは、マウス4D5抗体（ATCC CRL 10463）の、またはそれに由来する、抗原結合残基を有する抗体をいう。例えば、モノクローナル抗体4D5は、マウスモノクローナル抗体4D5またはその改変体（例えば、ヒト化4D5）であり得、その改変体は、マウスモノクローナル抗体4D5の抗原結合残基を保持する。例示的なヒト化4D5抗体としては、米国特許第5,821,337号に記載のような、huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7およびhuMAb4D5-8（HERCEPTIN（登録商標））が挙げられ、huMAb4D5-8（HERCEPTIN（登録商標））が好ましいヒト化4D5抗体である。

20

## 【0076】

本明細書中で使用される場合、「増殖阻害薬剤」とは、インビトロまたはインビボで、細胞（特に、Erbb発現癌細胞）の増殖を阻害する化合物または組成物をいう。従って、増殖阻害薬剤は、S期にあるErbb発現細胞の割合を有意に減少させる薬剤であり得る。増殖阻害薬剤の例としては、（S期以外で）細胞周期進行をブロックする薬剤（例えば、G1阻止およびM期阻止を誘導する薬剤）が挙げられる。古典的なM期ブロッカーとしては、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンプラスチン）、タキサン、およびトポI/Iインヒビター（例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシドおよびブレオマイシン）が挙げられる。G1を阻止する薬剤はまた、S期阻止をももたらし、例えば、DNAアルキル化剤（例えば、タモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキサート、5-フルオロウラシルおよびara-C）が挙げられる。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer、MendelsohnおよびIsrael編、第1章、Murakamiらによる表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」（WB Saunders: Philadelphia, 1995）（特に、13頁）に見出され得る。

30

## 【0077】

「増殖阻害」抗体の例は、Erbb2に結合する抗体およびErbb2を過剰発現する癌細胞の増殖を阻害する抗体である。好ましい増殖阻害抗Erbb2抗体は、細胞培養物中のSK-BR-3乳癌細胞の増殖を、約0.5～30μg/mlの抗体濃度で、20%よりも高く、好ましくは、50%よりも高く（例えば、約50%～約100%）阻害する。ここでは、この増殖阻害を、SK-BR-3細胞の抗体への曝露後6日で測定する（米国特許第5,677,171号（1997年10月14日発行）を参照のこと）。このSK-BR-3細胞増殖阻害アッセイは、この特許および本明細書以下により詳細に記載される。好ましい増殖阻害抗体は、モノクローナル抗体4D5（例えば、ヒト化4D5）である。

40

## 【0078】

50

「細胞死を誘導する」抗体は、生存細胞を生育不能にさせる抗体である。この細胞は、一般に、ErbB2レセプターを発現する細胞であり、特に、この細胞は、ErbB2レセプターを過剰発現する。好ましくは、細胞は、癌細胞（例えば、乳癌細胞、卵巣癌細胞、胃癌細胞、子宮内膜癌細胞、唾液腺癌細胞、肺癌細胞、腎臓癌細胞、結腸癌細胞、甲状腺癌細胞、膵臓癌細胞または膀胱癌細胞）である。インビトロでは、細胞は、SK-BR-3細胞、BT474細胞、Calu3細胞、MDA-MB-453細胞、MDA-MB-361細胞またはSKOV3細胞であり得る。インビトロでの細胞死は、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ADCC）または補体依存性細胞傷害性（CDC）によって誘導される細胞死を区別するために、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で決定され得る。従って、細胞死についてのアッセイは、熱不活化血清を使用して（すなわち、補体の非存在下で）かつ免疫エフェクター細胞の非存在下で行われ得る。抗体が細胞死を誘導し得るか否かを決定するために、膜の完全性の損失（ヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンブルー（Mooreら、Cytotechnology 17:1-11 (1995) を参照のこと）または7AADの取り込みによって評価されるよう）が、非処理細胞と比較して評価され得る。好ましい細胞死誘導抗体は、BT474細胞におけるPI取り込みアッセイにおいて、PI取り込みを誘導する抗体である（以下を参照のこと）。

#### 【0079】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、以下によって決定されるような、プログラムされた細胞死を誘導する抗体である：アネキシンVの結合、DNAのフラグメント化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞のフラグメント化および/または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成。この細胞は、通常、ErbB2レセプターを過剰発現する細胞である。好ましくは、この細胞は、腫瘍細胞（例えば、乳房腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、子宮内膜腫瘍細胞、唾液腺腫瘍細胞、肺腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、結腸腫瘍細胞、甲状腺腫瘍細胞、膵臓腫瘍細胞または膀胱腫瘍細胞）である。インビトロでは、細胞は、SK-BR-3細胞、BT474細胞、Calu3細胞、MDA-MB-453細胞、MDA-MB-361細胞またはSKOV3細胞であり得る。種々の方法が、アポトーシスに関連する細胞事象を評価するために利用可能である。例えば、ホスファチジルセリン（PS）トランスロケーションが、アネキシン結合によって測定され得；DNAのフラグメント化が、DNAのラダー形成によって評価され得；そしてDNAのフラグメント化に伴う核/クロマチンの圧縮が、低二倍体細胞の任意の増加によって評価され得る。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、BT474細胞を使用するアネキシン結合アッセイにおいて、非処理細胞と比較して、約2~50倍、好ましくは、約5~50倍、そして最も好ましくは、約10~50倍のアネキシン結合の誘導を生じる抗体である（以下を参照のこと）。時には、このプロアポトーシス抗体は、ErbB2レセプターのErbBリガンド活性化をさらにブロックする抗体（例えば、7F3抗体）であり；すなわち、この抗体は、モノクローナル抗体2C4と生物学的特性を共有する。別の状況において、この抗体は、ErbB2レセプターのErbBリガンド活性化を有意にブロックしない抗体（例えば、7C2）である。さらに、この抗体は、アポトーシスの誘導の間に、S期にある細胞の割合の大きな減少を誘導しない、7C2のような抗体（例えば、コントロールと比較して、これらの細胞の割合の約0~10%の減少のみを誘導する抗体）であり得る。

#### 【0080】

「エピトープ2C4」は、抗体2C4が結合するErbB2の細胞外ドメイン中の領域である。2C4エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、慣用的な交差ブロック（cross-blocking）アッセイ（例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, HarlowおよびDavid Lane編（1988）に記載されるアッセイ）を行い得る。あるいは、エピトープマッピングを行って、抗体がErbB2の2C4エピトープ（例えば、ErbB2のおよそ残基22~およそ残基584の領域（残基22および残基584を含む）における任意の1以上の残基；図1A~Bを参照のこと）に結合するか否かを評価し得る。

10

20

30

40

50

## 【0081】

「エピトープ4D5」は、抗体4D5 (ATCC CRL 10463) が結合するEr b B 2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、Er b B 2の膜貫通ドメインに近接する。4D5エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、慣用的な交差ブロックアッセイ（例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, HarlowおよびDavid Lane編(1988)に記載されるアッセイ）を行い得る。あるいは、エピトープマッピングを行って、抗体がEr b B 2の4D5エピトープ（例えば、包括的には、およそ残基529～およそ残基625の領域（残基529および残基625を含む）における任意の1以上の残基；図1A～Bを参照のこと）に結合するか否かを評価し得る。10

## 【0082】

「エピトープ3H4」は、抗体3H4が結合するEr b B 2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、Er b B 2細胞外ドメインのアミノ酸配列中のおよそ残基541～およそ残基599における残基（残基541および残基599を含む）を含む；図1A～Bを参照のこと。

## 【0083】

「エピトープ7C2/7F3」は、7C2抗体および/または7F3抗体（各々、ATCCに寄託されている。以下を参照のこと）が結合するEr b B 2の細胞外ドメインのN末端の領域である。7C2/7F3エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、慣用的な交差ブロックアッセイ（例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, HarlowおよびDavid Lane編(1988)に記載されるアッセイ）を行い得る。あるいは、エピトープマッピングを行って、抗体がEr b B 2上の7C2/7F3エピトープ（例えば、Er b B 2のおよそ残基22～およそ残基53の領域における任意の1以上の残基；図1A～Bを参照のこと）に結合するか否かを確認し得る。20

## 【0084】

処置の目的のための「哺乳動物」とは、哺乳動物（ヒト、家庭内動物および家畜動物、動物園の動物、スポーツ用動物またはペット動物（例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）を含む）として分類される任意の動物をいう。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。30

## 【0085】

「処置に応答性である」腫瘍は、認可動物モデルまたはヒト臨床試験において、未処置または偽薬処置と比較して、抗Er b B抗体処置に対する反応において統計的に有意な改善を示す腫瘍か、または抗Er b B抗体での初期処置に反応するが、処置が続くに従つて増殖する腫瘍である。

## 【0086】

「処置する(treat)」または「処置(treatment)」とは、治療的処置および予防的(prophylactic)または予防的(preventative)手段の両方をいい、ここで目的は、所望しない生理的変化または障害（例えば、癌の進行または拡散）を予防または減速（軽減）することである。本発明の目的のために、有利な臨床結果または所望の臨床結果としては、検出可能または検出不可能な、症状の軽減、疾患の程度の減少、疾患の安定化した（すなわち悪化しないこと）状態、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の緩和または回復、および寛解（部分的または全体的のいずれか）が挙げられるが、これらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けない場合に予測される生存より生存を延長することを意味し得る。処置を必要とする者としては、既に状態もしくは疾患を有する者、ならびに状態もしくは疾患を有しやすい者、または状態もしくは疾患が予防されるべき者が、挙げられる。40

## 【0087】

「障害」は、本発明の処置から利益を得る任意の状態である。これは、慢性的および急性の障害または疾患を含み、これらとしては、哺乳動物が問題の障害を罹患しやすい病理50

学的状態が挙げられる。本明細書中で処置されるべき障害の非限定の例としては、良性または悪性の腫瘍；白血病およびリンパ悪性疾患、特に、乳癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、肺癌、腎臓癌、結腸癌、甲状腺癌、肺臓癌、前立腺癌または膀胱癌；ニューロン障害、神経膠障害、星状細胞癌、視床下部性障害および他の腺の障害、マクロファージ障害、上皮性障害、間質性障害および胞腔障害；ならびに炎症性障害、脈管形成障害および免疫性障害が挙げられる。本発明に従って処置されるべき好ましい障害は、悪性腫瘍である。

#### 【 0 0 8 8 】

用語「治療的有効量」とは、哺乳動物における疾患または障害を処置するために有効な薬物の量をいう。癌の場合において、この薬物の治療的有効量は、癌細胞の数を減少し得るか；腫瘍サイズを減少し得るか；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害し得る（すなわち、ある程度緩やかにし得、そして好ましくは、停止させ得る）か；腫瘍転移を阻害し得る（すなわち、ある程度緩やかにし得、そして好ましくは、停止させ得る）か；腫瘍増殖をある程度阻害し得るか；そして／または癌に関連する1以上の症状をある程度軽減し得る。薬物が増殖を妨げ得るかそして／または既存の癌細胞を殺傷し得る程度まで、薬物は、細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であり得る。癌治療については、効力は、例えば、疾患進行に対する時間（TTP）の評価および／または応答速度（RR）の決定によって測定され得る。

#### 【 0 0 8 9 】

用語「癌」および「癌性」とは、調節されない細胞増殖によって代表的に特徴付けられる、哺乳動物の生理学的状態を言及または記載する。「腫瘍」は、1つ以上の癌細胞を含む。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病またはリンパ系悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより特定の例としては、扁平細胞癌（例えば、扁平上皮細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌（「NSCLC」）、肺の腺癌および肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（胃腸癌を含む）、肺臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、ヘパトーム、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺腫、腎臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭頸部癌が挙げられる。

#### 【 0 0 9 0 】

「Erbbを発現する癌」は、その細胞表面に存在するErbbタンパク質を有する細胞を含む癌である。「Erbb2を発現する癌」は、その細胞表面に十分なレベルのErbb2を産生する癌であり、その結果、抗Erbb2抗体が、それに結合し得、そしてこの癌に対する治療効果を有する。

#### 【 0 0 9 1 】

Erbbレセプターの「過剰な活性化によって特徴付けられる」癌は、癌細胞におけるErbbレセプター活性化の程度が、同じ組織型の非癌性細胞におけるErbbレセプターの活性化のレベルを有意に超える癌である。このような過剰な活性化は、Erbbレセプターの過剰発現および／または癌細胞中のErbbレセプターの活性化に利用可能な正常レベルを超えるErbbリガンドから生じ得る。このような過剰な活性化は、癌細胞の悪性疾患状態を引き起こし得るか、そして／またはこの状態から引き起こされ得る。いくつかの実施形態において、この癌を診断アッセイまたは予後アッセイに供し、Erbbレセプターのこのような過剰な活性化を生じるErbbレセプターの増幅および／または過剰発現が生じているか否かを決定する。あるいは、またはさらに、この癌を診断アッセイまたは予後アッセイに供し、そのレセプターの過剰な活性化に寄与するErbbリガンドの増幅および／または過剰発現が、この癌において生じているか否かを決定し得る。このような癌のサブセットにおいて、このレセプターの過剰な活性化は、オートクライイン刺激経路から生じ得る。

#### 【 0 0 9 2 】

「オートクライイン」刺激経路において、Erbbリガンドおよびその同族のErbbレセプターの両方を産生する癌細胞によって、自己刺激が生じる。例えば、この癌は、EG

10

20

30

40

50

F R を発現または過剰発現し得、そしてまた E G F R リガンド（例えば、E G F、T G F - または H B - E G F ）を発現または過剰発現し得る。別の実施形態において、この癌は、E r b B 2 を発現または過剰発現し得、そしてまたヘレグリン（例えば、- H R G ）を発現または過剰発現し得る。

【0093】

E r b B レセプターを「過剰発現する」癌は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、その細胞表面に有意により高いレベルのE r b B レセプター（例えば、E r b B 2 ）を有する癌である。このような過剰発現は、遺伝子増幅によって、あるいは転写または翻訳の増加によって引き起こされ得る。E r b B レセプターの過剰発現は、細胞の表面上に存在するE r b B タンパク質のレベルの増加を評価することによる（例えば、免疫組織化学アッセイ；I H C による）、診断アッセイまたは予後アッセイにおいて決定され得る。あるいは、またはさらに、例えば、以下によって、細胞中のE r b B コード核酸のレベルを測定し得る：蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（F I S H；1998年10月に公開されたW O 9 8 / 4 5 4 7 9 を参照のこと）、サザンプロッティング、またはポリメラーゼ連鎖反応（P C R）技術（例えば、リアルタイム定量P C R（R T - P C R））。E r b B リガンドの過剰発現は、患者（例えば、腫瘍生検）においてリガンド（またはそれをコードする核酸）のレベルを評価することにより診断的に決定され得るか、または種々の診断アッセイ（I H C、F I S H、サザンプロッティング、P C R または上記のインビボアッセイ）によって、決定され得る。また、生物学的流体（例えば、血清）中の流出（s h e d ）抗原（例えば、E r b B 細胞外ドメイン）を測定することによって、E r b B レセプター過剰発現を研究し得る（例えば、米国特許第4,933,294号（1990年6月12日発行）；W O 9 1 / 0 5 2 6 4 （1991年4月18日公開）；米国特許第5,401,638号（1995年3月28日発行）；およびS i a s ら、J . I mm u n o 1 . M e t h o d s , 1 3 2 : 7 3 - 8 0 (1990) を参照のこと）。上記のアッセイとは別に、種々のインビボアッセイが、当業者に利用可能である。例えば、患者の体内の細胞に抗体（必要に応じて、検出可能な標識（例えば、放射性同位体）で標識する）を曝露させ得、そしてこの抗体の患者の細胞への結合を、例えば、放射活性の外部スキャニングによって、またはこの抗体に予め曝露された患者から採取した生検を分析することによって、評価し得る。H E R 2 を過剰発現する腫瘍は、1 細胞につき発現されるH E R 2 分子のコピー数に対応する免疫組織化学的スコアによって評定され、生物化学的に決定され得る：0 = 0 ~ 1 0 , 0 0 0 コピー / 細胞、1 + = 少なくとも約2 0 0 , 0 0 0 コピー / 細胞、2 + = 少なくとも約5 0 0 , 0 0 0 コピー / 細胞、3 + = 少なくとも約2 , 0 0 0 , 0 0 0 コピー / 細胞。チロシンキナーゼのリガンド非依存性活性化に導く3 + レベルのH E R 2 の過剰発現（H u d z i a k ら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 4 : 7 1 5 9 - 7 1 6 3 [1987] ）は、胸腺癌の約3 0 %において生じ、そしてこれらの患者において、再発のない生存率および全体の生存率は低下する（S l a m o n ら, S c i e n c e , 2 4 4 : 7 0 7 - 7 1 2 [1989] ；S a l m o n ら, S c i e n c e , 2 3 5 : 1 7 7 - 1 8 2 [1987] ）。

【0094】

逆に、「E r b B 2 レセプターの過剰発現によって特徴付けられない」癌は、診断アッセイにおいて、同じ組織型の非癌性細胞と比較して、正常レベルよりも高いレベルのE r b B 2 レセプターを発現しない癌である。「ホルモン非依存性」の癌は、その増殖がその癌における細胞によって発現されるレセプターに結合するホルモンの存在に依存しない癌である。このような癌は、腫瘍中または腫瘍近辺のホルモン濃度を減少させる薬理学的または外科的ストラテジーの投与に際して、臨床的退行を生じない。ホルモン非依存性の癌の例としては、アンドロゲン非依存性前立腺癌、エストロゲン非依存性乳癌、子宮内膜癌および卵巣癌が挙げられる。このような癌は、ホルモン依存性腫瘍として始まり得、そして抗ホルモン療法後にホルモン感受性状態からホルモン不応性腫瘍に進行し得る。

【0095】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞傷害性薬剤」とは、細胞の機能を阻害するか

または妨げ、そして／または細胞の破壊を引き起こす物質をいう。この用語は、以下を含むことが意図される：放射性同位体（例えば、 $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$ 、および $\text{Lu}$ の放射性同位体）、化学療法剤、およびトキシン（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子トキシンまたは酵素的に活性なトキシン（そのフラグメントおよび／または改変体を含む）。

### 【0096】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、以下が挙げられる：アルキル化剤（例えば、チオテバおよびシクロホスファミド（cyclic phosphosphamide）（CYTOXANTM）；アルキルスルホネート（例えば、ブスルファン、イムプロスルファンおよびピポスルファン）；アジリジン（例えば、ベンゾデパ（benzodopa）、カルボコン、メツレデパ（meturedopa）およびウレデパ（uredopa））；エチレンイミンおよびメチルメラミン（methylmelamine）（アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド（triethylenethiophosphamide）およびトリメチロールメラミン（trimethylololomelamine）を含む）；ナイトロジエンマスター（例えば、クロラムブシリ、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンビシン（novembichin）、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスター）；ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン）；抗生物質（例えば、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリチエアマイシン（calicheamicin）、カラビシン（carabacin）、カラミノマイシン（carminomycin）、カルチノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン（marcellomycin）、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン（queelamycin）、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン）；代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU））；葉酸アナログ（例えば、デノブテリン、メトトレキサート、ブロブテリン、トリメトレキサート）；ブリンアナログ（例えば、フルダラビン、6-メルカブトブリン、チアミブリン、チオグアニン）；ピリミジンアナログ（例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフルール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU）；アンドロゲン（例えば、カルステロン、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン）；抗副腎剤（anti-adrenals）（例えば、アミノグルテチミド、ミトーテン、トリロスタン）；葉酸補助剤（例えば、フロリニン酸（frolinic acid））；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；ベストラムブシリ（bestrabucil）；ビサントレン；エダトラキサート；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルニチン（elfornithine）；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット（phenamet）；ピラルビシン；ポドフィリン酸（podophyllinic acid）；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；

10

20

30

40

50

ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボブロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン (例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) およびドセタキセル (docetaxel) (TAXOTERE (登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシリル；ゲムシタбин；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ (例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン)；ビンプラスチン；白金；エトポシド (VP-16)；イフオスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン (navelbine)；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノブテリン；キセロダ (xeloda)；イバンドロネート (ibandronate)；CPT-11；トポイソメラーゼインヒビター RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DIFO)；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタбин (capecitabine)；ならびにそれらのいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸または誘導体。この定義にはまた、以下のような、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するよう作用する抗ホルモン剤が含まれる：抗エストロゲン (例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン (keoxifene)、LY117018、オナブリストンおよびトレミフェン (Fareston))；ならびに抗アンドロゲン (例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド (bicalutamide)、ロイプロリドおよびゴセレリン)；ならびに上記のいずれかの薬学的に受容可能な塩、酸または誘導体。 10

#### 【0097】

本明細書中で使用される場合、用語「EGFR標的薬物」とは、EGFRに結合し、そして必要に応じてEGFR活性化を阻害する、治療剤をいう。そのような因子 (agent) の例としては、EGFRと結合する抗体および低分子が挙げられる。EGFRと結合する抗体の例としては、MAb579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb455 (ATCC CRL HB 8507)、MAb225 (ATCC CRL 8508)、MAb528 (ATCC CRL 8509) (米国特許第4,943,533号、Mendelsohnらを参照のこと) およびその変体 (例えば、キメラ化225 (C225またはセツキシマブ；ERBUTIX (登録商標)) および新形態化ヒト225 (H225) (WO 96/40210、Imclone Systems Inc. を参照のこと)；I型変異体EGFRと結合する抗体 (米国特許第5,212,290号)；米国特許第5,891,996号に記載されるような、EGFRと結合するヒト化抗体およびキメラ抗体；およびEGFRと結合するヒト抗体 (例えば、ABX-EGF) (WO 98/50433、Abgenixを参照のこと) が挙げられる。抗EGFR抗体は、細胞傷害剤と結合体化され得、それにより免疫結合体を生成する (例えば、EP659,439A2、Merck Patent GmbHを参照のこと)。EGFRと結合する低分子の例としては、ZD1839またはゲフィチニブ (IRESSA<sup>TM</sup>；AstraZeneca)、CP-358774 (TARCEVA<sup>TM</sup>；Genentech/OSI) およびAG1478、AG1571 (SU 5271；Sugen) が挙げられる。 30

#### 【0098】

「チロシンキナーゼインヒビター」とは、チロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をいくらかの程度阻害する分子 (例えば、ErbbBレセプター) である。そのようなインヒビターの例としては、上記の段落に記載されるEGFR標的化薬物、ならびにキナゾリン (例えば、PD 153035、4-(3-クロロアニリノ)キナゾリン)、ピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、ピロロピリミジン (例えば、CGP 59326、CGP 60261およびCGP 62706)、およびピラゾーロピリミジン、4-(フェニルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン、クルクミン (ジフェルロイルメタン、4,5-ビス(4-フルオロアニリノ)フタルイミド)、ニトロチオフェン部分含有チロホスチン；PD-0183805 (Warner-Lambert)；アンチセンス分 40

