

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6271432号
(P6271432)

(45) 発行日 平成30年1月31日(2018.1.31)

(24) 登録日 平成30年1月12日(2018.1.12)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|---------------|---------------|------------------|-----------------|
| C07K | 16/30 | (2006.01) | C07K 16/30 |
| C12N | 15/02 | (2006.01) | C12N 15/00 ZNAC |
| A61K | 39/395 | (2006.01) | A61K 39/395 T |
| A61P | 35/00 | (2006.01) | A61P 35/00 |
| A61P | 43/00 | (2006.01) | A61K 39/395 U |

請求項の数 8 (全 44 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2014-533618 (P2014-533618) | (73) 特許権者 | 597160510 リジェネロン・ファーマシューティカルズ ・インコーポレイテッド REGENERON PHARMACEU TICALS, INC. アメリカ合衆国10591-6707ニュ ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー ・ミル・リバー・ロード777番 |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年9月21日(2012.9.21) | (74) 代理人 | 100127926 弁理士 結田 純次 |
| (65) 公表番号 | 特表2014-530215 (P2014-530215A) | (74) 代理人 | 100140132 弁理士 竹林 則幸 |
| (43) 公表日 | 平成26年11月17日(2014.11.17) | | |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2012/056446 | | |
| (87) 国際公開番号 | W02013/048883 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成25年4月4日(2013.4.4) | | |
| 審査請求日 | 平成27年9月15日(2015.9.15) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/614,565 | | |
| (32) 優先日 | 平成24年3月23日(2012.3.23) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/557,460 | | |
| (32) 優先日 | 平成23年11月9日(2011.11.9) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗Er b B 3抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Er b B 3を特異的に結合する、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、配列番号306/314及び322/330から選択される重鎖可変領域/軽鎖可変領域のアミノ酸配列対の相補性決定領域HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3を含み、そして、該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、水素/重水素交換によって決定したように、配列番号：498のアミノ酸345-367、配列番号：498のアミノ酸423-439；および配列番号：498のアミノ酸451-463と相互作用し、かつ25でE L I S Aにおいて30 p M未満のI C₅₀でEr b B 3に対するNRG1の結合を遮断する、

単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項2】

それぞれ、配列番号：308-310-312-316-318-320；および324-326-328-332-334-336からなる群から選択されるHCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3ドメインを含み、かつ25でE L I S Aにおいて30 p M未満のI C₅₀でEr b B 3に対するNRG1の結合を遮断する、

単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 3】

配列番号：306 / 314、および322 / 330からなる群から選択されたHCV R / LCV Rアミノ酸配列対を含み、