子(例えば、Erbbコード核酸に結合するアンチセンス)；キノキサリン(米国特許第5,804,396号)；トリホスチン(米国特許第5,804,396号)；ZD6474(AstraZeneca)；PTK-787(Novartis/Schering AG)；パンErbbインヒビター(例えば、CI-1033(Pfizer))；Affinitac(ISIS 3521；Isis/Lilly)；イマチニブメシレート(Gleevac；Novartis)；PKI 166(Novartis)；GW2016(Glaxo SmithKline)；CI-1033(Pfizer)；EKB-569(Wyeth)；セマキサニブ(Sugen)；ZD6474(AstraZeneca)；PTK-787(Novartis/Schering AG)；INC-1C11(Imclone)；または以下の特許公開のいずれかに記載されるEGFR標的化薬物：米国特許第5,804,396号；WO99/09016(American Cyanimid)；WO98/43960(American Cyanimid)；WO97/38983(Warner Lambert)；WO99/06378(Warner Lambert)；WO99/06396(Warner Lambert)；WO96/30347(Pfizer, Inc)；WO96/33978(Zeneca)；WO96/3397(Zeneca)；およびWO96/33980(Zeneca)が、挙げられる。

#### 【0099】

「抗脈管形成剤」とは、血管の発生をある程度までプロックするかまたは妨げる、化合物をいう。抗脈管形成因子は、例えば、新脈管形成の促進に関する増殖因子または増殖因子レセプターと結合する、低分子または抗体であり得る。本明細書中の好ましい抗脈管形成因子は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)と結合する抗体である。

#### 【0100】

用語「サイトカイン」とは、細胞内媒介因子として別の細胞に対して作用する、ある細胞集団により放出されるタンパク質についての包括的用語である。そのようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。このサイトカインの中に含まれるのは、成長ホルモン(例えば、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン)；.副甲状腺ホルモン；サイロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；糖タンパク質ホルモン(例えば、卵胞刺激ホルモン(FSH)；甲状腺刺激ホルモン(TSH)；および黄体形成ホルモン(LH)；肝増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子 および腫瘍壊死因子 ；ミューラー阻害物質；マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；脈管内皮増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；神経成長因子(例えば、NGF-)；血小板増殖因子；トランスフォーミング増殖因子(TGF)(例えば、TGF- およびTGF-)；インスリン様増殖因子Iおよびインスリン様増殖因子II；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン(例えば、インターフェロン、インターフェロン およびインターフェロン-)；コロニー刺激因子(CSF)(例えば、マクロファージCSF(M-CSF)；顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)；および顆粒球CSF(G-CSF))；インターロイキン(IL)(例えば、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12)；腫瘍壊死因子(例えば、TNF- またはTNF-)；ならびに他のポリペプチド因子(LIFおよびキットリガンド(KL))である。本明細書中で使用される場合、用語「サイトカイン」とは、天然供給源由来のタンパク質、または組換え細胞培養物由来のタンパク質、およびネイティブ配列のサイトカインの生理活性等価物を包含する。

#### 【0101】

本出願において使用される用語「プロドラッグ」とは、親薬物と比較して腫瘍細胞に対して細胞傷害性が小さく、なおかつ酵素学的に活性化され得るか、またはより活性な親形態に転換され得る、薬学的に活性である物質の前駆体形態または誘導体形態をいう。例え

10

20

30

40

50

ば、Willman、「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」Biochemical Society Transactions、14、375-382頁、第615回 Meeting Belfast (1986) およびStellaら、「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery」Directed Drug Delivery, Borchardら編、247-267頁、Humana Press (1985) を参照のこと。本発明のプロドラッグとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：ホスフェート含有プロドラッグ、チオホスフェート含有プロドラッグ、サルフェート含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸改変プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、-ラクタム含有プロドラッグ、必要に応じて置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグまたは必要に応じて置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、より活性な細胞傷害性の無い薬物へ転換され得る5-フルオロシトシンプロドラッグおよび他の5-フルオロウリジンプロドラッグ。本発明における使用のためのプロドラッグ形態に誘導体化され得る細胞傷害性薬物の例としては、上記の化学療法剤が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0102】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質および/または界面活性剤から構成される小胞であり、これは、薬物（例えば、本明細書中に開示される抗erbB2抗体、および必要に応じて化学療法剤）を哺乳動物に送達するために有用である。リポソームの成分は、一般的に二重層形成体（これは生体膜の脂質配置に類似する）の中に配置される。

## 【0103】

用語「パッケージ挿入物」は、治療生成物の市販のパッケージ内に慣習的に備えられる説明書をいうために使用され、これは、そのような治療生成物の使用に関する適応症、用法、投薬量、投与、禁忌および/または警告についての情報を含む。

## 【0104】

「心臓保護剤」は、患者への薬物（例えば、アントラサイクリン抗生物質および/または抗erbB2抗体）の投与に関連する心筋機能不全（すなわち、心筋症および/または鬱血性心不全）を予防または減少させる、化合物または組成物である。心臓保護剤は、例えば、フリーラジカル媒介性心臓毒性効果をブロックまたは減少し得、そして/または酸化的ストレス損傷を予防もしくは減少し得る。この定義によって包含される心臓保護剤の例としては、以下が挙げられる：鉄キレート化剤であるデキスラゾキサン（ICRF-187）（Seifertら、The Annals of Pharmacotherapy 28:1063-1072 (1994)）；脂質低下剤および/または抗酸化剤（例えば、プロブコール（Singalら、J. Mol. Cell Cardiol. 27:1055-1063 (1995)）；アミホスチン（アミノチオール2-[（3-アミノプロピル）アミノ]エタンチオールニ水素リン酸エステル（これはまた、WR-2721と呼ばれる）およびその脱リン酸化された細胞取り込み形態（これは、WR-1065と呼ばれる）ならびにS-3-（3-メチルアミノプロピルアミノ）プロピルホスホチオ酸（WR-151327）（Greenら、Cancer Research 54:738-741 (1994) を参照のこと）；ジゴキシン（Bristol, M.R.: Bristol MR編、Drug-Induced Heart Disease. New York: Elsevier 191-215 (1980)）；ブロッカー（例えば、メトプロロール（Hjalmarsonら、Drugs 47:補遺4:31-9 (1994)；およびShaddyら、Am. Heart J. 129:197-9 (1995)）；ビタミンE；アスコルビン酸（ビタミンC）；フリーラジカルスカベンジャー（例えば、オレアノール酸、ウルソル酸およびN-アセチルシステイン（NAC）；スピノン捕捉化合物（例えば、-フェニル-tert-ブチルニトロン（PBN）；（Pacciniら、Anticancer Res. 13:1607-1612 (1993)）；セレノ有機化合物（例えば、P251 (Elbesen) など。

## 【0105】

10

20

30

40

50

「単離された」核酸分子とは、抗体核酸の天然の供給源に通常は関連する少なくとも1種の夾雑核酸分子から分離されている、同定された核酸分子である。単離された核酸分子は、それが天然で見出される形態または状況以外である。従って、単離された核酸分子は、それが天然細胞中で存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子としては、抗体を通常は発現する細胞中に含まれる核酸分子が挙げられ、ここで、例えば、その核酸分子は、天然細胞とは異なる染色体位置にある。

#### 【0106】

発現「制御配列」とは、特定の宿主生物における、作動可能に連結されたコード配列の発現のために必要なDNA配列をさす。例えば、原核生物に適切な制御配列としては、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が挙げられる。真核生物細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用する10ことが公知である。

#### 【0107】

核酸は、別の核酸配列と機能的に関連するように配置された場合に、「作動可能に連結され」ている。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、あるポリペプチドのDNAと、そのポリペプチドの分泌に関するプレタンパク質として発現される場合に、そのDNAに作動可能に連結されている。プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列の転写に影響を与える場合、そのコード配列と作動可能に連結されている。リボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置された場合に、コード配列と作動可能に連結されている。一般に、「作動可能に連結される」とは、連結されているDNA配列が、連続しており、分泌リーダーの場合には、連続してかつ読み取り枠が同じであることを、意味する。しかし、エンハンサーは、連続している必要はない。連結は、簡便な制限酵素切断部位におけるライゲーションによって、達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーは、従来の実施に従って使用される。20

#### 【0108】

本明細書中で使用される場合、発現「細胞」、発現「細胞株」、および発現「細胞培養物」は、互換可能に使用され、そのような指示はすべて、子孫を包含する。従って、用語「形質転換体」および「形質転換細胞」とは、初代対象細胞、および伝達回数に関わらずそれに由来する培養物を包含する。すべての子孫は、意図的変異または偶発的変異に起因して、DNA含量が正確には同一ではないかもしれない。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングされたのと同じ機能または生理活性を有する変異体子孫が、含まれる。別の指示が意図される場合、それはその内容から明らかである。30

#### 【0109】

(抗HER2抗体での処置に対して応答性である腫瘍を同定する方法)

(腫瘍源および腫瘍細胞)

腫瘍は、2C4または機能的に等価な抗体（すなわち、抗体2C4の生物学的特徴のうちの1つ以上を有する抗体）を用いる治療に対して、例えば、HER2活性化の尺度として、細胞表面上にEGFR-ErbB2および/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーが存在することに基づいて、治療に対して応答性であると特徴付けられ得る。腫瘍サンプルは、当該分野で公知の任意の方法によってヘテロダイマーの存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ヘテロダイマーの存在は、下記の方法のうちの1つ以上によって決定される。40

#### 【0110】

HER2活性化は、レセプターのヘテロダイマー化およびリン酸化の結果であるので、2C4または機能的に等価な抗体を用いる治療に対して応答性の腫瘍を同定するため特に重要な方法は、下記のような、ErbB2レセプターのリン酸化（例えば、ErbB2(HER2)レセプターのリン酸化）の検出である。

#### 【0111】

アッセイされ得る腫瘍細胞の供給源としては、腫瘍生検、循環する腫瘍細胞、循環する血漿タンパク質、腹水、異種移植腫瘍および他の腫瘍モデル、ならびに初代細胞培養物も50

しくは腫瘍に由来する初代細胞株または腫瘍様特性を示す細胞株、ならびに保存された腫瘍サンプル（例えば、ホルマリン固定してパラフィン包埋した腫瘍サンプル）が挙げられるが、これらに限定されない。EGFR-ErbB2および/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーについての種々の細胞型群ならびに/あるいはErbBレセプターのリン酸化のスクリーニングが、本発明によって企図される。ヘテロダイマーおよび/またはErbBレセプター（例えば、ErbB2（HER2）レセプター）のリン酸化について陽性であると検査で出る腫瘍細胞と同じ型の腫瘍細胞が、2C4を用いる治療に供され得る。下記の腫瘍モデルは、例として提供される。これらは、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

## 【0112】

10

1つの実施形態において、腫瘍に現在罹患している患者に由来する腫瘍細胞が、2C4を用いる治療に対する応答性についてアッセイされる。その細胞が、HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーの存在に基づいて、またはErbBレセプターのリン酸化を示すことによって、応答性であると決定された場合、その患者は、その後、2C4の生物学的特徴のうちの1つ以上を有する抗体で処置され得る。好ましくは、その患者は、rhumaMab 2C4で処置される。

## 【0113】

別の実施形態において、特定の型の腫瘍に由来する腫瘍細胞、または特定の型の腫瘍の特徴を有すると考えられる細胞が、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーおよび/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの存在について、またはErbBレセプター（好ましくは、ErbB2（HER2）レセプター）のリン酸化について、アッセイされる。EGFR-ErbB2ヘテロダイマーおよび/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマー、ならびに/あるいはErbBレセプターのリン酸化が検出される場合、その型の腫瘍は、2C4の生物学的特徴のうちの1つ以上を有する抗ErbB2抗体を用いる処置の良好な候補であると解釈される。その後、その型の腫瘍に罹患している患者は、そのような抗体で処置され得る。

20

## 【0114】

## （細胞株移植片）

インビトロ増殖した腫瘍細胞（例えば、培養中で増殖した腫瘍細胞、および腫瘍細胞株）は、目的の部位中に直接細胞を移植することによって、マウス中に異種移植され得る。そのような方法は、当業者に周知である。その細胞は、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーおよび/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの存在を同定するため、あるいはErbBレセプターのリン酸化（例えば、ErbB2（HER2）レセプターのリン酸化）について、アッセイされ得る。

30

## 【0115】

一実施形態において、腫瘍細胞は、マウス（好ましくは、無胸腺ヌードマウス）中に皮下移植される。別の実施形態において、腫瘍細胞は、適切なインサイチュ腫瘍モデルを作製するために生理学的に適切な位置に移植される。例えば、乳癌細胞株由来の細胞が、乳癌の生物学をより正確にモデルリングするために、無胸腺ヌードマウスの乳房脂肪パッド中に種々の濃度で移植され得る。腫瘍細胞は、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーまたはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの存在について、あるいはErbBレセプターのリン酸化について、移植の前または後のいずれかにアッセイされ得る。好ましくは、腫瘍細胞は、移植された細胞が所定の大きさの腫瘍へと発達した後で、アッセイされる。そのマウスはまた、2C4または機能的に等価な抗体を用いる治療に供され得、未処置マウスがコントロールとしての役割を果たす。

40

## 【0116】

同様のモデルは、培養細胞または細胞株が誘導される任意の型の腫瘍について確立され得る。腫瘍型としては、膀胱腫瘍、脳腫瘍、乳房腫瘍、結腸腫瘍、食道腫瘍、腎臓腫瘍、白血球、肝腫瘍、肺腫瘍、黒色腫、卵巣腫瘍、脾臓腫瘍、前立腺腫瘍、肉腫、胃腫瘍、精巣腫瘍、および子宮腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、

50

ErbB2を過剰発現する腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、移植のために使用され、一方、別の実施形態において、正常量または正常量未満のErbB2を発現する腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、移植のために使用される。なお別の実施形態において、HERCEPTIN(登録商標)に対して非応答性である腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、移植のために使用される。

【0117】

特定の実施形態において、約2,000万個のMDA-175乳房腫瘍細胞が、マウス性腺脂肪パッド中に移植される。異種移植された細胞の表面上のHER2/HER1ダイマーおよび/またはHER2/HER3ダイマーの発現が、例えば、下記の方法のうちの1つによって、決定される。そのように移植されたマウスはまた、0.3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg、または100mg/kgの2C4を用いる処置に供され得る。他の投与レジメンは、当業者の決定範囲内にある。

【0118】

本発明は、あらゆるHER2発現腫瘍の分類のために適切であるが、固形腫瘍(乳癌、卵巣癌、肺癌、前立腺癌、および結腸直腸癌など)が、本発明に従う分析および処置のために特に適切である。

【0119】

(腫瘍異種移植片)

哺乳動物腫瘍標本(好ましくは、ヒト腫瘍標本)が、取得され得、そしてマウス(好ましくは、無胸腺ヌードマウス)中に移植され得る。その腫瘍標本は、当該分野において公知の任意の方法によって取得され得る。一実施形態において、その腫瘍標本は、例えば、生検中で、またはその哺乳動物から腫瘍を除去する手術過程において、外科的に切除される。別の実施形態において、その腫瘍標本は、哺乳動物の血液から循環する腫瘍細胞を純化することによって、取得される。

【0120】

具体的な実施形態において、約5mm×直径0.5mm~1mmの固形腫瘍スライスが、無胸腺ヌードマウスの側腹部に、マウス1匹当たり概して4断片が移植される。この移植された腫瘍が中央値直径約10mm~15mmに達した時に、それらの腫瘍は、概してより小さい腫瘍断片を使用して連続継代され得る。ヒト腫瘍異種移植片を生成および研究する方法は、以下の参考文献(本明細書中で全体が援用される)において記載される: Fiebigら「Human Tumor Xenografts: Predictivity, Characterization and Discovery of New Anticancer Agents」Contributions to Oncology: Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development, FiebigおよびBerger編(Basel, Karger 1999)第54巻、pp. 29~50; Bergerら「Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice」Immunodeficient Mice in Oncology, FiebigおよびBerger編(Basel, Karger, 1992)pp. 23~46; FiebigおよびBerger「Human Tumor Xenografts and Explants」Models in Cancer Research, Teicher編(Humana Press 2002)pp. 113~137。

【0121】

ヒト異種移植片は、ドナー患者内での腫瘍の挙動について非常に予測定であると考えられる。なぜなら、その異種移植片は、固形腫瘍として増殖し、分化し、そして間質、脈管構造、および中心壊死を発生するからである。ほとんどの場合、異種移植片は、患者由来の新たな腫瘍の分子特徴、組織学的特徴および病態生理学的特徴のうちのほとんどを保持する。最初の腫瘍または連続継代腫瘍を含むマウス由来の腫瘍細胞は、EGFR-Erb

10

20

30

40

50

B2ヘテロダイマーおよび/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの存在について、またはErbBレセプターのリン酸化について、分析され得る。マウスはまた、2C4または機能的に等価な抗体を用いる治療に供され得る。

#### 【0122】

一実施形態において、ヒト腫瘍異種移植片の新たに生成または樹立した群が、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーまたはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの存在について、またはErbBレセプターのリン酸化について、スクリーニングされる。前出のFiebigおよびBurgerは、種々の一般的癌の型（例えば、膀胱癌、脳癌、乳癌、結腸癌、食道癌、腎臓癌、白血病、肝臓癌、肺癌、黒色腫、卵巣癌、胰臓癌、前立腺癌、肉腫、胃癌、精巣癌、および子宮癌）から確立された300個を超えるヒト腫瘍異種移植片群を記載する。一実施形態において、この群全体は、ヘテロダイマーについて、またはErbBレセプター（例えば、ErbB2（HER2）レセプター）のリン酸化について、スクリーニングされ得る。この群の部分集合はまた、ヘテロダイマーについて、またはErbBレセプターのリン酸化について、スクリーニングされ得、この部分集合は、例えば、組織型、ErbB2の過剰発現、ErbB2の発現不足またはErbB2の正常な発現、あるいはHERCEPTIN（登録商標）に対して応答しないことに基づく。この様式で、腫瘍は、ヘテロダイマーの存在に基づいて、またはErbBレセプター（例えば、ErbB2（HER2）レセプター）のリン酸化を示すことによって、治療候補として分類され得る。同様に、そのように分類された腫瘍を保有する患者は、2C4または機能的に等価な抗体を用いる治療に適格であると、より迅速に判断され得る。

10

20

#### 【0123】

腫瘍標本は、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーまたはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの存在について、あるいはErbBレセプターのリン酸化について、移植の前または後のいずれかにアッセイされ得る。一実施形態において、最初の異種移植片および/または連続継代した異種移植片からの約1gの腫瘍が、ヘテロダイマーについてさらに分子的に特徴付けられるか、または液体窒素中で凍結され、そして後の特徴付けのために-80にて保存される。異種移植片腫瘍は、二重層軟寒天アッセイ（例えば、前出のFiebigおよびBurgerに記載されるような、いわゆる試験管内腫瘍細胞感受性試験）によってさらに分析され得る。固体ヒト腫瘍異種移植片は、単細胞懸濁物へと機械的およびタンパク質分解的に脱凝集される。この単細胞懸濁物は、記載されるように軟寒天を層状にしたマルチウェルプレート中に配置される。インビトロで増殖された腫瘍細胞は、コロニーの形成をもたらし、このコロニーは、分子的特徴（例えば、ヘテロダイマー）について、またはErbBレセプターのリン酸化について、あるいは他の組織化学的特徴または形態学的特徴について、さらに分析され得る。

30

#### 【0124】

（B. EGFR-ErbB2ヘテロダイマーおよびErbB2-ErbB3ヘテロダイマーの検出）

当該分野で公知の任意の方法が、腫瘍中のEGFR-ErbB2ヘテロダイマーまたはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーを検出するために使用され得る。いくつかの好ましい方法が、以下に記載される。これらの方法は、多価タンパク質-タンパク質相互作用を検出するか、あるいは目的のタンパク質間の近さを示す。下記の方法は、例として提供される。この下記の方法は、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

40

#### 【0125】

（同時免疫沈降およびイムノプロッティング）

免疫親和性ベースの方法（例えば、免疫沈降またはELISA）は、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーまたはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーを検出するために使用され得る。一実施形態において、抗ErbB2抗体が、腫瘍細胞からのErbB2を含む複合体を免疫沈降するために使用され、その後、生じた免疫沈降物が、イムノプロッティングによって、EGFRまたはErbB3の存在についてプロービングされる。別の実施形態において、EGFR抗体またはErbB3抗体が、免疫沈降工程のために使用され得

50

、その後、その免疫沈降物が、ErbB2抗体を用いてプロービングされ得る。さらなる実施形態において、HER1、HER3、HER2/HER1複合体またはHER2/HER3複合体に対して特異的なErbBリガンドが、複合体を沈降させるために使用され得、この複合体は、その後、HER2の存在についてプロービングされ得る。例えば、リガンドは、アビジンに結合体化され得、そして複合体は、ビオチンカラムにて精製され得る。他の実施形態（例えば、ELISAまたは抗体「サンドイッチ」型アッセイ）において、ErbB2に対する抗体が、固体支持体上に固定され、腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物と接触され、洗浄され、その後、EGFRに対する抗体またはErbB3に対する抗体に対して曝露される。後者の抗体の結合（これは、直接検出され得るか、または検出可能な標識に結合体化された二次抗体によって検出され得る）は、ヘテロダイマーの存在を示す。特定の実施形態において、EGFR抗体またはErbB3抗体が、固定され、そしてErbB2抗体が、検出工程のために使用される。他の実施形態において、ErbBレセプターリガンドが、抗ErbBレセプター抗体の代わりに、または抗ErbBレセプター抗体と組み合わせて、使用され得る。

【0126】

EGFR抗体、ErbB2抗体、またはErbB3抗体との免疫沈降に続いて、ヘテロダイマーについての機能的アッセイを、免疫プロッティングの代わりとしてかまたは免疫プロッティングの補足として、行い得る。1つの実施形態において、ErbB3抗体との免疫沈降に続いて、この免疫沈降物におけるレセプターチロシンキナーゼ活性についてのアッセイを行う。ErbB3は、固有のチロシンキナーゼ活性を有さないので、免疫沈降物におけるチロシンキナーゼ活性の存在は、ErbB3が、ErbB2と最も会合しやすいことを示す。Graus-Portaら、EMBO J., 16: 1647-55 (1997); Klappeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 4995-5000 (1999)。この結果は、ErbB2抗体での免疫プロッティングによって確認され得る。別の実施形態において、ErbB2抗体との免疫沈降に続いて、EGFRレセプターチロシンキナーゼ活性についてアッセイを行う。このアッセイにおいて、免疫沈降物は、放射活性ATPと接触され、そしてErbB2の、EGFRによるリン酸交換反応のインビボでの部位を模倣するペプチド基質と接触される。このペプチドのリン酸化は、共免疫沈降を示し、従って、ErbB2とのEGFRのヘテロダイマー化を示す。レセプターチロシンキナーゼ活性アッセイは、当該分野において周知であり、そして例えば、ホスホチロシン抗体による標的基質のリン酸化を検出するアッセイ、およびMAPK経路のような同種シグナル伝達経路の活性化を検出するアッセイが挙げられる。

【0127】

上記の方法およびアッセイのバリエーションは、当業者に容易に明らかであり、そして慣用的である。

【0128】

化学架橋またはUV架橋もまた、生存細胞の表面のヘテロダイマーを共有結合させるために使用され得る。Hunterら、Biochem, J., 320: 847-53。化学架橋剤の例としては、ジチオビス（スクシンイミジル）プロピオネート（DSP）および3,3'ジチオビス（スルホスクシンイミジル）プロピオネート（DTSSP）が挙げられる。1つの実施形態において、化学的に架橋した腫瘍細胞からの細胞抽出物は、SDS-PAGEによって分析され、そしてEGFRおよび/またはErbB3に対する抗体で免疫プロットされる。適切な分子量の非常にシフトしたバンドは、おそらく、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーまたはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーを表す。なぜなら、ErbB2は、EGFRおよびErbB3に対する好ましいヘテロダイマー化パートナーであるからである。この結果は、ErbB2抗体での引き続く免疫プロッティングによって確認され得る。

【0129】

（FRETおよび蛍光ベースの方法）

蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）がまた、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーま

10

20

30

40

50

たは E r b B 2 - E r b B 3 ヘテロダイマーを検出するために使用され得る。 F R E T は、タンパク質のコンホメーション変化およびタンパク質 - タンパク質相互作用を、インピボおよびインピトロで、ドナー発蛍光団からアクセプター発蛍光団へのエネルギーの移動に基づいて、検出する。 S elvin, N at. S truct. B iol. , 7 : 730 - 34 ( 2000 )。エネルギー移動は、ドナー発蛍光団が、アクセプター発蛍光団に十分に近い場合にのみ起こる。代表的な F R E T 実験において、2つのタンパク質、または1つのタンパク質上の2つの部位が、異なる蛍光プローブで標識される。これらのプローブの一方(ドナープローブ)は、特定の波長の入射高によって、より高いエネルギー状態に励起される。次いで、ドナープローブは、そのエネルギーを、第二のプローブ(アクセプタープローブ)に伝達し、ドナーの蛍光強度の減少およびアクセプターの蛍光発光の増加を生じる。エネルギー移動の程度を測定するために、ドナープローブおよびアクセプタープローブで標識されたサンプル中のドナーの強度が、ドナープローブのみで標識されたサンプル中の強度と比較される。必要に応じて、アクセプターの強度が、ドナー / アクセプターサンプルおよびアクセプターのみのサンプルにおいて比較される。適切なプローブは、当該分野において公知であり、そして例えば、膜透過性色素(例えば、フルオレセインおよびローダミン)、有機色素(例えば、シアニン色素)、およびランタニド原子が挙げられる。 S elvin, 前出。エネルギー移動を検出および測定するための方法および器具は、当該分野において公知である。 S elvin, 前出。

#### 【 0130 】

F R E T ベースの技術は、タンパク質 - タンパク質相互作用を個々の細胞において検出および測定するために適切であり、これもまた、当該分野において公知である。例えば、ドナーフォトブリーチング蛍光共鳴エネルギー移動( b p F R D T )顕微鏡検査法および蛍光寿命画像化顕微鏡検査法( F L I M )が、細胞表面レセプターのダイマー化を検出するために使用される。 S elvin, 前出 ; G adella および J ovine, J. C e 11 B iol. , 129 : 1543 - 58 ( 1995 )。1つの実施形態において、 p b F R E T は、 N agy ら、 C y t o m e t r y , 32 : 120 - 131 ( 1998 )に記載されるように、細胞上で、「懸濁液中」または「インサイチュ」のいずれかで使用されて、 E G F R - E r b B 2 ヘテロダイマーまたは E r b B 2 - E r b B 3 ヘテロダイマーの形成を検出および測定する。これらの技術は、エネルギー移動に起因する、ドナーの蛍光寿命の減少を測定する。特定の実施形態において、フローサイトメトリー Foers t e r 型 F R E T 技術( F C E T )が、 N agy ら、前出および B rockhoff ら、 C y t o m e t r y , 44 : 338 - 48 ( 2001 )に記載されるように、 E G F R - E r b B 2 ヘテロダイマーおよび E r b B 2 - E r b B 3 ヘテロダイマーを調査するために使用され得る。

#### 【 0131 】

F R E T は、好ましくは、標準的な免疫組織化学的標識技術と組み合わせて使用される。 K enworthy, M ethods , 24 : 289 - 96 ( 2001 )。例えば、適切な蛍光色素と結合体化した抗体は、2つの異なるタンパク質を標識するためのプローブとして使用され得る。これらのタンパク質が互いに近くにある場合、これらの蛍光色素は、 F R E T のためのドナーおよびアクセプターとして働く。エネルギー移動は、標準的な手段によって検出される。エネルギー移動は、フローサイトメトリー手段によって、またはデジタル顕微鏡検査システム(例えば、電荷結合素子( C C D )カメラに結合された、共焦点顕微鏡検査法もしくは広視野蛍光顕微鏡検査法)によって、検出され得る。

#### 【 0132 】

本発明の1つの実施形態において、 E r b B 2 抗体および E G F R 抗体または E r b B 3 抗体のいずれかは、例えば、 N agy ら、前出に記載されるように、2つの異なる発蛍光団で直接標識される。腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物が、異なって標識された抗体と接触され、これらの抗体は、 E G F R - E r b B 2 ヘテロダイマーまたは E r b B 2 - E r b B 3 ヘテロダイマーの存在下で、 F R E T のためのドナーおよびアクセプターとして働く。あるいは、 E r b B 2 および E G F R または E r b B 3 に対する、標識されていない

10

20

30

40

50

抗体が、異なって標識された二次抗体（これは、ドナーおよびアクセプターとして働く）とともに使用される。例えば、B r o c k h o f f ら、前出を参照のこと。これらの標識が近く接近していることがわかる場合、エネルギー移動が検出され、そしてヘテロダイマーの存在が決定される。

【0133】

他の実施形態において、HER2およびHER1またはHER3のいずれかに特異的なEr b Bレセプタリガンドが、蛍光標識され、そしてFRET研究のために使用される。

【0134】

本発明のなお他の実施形態において、腫瘍細胞の表面上のヘテロダイマーの存在は、標準的な直接的または間接的な免疫蛍光技術および共焦点レーザー走査顕微鏡検査法を使用して、EGFRまたはEr b B3のいずれかとのEr b B2の同時局在化によって、実証される。あるいは、レーザー走査画像化（LSI）が使用されて、Zuckら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 11122-27 (1999)に記載されるように、Er b B2の、EGFRまたはEr b B3のいずれかとの抗体結合および同時局在を、ハイスループット形式で（例えば、マイクロウェルプレート）検出する。

【0135】

さらなる実施形態において、EGFR-ErbB2ヘテロダイマーおよび/またはEr b B2-ErbB3ヘテロダイマーの存在は、ヘテロダイマー成分の近位性に依存する酵素活性を同定することによって、決定される。Er b B2抗体が1つの酵素と結合体化され、そしてEGFR抗体またはEr b B3抗体が第二の酵素と結合体化される。第一の酵素に対する第一の基質が添加され、そしてこの反応は、第二の酵素に対する第二の基質を生成する。これは、検出可能な化合物（例えば、色素）を生成するための、別の分子との反応を導く。別の化学物質の存在は、第二の基質を分解し、その結果、第一の酵素と第二の酵素、および従って、2つの抗体が近く接近しない限り、第二の酵素との反応は防止される。特定の実施形態において、腫瘍細胞または細胞溶解物は、グルコースオキシダーゼと結合体化したEr b B2抗体、およびホースラディッシュペルオキシダーゼと結合体化したEr b B3抗体またはEr b B1抗体と接触される。グルコースが、色素前駆体（例えば、DAB）およびカタラーゼと共に、この反応に添加される。ヘテロダイマーの存在は、DABについての染色の際に、色の現像によって決定される。

【0136】

（eTag<sup>TM</sup>アッセイ系）

ヘテロダイマーは、eTag<sup>TM</sup>アッセイ系（Aclarra Bio Science s, Mountain View, CA）に基づく方法を使用して、例えば、WO 83502および米国特許出願2001/0049105（2001年12月6日公開）（これらの両方は、その全体が本質的に参考として援用される）に記載されるように、検出され得る。eTag<sup>TM</sup>、すなわち「電気泳動タグ」は、検出可能なレポーター部分（例えば、蛍光基）を含む。これはまた、「移動度調節剤」を含み得、これは、本質的に、独特の電気泳動移動度を有する部分からなる。これらの部分は、eTag<sup>TM</sup>の、複雑な混合物からの分離および検出を、規定された電気泳動条件下（例えば、キャピラリー電気泳動（CE））で可能にする。eTag<sup>TM</sup>の、レポーター部分、および必要に応じて、移動度変剤を含む部分は、切断可能な連結基によって、第一の標的結合部分に連結され、第一の結合化合物を生成する。第一の標的結合部分は、特定の第一の標的（例えば、核酸またはタンパク質）を特異的に認識する。第一の標的結合部分は、いずれの様式でも限定されず、そして例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドであり得る。好ましくは、第一の標的結合部分は、抗体または抗体フラグメントである。あるいは、第一の標的結合部分は、Er b Bレセプタリガンドまたはその結合能力のあるフラグメントであり得る。

【0137】

連結基は、好ましくは、切断可能な部分（例えば、酵素基質）、または規定された条件下で切断され得る任意の化学結合を含む。第一の標的結合部分がその標的に結合する場合

10

20

30

40

50

、切断剤が導入され、そして／または活性化され、そして連結基が切断され、これによって、e Tag<sup>TM</sup>の、レポーター部分および移動度変換剤を含む部分を放出する。従って、「遊離」e Tag<sup>TM</sup>の存在は、その標的結合部分の、その標的への結合を示す。

【0138】

好ましくは、第二の結合化合物は、切断剤および第二の標的結合部分（これは、第二の標的を特異的に認識する）を含む。第二の標的結合分もまた、いずれの様式でも限定されず、そして例えば、抗体もしくは抗体フラグメント、またはEr b Bレセプターリガンドもしくは結合能力を有するリガンドフラグメントであり得る。切断剤は、第一の結合化合物および第二の結合化合物が近く近位にある場合に、第一の結合化合物中の連結基のみを切断するようなものである。

10

【0139】

本発明の実施形態において、第一の結合化合物は、e Tag<sup>TM</sup>を含み、ここで、Er b B2に対する抗体は、第一の標的結合部分として働く。第二の結合化合物は、EGFRまたはEr b B3に対する抗体を含み、これは、e Tag<sup>TM</sup>の連結基を切断し得る切断剤に結合される。好ましくは、この結合剤は、連結基の切断を可能にするために活性化されなければならない。腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物は、e Tag<sup>TM</sup>（これは、Er b B2に結合する）および修飾されたEGFR抗体またはEr b B3抗体（これは、細胞表面のEGFRまたはEr b B3と結合する）と接触される。結合していない結合化合物は、好ましくは除去され、そして必要である場合、切断剤が活性化される。EGFR-Er b B2ヘテロダイマーまたはEr b B2-Er b B3ヘテロダイマーが存在する場合、切断剤は、連結基に対する切断剤の近位性に起因して、連結基を切断し、そしてe Tag<sup>TM</sup>を放出する。次いで、遊離e Tag<sup>TM</sup>は、当該分野において公知の任意の方法（例えば、キャピラリー電気泳動）によって検出され得る。

20

【0140】

1つの実施形態において、切断剤は、連結基に対して作用する、活性化可能な化学種である。例えば、切断剤は、サンプルを光に曝露することによって、活性化され得る。

【0141】

別の実施形態において、e Tag<sup>TM</sup>は、第一の標的結合部分としてEGFRまたはEr b B3に対する抗体を使用して構築され、そして第二の結合化合物は、Er b B2に対する抗体から構築される。

30

【0142】

（Er b Bレセプターのリン酸化の検出）

Er b Bレセプターのリン酸化の存在を使用して、HER2活性化を実証し得る。

【0143】

1つの実施形態において、Er b Bレセプターのリン酸化は、1つ以上のEr b Bレセプター（例えば、Er b B2（HER2）レセプター）の免疫沈降、およびウェスタンブロット分析によって、評価される。例えば、陽性は、免疫沈降したEr b Bレセプターにおけるリン酸化チロシン残基を検出するための、抗ホスホチロシン抗体を使用して、ゲル上のホスホ-HER2バンドの存在によって決定される。抗ホスホチロシン抗体は、PanVera（Madison, WI）、Invitrogen, Chemicon International Inc.（Temecula, CA）の子会社、またはUpstate Biotechnology（Lake Placid, NY）から市販されている。陰性は、バンドの非存在によって決定される。

40

【0144】

別の実施形態において、Er b B2（HER2）レセプターのリン酸化が、ホスホ特異的抗HER2抗体（クローンPN2A；Thorら、J. Clin. Oncol., 18(18):3230-3239(2000)）を使用して、免疫組織化学によって評価される。

【0145】

Er b Bレセプターのリン酸化を検出するための他の方法としては、KIRAE LI

50

S A (米国特許第5,766,863号；同第5,891,650号；同第5,914,237号；同第6,025,145号；および同第6,287,784号)、質量分析法(リン酸化されたHER2とリン酸化されていないHER2とのサイズを比較する)、および抗HER2抗体を用いるe-タグ近位性アッセイ(例えば、Acclarabiosciences(Mountain View, CA)から入手可能なeTag<sup>TM</sup>アッセイキットを使用する)が挙げられるが、これらに限定されない。eTag<sup>TM</sup>アッセイの詳細は、本明細書中で上に記載されている。

#### 【0146】

##### (抗体の產生)

本発明に従って使用される、治療用抗体および診断用抗体の產生のための例示的技術に関する記載が続く。この記載は、一般に、抗Erbb2抗体の產生に関するが、当業者は、この開示を、Erbb2レセプターのいずれかに対する抗体を產生することに容易に適合させ得る。

10

#### 【0147】

抗体の產生のために使用されるべきErbb2抗原は、例えば、Erbb2の細胞外ドメインの可溶性形態またはその一部であり得、これらは所望のエピトープを含む。あるいは、細胞表面にErbb2を発現する細胞(例えば、Erbb2を過剰発現するように形質転換されたNIH-3T3細胞；または癌細胞株(例えば、SK-BR-3細胞、Stampcovskilら、PNAS(USA)88:8691-8695(1991)を参照のこと)を使用して、抗体を產生し得る。抗体を產生するために有用なErbb2の他の形態は、当業者に明らかである。

20

#### 【0148】

##### (ポリクローナル抗体)

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原およびアジュvantの数回の皮下(s.c.)注射または腹腔内(i.p.)注射によって動物において惹起される。関連抗原を、二官能剤または誘導化剤(例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システィン残基を介する結合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOC<sub>1,2</sub>、またはR<sub>1</sub>N=C=N<sub>2</sub>(ここで、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は異なるアルキル基である)を使用して、免疫化される種において免疫原性であるタンパク質(例えば、キーホールリンペットヘモシニアン、血清アルブミン、ウシサイログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビター)と結合体化させることは有用であり得る。

30

#### 【0149】

動物を、例えば、100μgまたは5μgのタンパク質もしくは結合体(それぞれウサギまたはマウスに対して)を3容量のフロイント完全アジュvantと組み合わせて、そして複数の部位にその溶液を皮内注射することによって、抗原、免疫原性結合体、または誘導体に対して免疫化する。一ヶ月後、その動物を、フロイント完全アジュvant中の初めの量のペプチドまたは結合体の1/5~1/10の量で複数の部位での皮下注射によりブーストする。7日~14日後、その動物から採血し、そしてその血清を抗体力値についてアッセイする。動物を、その力値がプラターになるまでブーストする。好ましくは、その動物を、同じ抗原の結合体(ただし、異なるタンパク質と結合および/または異なる架橋試薬により結合させた)でブーストする。結合体はまた、タンパク質融合物として組換え細胞培養において作製され得る。また、凝集剤(agggregating agent)(例えば、ミョウバン)を適切に使用して、免疫応答を増強させる。

40

#### 【0150】

##### (モノクローナル抗体)

モノクローナル抗体を、実質的に均一な抗体(すなわち、集団を構成する個々の抗体は、可能性として天然に存在する変異(微量に存在し得る)を除いて同一である)の集団から入手する。従って、変更因子(modifier)「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物でない場合の抗体の特徴を示す。

50

## 【0151】

例えば、モノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature、256:495(1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法を使用して作製され得るか、または組換えDNA方法(米国特許第4,816,567号)によって作製され得る。

## 【0152】

ハイブリドーマ方法において、マウスまたは他の適切な宿主動物(例えば、ハムスター)は、本明細書中上記のように免疫化されて、免疫化のために使用されるタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。次いで、リンパ球を、適切な融合剤(例えば、ポリエチレングリコール)を使用してミエローマ細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成させ得る(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59~103頁(Academic Press, 1986))。

## 【0153】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の親ミエローマ細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培養培地中に播種され、そして増殖される。例えば、親ミエローマ細胞が酵素であるヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGprtまたはHprt)を欠損している場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含み(HAT培地)、これらの物質は、HGprt欠損細胞の増殖を防ぐ。

## 【0154】

好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞により抗体の安定な高レベルの産生を支持し、そして培地(例えば、HAT培地)に対して感受性である細胞である。とりわけ好ましいミエローマ細胞株は、マウスミエローマ細胞株(例えば、Salak Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍に由来するミエローマ細胞株、ならびにAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAより入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞)である。ヒトミエローマ細胞株およびマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984);およびBrodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

## 【0155】

ハイブリドーマ細胞が増殖する培養培地は、抗原に指向されたモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ(例えば、放射免疫アッセイ(RIA)または酵素結合免疫測定法(ELISA))によって決定される。

## 【0156】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonら、Anal. Biochim., 107:220(1980)のScatchard分析により決定され得る。

## 【0157】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、そのクローンは、限界希釈手順によりサブクローン化され得、そして標準的な方法により増殖され得る(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、このハイブリドーマ細

10

20

30

40

50

胞は動物の腹水腫瘍としてインビボで増殖され得る。

【0158】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、従来の抗体精製手順（例えば、プロテインA - Sepharose、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析またはアフィニティクロマトグラフィーなど）によって培養培地、腹水または血清から適切に分離される。

【0159】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離されて、そして配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源として役に立つ。一旦単離されると、そのDNAは、発現ベクターの中に配置され得、次いでその発現ベクターは、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を獲得するために、宿主細胞（例えば、*E. coli* 細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または別の状況では抗体タンパク質を産生しないミエローマ細胞）にトランスフェクトされる。抗体をコードするDNAの細菌における組換え発現に関する概説論文としては、Skerraら、Currey. Opinion in Immunol., 5: 256 - 262 (1993) およびPlueckthun, Immunol. Revs., 130: 151 - 188 (1992) が挙げられる。

【0160】

さらなる実施形態において、モノクローナル抗体または抗体フラグメントは、McCafertryら、Nature, 348: 552 - 554 (1990) に記載される技術を使用して作製された抗体ファージライプラリーから単離され得る。Clacksonら、Nature, 352: 624 - 628 (1991) およびMarksら、J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991) は、それぞれ、ファージライプラリーを使用する、マウス抗体およびヒト抗体の単離を記載している。引き続く出版物は、鎖シャッフリング (Marksら、Bio/Technology, 10: 779 - 783 (1992)) ならびに非常に大規模なファージライプラリーを構築するためのストラテジーとしての組み合わせ感染およびインビボ組換えによる高い親和性の (nM範囲) ヒト抗体の産生を記載している (Waterhouseら、Nuc. Acids. Res., 21: 2265 - 2266 (1993))。従って、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替技術である。

【0161】

DNAはまた、例えば、相同マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインをコードする配列に置換することによってか（米国特許第4,816,567号；およびMorrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)、または免疫グロブリンコード配列を非免疫グロブリンポリペプチドをコードする配列の全てまたは一部に共有結合させることによって改変され得る。

【0162】

代表的には、そのような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗原に対する特異性を有する一つの抗原結合部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製するために、抗体の定常ドメインに対して置換されるか、またはそれらは、抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに対して置換される。

【0163】

（ヒト化抗体）

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野において記載されてきた。

【0164】

好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からその抗体に導入された一つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入 (import)

10

20

30

40

50

t )」残基と称される。この残基は、代表的に「輸入」可変ドメインから得られる。ヒト化は、超可変領域配列をヒト抗体のその対応配列に置換することによって、本質的にはWinterおよび共同研究者ら (Jonesら、Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmannら、Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoevenら、Science, 239: 1534-1536 (1988)) の方法に従って実施され得る。従って、そのような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり(米国特許第4,816,567号)、ここで実質的にあまりインタクトでないヒト可変ドメインは、非ヒト種由来の対応配列によって、置換されている。実際には、ヒト化抗体は、代表的に、いくつかの超可変領域残基およびおそらくいくつかのFR残基が、げっ歯動物抗体の類似部位に由来する残基によって置換されている、ヒト抗体である。

10

#### 【0165】

ヒト化抗体を作製する際に使用されるヒト可変ドメイン(軽鎖および重鎖の両方)の選択は、抗原性を減少させるために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」方法に従って、げっ歯動物抗体の可変ドメインの配列は、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングされる。次いで、げっ歯動物の配列に最も類似しているヒト配列が、ヒト化抗体のためにヒトフレームワーク領域(FR)として受容される(Simsら、J. Immunol., 151: 2296 (1993); Chothiaら、J. Mol. Biol., 196: 901 (1987))。別の方法は、軽鎖および重鎖の特定小群の全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークが、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用され得る(Carterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Prestaら、J. Immunol., 151: 2623 (1993))。

20

#### 【0166】

抗体が、抗原に対する高い親和性の維持および他の有利な生物学的特性を有することがさらに重要である。この目的を達成するために、好ましい方法に従って、ヒト化抗体は、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列および種々の概念のヒト化産物の分析のプロセスによって調製される。三次元免疫グロブリンモデルは、一般的に利用可能であり、そして当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な三次元コンホメーション構造を例示し、そして表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の綿密な調査は、候補免疫グロブリン配列の機能決定(functioning)する際に、残基の適切な役割を分析すること(すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析)を可能にする。この方法において、FR残基は、レシピエントおよび輸入配列から選択されて、そして組み合わせられ得、その結果、所望の抗体特徴(例えば、標的抗原に対する増大した親和性)が達成される。一般的に、超可変領域残基は、抗原結合に影響を及ぼす際に、直接的かつ最も実質的に関与する。

30

#### 【0167】

Erbb2と結合し、そしてErbb2レセプターのリガンド活性化をブロックする例示的なヒト化抗Erbb2抗体が、WO01/0245(本明細書中に参考として援用される)に記載している。本明細書中の特定の目的のヒト化抗体は、本質的に、マウスモノクローナル抗体2C4(またはそのFabフラグメント)と同じぐらい効果的にMAPKのEGF、TGF- $\alpha$ および/またはHRG媒介性の活性化をブロックし、そして/または本質的にマウスモノクローナル抗体2C4(またはそのFabフラグメント)と同じぐらい効果的にErbb2に結合する。本明細書中のヒト化抗体は、例えば、ヒト可変重鎖ドメイン内に組み込まれた非ヒト超可変領域残基を含み、そして69H、71H、および73H(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載される可変ドメイン番号付けシステムを利用する)からな

40

50

る群から選択される位置でのフレームワーク領域 (F R) 置換をさらに含み得る。一つの実施形態において、ヒト化抗体は、69H位、71H位、および73H位のうちの2つまたは全ての位置におけるF R置換を含む。

【0168】

本明細書中の目的的例示的ヒト化抗体は、可変重鎖ドメイン相補性決定残基G F T F T D Y T M X (ここで、Xは、好ましくはDまたはSである) (配列番号7)、D V N P N S G G S I Y N Q R F K G (配列番号8)；および/またはN L G P S F Y F D Y (配列番号9)を含み、必要に応じて、それらのCDR残基のアミノ酸改変を含む(例えば、その改変は、本質的にその抗体の親和性を維持するか、または改善する)。例えば、目的的抗体改変体は、上記可変重鎖CDR配列において約1個～約7個または約5個のアミノ酸置換を有し得る。そのような抗体改変体は、親和性変異(例えば、以下に記載されるような)によって調製され得る。最も好ましいヒト化抗体は、配列番号4における可変重鎖ドメインアミノ酸配列を含む(図1B)。

【0169】

ヒト化抗体は、例えば、前のパラグラフにおけるそれらの可変重鎖ドメインCDR残基に加えて、可変軽鎖ドメイン相補性決定残基K A S Q D V S I G V A (配列番号10)、S A S Y X 1 X 2 X 3 (ここで、X1は好ましくはRまたはLであり；X2は好ましくはYまたはEであり；そしてX3は好ましくはTまたはSである) (配列番号11)；およびQ Q Y Y I Y P Y T (配列番号12)を含み得る。そのようなヒト化抗体は、必要に応じて上記CDR残基のアミノ酸改変(例えば、その改変は、その抗体の親和性を本質的に維持または改善する)を含む。例えば、目的的抗体改変体は、上記可変軽鎖CDR配列においてお約1個～約7個もしくは約5個のアミノ酸置換を有し得る。そのような抗体改変体は、親和性変異(例えば、以下に記載されるような)によって調製され得る。最も好ましいヒト化抗体は、配列番号3における可変軽鎖ドメインアミノ酸配列を含む(図1A)。

【0170】

本出願はまた、ErbB2に結合し、そしてErbB2レセプターのリガンド活性化をブロックするアフィニティ成熟抗体を意図する。親抗体は、例えば、配列番号3および4の可変軽鎖および/または重鎖配列をそれぞれ含む(すなわち、改変体574；図1AおよびB)、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。アフィニティ成熟抗体は、好ましくは、マウス2C4または改変体574の親和性よりも優れた親和性(例えば、ErbB2細胞外ドメイン(ECD)ELISAを使用して評価した場合において、例えば、約2倍もしくは約4倍～約100倍もしくは1000倍の改善された親和性)によってErbB2レセプターに結合する。置換のための例示的な可変重鎖CDR残基としては、H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99、または2つ以上の組み合わせ(例えば、これらの残基の2、3、4、5、6または7個)が挙げられる。変更のための可変軽鎖CDR残基の例としては、L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97または2つ以上の組み合わせ(例えば、これらの残基の2～3、4、5またはおよそ10個まで)が挙げられる。

【0171】

ヒト化抗体またはアフィニティ成熟抗体の種々の形態が意図される。例えば、ヒト化抗体またはアフィニティ成熟抗体は、抗体フラグメント(例えば、Fab)であり得、これは、免疫結合体を作製するために必要に応じて一つ以上の細胞傷害剤と結合される。あるいは、ヒト化抗体またはアフィニティ成熟抗体は、インタクトな抗体(例えば、インタクトなIgG1抗体)であり得る。

【0172】

(ヒト抗体)

ヒト化の代替として、ヒト抗体が生成され得る。例えば、トランスジェニック動物(例えば、マウス)であって、免疫の際に内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の充分なレパートリーを生成し得るものを作製することが今や可能である。例えば、キメラ

10

20

30

30

40

50

および生殖系列変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域（J H）遺伝子のホモ接合性欠失は、内因性抗体産生の完全阻害を生じることが記載されている。そのような生殖系列変異体マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子のアレイの移入は、抗原攻撃（challenge）に際しヒト抗体の産生を生じる。例えば、以下を参照のこと：Jako bovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993)；Jakobovitsら、Nature, 362: 255-258 (1993)；Bruggermannら、Year in Immunol., 7: 33 (1993)；ならびに米国特許第5,591,669号、同第5,589,369号および同第5,545,807号。

## 【0173】

10

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCaffertyら、Nature 348: 552-553 (1990)）を使用して、免疫していないドナーから免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリー由来のヒト抗体および抗体フラグメントをインビトロで生成し得る。この技術に従って、抗体Vドメイン遺伝子は、糸状バクテリオファージ（例えば、M13またはfd）の主要コートタンパク質遺伝子またはマイナーなコートタンパク質遺伝子のいずれか中にインフレームでクローニングされ、そしてファージ粒子の表面上に機能的な抗体フラグメントとして提示される。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むことから、その抗体の機能的特性に基づく選択もまた、それらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択を生じる。従って、そのファージは、B細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、種々の形式で行われ得る；それらの概説については以下を参照のこと：Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993)。V遺伝子セグメントのいくつかの供給源をファージディスプレイのために使用し得る。Clacksonら、Nature, 352: 624-628 (1991)は、免疫したマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリーからの抗オキサゾロン抗体の多岐のアレイを単離した。免疫していないヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーが構築され得、そして多様なアレイの抗原（自己抗原を含む）に対する抗体は、以下に記載される技術に本質的に従って単離され得る：Marksら、J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)、またはGriffithら、EMBO J. 12: 725-734 (1993)。また、以下を参照のこと：米国特許第5,565,332号および同第5,573,905号。

20

## 【0174】

30

上記のように、ヒト抗体はまた、インビトロで活性化したB細胞から生成され得る（以下を参照のこと：米国特許第5,567,610号および同第5,229,275号）。

## 【0175】

ヒト抗Erbb2抗体は、以下に記載される：米国特許第5,772,997号（1998年6月30日発行）およびWO 97/00271（1997年1月3日公開）。

## 【0176】

40

（抗体フラグメント）

種々の技術が抗体フラグメントの産生のために開発されてきた。

## 【0177】

伝統的には、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して誘導された（例えば、以下を参照のこと：Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992)；およびBrennanら、Science, 229: 81 (1985)）。しかし、これらのフラグメントは、今や、組換え宿主細胞によって直接產生され得る。例えば、その抗体フラグメントは、上記の抗体ファージライブラリーから単離され得る。あるいは、Fab'-SHフラグメントは、E. coliから直接回収され得、化学的に結合されて、Fab'(ab')2フラグメントを形成し得る（Carterら

50

、 Bio / Technology 10 : 163 - 167 ( 1992 ) )。別のアプローチに従って、 F ( a b ' ) 2 フラグメントは、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。抗体フラグメントの產生のための他の技術は、当業者に明白である。他の実施形態において、選り抜きの抗体は、単鎖 Fv フラグメント ( scFv ) である。以下を参照のこと : WO 93 / 16185 ; 米国特許第 5,571,894 号 ; および同第 5,587,458 号。この抗体フラグメントはまた、「線状抗体」 ( linear antibody ) であり得る ( 例えば、米国特許第 5,641,870 号に記載されるとおり ) 。そのような線状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性であり得る。

## 【 0178 】

## ( 二重特異性抗体 )

10

二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なるエピトープについての結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、 ErbB2 タンパク質の 2 つの異なるエピトープに結合し得る。他のそのような抗体は、 ErbB2 結合部位と、 EGFR 、 Erb3 および / または ErbB4 についての結合部位とを組合せ得る。あるいは、抗 ErbB2 アームは、 T 細胞レセプター分子 ( 例えば、 CD2 または CD3 ) のような白血球上のトリガーモルエドに結合するアームと組み合わされるか、または IgG についての Fc レセプター ( 例えば、 FcRI ( 例えば、 FcRI ( CD64 ) 、 FcRII ( CD32 ) および FcRIII ( CD16 ) ) ) 、細胞防御機構を ErbB2 発現細胞へと集中させ得る。二重特異性抗体はまた、 ErbB2 を発現する細胞に対して細胞傷害性因子を局在化させるために使用され得る。これらの抗体は、 ErbB2 結合アーム、および細胞傷害性因子に結合するアーム ( 例えば、サポリン、抗インターフェロン 、ピンカアルカロイド、リシン A 鎖、メトトレキサートまたは放射性同位体ハプテン ) を有する。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント ( 例えば、 F ( a b ' ) 2 二重特異性抗体 ) として調製され得る。

20

## 【 0179 】

WO 96 / 16673 は、二重特異性抗 ErbB2 / 抗 FcRIII 抗体を記載し、そして米国特許第 5,837,234 号は、二重特異性抗 ErbB2 / 抗 FcRI 抗体を開示する。二重特異性抗 ErbB2 / Fc 抗体は、 WO 98 / 02463 に示されている。米国特許第 5,821,337 号は、二重特異性抗 ErbB2 / 抗 CD3 抗体を教示する。

30

## 【 0180 】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該分野において公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な產生は、 2 つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づく。ここでは、その 2 つの鎖は、異なる特異性を有する ( Millstein ら、 Nature , 305 : 537 - 539 ( 1983 ) ) 。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな配列のために、これらのハイブリドーマ ( クアドローマ ( quadroma ) ) は、 10 の異なる抗体分子の潜在的な混合物を產生する。このうち、たった 1 つが正確な二重特異性構造を有する。正確な分子の精製 ( これは、通常、アフィニティーコロマトグラフィー工程によってなされる ) は、かなり煩雑であり、そしてその産物の収率は低い。類似の手順が WO 93 / 08829 、および Traunecker ら、 EMBO J. , 10 : 3655 - 3659 ( 1991 ) に開示されている。

40

## 【 0181 】

異なるアプローチに従って、所望の結合特異性 ( 抗体 - 抗原組合せ部位 ) を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。この融合物は、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常ドメインを伴い、少なくともヒンジ、 CH2 および CH3 の領域の部分を含む。これらの融合物の少なくとも 1 つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む、第一の重鎖定常領域 ( CH1 ) を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物、および所望であれば免疫グロブリン軽鎖をコードする DNA は、別個の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物中に同時トランスフェクトされる。これは、その構築において使用される不等の比率の 3 つのポリペプチド鎖が最適な収率を提供する実施形

50

態において3つのポリペプチドフラグメントの相対比率の調整においてかなりの柔軟性を提供する。しかし、2つまたは3つすべてのポリペプチド鎖についてコード配列を1つの発現ベクター中に挿入することは、等価な比での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率を生じる場合またはその比率が特に重要ではない場合に可能である。

#### 【0182】

このアプローチの好ましい実施形態において、その二重特異性抗体は、一方のアームにおいて第一の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアームにおいてハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖の対（第二の結合特異性を提供する）から構成される。この非対称性の構造は、所望ではない免疫グロブリン鎖組合せから所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。なぜなら、二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が分離の容易な方法を提供するからである。このアプローチは、WO 94/04690に開示される。例えば、二重特異性抗体を生成するさらなる詳細については、Sureshら、Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)を参照のこと。

10

#### 【0183】

米国特許第5,731,168号において記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーの百分率を最大化するように操作され得る。この好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも1対を含む。この方法において、第一の抗体分子の界面からの1つ以上の低アミノ酸側鎖は、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置き換えられる。その大きな側鎖と同一または類似のサイズの代償的な「溝」は、大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）に置き換えることによって第二の抗体分子の界面上に作製される。これは、ホモダイマーのような他の所望されない最終産物よりもヘテロダイマーの収率を増加するための機構を提供する。

20

#### 【0184】

二重特異性抗体は、架橋抗体または「ヘテロ結合体」抗体を包含する。例えば、ヘテロ結合体における抗体のうちの一方は、アビジンと結合され得、他方はビオチンに結合され得る。そのような抗体は、例えば、所望されない細胞に免疫系を標的化させることができた（米国特許第4,676,980号）、そしてHIV感染の処置について提唱された（WO 91/00360、WO 92/200373およびEP 03089）。ヘテロ結合体抗体は、任意の従来の架橋方法を用いて作製され得る。適切な架橋剤は当該分野において周知であり、そして米国特許第4,676,980号において、多数の架橋技術とともに開示される。

30

#### 【0185】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を生成するための技術もまた、文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学的結合を用いて調製され得る。Brennanら、Science, 229: 81 (1985)は、インタクト抗体がタンパク質分解的に開裂してFab'2フラグメントを生成する手順を記載する。これらのフラグメントは、ジチオール錯化剤砒素ナトリウムの存在下で還元されて、ビジナルなジチオールが安定化され、そして分子間のジスルフィド形成が妨害される。次いで、生成されたFab'2フラグメントは、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体へと変換される。次いで、Fab'2-TNB誘導体の一つは、メルカプトエチルアミンを用いた還元によりFab'2-チオールへと再変換され、そして等モル量の他のFab'2-TNB誘導体と混合されて、二重特異性抗体を形成する。生成された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

40

#### 【0186】

最近の進展により、E. coliからのFab'2-SHフラグメントの直接の回収を容易にした。これは、化学的に結合されて、二重特異性抗体を形成し得る。Shalabyら、J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体Fab'2分子の产生を記載する。各々のFab'2フラグメントは

50

、*E. coli* から別個に分泌され、そしてインビトロでの指向された化学的結合に供されて、二重特異性抗体を形成する。このように形成された二重特異性抗体は、*ErbB2* レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の分解性活性をトリガーし得る。

【0187】

組換え細胞培養物から二重特異性抗体フラグメントを直接作製および単離するための種々の技術もまた、記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生された。Kostelnyら、*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553(1992)。FossおよびJunのタンパク質からのロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に結合された。その抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成させ、そして次いで再度酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成させた。この方法はまた、抗体ホモダイマーの生成のためにも利用され得る。Hollingerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)により記載された「ジアボディ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替機構を提供した。このフラグメントは、リンカーによって軽鎖可変ドメイン(VL)に結合された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。このリンカーは、同じ鎖の上の2つのドメインの間を対合させるには短すぎる。従って、1つのフラグメントのVHおよびVLのドメインは、別のフラグメントの相補的VLおよびVHのドメインと対合されるように強制され、それにより、2つの抗原結合部位を形成する。二重特異性抗体フラグメントを単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用によって作製するための別の戦略もまた、報告されている。以下を参照のこと: Gruberら、*J. Immunol.*, 152:5368(1994)。

【0188】

2つを超える価数を伴う抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る。Tuttleら、*J. Immunol.* 147:60(1991)。

【0189】

(他のアミノ酸配列改変)

抗*ErbB2*抗体のアミノ酸配列改変が企図される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが好ましくあり得る。抗*ErbB2*抗体のアミノ酸配列改変体は、適切なヌクレオチド変化を抗*ErbB2*抗体核酸に導入することによるか、またはペプチド合成により調製される。そのような改変としては、例えば、抗*ErbB2*抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、および/または挿入および/または置換を包含する。欠失、挿入および置換の任意の組合せは、最終構築物に達するように作製されるが、ただし、その最終構築物は所望の特性を有する。そのアミノ酸変化はまた、抗*ErbB2*抗体の翻訳後プロセシングを変更してもよい(例えば、グリコシル化部位の数または位置の変化)。

【0190】

変異誘発についての好ましい位置である、抗*ErbB2*抗体の特定の残基または領域の同定のための有用な方法は、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれ、Cunningham and Wells、*Science*, 244:1081-1085(1989)に記載される。本明細書において、標的残基の残基または基(例えば、荷電された残基(例えば、arg、asp、his、lys、およびglu)が同定され、そして中性または陰性に荷電したアミノ酸(最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン)により置換され、*ErbB2*抗原とアミノ酸との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置は、さらにまたは他の改変体を置換の部位またはそれについて導入することによって再度調整される。従って、アミノ酸配列バリエーションを導入するための部位が予め決定されるものの、その変異自体の性質は、予め決定される必要はない。例えば、所定の部位での変異の性能を分析するために、alanineスキャニングまたはランダム変異誘発が、標的コドンまたは領域に施され、そして発現された抗*ErbB2*抗体改変体が、所望の活性についてスクリーニングされる。

10

20

30

40

50

## 【0191】

アミノ酸配列挿入としては、1つの残基から百以上の残基を有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および/またはカルボキシ末端の融合物、ならびに单一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端の挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗ErbB2抗体、または細胞傷害性ポリペプチドに対して融合された抗体が挙げられる。抗ErbB2抗体分子の他の挿入改変体としては、レセプター分子、酵素（例えば、ADEP-T）または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドに対する抗ErbB2抗体のN末端もしくはC末端への融合物が挙げられる。

## 【0192】

改変体の別の型は、アミノ酸置換改変体である。これらの改変体は、異なる残基によって置換された抗ErbB2抗体分子における少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換変異誘発のために最も関心ある部位としては、超可変領域が挙げられるが、FR改変もまた企図される。保存置換は、「好ましい置換」の見出しの以下の表1に示される。そのような置換が生物学的活性における変化を生じる場合、より実質的な変化（「例示的置換」と表1において称するか、またはアミノ酸クラスを参照して以下にさらに記載される）は、導入され得そしてその産物がスクリーニングされ得る。

## 【0193】

## 【表1】

表1

元の残基	例示的な置換基	好ましい置換基
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu
Leu (L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu

## 【0194】

抗体の生物学的特性における実質的な改変は、(a)置換の領域におけるポリペプチド骨格の構造（例えば、シートまたはヘリックスコンホメーション）、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性）、または(c)側鎖のかさ高さ、を維持することに対するそれらの効果において有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいて以下のような群に分類される：

(1) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；

(2) 中性親水性：cys、ser、thr；

10

20

30

40

50

- (3) 酸性: asp, glu;
- (4) 塩基性: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖方向に影響を与える残基: gly, pro; および
- (6) 芳香族性: trp, tyr, phe。

【0195】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスのものに交換することを包含する。

【0196】

抗ErbB2抗体の適切なコンホメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基はまた、一般にセリンに置換されて、その分子の酸化に対する安定性を改善し得、そして異常な架橋を妨害し得る。逆に、システイン結合は、その抗体に付加されて、その安定性(特に、その抗体がFvフラグメントのような抗体フラグメントである場合)を改善し得る。

10

【0197】

特に好ましい型の置換改変体は、親の抗体(例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体)の1つ以上の超可変領域残基を置換することを包含する。一般に、さらなる開発のために選択された得られた改変体は、それらが生成される親の抗体と比較して改善された生物学的特性を有する。そのような置換改変体を生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟を包含する。手短には、いくつかの超可変領域部位(例えば、6から7の部位)を変異させてすべての可能なアミノ置換を各部位に生成する。このように生成された抗体改変体は、糸状ファージ粒子から一価の様式で、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子I1I1産物に対する融合物としてディスプレイされる。次いで、ファージディスプレイされた改変体は、本明細書において開示されるように、それらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。改変について候補となる超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定し得る。あるいはまたはさらに、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトErbB2との間の接触点を同定することも有利であり得る。そのような接触残基および隣接する残基は、本明細書において説明される技術に従う置換のための候補である。一旦そのような改変体が生成されると、改変体のパネルが、本明細書において記載されるスクリーニングに供され、そして1つ以上の関連するアッセイにおいて優越した特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択し得る。

20

【0198】

その抗体の別の型のアミノ酸改変体は、抗体の元のグリコシル化パターンを変化させる。変化させることは、抗体で見出される1つ以上の炭水化物部位を除去することおよび/または抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を加えることを意味する。

30

【0199】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N連結またはO連結のどちらかである。N結合は、アスパラギン残基の側鎖に炭水化物部位を取りつけることをいう。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン(ここで、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖に炭水化物部位を酵素的に取りつけるための認識配列である。従って、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のどちらかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作製する。O連結のグリコシル化は、N-アセチルガラクトサミン(N-acetyl galactosamine)、ガラクトースまたはキシロースの糖の1つを、ヒドロキシアミノ酸(5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンもまた使用され得るが、最も一般的にはセリンまたはトレオニン)への付着をいう。

40

【0200】

グリコシル化部位の抗体への付加は、好都合なことに、上記の1つ以上のトリペプチド配列を含むように、アミノ酸配列を変化させることにより達成される(N連結グリコシル化部位について)。この変化はまた、元の抗体の配列に、1つ以上のセリンまたはトレオ

50

ニン残基を付加することによるか、または置換することによって、行なわれ得る（O連結グリコシル化部位について）。

【0201】

抗ErbB2抗体のアミノ酸配列改変体をコードする核酸分子は、当該分野で公知の種々の方法によって調製される。これらの方法としては、天然の供給源（天然に存在するアミノ酸配列改変体の場合）からの単離、またはオリゴヌクレオチド媒介（または部位指向性）変異誘発、PCR変異誘発、および初期調製の改変体または抗ErbB2抗体の非改変体バージョンのカセット変異誘発による調製が挙げられるが、それらに限定されない。

【0202】

エフェクター機能（例えば、抗体の抗原依存細胞媒介細胞障害性（ADCC）および/または補体依存細胞障害性（CDC）を増強するために）に関して、本発明の抗体を改変することが所望され得る。このことは、抗体のFc領域に1つ以上のアミノ酸置換を導入することによって達成され得る。あるいはまたはさらに、システイン残基は、Fc領域に導入され得、これにより、この領域の鎖間ジスルフィド結合形成を可能とする。従って、產生されたホモ二量体抗体は、内部移行能力を改善し得そして/または補体媒介細胞死滅および抗体依存細胞性細胞障害性（ADCC）を増加させ得る。Caronら、J. Expt Med. 176: 1191-1195 (1992) およびShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体はまた、Wolffら、Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されるように、ヘテロ二官能性の架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、二重Fc領域を有する抗体が操作され得、そして、それによって、補体溶解およびADCC能力を増強し得る。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) を参照のこと。

【0203】

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体（特に抗体フラグメント）に組み込み得る。本明細書に記載されているように、用語「サルベージレセプター結合エピトープ」とは、インビボ血清の半分の寿命のIgG分子を増加させることを担うIgG分子（例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4）のFc領域のエピトープをいう。

【0204】

（所望の特質を有する抗体についてのスクリーニング）

抗体を产生する技術は、上記されている。所望である場合、特定の生物学的特徴を有する抗体をさらに選択し得る。

【0205】

ErbBレセプターのリガンド活性化をブロックする抗体を同定するために、ErbBリガンドが、ErbBレセプターを発現する細胞に結合するのをブロックする抗体の能力（例えば、目的のErbBレセプターがErbBヘテロオリゴマーを形成する別のErbBレセプターと結合体化する際の）が決定され得る。例えば、ErbBヘテロオリゴマーのErbBレセプターを天然に発現するかまたは発現するようにトランスフェクトされた細胞は、抗体とインキュベートされ、次いで標識されたErbBリガンドに曝される。次いでリガンドが、ErbBヘテロオリゴマー中のErbBレセプターに結合するのをブロックする抗ErbB2抗体の能力が、評価され得る。

【0206】

例えば、抗ErbB2抗体によって、HRGがMCF7乳癌細胞株に結合するのを阻害することが、本質的にはWO01/00245に記載されるように、24ウェルプレート形式で氷上の単層MCF7培養物を使用して、行なわれ得る。抗ErbB2モノクローナル抗体が、それぞれのウェルに加えられ得、そして30分間インキュベートされ得る。125I標識されたrHRG 1177-224 (25pm)が次いで加えられ得、そして

10

20

30

40

50

インキュベーションが4～16時間続けられ得る。用量応答曲線が調製され得、そしてIC50値が、目的の抗体について計算され得る。1つの実施形態では、Erbbレセプターのリガンド活性化をブロックする抗体は、このアッセイにおいて、約50nM未満、より好ましくは10nM未満の、HRGがMCF7細胞に結合するのを阻害するIC50を有する。抗体が、Fabフラグメントのような抗体フラグメントである場合、このアッセイにおけるHRGがMCF7細胞に結合するのを阻害するIC50は、例えば、約100nM未満、より好ましくは50nM未満であり得る。

#### 【0207】

あるいは、またはさらに、Erbbヘテロオリゴマーに存在するErbbレセプターのErbbリガンドが刺激するチロシンリン酸化をブロックする抗Erbb2抗体の能力が、評価され得る。例えば、内因的にErbbレセプターを発現するかまたはそれらを発現するようにトランスフェクトされた細胞は、抗体と共にインキュベートされ、次いで、抗ホスホチロシンモノクローナル（これは、必要に応じて、検出可能な標識と結合体化する）を使用して、Erbbリガンド依存チロシンリン酸化活性についてアッセイされる。米国特許第5,766,863号に記載されるこのキナーゼレセプター活性化アッセイはまた、Erbbレセプター活性化を決定するためおよび抗体によるErbbレセプターの活性をブロックするために利用可能である。

#### 【0208】

1つの実施形態では、本質的には以下の実施例1に記載されるように、MCF7細胞におけるHRG刺激によるp180チロシンリン酸化を阻害する抗体についてスクリーニングし得る。例えば、MCF7細胞は、24ウェルプレートにプレーティングされ得、そしてErbb2に対するモノクローナル抗体が、それぞれのウェルに加えられ得、そして室温で30分間インキュベートされ得る；次いで、rHRG 1177-244は、最終濃度の0.2nMまでそれぞれのウェルに加えられ得、そしてそのインキュベーションは、8分間続けられ得る。培養液が、それぞれのウェルから吸引され、そして反応は、100μlのSDSサンプル緩衝液（5% SDS、25mM DTTおよび25mM Tris-HCl, pH 6.8）を加えることによって停止され得る。それぞれのサンプル（25μl）は、4～12%の勾配ゲル（Novex）上で電気泳動され得、次いで、ポリビニリデンジフルオリドメンブレンに、電気泳動的に転写され得る。抗ホスホチロシン（1μg/ml）免疫プロットが現像され得、そして約180,000のMrの優性の反応性バンドの強度は、反射率デンシトメトリーによって定量され得る。選択された抗体は、このアッセイにおいて、好ましくは有意にp180チロシンリン酸化のHRG刺激をコントロールの約0～35%に阻害する。反射率デンシトメトリーによって決定される場合のp180チロシンリン酸化のHRG刺激の阻害の用量応答曲線は、調製され得、そして目的の抗体についてのIC50が計算され得る。1つの実施形態では、Erbbレセプターのリガンド活性化をブロックする抗体は、このアッセイにおいて、約50nM未満、より好ましくは10nM未満のHRG刺激によるp180チロシンリン酸化を阻害するIC50を有する。抗体が、Fabフラグメントのような抗体フラグメントである場合、このアッセイにおけるHRG刺激によるp180チロシンリン酸化の阻害についてのIC50は、例えば、約100nM未満、より好ましくは、50nM未満であり得る。

#### 【0209】

また、例えば、基本的にSchaeferら、Oncogene 15:1385-1394 (1997)に記載されるように、MDA-MB-175細胞に対する抗体の増殖阻害的効果を評価し得る。このアッセイに従って、MDA-MB-175細胞は、4日間、抗Erbb2モノクローナル抗体（10μl/ml）で処理され得、そしてクリスタルバイオレットで染色され得る。抗Erbb2抗体とのインキュベーションは、モノクローナル抗体2C4によって示される効果と類似した、この細胞株に対する増殖阻害効果を示し得る。さらなる実施形態では、外因性HRGは、有意にこの阻害を覆さない。好ましくは、抗体は、外因性HRGの存在下および非存在下の両方で、モノクローナル抗体4D5より大きい程度（そして、必要に応じて、モノクローナル抗体7F3より大きい程度）、

10

20

30

40

50

M D A - M B - 1 7 5 細胞の細胞増殖を阻害し得る。

【 0 2 1 0 】

1つの実施形態では、目的の抗 E r b B 2 抗体は、実施例 1 で記載されるような共免疫沈降実験で決定されるように、実質的にモノクローナル抗体 4 D 5 より効果的に、そして好ましくは、実質的にモノクローナル抗体 7 F 3 より効果的に、M C F 7 細胞および S K - B R - 3 細胞の両方において、E r b B 2 の、E r b B 3 とのヘリグリン非依存性相互作用をブロックし得る。

【 0 2 1 1 】

増殖阻害抗 E r b B 2 抗体を同定するために、E r b B 2 を過剰発現する癌細胞の増殖を阻害する抗体についてスクリーニングし得る。1つの実施形態では、選り抜きの増殖阻害抗体は、約 0 . 5 ~ 3 0  $\mu$  g / m l の抗体濃度で、約 2 0 ~ 1 0 0 %、そして好ましくは約 5 0 ~ 1 0 0 %、細胞培養中の S K - B R - 3 細胞の増殖を阻害し得る。そのような抗体を同定するために、米国特許第 5 , 6 7 7 , 1 7 1 号に記載されている S K - B R - 3 アッセイが、行われ得る。このアッセイに従って、S K - B R - 3 細胞は、1 0 % ウシ胎児血清、グルタミンおよびペニシリン ストレプトマイシンを補充した、F 1 2 および D M E M 培養液の 1 : 1 の混合物中で増殖される。この S K - B R - 3 細胞は、3 5 mm 細胞培養皿 ( 2 m l / 3 5 mm 皿 ) 中に、2 0 , 0 0 0 細胞がプレーティングされた。0 . 5 ~ 3 0  $\mu$  g / m l の抗 E r b B 2 抗体が、1 皿当たりに加えられた。6 日後、未処理の細胞に対する細胞の数が、電動 C O U L T E R <sup>TM</sup> 細胞カウンターを使用して、計算された。S K - B R - 3 細胞の増殖を、約 2 0 ~ 1 0 0 % または約 5 0 ~ 1 0 0 % 阻害するこれらの中の抗体は、増殖阻害抗体として選択され得る。

【 0 2 1 2 】

細胞死を誘導する抗体を選択するために、例えば、P I 、トリパンブルーまたは 7 A A D の取り込みによって示される膜完全性の喪失が、コントロールに対して相対的に評価され得る。好ましいアッセイは、B T 4 7 4 細胞を使用する P I 取り込みアッセイである。このアッセイに従って、B T 4 7 4 細胞 ( アメリカンタイプカルチャーコレクション ( R o c k v i l l e , M D ) から得ることができる ) は、ダルベッコ改変イーグル培地 ( D - M E M ) : 1 0 % 热不活性 F B S ( H y c l o n e ) および 2 m M L - グルタミンが補充された H a m ' s F - 1 2 ( 5 0 : 5 0 ) 中で、培養される。( 従って、アッセイは、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で行なわれる ) 。B T 4 7 4 細胞は、1 0 0  $\times$  2 0 mm 皿 中で 1 皿当たり 3  $\times$  1 0 <sup>6</sup> の密度で播種され、そして一晩付着させた。培地が、次いで除去され、そして、新鮮な培地単独とか、または 1 0  $\mu$  g / m l の適切なモノクローナル抗体を含む培地で置換される。細胞は、3 日の期間インキュベートされる。それぞれの処理の後に、単層は、P B S で洗浄され、そしてトリプシン処理によって剥離される。次いで、細胞は、4 度 5 分間 1 2 0 0 r p m で遠心分離され、ペレットは、3 m l の氷冷した C a <sup>2+</sup> 結合緩衝液 ( 1 0 m M H e p e s , p H 7 . 4 , 1 4 0 m M N a C l 、 2 . 5 m M C a C l <sub>2</sub> ) 中に再懸濁され、そして細胞凝集塊の除去のために、3 5 mm ストレーナーキャップの 1 2  $\times$  7 5 チューブ ( 1 チューブ当たり 1 m l 、 1 処理群当たり 3 チューブ ) にアリコートする。次いで、チューブは、P I ( 1 0  $\mu$  g / m l ) を受け入れる。サンプルは、F A C S C A N <sup>TM</sup> フローサイトメーターおよび F A C S C O N V E R T <sup>TM</sup> C e l l Q u e s t ソフトウェア ( B e c t o n D i c k i n s o n ) を使用して分析され得る。P I の取り込みによって決定される統計的に有意なレベルの細胞死を誘導するこれらの抗体は、細胞死誘導抗体として選択され得る。

【 0 2 1 3 】

アポトーシスを誘導する抗体を選択するために、B T 4 7 4 細胞を使用するアネキシン結合アッセイが利用可能である。B T 4 7 4 細胞は培養され、そして前の段落で議論されるように、シャーレに播種される。次いで、培地は、除去され、そして、新鮮な培地単独とか、または 1 0  $\mu$  g / m l の適切なモノクローナル抗体を含む培地で置換される。3 日間のインキュベート期間の後、単層は、P B S で洗浄され、そしてトリプシン処理によって剥離される。次いで、細胞死アッセイのために上記議論されたように、細胞は、遠心分

10

20

30

40

50

離され、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合緩衝液中に再懸濁され、そしてチューブにアリコートされた。次いで、チューブは、標識化アネキシン（例えば、アネキシンV-FITC）（1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を受け入れる。サンプルは、FACSCAN™フローサイトメーターおよびFACS CONVERT™CellQuestソフトウェア（Becton Dickinson）を使用して分析され得る。コントロールに対して、統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する、これらの抗体は、アポトーシス誘導抗体として選択される。

【0214】

アネキシン結合アッセイに加えて、BT474細胞を使用するDNA染色アッセイが利用できる。このアッセイを行なうために、前の2つの段落に記載されるように、目的の抗体で処理したBT474細胞は、37℃で2時間、9  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のHOECHST33342™と共にインキュベートされ、次いで、MODFITLT™ソフトウェア（Veility Software House）を使用して、EPICS ELITE™フローサイトメーター（Coulter Corporation）で分析された。未処理細胞（100%未満のアポトーシス細胞）より2倍以上大きい（好ましくは3倍以上）アポトーシス細胞の割合の変化を誘導する抗体は、このアッセイを使用して、アポトーシス促進性の（pro-apoptotic）抗体として選択され得る。

【0215】

目的の抗体によって結合されるErbb2上のエピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、慣用的な交差プロックアッセイ（例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, HarlowおよびDavid Lane編（1988）に記載されるようなアッセイ）が行なわれ得る。あるいは、またはさらに、エピトープマッピングが、当該分野で公知の方法（例えば、本明細書中の図1Aおよび1Bを参照のこと）によって行なわれ得る。

【0216】

（免疫結合体）

本発明はまた、細胞障害性薬剤（例えば、化学治療剤、毒素（例えば、低分子毒素または細菌、真菌、植物または動物の起源由来の酵素学的に活性な毒素（そのフラグメントおよび/または変異体を含む））、または放射活性同位体（すなわち、放射性結合体））に結合体化する抗体を含む免疫結合体に関する。

【0217】

そのような免疫結合体の生成に有用な化学治療剤が、上記に記載されている。抗体および1つ以上の低分子毒素（例えば、カリーチアミシン（Calicheamicin）、メイタンシン（米国特許第5,208,020号）、トリコテン（trichothene）、およびCC1065）の結合体もまた、本明細書中に意図される。

【0218】

本発明の1つの好ましい実施形態では、抗体は、1つ以上のメイタンシン分子（例えば、1つの抗体分子当たり、約1～約10のメイタンシン分子）に結合体化する。例えば、メイタンシンは、May-SH3に還元され得るMay-SS-Meに変換され得、そして改变抗体（Charilà、Cancer Research 52:127-131（1992））と反応してメイタンシノイド-抗体免疫結合体を生成し得る。

【0219】

別の目的の免疫結合体は、1つ以上のカリーチアミシン分子と結合体化する抗Erbb2抗体を含む。抗生物質のカリーチアミシンファミリーは、ピコモーラー以下の濃度で、二本鎖DNAの破壊を起こすことが可能である。使用され得るカリーチアミシンの構造アナログとしては、 ${}_1^{\text{I}}$ 、 ${}_2^{\text{I}}$ 、 ${}_3^{\text{I}}$ 、N-アセチル- ${}_1^{\text{I}}$ 、PSAGおよび ${}_1^{\text{I}}$ が挙げられるがそれらに限定されない（Hinmanら、Cancer Research 53:3336-3342（1993）およびLodeら、Cancer Research 58:2925-2928（1998））。米国特許第5,714,586号；同第5,712,374号；同第5,264,586号；および同第5,773,050

01号(これらは、本明細書中に参考として明確に援用される)もまた、参照のこと)。

【0220】

使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(*Pseudomonas aeruginosa*由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(*modessin*)A鎖、-サルシン(*sarcin*)、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン(*dianthin*)タンパク質、*Phytolaca americana*タンパク質(*PAPI*, *PAPII*, および*PAP-S*)、*momordica charantia*インヒビター、カーシン(*curcinn*)、クロチン(*crotin*)、*sapaponaria officinalis*インヒビター、ゲロンニン(*gelonin*)、マイトジェリン(*mitogellin*)、レストリクトシン、フェノマイシン(*phenomycin*)、エノマイシン(*enomycin*)、およびトリコテセン(*tricotecene*)が挙げられる。例えば、1993年10月28日公開のWO93/21232を参照のこと。

【0221】

本発明はさらに、抗体と核酸溶解活性(例えば、リボヌクレアーゼまたはデオキシリボヌクレアーゼ(*DNAse*)のようなDNAエンドヌクレアーゼ)を有する化合物との間で形成される免疫結合体を意図する。

【0222】

種々の放射活性同位体は、放射性結合体化抗Erbb2抗体の精製のために利用可能である。例としては、*At<sup>211</sup>*, *I<sup>131</sup>*, *I<sup>125</sup>*, *Y<sup>90</sup>*, *Re<sup>186</sup>*, *Re<sup>188</sup>*, *Sm<sup>153</sup>*, *Bi<sup>212</sup>*, *P<sup>32</sup>*およびLuの放射性アイソトープが挙げられる。

【0223】

抗体および細胞障害性薬剤の結合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤(例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ビリジルジチオール)プロピネート(*SPDP*)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(*iminothiolane*)(*IT*))、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピン酸HCL)、活性化エステル(例えば、ジスクシンイミジルスペリン酸)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(*p*-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(*p*-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、およびビス-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して行なわれ得る。例えば、リシン免疫毒素は、*Vitetta*、*Science* 238:1098(1987)に記載されるように、調製され得る。炭素14標識した1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(*MX-DTPA*)は、抗体への放射性ヌクレオチドの結合体化についての例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。そのリンカーは、細胞中の細胞障害性薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー(*Charila*、*Cancer Research* 52:127-131(1992))が使用され得る。

【0224】

あるいは、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって、抗Erbb2抗体および細胞障害性薬剤を含む融合タンパク質が、作製され得る。

【0225】

なお別の実施形態では、抗体は、標的化される前の腫瘍(ここで、抗体-レセプター結合体が患者に投与される)での利用のための「レセプター」(ストレプトアビシンなど)に結合体化され得、引き続き除去剤を使用して、未結合の結合体を循環より除去し、次いで、細胞障害性薬剤(例えば、放射性ヌクレオチド)に結合体化される「リガンド」(例えば、アビシン)を投与する。

10

20

30

40

50

## 【0226】

(抗体依存酵素媒介性プロドラッグ治療 (A D E P T))

本発明の抗体はまた、プロドラッグ(例えば、ペプチジル化学治療剤 (W O 8 1 / 0 1 1 4 5 を参照のこと))を活性な抗癌剤に変換するプロドラッグ活性化酵素に抗体を結合体化させることによって、A D E P Tにおいて使用され得る。例えば、W O 8 8 / 0 7 3 7 8 および米国特許第4,975,278号を参照のこと。

## 【0227】

A D E P T に有用な免疫結合体の酵素成分は、そのような方法で、プロドラッグに對して作用し得る任意の酵素を含み、その結果、プロドラッグをそのより活性な細胞障害性形態に変換する。

10

## 【0228】

本発明の方法において有用な酵素としては、リン酸含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；サルフェート含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；非毒素性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；例えば、セラチア属プロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン(例えば、カテプシンBおよびL)などのプロテアーゼ(これらはペプチド含有プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用である)；D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシリ化プロドラッグを遊離薬物に変換するのに有用な、例えば、-ガラクトシダーゼおよびノイラミニラーゼなどの炭水化物切断酵素；-ラクタムで誘導した薬物を遊離薬物に変換するのに有用な-ラクタマーゼ；そしてそれらのアミンの窒素が、それぞれフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基を用いて誘導体化された薬物を、遊離薬物に変換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼが挙げられるが、それらに限定されない。あるいは、酵素活性を有する抗体(また、当該分野で「アブザイム」として公知である)は、本発明のプロドラッグを、遊離活性薬物に変換するのに使用され得る(例えば、Massey, Nature 328: 457-458(1987)を参照のこと)。抗体-アブザイム結合体は、本明細書中に記載されるように、腫瘍細胞集団へのアブザイムの送達のために調製され得る。

20

## 【0229】

30

本発明の酵素は、上記に議論されたヘテロ二官能性架橋試薬の使用のような当該分野で周知の技術によって、抗ErbB2抗体に共有結合され得る。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結された、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域を含む融合タンパク質は、当該分野で周知の組換えDNA技術(例えば、Neuberg et al., Nature 312: 604-608(1984)を参照のこと)を使用して構築され得る。

## 【0230】

40

(他の抗体改変)

抗体の他の改変は、本明細書中に意図される。例えば、抗体は、種々の非タンパク様ポリマー(例えば、ポリエチレンギリコール、ポリプロピレンギリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレンギリコールおよびポリプロピレンギリコールのコポリマー)の1つに連結され得る。抗体はまた、1つ以上の種々の異なる部分(例えば、蛍光標識)、既知の電気泳動移動部分、または特定のリンカー分子を切断し得る部分に連結され得るか、あるいは代替的にこれらの部分に連結され得る。

## 【0231】

50

抗体はまた、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中か、またはマクロエマルジョン中に、例えば、コアセルベーション技術によるかまたは界面のポリマー化(例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタキシレート)マイクロカプセル)によって調製されたマイクロカプセル中に包括

され得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版、Oslo, A. 編(1980)において開示される。

【0232】

本明細書中に開示された抗ErbB2抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、例えば、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688(1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号; ならびに1997年10月23日公開のWO97/38731に記載されるような当該分野で公知の方法によって調製される。増強された循環時間有するリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示される。

10

【0233】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含むリピド組成物を用いる逆相エバボレーション法によって作製され得る。リポソームは、所望の半径を有するリポソームを得るために、規定の細孔のサイズのフィルターを通して押し出される。本発明の抗体のFab'フラグメントは、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら、J. Biol. Chem., 57:286-288(1982)に記載されるように、リポソームに結合体化され得る化学治療剤は、必要に応じて、リポソーム内に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)を参照のこと。

20

【0234】

(ベクター、宿主細胞および組換え方法)

本発明はまた、ヒト化抗ErbB2抗体を含む抗体をコードする単離された核酸、この核酸を含むベクターおよび宿主細胞、ならびにこの抗体作製のための組換え技術を提供する。抗体の組換え作製のために、その抗体をコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(DNAの增幅)または発現のために複製可能ベクター中に挿入される。モノクローナル抗体をコードするDNAは、容易に単離され、従来的な手順を使用して(例えば、その抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)配列決定される。多くのベクターが利用可能である。このベクターの成分としては、一般的に、シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、転写終結配列のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0235】

(シグナル配列成分)

抗ErbB2抗体は、直接的に組換えによって作製されるばかりではなく、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換えによって作製され得る。この異種ポリペプチドは、好ましくは、シグナル配列またはその成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端で特異的な切断部位を有する他のポリペプチドである。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識され、そしてプロセシングを受ける(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)シグナル配列である。天然の抗ErbB2抗体シグナル配列を認識せず、プロセシングしない原核生物宿主細胞に関しては、シグナル配列は、例えば、以下、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1ppまたは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母の分泌に関しては、天然のシグナル配列は、例えば、酵母インペルターゼリーダー、因子リーダー(Saccharomyces因子リーダーおよびKluyveromyces因子リーダー)または酸ホスファターゼリーダー、C. albicansグルコアミラーゼリーダーまたはWO90/13646に記載されるシグナルによって置換され得る。哺乳動物細胞の発現に関しては、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー(例えば、単純ヘルペスgDシグナル)が利用可能である。

40

【0236】

50

このような前駆体領域に対するDNAは、抗ErbB2抗体をコードするDNAのリーディングフレームに連結される。

【0237】

(複製起点成分)

発現ベクターおよびクローニングベクターの両方とも、1つ以上の選択された宿主細胞内で、ベクターが複製するのを可能にする核酸配列を含む。一般的に、クローニングベクター内では、この配列は、ベクターが、宿主の染色体DNAとは独立して複製することを可能にする配列であり、複製起点または独立に複製する配列を含む。このような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスについて、周知である。プラスミドpBR322由来の複製起点は、ほとんどのグラム陰性細菌に対して適しており、2μプラスミド起点は、酵母に適している。そして、種々のウイルス起源(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV)が、哺乳動物細胞中のクローニングベクターに対して有用である。一般的に、複製成分の起点は、哺乳動物の発現ベクターには必要ではない(SV40起点は、初期プロモーターを含むという理由のみで代表的に使用され得る)。

10

【0238】

(選択遺伝子成分)

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択遺伝子(選択マーカーとも呼ばれる)を含み得る。代表的な選択遺伝子は、(a)抗生物質または他の毒素(例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリン)に耐性を与え、(b)栄養要求性欠損を補完し、または、(c)天然培地からは利用不可能な重要な栄養分(例えば、*Bacillus*属に対しては、D-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子)を提供するタンパク質をコードする。

20

【0239】

選択スキームの一つの実施例は、宿主細胞の増殖を阻止する薬物を使用する。異種遺伝子を首尾よく形質転換された細胞は、薬物耐性を与えるタンパク質を作製し、そのため、選択方式を生存する。このような優性選択の実施例は、薬物(ネオマイシン、ミコフェノール酸およびハイグロマイシン)を使用する。

【0240】

哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの別の例は、抗ErbB2抗体核酸(例えば、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-Iおよびメタロチオネイン-II、好ましくは、靈長類のメタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなど)を処理する細胞成分の同定を可能にするマーカーである。

30

【0241】

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換した細胞は、最初に、DHFRの競合アンタゴニストであるメトトレキサート(Mtx)を含有する培養培地で、全ての形質転換体の培養により同定される。野生型DHFRが使用される場合、適切な宿主細胞は、DHFR活性を欠損したチャイニーズハムスターの卵巣(CHO)細胞株である。

【0242】

あるいは、抗ErbB2抗体、野生型DHFRタンパク質をコードするDNA配列および別の選択マーカー(例えば、アミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH))で、形質転換したか、または、同時形質転換した宿主細胞(特に、内生のDHFRを含む野生型宿主)は、選択マーカー(例えば、アミノグリコシド系抗生物質(カナマイシン、ネオマイシンまたはG418など))に対する選択薬剤を含有する培地中での細胞増殖によって選択され得る。例えば、米国特許第4,965,199号を参照のこと。

40

【0243】

酵母において使用するための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcombら、Nature、282:39(1979))。trp1遺伝子は、トリプトファン中で増殖する能力を欠如する酵母の変異体株(例えば、ATCC番号44076またはATCC番号PEP4-1、Jones、Genetics、85:12(1977))に対する選択マーカーを提供する。次いで、酵

50

母宿主細胞ゲノム中の *trp1* 損傷の存在は、トリプトファンの非存在下での増殖によって、形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、*Leu2* 欠損酵母株 (ATCC20, 622 または ATCC38, 626) は、*Leu2* 遺伝子を有する公知のプラスミドによって補完される。

【0244】

さらに、1.6  $\mu$ mの環状プラスミド pKD1 由来のベクターは、*Kluyveromyces* 酵母の形質転換に使用され得る。あるいは、組換えウシキモシンの大規模作製に対する発現系は、*K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology 10 1990, 8: 135 によって報告された。*Kluyveromyces* の産業用株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための適切な多コピー発現ベクターが、開示されている (Fleerら, Bio/Technology, 9: 968~975 (1991))。

【0245】

(プロモーター成分)

発現ベクターおよびクローニングベクターは通常、宿主生物によって識別され、かつ抗 *Erbb2* 抗体核酸に作動可能に連結するプロモーターを有する。原核細胞宿主との使用に適したプロモーターとしては、*phoA* プロモーター、ラクタマーゼプロモーター系およびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (*trp*) プロモーター系ならびにハイブリッドプロモーター (例えば、*tac* プロモーター) が挙げられる。しかし、他の公知の細菌のプロモーターも適している。細菌系での使用のためのプロモーターはまた、抗 *Erbb2* 抗体をコードする DNA に作動可能に結合した *Shine-Dalgarno* (S.D.) 配列を含む。 20

【0246】

真核生物に対するプロモーター配列は、公知である。実質的に全ての真核生物遺伝子は、転写が開始される位置から約 25~30 塩基上流に位置する AT リッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始点から 70~80 塩基上流に見出される別の配列は、CNCATA 領域であって、ここで、N は任意のヌクレオチドであり得る。ほとんどの真核生物遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A テールの付加のためのシグナルであり得る AATAAA が存在し得る。これらの配列は全て、真核生物の発現ベクター中に適切に挿入される。 30

【0247】

酵母宿主とともに使用するための適切なプロモーター配列の例としては、以下に対するプロモーターが挙げられる：3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、他の糖分解キナーゼ (例えば、エノラーゼ)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソゲナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼ。

【0248】

増殖条件によって制御される転写物のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトクロム C、酸ホスファターゼ、窒素代謝に関連した分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3 リン酸デヒドロゲナーゼおよびマルトースおよびガラクトース利用を担う酵素に対するプロモーター領域である。酵母の発現に使用するための適切なベクターおよびプロモーターは、さらに EP73657 に記載される。酵母エンハンサーはまた、酵母プロモーターとともに、有利に使用される。 40

【0249】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの抗 *Erbb2* 抗体転写は、例えば、ウイルス (例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス (例えば、アデノウイルス 2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルスおよび、最も好ましくは、サルウイルス 40 (SV40)) のゲノ 50

ムから得られるプロモーター、異種哺乳動物プロモーター（例えば、作動プロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター）から得られるプロモーター、熱ショックプロモーターによって制御される。但し、このようなプロモーターは、これらの細胞系と適合性である。

【0250】

S V 4 0 ウィルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターは、S V 4 0 ウィルスの複製起点も含むS V 4 0 制限フラグメントとして、好都合に入手される。ヒトサイトメガロウイルスの極初期プロモーターは、H i n d I I I E 制限酵素フラグメントとして、好都合に入手される。ベクターとして、ウシ乳頭腫ウイルスを使用する哺乳動物宿主においてD N Aを発現するための系は、米国特許第4,419,446号中に開示される。この系の改変は、米国特許第4,601,978号中に記載される。ヘルペス単純ウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞でのヒト-インテグリンc D N Aの発現については、R e y e sら、N a t u r e、297:598~601(1982)も参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復は、そのプロモーターとして使用され得る。

【0251】

(エンハンサー要素成分)

高等真核生物による本発明の抗E r b B 2 抗体をコードするD N Aの転写は、多くの場合、そのベクターにエンハンサー配列を挿入することによって増加され得る。哺乳動物遺伝子（グロブリン、エラスターーゼ、アルブミン、フェトプロテインおよびインスリン）由来の多くのエンハンサー配列が現在公知である。しかし、代表的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用される。実施例は、複製起点（1 0 0 ~ 2 7 0 b p）の下流側のS V 4 0 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の下流側のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーを含む。真核生物プロモーターの活性化についてのエンハンサー要素については、Y a n i v、N a t u r e、297:17~18(1982)も参照のこと。このエンハンサーは、5'位または3'位で、抗E r b B 2 抗体コード配列に、再接合され得るが、好ましくは、そのプロモーターの5'部位に位置する。

【0252】

(転写終結成分)

真核宿主細胞（酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物由来の有核細胞）で使用される発現ベクターはまた、転写の終結に必要な配列およびm R N Aの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、一般的に、真核生物またはウイルスのD N Aまたはc D N Aの5'および、時には3'（真核生物またはウイルスのD N Aまたはc D N Aの非翻訳領域）から利用可能である。これらの領域は、抗E r b B 2 抗体をコードするm R N Aの非翻訳部分中のポリアデニル化フラグメントとして転写される核酸断フラグメントを含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 およびそこに開示される発現ベクターを参照のこと。

【0253】

(宿主細胞の選択および形質転換)

本明細書中のベクターにおいて、D N Aをクローニングするかまたは発現するのに適した宿主細胞は、原核細胞、酵母細胞または上記の真核細胞である。この目的に適した原核生物としては、真正細菌（例えば、グラム陰性生物またはグラム陽性生物（例えば、E s c h e r i c h i a ( 例えは、E . c o l i など ) といつた E n t e r o b a c t e r i a c e a e 、 E n t e r o b a c t e r 、 E r w i n i a 、 K l e b s i e l l a 、 P r o t e u s 、 S a l m o n e l l a ( 例えは、S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m など ) 、 S e r r a t i a ( 例えは、S e r r a t i a m a r c e s c a n s など ) および S h i g e l l a ならびに B a c i l l i ( B . s u b t i l i s および B . l i c h e n i f o r m i s など ( 例えは、B . l i c h e n i f o r m i s は 1 9 8 9 年 4 月 1 2 日に公開された D D 2 6 6 , 7 1 0 の 4 1 ページに開示される ) ) 、 P s e u

10

20

30

40

50

domonas (*P. aeruginosa*など) ならびに *Streptomyces* が挙げられる。宿主をクローニングする1つの好ましい *E. coli* は、*E. coli* 294 (ATCC 31,446) であるが、他の株(例えば、*E. coli* B、*E. coli* X1776 (ATCC 31,537) および *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) も適している。これらの例は、限定的というよりはむしろ例示的である。

【0254】

原核生物に加えて、真核微生物(例えば、糸状菌または酵母)が、抗 *Erbb2* 抗体をコードするベクターに対するクローニングまたは発現のための適した宿主である。 *Saccharomyces cerevisiae* または一般的なパン酵母は、下等真核生物宿主微生物の内で最も一般的に使用される。しかし、他の多くの属、種および株(例えば、*Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces* 宿主(例えば、*K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12,424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16,045)、*K. wickeremii* (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、*K. drosophilicarum* (ATCC 36,906)、*K. thermotolerans* および *K. marxianus*; *yarrowiae* (EP402,226); *Phichiapastoris* (EP183,070); *Candida*; *Trichodermareesiae* (EP244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*(例えば、*Schwanniomyces occidentalis*) および糸状菌(例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tolypocladium*) および *Aspergillus*宿主(例えば、*A. nidulans* および *A. niger*))が、本明細書中では、一般的に利用可能であって、かつ有用である。

【0255】

グリコシリ化抗 *Erbb2* 抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物由来である。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。多くのバキュロウイルス株および改变体ならびに宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞(例えば、*Spodoptera frugiperda*(毛虫)、*Aedes aegypti*(蚊)、*Aedes albopictus*(蚊)、*Drosophila melanogaster*(ショウジョウバエ) および *Bombyx mori*)が同定されている。トランسفェクトのための種々のウイルス株は、市販されており、例えば、*Autographa californica NPV* の L-1 改変体および *Bombyx mori NPV* の Bm-5 株ならびにそのようなウイルスが、本発明に記載の本明細書中のウイルスとして使用され得、特に、*Spodoptera frugiperda* 細胞のトランسفェクションのために使用され得る。

【0256】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物もまた宿主として使用され得る。

【0257】

しかし、関心は脊椎動物細胞で最も高く、培養(組織培養)における脊椎動物細胞の増殖が、慣用的な手順になってきた。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、*SV40* で形質転換したサル腎臓 CV1 株 (COS-7、ATCC CRL 1651); ヒト胚腎臓株 (293 細胞または懸濁培養で増殖するためにサブクローニングした 293 細胞 (Grahamら、*J. Gen. Virol.* 36:59 (1977)); 仔ハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Urbaubら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather、*Biol. Reprod.* 23:243~251 (1980)); サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70); アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587);

ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL34)；バッファローラット (buffalo rat) 肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL1442)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL75)；ヒト肝細胞 (Hep G2、HB8605)；マウス乳腺癌 (MMT 060562、ATCC CCL51) TRI細胞 (Mathewsら、Annals N.Y. Acad. Sci.、383: 44~68 (1982))；MRC5細胞；FS4細胞；およびヒト肝臓癌株 (Hep G2) である。

【0258】

宿主細胞は、抗Erbb2抗体作製のために、上記の発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換され、プロモーター、形質転換体を誘導するためまたは所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適切に改変した通常の栄養培地で培養される。

【0259】

(宿主細胞の培養)

本発明の抗Erbb2抗体を作製するために使用される宿主細胞は、種々の培地の中で培養され得る。市販の培地 (例えば、Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) および Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma)) が、宿主細胞の培養に適している。さらに、Hamら、Meth. Enz.、58: 44 (1979)、Barnesら、Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許第4,767,704号、同第4,657,866号、同第4,927,762号、同第4,560,655号、または同第5,122,469号、WO90/03430、WO87/00195、または米国再発行特許第30,985号に記載される任意の培地が、宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれもが、必要な場合、ホルモンおよび/または他の増殖因子 (例えば、インスリン、トランスフェリンまたは表皮増殖因子)、塩 (例えば、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムおよびリン酸塩)、緩衝液 (例えば、HEPES)、ヌクレオチド (例えば、アデノシンおよびチミジン)、抗生物質 (例えば、GENTAMYCIN (登録商標) 薬物)、微量元素 (通常、最終濃度で、 $\mu\text{mol}$  範囲で存在する無機化合物として定義される) ならびにグルコースまたは等価なエネルギー源が補充され得る。当業者に公知の他の必要な任意のサブリメントも、適切な濃度で含有され得る。培養条件 (例えば、温度、pHなど) は、発現のために選択された宿主細胞でこれまでにも使用されるが、当業者には明らかである。

【0260】

(抗Erbb2抗体の精製)

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、周辺質空間内または培地中に直接分泌されて作製され得る。抗体が、第1工程として、細胞内で作製される場合、微粒子破片 (宿主細胞または溶解したフラグメントのどちらか) は、例えば、遠心または限外ろ過により取り除かれる。Carterら、Bio/Technology、10: 163~167 (1992) は、E. coli のペリプラズム間隙に分泌される抗体を単離するための手順を記載する。簡単に説明すると、細胞のペーストを、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA およびフェニルメチルスルフォニルフルオライド (PMSF) の存在下で 30 分間に亘り解凍する。細胞の破片は、遠心により取り除かれ得る。抗体が培地中に分泌される場合、このような発現系由来の上清は一般的に、市販のタンパク質濃縮フィルター (例えば、Amicon または Millipore Pellicon 限外ろ過装置を使用します) で濃縮される。プロテアーゼインヒビター (例えば、PMSF) は、タンパク質分解を阻害するために、前述の任意の工程に含有され得、外来の汚染菌の増殖を防止するために抗生物質が含有され得る。

【0261】

それらの細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティクロマトグラフィーを使用して精

10

20

30

40

50

製され得、アフィニティクロマトグラフィーが好ましい精製技術である。プロテインAの親和性リガンドとしての適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト1重鎖、ヒト2重鎖またはヒト4重鎖に基いた抗体を精製するために使用され得る(Lindmarkら、J. Immunol. Meth.、62:1~13(1983))。プロテインGは、全てのマウスのアイソタイプおよびヒト3に対して推奨される(Gussら、EMBO J.、5:1567~1575(1986))。多くの場合、アフィニティリガンドがアガロースに付着するマトリックスが利用可能であるが、他のマトリックスも利用可能である。力学的に安定なマトリックス(例えば、制御された細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼン)は、アガロースを用いて達成され得る場合よりも速い流速を可能にし、そして、その場合よりも短い処理時間を可能にする。この抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX<sup>TM</sup>樹脂(J.T.Baker、Philipsburg、NJ)が精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術(例えば、イオン交換カラムにおける分画、エタノール沈殿、逆層HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE<sup>TM</sup>でのクロマトグラフィー、アニオン交換樹脂またはカチオン交換樹脂(例えば、ポリアスパラギン酸カラム)でのクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿)が回収される抗体に依存して利用可能である。10

#### 【0262】

任意の予備精製工程の後、目的の抗体および混入物を含む混合物は、約2.5と約4.5との間のpHで、溶出緩衝液を使用して、好ましくは、低塩濃度(例えば、約0~0.25M塩)で、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供され得る。20

#### 【0263】

##### (薬学的処方物)

本発明に従って使用される抗体の治療的処方物は、凍結乾燥した処方物または水性溶液の形態で、必要に応じて、薬学的に受容可能なキャリア、賦形剤または安定剤(Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Oso1, A.編(1980))と、所望の程度の純度を有する抗体を混合させることによって、貯蔵のために調製される。受容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して毒性はなく、そして例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド、ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；例えば、メチルパラベン(methyl paraben)またはプロピルパラベン(propyl paraben)などのアルキルパラベン(alkyl paraben)；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)ポリペチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；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、またはリジンなどのアミノ酸；单糖類、二糖類、および他の炭水化物(グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む)；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合体(例えば、亜鉛-タンパク質複合体)；および/またはTWEENT<sup>TM</sup>、PLURONICS<sup>TM</sup>またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性物質が挙げられる。好ましい凍結乾燥された抗Erbb2抗体処方物は、WO97/04801に記載され、本明細書中に参考として明確に援用される。30

#### 【0264】

本明細書中の処方物はまた、特定の適応症が処置されるために必要な1つを超える活性化合物を含み得、好ましくは、互いに悪影響を与えない補完的な活性を有する化合物である。例えば、1つの処方物において、EGFR、Erbb2(例えば、Erbb2上の異40

10

20

30

40

50

なったエピトープ)、ErbB3、ErbB4、または血管内皮因子(VEGF)に結合する抗体をさらに提供することが、所望であり得る。あるいは、またはさらに、その組成物は、化学療法剤、細胞障害性薬剤、サイトカイン、増殖阻害薬剤、抗ホルモン剤、EGFR標的化薬物、抗血管形成剤および/または心保護剤をさらに含み得る。そのような分子は、意図される目的のために効果的な量で、組み合わせて、適切に提供される。

【0265】

活性成分はまた、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)において、またはマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション(coacervation)技術によってまたは界面のポリマー化(例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース、またはゼラチン-ミクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)ミクロカプセル)によって調製されたミクロカプセルに捕捉され得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版、Osol, A. 編(1980)において開示される。

10

【0266】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の適切な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは、例えば、フィルム、またはミクロカプセルなどの成形品の形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、LUPRON DEPOT<sup>TM</sup>(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注入可能なミクロスフェア)のような分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ならびにポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

20

【0267】

インピボ投与で使用される処方物は、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過により容易に達成される。

【0268】

(抗ErbB2抗体での処置)

本発明に従って、抗ErbB2抗体を使用して、種々の疾患または障害を処置し得ることが、企図される。例示的な状態または障害としては、良性の腫瘍または悪性の腫瘍；白血病およびリンパ性悪性疾患；他の障害(例えば、ニューロン障害、グリア障害、星状細胞傷害、視床下部障害、腺障害、大食細胞傷害、上皮障害、間質障害、胞胚腔障害、炎症障害、脈管形成障害、および免疫学的障害)が挙げられる。好ましくは、抗ErbB2抗体を使用して、本明細書中で開示される方法によるこのような抗体での処置に応答性であると識別される腫瘍を処置する。

30

【0269】

一般に、処置される疾患または障害は、癌である。本明細書中で処置されるべき癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病またはリンパ球様悪性疾患が挙げられるが、これらに限定されない。このような癌のより具体的な例としては、扁平細胞癌(例えば、扁平上皮細胞癌)、肺癌(小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺の扁平上皮癌を含む)、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃癌(gastric cancer)または胃癌(stomach cancer)、肺腺癌、グリア芽細胞腫、子宮頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、腎臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌もしくは直腸癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌および癌腫、陰茎癌、ならびに頭部癌および頸部癌が挙げられる。好ましくは、処置される癌は、腫瘍サンプル中のHER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーの同定、あるいはErbB2レセプターのリン酸化に基づいて、抗ErbB2抗体での処置に応答性であるとして識別される。HER2/HER3ヘテロダイマー形成および/またはHER2/HER1ヘテロダイマー形成ならびに

40

50

/あるいはErbBレセプターのリン酸化が検出されると予期される、特定の群の癌としては、肺乳癌 (lung breast cancer)、肺癌、卵巣癌（進行した卵巣癌、難治性卵巣癌、または再発した卵巣癌を含む）、前立腺癌、結腸直腸癌、および膵臓癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0270】

一般的に、その癌はErbB2発現細胞を含み、その結果、本明細書中の抗ErbB2抗体は、この癌に結合し得る。この癌は、ErbB2レセプターの過剰発現によって特徴付けられ得る一方、本願は、ErbB2を過剰発現する癌ではないと考えられる癌の処置の方法をさらに提供する。癌におけるErbB2の発現を決定するために、種々の診断アッセイ/予後アッセイが利用可能である。1つの実施形態では、ErbB2の過剰発現は、IHCによって（例えば、HERCEPTEST（登録商標）（Dak o）を使用して）、分析され得る。腫瘍生検に由来するパラフィン埋包した組織切片が、IHCアッセイに供され得、そして以下のようなErbB2タンパク質染色強度基準に従った：

スコア0 染色は全く見られないかまたは膜染色が、10%未満の腫瘍細胞で観察される。

スコア1+ かすかな/からうじて知覚できる膜染色が、10%を越える腫瘍細胞で検出される。その細胞は、それらの膜の一部のみが染色されている。

スコア2+ 弱から中程度の完全な膜染色が、10%を越える腫瘍細胞で観察される。

スコア3+ 中程度から強い完全な膜染色が、10%を越える腫瘍細胞で観察される。

【0271】

ErbB2過剰発現の評価のための、スコア0または1+を有する腫瘍は、ErbB2を過剰発現しないとして特徴付けられ得、一方、スコア2+または3+を有する腫瘍は、ErbB2を過剰発現するとして特徴付けられ得る。

【0272】

あるいは、またはさらに、INFORM<sup>TM</sup> (Ventana, Arizona)によって販売される）またはPATHVISION<sup>TM</sup> (Vysis, Illinois)のようなFISHアッセイは、腫瘍におけるErbB2過剰発現の程度（存在する場合）を決定するために、ホルマリン固定されたパラフィン包埋した腫瘍組織で実行され得る。

【0273】

1つの実施形態において、癌は、EGFRを発現する（そして、EGFRを過剰発現し得るが、その必要はない）癌である。EGFRを発現または過剰発現し得る癌の例としては、扁平細胞癌（例えば、扁平上皮細胞癌）、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺腺癌および肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃癌（gastric cancer）または胃癌（stomach cancer）、膵臓癌、グリア芽細胞腫、子宮頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌もしくは子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌もしくは腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、ならびに頭部癌および頸部癌が挙げられる。

【0274】

本発明は、HER2を含むErbBヘテロダイマーのリガンド活性化をブロックする抗HER2抗体（例えば、モノクローナル抗体2C4またはrhUMAb-2C4）での処置に十分応答する可能性がある乳癌患者、前立腺癌患者（去勢抵抗性前立腺癌（CRPC））、および卵巣癌患者の識別に特に適切である。

【0275】

本明細書中で処置される癌は、ErbBレセプター（例えば、EGFR）の過剰な活性化によって特徴付けられる癌であり得る。このような過剰な活性化は、ErbBレセプターまたはErbBリガンドの過剰発現または増加した産生に起因し得る。本発明の1つの実施形態では、診断アッセイまたは予後アッセイは、患者の癌がErbBレセプターの過剰な活性化によって特徴付けられるかどうかを決定するために、実施される。例えば、癌におけるErbB遺伝子増幅および/またはErbBレセプターの過剰発現が、決定され

10

20

40

50

得る。このような増幅 / 過剰発現を決定するための種々のアッセイが、当該分野で利用可能であり、そして IHC、FISH および上に記載される分離 (shed) 抗原アッセイが含まれる。あるいは、またはさらに、その腫瘍におけるまたはその腫瘍に関連した Erbb2 リガンド (TGF- $\beta$  など) のレベルは、既知の手順に従って、決定され得る。このようなアッセイは、試験されるサンプル中にタンパク質および / またはそれをコードする核酸を検出し得る。1つの実施形態では、腫瘍における Erbb2 リガンドレベルは、免疫組織化学 (IHC) を使用して決定され得る；例えば、Scherlら、Clin. Cancer Research, 1: 545-550 (1995) を参照のこと。あるいは、またはさらに、試験されるサンプル中の Erbb2 リガンドをコードする核酸のレベルを、例えば、FISH、サザンプロットティング、または PCR 技術を介して評価し得る。

10

## 【0276】

さらに、Erbb2 レセプターまたは Erbb2 リガンドの過剰発現もしくは増幅は、インビオ診断アッセイ（例えば、検出される分子に結合する分子（抗体など）を投与することによって）を使用して評価され得、そして検出可能な標識（例えば、放射性同位体）でタグ化され、そして標識の位置決定のために、患者を外部走査する。

## 【0277】

処置される癌がホルモン独立性癌である場合、腫瘍中のホルモン（例えば、アンドロゲン）および / またはその同種のレセプターの発現が、例えば上に記載されるような、任意の種々の利用可能なアッセイを使用して評価され得る。あるいは、またはさらに、患者は、彼らが抗アンドロゲン治療にもはや応答しないという点でホルモン独立性癌を有するとして、診断され得る。

20

## 【0278】

特定の実施形態では、細胞傷害性薬剤と結合体化した抗 Erbb2 抗体を含む免疫結合体が、患者に投与される。好ましくは、免疫結合体および / またはその免疫結合体が結合される Erbb2 タンパク質は、細胞によって内部移行され、それが結合する癌細胞を殺す際に、免疫結合体の増加した治療効力を生じる。好ましい実施形態では、細胞傷害性薬剤は、癌細胞の核酸を標的とするかまたはそれに干渉する。そのような細胞傷害性薬剤の例としては、メイタンシノイド (maytansinoid)、カリッシュアミシン (calicheamicin)、リボヌクレアーゼおよび DNA エンドヌクレアーゼが挙げられる。

30

## 【0279】

特定の実施形態において、投与される抗体は、rhumaMAb 2C4 またはその機能的な等価物である。RhumaMAb 2C4 は、ヒト IgG1 フレームワーク配列に基づくヒト化モノクローナル抗体であり、2つの重鎖（449 残基）および2つの軽鎖（214 残基）からなる。RhumaMAb 2C4 は、軽鎖および重鎖のエピトープ結合領域における別の抗 HER2 抗体 HERCEPTIN (登録商標) (Trastuzumab (Trastuzumab)) と有意に異なる。結果として、rhumaMAb 2C4 は、HER2 の完全に異なるエピトープと結合する。本発明は、rhumaMAb 2C4 またはその機能的等価物での処置に対して応答性である癌を識別するための感度のよい方法を提供する。rhumaMAb 2C4 処置に対して応答性であるこのような癌は HER2 を過剰発現するために必要とされないことが、留意される。

40

## 【0280】

抗 Erbb2 抗体または免疫結合体は、公知の方法（静脈内投与（例えば、ボーラス投与）、または一定の期間にわたる継続的な注入（筋内経路、腹腔内経路、脳脊髄内経路、皮下経路、関節内経路、滑液包内経路、髄腔内経路、経口経路、局所経路、または吸入経路）などによる）に従って、ヒト患者に投与される。抗体の静脈内投与または皮下投与が、好ましい。

## 【0281】

他の治療レジメンは、抗 Erbb2 抗体の投与と組み合わせられ得る。その組み合わせられた投与は、別個の処方物または単一の薬学的処方物を使用する同時投与およびいずれ

50

かの順序での連続投与を含み、ここで、好ましくは、両方（または全て）の活性薬剤が、それらの生物学的活性を同時に発揮する期間が存在する。

【0282】

1つの好ましい実施形態では、患者は、2つの異なった抗ErbB2抗体で処置される。例えば、患者は、ErbB2レセプターのリガンド活性化をブロックする第一の抗ErbB2抗体、またはモノクローナル抗体2C4の生物学的特徴を有する抗体、および増殖阻害性である第二の抗ErbB2抗体（例えば、HERCEPTIN（登録商標））、またはErbB2過剰発現細胞のアポトーシスを誘導する抗ErbB2抗体（例えば、7C2、7F3またはそのヒト化改变体）で処置され得る。好ましくは、そのような組み合わせ治療は、相乗的な治療効果を生じる。例えば、HERCEPTIN（登録商標）を用いて患者を処置し得、その後、その患者がHERCEPTIN（登録商標）治療に対して応答しない場合に、rhUMAb 2C4を用いて処置し得る。別の実施形態において、その患者は、まず、rhUMAb 2C4で処置され得、その後、HERCEPTIN（登録商標）治療を受け得る。なおさらなる実施形態において、その患者は、rhUMAb 2C4およびHERCEPTIN（登録商標）の両方で同時に処置され得る。

【0283】

抗ErbB2抗体（単数または複数）の投与を、別の腫瘍関連抗原に対する抗体の投与と組み合わせることがまた、所望され得る。この場合、他の抗体は、例えば、EGFR、ErbB3、ErbB4、または血管内皮増殖因子（VEGF）に結合し得る。

【0284】

1つの実施形態では、本発明の処置は、抗ErbB2抗体（単数または複数）および1つ以上の化学療法剤または増殖阻害剤の組み合わせ投与を含み、異なった化学療法剤のカクテルの同時投与を含む。好ましい化学療法剤は、タキサン（パクリタキセルおよびドセタキセルなど）および/またはアントラサイクリン抗生物質を含む。そのような化学療法剤のための調製および投薬計画は、製造業者の指示に従って、または当業者によって経験的に決定されるように、使用され得る。このような化学療法のための調製および投薬計画はまた、Chemotherapy Service編、M.C.Perry, WilliamsおよびWilkins, Baltimore, MD (1992) に記載される。

【0285】

抗体は、このような分子について既知の投与量で、抗ホルモン化合物（例えば、タモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物；オナプリストン（EP 616 812を参照のこと）などの抗プロゲステロン；またはフルタミドのような抗アンドロゲン）と組み合わせられ得る。処置される癌が、ホルモン独立性の癌である場合、患者は、以前に抗ホルモン治療に供されたものであり得、そして癌が、ホルモン独立になった後、抗ErbB2抗体（および必要に応じて本明細書中に記載されるような他の薬剤）が患者に投与され得る。

【0286】

時々、（その治療に関連した心筋機能障害を予防または減少させる）心保護剤または1つ以上のサイトカインを患者に同時投与することはまた、有益であり得る。EGFR-標的化薬物または抗脈管形成剤がまた、同時投与され得る。上記の治療レジメンに加えて、患者は、癌細胞の外科的除去および/または照射治療に供され得る。

【0287】

本明細書中の抗ErbB2抗体はまた、上の定義の節で議論されたような、EGFR-標的化薬物と組合され得、補償的かつ潜在的に共同作用的な治療効果を生じる。

【0288】

抗体と組み合され得るさらなる薬物の例としては、カルボプラチニン、タキサン（例えば、パクリタキセルまたはドセタキセル）、ゲムシタビン、ナベルビン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、またはカルボプラチニン/ドセタキセルのようなこれらの任意の組み合わせのような化学療法剤；別の抗HER2抗体（例えば、HERCEPTIN（登録商標））のような増殖阻害抗HER2抗体または7C2または7F3のようなアポトーシスを誘導

10

20

30

40

50

する抗 H E R 2 抗体（そのヒト化改变体またはアフィニティ成熟した改变体を含む）；ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター；抗脈管形成剤（例えば、抗 V E G F 抗体）；E G F R 標的化薬物（例えば C 2 2 5 もしくは Z D 1 8 3 9 ）；サイトカイン（例えば、I L - 2 、I L - 1 2 、G - C S F もしくは G M - C S F ）；または上記の組み合わせが挙げられる。

【 0 2 8 9 】

任意の上記の同時投与された薬剤についての適切な投与量は、現在使用され、そして薬剤および抗 E r b B 2 抗体の組み合わされた作用（相乗作用）に起因して低下され得る。

【 0 2 9 0 】

疾患の予防または処置のために、抗体の適切な投与量は、上記に定義されるように、処置される疾患の型、疾患の重篤度および経過、抗体が予防目的または治療目的のために投与されるかどうか、以前の治療、患者の臨床履歴および抗体に対する応答、ならびに担当医の判断に依存する。抗体は、1回または一連の処置にわたって、患者に適切に投与される。疾患の型および重篤度に依存して、約 1  $\mu$  g / k g ~ 1 5 m g / k g ( 例えば、0 . 1 m g / k g ~ 2 0 m g / k g ) の抗体が、例えば、1回以上の別々の投与によるか、または継続的な注入によるかのいずれかで、患者に対する投与の最初の候補投与量である。典型的な1日毎の投与量は、約 1  $\mu$  g / k g ~ 1 0 0 m g / k g 以上の範囲であり得、上で述べられた因子に依存する。状態に依存して、数日またはそれ以上にわたる反復投与のために、疾患状態の所望の抑制が生じるまで、処置は持続される。抗体の好みの投与量は、約 0 . 0 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の範囲にある。従って、約 0 . 5 m g / k g 、 2 . 0 m g / k g 、 4 . 0 m g / k g または 1 0 m g / k g のうちの1つ以上の用量（またはその任意の組み合わせ）が、患者に投与され得る。そのような用量は、断続的に、例えば、1週毎または3週毎に投与され得る（例えば、その結果、その患者は、約 2 ~ 約 2 0 ( 例えば、約 6 ) 用量の抗 E r b B 2 抗体を受容する）。最初のより高い負荷用量、その後、1回以上のより低い用量が、投与され得る。例示的な投与レジメンは、約 4 m g / k g の最初の負荷用量、続いて約 2 m g / k g の E r b B 2 抗体の1週間毎の維持用量を投与する工程を包含する。しかし、他の投薬量レジメンは、有用であり得る。この療法の経過は、慣例的な技術およびアッセイによって、容易にモニターされる。

【 0 2 9 1 】

特定の実施形態において、r h u M A b 2 C 4 は、3週間毎に 4 2 0 m g の固定用量（70 k g の被検体に対して 1 k g 当たり 6 m g の用量と等しい）で投与される。処置は、より高い負荷投与量（例えば、8 4 0 m g 、体重 1 k g 当たり 1 2 m g に等しい）で開始され得る。これは、定常状態の血清濃度をより迅速に達成するためである。特定の投与レジメンがまた、以下の実施例で提供される。

【 0 2 9 2 】

患者に対する抗体タンパク質の投与は別として、本願は、遺伝子治療による抗体の投与を企図する。抗体をコードする核酸のそのような投与は、表現「治療的に有効量の抗体を投与する」によって、包含される。例えば、細胞内抗体を生成する遺伝子治療の使用に関する 1 9 9 6 年 3 月 1 4 日に公開された W O 9 6 / 0 7 3 2 1 を参照のこと。

【 0 2 9 3 】

患者細胞に核酸（必要に応じて、ベクターに含まれる）を投与する2つの主要なアプローチ（インビオおよびエキソビオ）が存在する。インビオ送達のために、核酸は、患者に直接注入され、通常、抗体が必要とされる部位に注入される。エキソビオ処置では、患者の細胞は取り出され、核酸は単離された細胞に導入され、そして改変細胞が、患者に直接か、または例えば、患者に移植される多孔性膜内に被包されてのいずれかで投与される（例えば、米国特許第 4 , 8 9 2 , 5 3 8 号および同 5 , 2 8 3 , 1 8 7 号を参照のこと）。核酸を生細胞に導入するために利用可能な種々の技術が存在する。この技術は、その核酸が、インビオで培養細胞へ、またはインビオで意図される宿主の細胞に移入されるかどうかに依存して、変動する。インビオでの哺乳動物細胞への核酸の移入のために適した技術としては、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細

10

20

20

30

40

50

胞融合、D E A E - デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などの使用が挙げられる。遺伝子のエキソビオ送達のために一般に使用されるベクターは、レトロウイルスである。

【0294】

現在好ましいインビオ核酸移入技術としては、ウイルスベクター（アデノウイルス、I型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ随伴ウイルスなど）および脂質ベースの系（遺伝子の脂質媒介性移入に有用な脂質は、例えば、D O T M A、D O P E およびD C - C h o 1である）でのトランスフェクションが挙げられる。いくつかの場合では、標的細胞を標的とする薬剤（細胞表面膜タンパク質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞のレセプターのリガンドなど）を核酸供給源に提供することが望ましい。リポソームが使用される場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、例えば、特定の細胞型に親和性のあるカプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環の際に内部移行を経験するタンパク質の抗体、および細胞内局在化を標的として細胞内半減期を増強するタンパク質を標的化するためそして／またはその取り込みを容易にするために使用され得る。レセプター媒介性エンドサイトーシス技術は、例えば、W u ら、J . B i o l . C h e m . 2 6 2 : 4 4 2 9 - 4 4 3 2 ( 1 9 8 7 ) ; およびW a g n e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 7 : 3 4 1 0 - 3 4 1 4 ( 1 9 9 0 ) により記載される。現在既知の遺伝子マーキングプロトコルおよび遺伝子治療プロトコルの総説については、A n d e r s o n ら、S c i e n c e , 2 5 6 : 8 0 8 - 8 1 3 ( 1 9 9 2 ) を参照のこと。またW O 9 3 / 2 5 6 7 3 およびそこに引用されている参考文献を参照のこと。

10

20

【0295】

（V. 製造品）

本発明の別の実施形態では、上記の障害の処置に有用な物質を含む製造品が、提供される。

【0296】

製造品は、容器と、容器上のラベルもしくはパッケージ挿入物または容器に付随したラベルもしくはパッケージ挿入物を含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリングなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の物質から形成され得る。この容器は、状態の処置に有効な組成物を保持し、そして滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通し得るストッパーを有するバイアルであり得る）。この組成物中の少なくとも1つの活性剤は、抗E r b B 2 抗体である。このラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が目的の状態（例えば、癌）を処置するために使用されることを示す。1つの実施形態において、ラベルまたはパッケージ挿入物は、E r b B 2 と結合する抗体を含む組成物が、腫瘍に苦しむ患者を処置するのに使用され得、この腫瘍において、H E R 2 / H E R 1 複合体および／またはH E R 2 / H E R 3 複合体および／またはH E R 2 / H E R 4 複合体の存在が識別されており、そして／またはE r b B レセプターのリン酸化が、検出されている。さらに、製造品は、（a）製造品に含まれる組成物を有する第一の容器（ここで、その組成物は、E r b B 2 に結合し、そしてE r b B 2 を過剰発現する癌細胞の増殖を阻害する第一の抗体を含む）；および（b）製造品に含まれる組成物を有する第二の容器（ここで、その組成物は、E r b B 2 に結合し、そしてE r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する第二の抗体を含む）を含み得る。本発明のこの実施形態における製造品は、第一および第二の抗体組成物が、H E R 2 / H E R 1 ヘテロダイマーおよび／またはH E R 2 / H E R 3 ヘテロダイマーおよび／またはH E R 2 / H E R 4 ヘテロダイマーの存在によって、かつ／あるいはE r b B レセプターのリン酸化によって特徴付けられる、癌を処置するために使用され得ることを示すパッケージ挿入物をさらに含み得る。さらに、このパッケージ挿入物は、組成物（E r b B 2 と結合し、E r b B レセプターのリガンド活性をブロックする抗体を含む）の使用者に、抗体での治療と前述の節で記載された任意の補助的治療（例えば、化学療法剤、E G F R 標的化薬物、抗脈管形成剤、抗ホルモン化合物、心保護剤および／またはサイトカイン）を組み合わせるよう指示し得る。あるいは、またはさらに

30

40

50

、製造品は、薬学的に受容可能な緩衝液（注入のための静菌水（B W F I）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液など）を含む第二（または第三）の容器をさらに含み得る。それは、商業的観点および利用者の観点から所望される他の物質をさらに含み得、これらの物質としては、他の緩衝液、希釀液、フィルター、針、およびシリングが挙げられる。

【0297】

抗体はまた、診断アッセイにおいて使用され得る。一般的に、この抗体は、上記方法に記載されるように標識される。簡便さのため、本発明の抗体は、キット（すなわち、診断アッセイを実行するための指示書とともに、所定の量の試薬の包装された組み合わせ）で提供され得る。抗体が酵素で標識される場合、キットは、基質および酵素に必要な補因子（例えば、検出可能な発色団または発蛍光団を提供する基質前駆体）を含む。さらに、他の添加剤（例えば、安定化剤、緩衝剤（例えば、ロック緩衝液または溶解緩衝液）などを含み得る。種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中の濃度を提供するように、幅広く変化し得る。特に、この試薬は、乾燥粉末として提供され得、これは、通常凍結乾燥され、溶解の際に、適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む。

【0298】

（物質の寄託）

以下のハイブリドーマ細胞株は、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC) に寄託された：

抗体名称	ATCC番号	寄託日
7C2	ATCC HB-12215	1996年10月17日
7F3	ATCC HB-12216	1996年10月17日
4D5	ATCC CRL10463	1990年 5月24日
2C4	ATCC HB-12697	1999年 4月 8日

先に記載された明細書は、当業者が本発明を実行し得るのに十分であると考えられる。本発明は、寄託された構築物によって範囲を制限されるべきではない。なぜなら、寄託された実施形態は、本発明の特定の局面のみを説明することを意図し、そして機能的等価物である任意の構築物が、本発明の範囲内である。本明細書中の物質の寄託は、本明細書中に含まれる記載された説明は、本発明の任意の局面（そのベストモードを含む）の実行を可能にするのに不適切であるという容認を構成せず、特許請求の範囲を制限するとして解釈されるべきではない。実際、示されるものおよび本明細書中に記載されるものに加えて、本発明の種々の改変は、先の記載から当業者に明らかになり、添付の特許請求の範囲内に入る。

【0299】

特定の問題または状態に対する本発明の教示の適用が、本明細書中に含まれる教示を考慮して、当業者の能力の範囲内であることが理解される。

【0300】

本発明のさらなる詳細は、以下の非制限的な実施例によって例示される。明細書中の全ての引用文献の開示は、本明細書中に参考として明確に援用される。

【実施例】

【0301】

（実施例1）

（ErbB2とErbB3とのHRG依存性の結合は、モノクローナル抗体2C4によって遮断される）

マウスモノクローナル抗体2C4（ErbB2の細胞外ドメインに特異的に結合する）は、WO01/89566（この開示は、その全体が、参考として明確に援用される）に記載される。

【0302】

10

20

30

40

50

ErbB3がErbB2と結合する能力は、同時免疫沈降実験において試験された。1.0 × 10<sup>6</sup> MCF7またはSK-BR-3細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS)および10 mM HEPES、pH 7.2(増殖培地)を含む50:50 DMEM/HamのF12培地において6ウェル組織培養プレートにおいて播種し、そして一晩結合させた。細胞を、実験を開始する前に、血清無しで増殖培地で2時間枯渇させた。細胞を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で手短に洗浄し、次いで、10 mM HEPES、pH 7.2(結合緩衝液)とともに、または結合緩衝液のみ(コントロール)で、0.2%w/vウシ血清アルブミン(BSA)、 RPMI培地で希釈された100 nMの示された抗体とともにインキュベートした。室温で1時間後、HRGは、ウェルの半分(+)に5 nMの最終濃度に添加した。結合緩衝液の類似の容量は、他のウェル(-)に添加された。インキュベーションを、約10分間継続した。  
10

#### 【0303】

上清を吸引によって除去し、そして細胞をRPMI、10 mM HEPES、pH 7.2、1.0%v/v TRITON X-100<sup>TM</sup>、1.0%w/v CHAPS(溶解緩衝液)(0.2 mM PMSF、10 μg/mlロイペプチド、および10 TU/mlアプロチニンを含む)中に溶解した。溶解物を遠心分離によって不溶性材料から除去した。

#### 【0304】

ErbB2を、アフィニティーゲル(Affiprep 10、Bio-Rad)に共有結合したモノクローナル抗体を使用して免疫沈降した。この抗体(Ab-3、Oncogene Sciences, USA)は、細胞質ドメインエピトープを認識する。免疫沈降を、10 μlのゲルスラリー(約8.5 μgの固定化抗体を含む)を各溶解物に添加することによって実行し、サンプルを室温で2時間混合させた。次いで、ゲルを遠心分離によって回収した。ゲルを溶解緩衝液を用いて3回バッヂで洗浄し、未結合の材料を除去した。次いで、SDSサンプル緩衝液を添加し、そしてサンプルを沸騰する水浴中で簡単に加熱した。  
20

#### 【0305】

上清を、4~12%ポリアクリルアミドゲルにおいて電気泳動し、そしてニトロセルロース膜にエレクトロプロットした。ErbB3の存在を、その細胞質ドメインエピトープに対するポリクローナル抗体でプロットをプローブすることによって評価した(c-17、Santa Cruz Biotech)。プロットを、化学発光基質(ECL、Amersham)を使用して可視化した。  
30

#### 【0306】

MCF7およびSK-BR-3細胞のそれぞれについて、図2Aおよび2Bのコントロールレーンに示されるように、ErbB3は、細胞がHRGで刺激された場合のみ、ErbB2免疫沈降物に存在した。細胞がモノクローナル抗体2C4とともに最初にインキュベートされた場合、ErbB3シグナルを、MCF7細胞(図5A、レーン2C4+)において廃棄するかまたはSK-BR-3細胞(図5B、レーン2C4+)において実質的に減少させた。図2A~Bに示されるように、モノクローナル抗体2C4は、HERC EPTIN(登録商標)よりも実質的に効率的に、MCF7細胞およびSK-BR-3細胞の両方においてErbB3とErbB2とのヘレグリン依存性会合を遮断する。HERC EPTIN(登録商標)を伴う予備インキュベーションは、MCF7溶解物におけるErbB3シグナルを減少したが、SK-BR-3溶解物から同時沈殿されるErbB3の量に対してほとんどまたは全く効果を有さなかった。EGFレセプター(Ab-1、Oncogene Sciences, USA)に対する抗体を伴う予備インキュベーションは、いずれの細胞株中においても、ErbB3がErbB2と同時沈殿する能力に対していかなる効果も有さなかった。  
40

#### 【0307】

(実施例2)

(細胞株およびヒト腫瘍異種移植片モデルの2C4に対する応答)

50

約40の腫瘍モデルを、2C4に対する応答について試験した。これらのモデルは、主要な癌（例えば、乳房、肺、前立腺および結腸）を表す。モデルの50～60%が2C4処置に応答した。以下の表1は、2C4に対する応答について試験した選択された腫瘍モデルを列挙する。簡単に述べると、約3mmの大きさのヒト腫瘍異種移植片フラグメントを、無胸腺症ヌードマウスの皮膚の下部に移植した。あるいは、インピトロで増殖したヒト腫瘍細胞を、培養ディッシュから脱着させ、リン酸緩衝化生理食塩水中で再懸濁させ、そして免疫無防備状態のマウスの脇腹に皮下的に注射した。腫瘍の増殖を、電気カリバーを使用して、2～3日毎にモニターした。腫瘍が30～100mmの大きさに達した場合、動物を異なる処置群およびコントロール群に無作為化した。2C4を、毎週1回、腹腔内注射によって投与した。コントロール動物は、処置群と同じスケジュールで、抗体を含まない同じ容量のビヒクル溶液を受容した。研究を、約3～6週間後に終わり、このとき、コントロール群の腫瘍が、約1000～1500mm<sup>3</sup>の大きさに達した。処置に対する応答を、50%以上の腫瘍容積の減少として規定した。

【0308】

【表2】

表1:異種移植片モデル

モデル番号	腫瘍モデル	2C4に対する応答	参考文献
1	LXFA 289	無し	(Fiebig et al., 1999)
2	LXFA 297	有り	
3	LXFA 526	無し	(Fiebig et al., 1999)
4	LXFA 629	有り	(Fiebig and Burger, 2002)
5	LXFA 1041	無し	
6	LXFE 211	無し	(Fiebig et al., 1999)
7	LXFE 397	無し	(Fiebig et al., 1999)
8	LXFL 529	無し	(Burger et al., 2001)
9	LXFL 1072	有り	(Fiebig et al., 1999)
10	Calu-3	有り	(Stein et al., 2001)
11	NCI-H522	有り	(Yamori et al., 1997)
12	NCI-H322	無し	(Zou et al., 2001)
13	NCI-H441(KAM)	有り	(Gridley et al., 1996)
14	MAXF MX1	無し	
15	MAXF 401	無し	(Fiebig et al., 1999)
16	MAXF 449	有り	(Burger et al., 2001)
17	MAXF 713	無し	(Berger et al., 1992)
18	MAXF 857	無し	(Fiebig et al., 1999)

【0309】

これらのモデルは、2つの主要な腫瘍型（すなわち、非小細胞肺癌（NSCLC；モデル番号1～13）および乳癌（モデル番号14～18）を表す。NSCLCモデルのうちの9匹（番号1～9）および全ての乳癌モデルは、免疫欠損マウスにおいてヒト腫瘍フラグメントのインビオ継代における連続により由來した。残りのNSCLCモデル（番号10～13）は、インビオ腫瘍増殖が、免疫無防備マウス内にインピトロ伝播した細胞の移植によって誘導される。

【0310】

10

20

30

40

## 【表3】

- Berger, D. P., Winterhalter, B. R., and Fiebig, H. H. (1992). Establishment and Characterization of Human Tumor Xenografts in Thymus-Aplastic Nude Mice. In Immunodeficient Mice in Oncology, H. H. Fiebig and D. P. Berger, eds. (Basel: Karger), pp. 23-46. 10
- Burger, A. M., Hartung, G., Stehle, G., Sinn, H., and Fiebig, H. H. (2001). Pre-clinical evaluation of a methotrexate-albumin conjugate (MTX-HSA) in human tumor xenografts in vivo. *Int. J. Cancer*, 92:718-24.
- Fiebig, H. H., and Burger, A. M. (2002). Human Tumor Xenografts and Explants. In Tumor Models in Cancer Research, B. A. Teicher, ed. (Totowa, New Jersey: Humana Press), pp. 113-137.
- Fiebig, H. H., Dengler, W. A., and Roth, T. (1999). Human Tumor Xenografts: Predictivity, Characterization and Discovery of New Anticancer Agents. In Contributions to Oncology: Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development, H. H. Fiebig and A. M. Burger, eds. (Basel: Karger), pp. 29-50. 20
- Gridley, D. S., Andres, M. L., Garner, C., Mao, X. W., and Slater, J. M. (1996). Evaluation of TNF-alpha effects on radiation efficacy in a human lung adenocarcinoma model. *Oncol Res.*, 8:485-95.
- Stein, R., Govindan, S. V., Chen, S., Reed, L., Spiegelman, H., Griffiths, G. L., Hansen, H. J., and Goldenberg, D. M. (2001). Successful therapy of a human lung cancer xenograft using MAb RS7 labeled with residualizing radioiodine. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 39:173-80.
- Yamori, T., Sato, S., Chikazawa, H., and Kadota, T. (1997). Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn. J. Cancer Res.*, 88:1205-10. 30
- Zou, Y., Wu, Q. P., Tansey, W., Chow, D., Hung, M. C., Charnsangavej, C., Wallace, S., and Li, C. (2001). Effectiveness of water soluble poly(L-glutamic acid)-camptothecin conjugate against resistant human lung cancer xenografted in nude mice. *Int. J. Oncol.*, 18:331-6.

## 【0311】

## (実施例3)

(免疫沈降による2C4応答性腫瘍におけるヘテロダイマーの検出)

2C4応答性腫瘍および非応答性腫瘍を、抗Erbb2抗体を用いる免疫沈降に供し、Erbb2-ErbB3およびEGFR-ErbB2ヘテロダイマーの存在についてアッセイした。他に示さない限り、この方法を、*Maniatis T.ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982*に従って実行した。

## 【0312】

交差反応しなかった抗HER2抗体、抗HER3抗体および抗HER1抗体を選択した。抗体交差反応するか否かを決定するために、HER1レセプター、HER2レセプター、HER3レセプターおよびHER4レセプターは、ヒト胚腎臓(HEK)293細胞に

40

50

おいて発現した。細胞を、HEPES緩衝液(pH 7.5)を含むTriton™ X-100(容積当たり1重量%)を使用して溶解させた。コントロール細胞、ならびにHER1発現細胞、HER2発現細胞、HER3発現細胞およびHER4発現細胞由来の合計約20 µgの細胞タンパク質を、SDSゲル上に分離し、そして半乾燥プロッティング手順によってニトロセルロース膜に移した。ゼラチンでブロックした後、種々の抗HER1抗体、抗HER2抗体および抗HER3抗体を、他のErbbレセプターに対する交差反応性について試験した。以下に記載の実験において使用するために選択された抗体は、いかなる有意な交差反応性も示さなかった。

## 【0313】

新鮮な腫瘍サンプルを、氷上で機械的に粉碎し、そして50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、10% (w/v) グリセロール、1% (w/v) Triton™ X-100、1 mM PMSF、10 µg/ml アプロチニンおよび0.4 mM オルトバナデートを含む緩衝液中に溶解させた。上清が完全に清澄化されるまで、完全に溶解した腫瘍を数回遠心分離した。清澄化された腫瘍溶解物(溶解物当たり5~7 mgのタンパク質)、5 µgの抗Erbb2抗体(ab-3、マウスモノクローナル; Cat番号OP15、Oncogene Inc., USA)および50 µlタンパク質G結合アガロースを1.5 mlエッペンドルフ反応チューブ中で組み合わせることによって、免疫沈降を進行させた。0.1% (w/v) Triton™ X-100を含む50 mM HEPES緩衝液、pH 7.5の1倍~2倍容量の添加の際、チューブを3~4時間、4℃で回転させ、続いて遠心分離した。ペレットを、500 µlの50 mM HEPES緩衝液pH 7.5(0.1% (w/v) Triton™ X-100を含む)で、2~3回洗浄した。等容量の2×Laemmliサンプル緩衝液を、洗浄した免疫沈降物に添加し、そしてサンプルを、5分間95℃に加熱した。サンプルをSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に移した。EGFR-Erbb2ヘテロダイマーおよびErbb2-Erbb3ヘテロダイマーの存在を、プロットをEGFR(EGFRに対するウサギポリクローナル抗体、Upstate Inc., USA; Cat.番号06-847)およびErbb3(ERbb3に対するポリクローナル抗体; Santa Cruz Inc., USA; Cat.番号SC-285)に対する抗体を用いてプローブすることによって評価した。ペルオキシダーゼ(POD)標識抗ウサギFc抗体(BioRad Laboratories Inc. USA)を、2次抗体として使用した。プロットを、化学発光基質(ECL plus, Amersham)を使用して視覚化した。

## 【0314】

図3は、これらの実験の結果を示す。Erbb2-Erbb3ヘテロダイマーおよび/またはEGFR-Erbb2ヘテロダイマーの存在が観察され得る。表1に示されるように、2C4応答の間で相関が観察され、Erbb2-Erbb3ヘテロダイマーおよび/またはEGFR-Erbb2ヘテロダイマーの存在が観察された。

## 【0315】

## (実施例4)

## (HER2リン酸化とrhuMAB 2C4に対する応答の相関)

腫瘍増殖に対するrhuhuMAB 2C4の効果を、マウスに外移植した14個のヒト腫瘍において研究した(9個の肺癌および5個の乳癌)。腫瘍の外移植および処置を、実施例2に記載されるように実行した。HER2ヘテロダイマーを、実施例3に記載されるように、検出した。

## 【0316】

HER2リン酸化を、HER2の免疫沈降およびウェスタンプロット分析によって評価した。ゲルのホスホ-HER2バンドの存在によって、ポジティブを決定した。このバンドの非存在によって、ネガティブを決定した。HER2リン酸化を、ホスホ特異的抗HER2抗体(クローンPN2A、Thorら、J. Clin. Oncol., 18:3230-9(2000))を使用して、免疫組織化学によって確認した。

10

20

30

40

50

## 【0317】

試験された5個の腫瘍（3つの肺および2つの乳房）において、腫瘍増殖の有意な阻害が観察され、これは、HER1またはHER3のいずれかを有するHER2の検出可能なヘテロダイマーの存在、および全ての場合における強力なHER2リン酸化と相関する。rhuma b 2C4処置に対する有意な応答が観察されない9個の腫瘍において、ヘテロダイマーは、検出されず、HER2リン酸化が存在しなかった。HER2ヘテロダイマーの存在または有意なHER2リン酸化は、非臨床的なモデルにおいてrhuma b 2C4処置に対する強力な指標である。同様な観察は、腫瘍細胞株から作製された異種移植片を用いて作製された。

## 【0318】

10

## （実施例5）

## （2C4応答性腫瘍におけるHER2リン酸化の検出）

rhuma b 2C4の効力を、9個の確立された非小細胞肺癌（NSCLC）異種移植片腫瘍モデル（LXFE211、LXF A289、LXF A297、LXF E397、LXF A526、LXF E529、LXF A629、LXF A1041、LXF E1071、Oncotest GmbH, Freiburg, Germany）において評価した。ヒト腫瘍異種移植片は、患者の腫瘍が、固体腫瘍として増殖し、支質、脈管構造、中心壊死を発生し、ドーム（dome）分化を示すので、抗癌薬物開発のための最も関連するモデルとして考える。さらに、異種移植片腫瘍モデルは、組織学および化学感受性において元の腫瘍と非常に密接に類似する。

20

## 【0319】

増殖阻害を実施例2に記載されるように評価した。有意な増殖阻害活性は、コントロール群に対する処置群の>50%の増殖阻害として規定された。3つのNSCLCモデル（LXF A297、LXF E629、およびLXF A1072）において、rhuma b 2C4処置に対する有意な増殖阻害応答が観察された。リガンド活性化HER2のいくつかの証拠もまた、タンパク質レベルにおいて調査された。図4に示されるように、HER2は、9個のNSCLC腫瘍のうちの8個由来の腫瘍抽出物から免疫沈降され得る。HER2の活性状態を決定するために、これらのプロットを、次いで、抗ホスホチロシン（抗-PY）抗体を用いてプローブした。図4の下パネルに示されるように、3つの応答性腫瘍（LXF A297、LXF A629、およびLXF A1072）は、強力なHER2活性化を示した。

30

## 【0320】

## （実施例6）

（HER2ヘテロダイマーを検出することにより、rhuma b 2C4での処置のための肺癌患者を同定するための臨床的研究）

患者は、患者由来の腫瘍が、HER2/HER3複合体および/またはHER2/HER1複合体および/またはHER2/HER4複合体を含むことが見出される場合、rhuma b 2C4での処置に応答性である非小細胞肺癌（NSCLC）を有するとして同定される。腫瘍サンプルは、腫瘍の生検によってまたは腫瘍の外科的切除の間に得られる。次いで、サンプルを、HER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーの存在について分析する。

40

## 【0321】

腫瘍細胞または細胞溶解物を、HER2に特異的に結合するeTag<sup>TM</sup>と接触させる。eTag<sup>TM</sup>は、検出可能な部分およびHER2に特異的な第1の結合部分を含む。検出可能な部分は、切断可能なリンカーを有する第1の結合部分に連結される。結合のための時間の後に、過剰なeTag<sup>TM</sup>を除去する。

## 【0322】

腫瘍細胞または細胞溶解物を、HER1またはHER3またはHER4に特異的に結合する第2の結合化合物と接触させる。非結合化合物を洗浄によって除去する。次いで、第

50

2の結合化合物を、活性化する。第1の結合化合物および第2の結合化合物が密接に近位にある場合、活性化された第2の結合化合物は、e Tag<sup>TM</sup>中の切断可能なリンカーを切断して、遊離した検出可能な部分を生成する。遊離した検出可能な部分の同定は、この腫瘍が、HER2/HER1ヘテロダイマーまたはHER2/HER3ヘテロダイマーまたはHER2/HER4ヘテロダイマーを含むことを示す。

【0323】

患者が、HER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER3ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーを含む腫瘍に罹患しているという決定の際に、rhuma b 2C4を、疾患の進行まで、それぞれ、2mg/kgまたは4mg/kgで、毎週または3週間毎に、静脈内(IV)投与する。抗体を、多用量液体処方物(20mg/mL以上の濃度で、20mLを充填)として供給する。効力についての最初の終点は、反応速度、および安全性を含む。第2の効力の終点は、全体的な生存、疾患進行に対する時間、生活の質、および/または応答の持続時間が挙げられる。

10

【0324】

(実施例7)

(rhuma b 2C4での処置のための癌患者を同定するための臨床的研究)

癌細胞を含む生物学的サンプルを、例えば、腫瘍組織の生検、腹水からの腫瘍細胞の吸引、または臨床的実施において公知の任意の他の方法によって、処置のための候補から得る。生物学的サンプルを、例えば、免疫沈降およびウェスタンプロット分析によって、HER2リン酸化について、ならびに/あるいは上記技術のいずれかによって、HER2/HER3ヘテロダイマー、HER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーの存在について分析する。生物学的サンプルが、HER2リン酸化ならびに/あるいはHER2/HER3ヘテロダイマー、HER2/HER1ヘテロダイマーおよび/またはHER2/HER4ヘテロダイマーの存在についてポジティブである被験体は、腫瘍サンプルがHER2リン酸化を示さず、ヘテロダイマーも検出されない患者よりも、rhuma b 2C4での処置に対してより良い応答を示すようである。

20

【0325】

例えば、卵巣癌を有すると診断された被験体は、腫瘍組織の生検または腹水からの腫瘍細胞の吸引を受ける。この組織は、免疫沈降およびウェスタンプロット分析によって、HER2リン酸化について分析される。これは、最小で約250mgの腫瘍組織を必要とする。

30

【0326】

患者が、HER2リン酸化についてポジティブである癌(例えば、Castration-Resistant Prostate Cancer-CRPC、または卵巣癌)に罹患するという決定において、患者は、サイクル1(最初の21日の処置期間)の1日目に、840mgのrhuma b 2C4の装填用量を受容し、続いて、連続的静脈内注入として、各々の引き続く21日のサイクルの1日目に、420mgを受容する。処置は、疾患の進行の証拠を示さない患者について、1年間(17サイクル)まで、3週間毎に、静脈内注射によって続ける。処置は、医師の決定のもと、応答の欠如、有害な副作用、または他の理由のために、任意の時間でより早く中断され得る。

40

【0327】

本開示全体で引用される全ての参考文献、およびそれらに引用される参考文献は、本明細書中において参考として明白に援用される。

【0328】

本発明が特定の実施形態を参照して記載されるものの、本発明は、このように制限されない。当業者は、種々の改変が、本発明を実質的に変更することなく、可能であることを理解する。過度な実験無しになされ得るこのような全ての改変が、本発明の範囲内であることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0329】

50

【図1】図1Aおよび図1Bは、マウスモノクローナル抗体2C4の可変軽鎖(VL)(図1A)ドメインおよび可変重鎖(VH)(図1B)ドメインのアミノ酸配列(それぞれ、配列番号1および配列番号2)；ヒト化2C4版574のVLドメインおよびVHドメインのアミノ酸配列(それぞれ、配列番号3および配列番号4)；ならびにヒトのVLコンセンサスフレームワークおよびVHコンセンサスフレームワーク(ヒト1、軽鎖サブグループ1；humIII、重鎖サブグループIII)のアミノ酸配列(それぞれ、配列番号5および配列番号6)のアライメントを示す。アスタリスクは、ヒト化2C4版574とマウスモノクローナル抗体2C4との間の相違、またはヒト化2C4番574とヒトフレームワークとの間の相違を同定する。相補性決定領域(CDR)は、括弧中である。

【図2】図2Aおよび図2Bは、低レベル/高レベルのErbb2を発現するMCF7細胞(図2A)および高レベルのErbbB2を発現するSK-BR-3細胞(図2B)中でのErbb2とErbb3とのヒレグリン(HRG)依存性会合に対する、モノクローナル抗体2C4、HERCEPTIN(登録商標)抗体または抗EGFR抗体の効果を示す;上記の実施例2を参照のこと。

【図3】図3は、非小細胞肺癌異種移植外植片由来のタンパク質抽出物中のHER1/HER2ヘテロダイマーおよびHER2/HER3ヘテロダイマーの存在を示す、免疫プロットである。

【図4】図4は、非小細胞肺癌（NSCLC）異種移植外植片から抽出したタンパク質におけるHER2リン酸化の存在を示す、免疫プロットである。

( 1 )

		10	20	30	40
2C4	DTVMTQS <span style="color:red">HKIM</span> 5T <span style="color:red">S</span> VGD <span style="color:red">R</span> WITC	[KASQDV <span style="color:red">S</span> IGVA]	WYQQKP		
574	DIQMT <span style="color:red">Q</span> SPSS <span style="color:red">L</span> ASVGDR <span style="color:red">R</span> WITC	[KASQDV <span style="color:red">S</span> IGVA]	WYQQKP		
hum xl	DIQMT <span style="color:red">Q</span> SPSS <span style="color:red">L</span> ASVGDR <span style="color:red">R</span> WITC	[RASQSI <span style="color:red">S</span> INLYLA]	WYQQKP		
		50	60	70	80
2C4	CQSPKLLI <span style="color:red">Y</span> [SASYRYT]	GVPDRFTG <span style="color:red">S</span> GSG <span style="color:red">T</span> DFTT <span style="color:red">I</span> SSVQ			
574	GKAPKLLI <span style="color:red">Y</span> [SASYRYT]	GVPSPRFS <span style="color:red">G</span> SG <span style="color:red">T</span> DFT <span style="color:red">I</span> SSL <span style="color:red">Q</span>			
hum xl	GKAPKLLI <span style="color:red">Y</span> [AASSLES]	GVPSPRFS <span style="color:red">G</span> SG <span style="color:red">T</span> DFT <span style="color:red">I</span> SSL <span style="color:red">Q</span>			
		90	100		
2C4	EDLAVY <span style="color:red">YC</span> [QQYYI <span style="color:red">PYPT</span> ]	FGGCT <span style="color:red">K</span> LEIK	( 配列番号 1 )		
574	EDFATY <span style="color:red">YC</span> [QQYYI <span style="color:red">PYPT</span> ]	FGQCT <span style="color:red">K</span> VEIK	( 配列番号 3 )		
hum xl	EDFATY <span style="color:red">YC</span> [QQYYI <span style="color:red">PYPT</span> ]	FGQCT <span style="color:red">K</span> VEIK	( 配列番号 5 )		

FIG. 1A: 可麥鋸鏈

		10	20	30	40
2C4	EVQLQSGCPELVKPGTSVKSCKAS	[GFTFTDVTMD]	WVKQS	•	•
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDVTMD]	WVRQA	•	•
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFPSSYAMS]	WVRQA		
2C4	HGKSLWEIG	50 a	60	70	80
	•••••	[DVNPNSCGS1YNQRFKG]	KASLTVSSRHSIVYM	•••••	•••••
574	PGKCLWEVA	[DVNPNSCGS1YNQRFKG]	RFTLSSVDRSKNTLYL	•	•
hum III	PGKGLWEVA	[V1SGDGGSTYYADSVKG]	RFT1SRDNSKNTLYL		
2C4	abc	90	100ab	110	
	ELRSCLTIEDTAVYYCAR	[NLGPFSPYFDY]	WGQGTIVLVSS	(	配列番号 2)
574	QMNSRLRAEDTAVYYCAR	[NLGPFSPYFDY]	WGQGTIVLVSS	(	配列番号 4)
hum xl	QMNSRLRAEDTAVYYCAR	[GRGVGYSLYD1]	WGCGJLVTVSS	(	配列番号 6)

FIG. 1B: 可變重鎖

( 2 )

FIG. 2A

【圖3】

FIG. 3

【図 4】

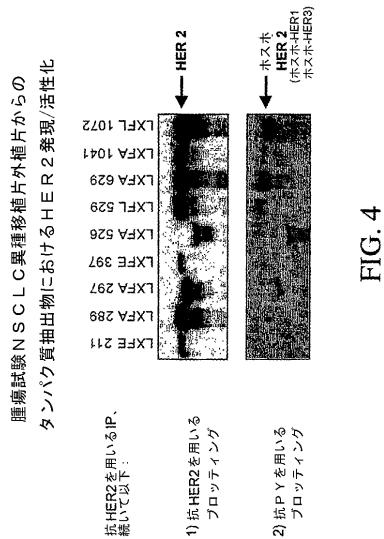


FIG. 4

## 【配列表】

0005069843000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 コル, ハンス  
  ドイツ国 85247 オーバーロート, ブリューテンアンガー 45  
(72)発明者 ボッセンマイヤー, ビルギット  
  ドイツ国 82229 ゼーフェルト, ホルスト - ヴォルフラム - ガイスラー - ヴェーク 10  
(72)発明者 ミュラー, ハンス - ヨアヒム  
  ドイツ国 82377 ペンツベルク, ルーエ アム バッハ 5 ベー  
(72)発明者 スリウコウスキー, マーク エックス.  
  アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, オーク クリーク レイン  
  42  
(72)発明者 ケルシー, ステファン マイケル  
  アメリカ合衆国 カリフォルニア 94037, モンタラ, 14ティーエイチ ストリート  
  360

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特表2003-503365 (JP, A)  
  米国特許出願公開第2002/0064805 (US, A1)  
  特開2004-002211 (JP, A)  
  国際公開第01/000244 (WO, A1)  
  J.Biol.Chem., 1995年, Vol.270, No.38, p.22608-22613  
  Cancer Research, 2002年, Vol.62, p.3151-3158  
  Mol.Cell.Biol., 2000年, Vol.20, No.9, p.3210-3223  
  Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1992年, Vol.89, p.1330-1334  
  FEBS Letters, 1998年, Vol.431, p.102-106

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/395  
G01N 33/574  
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)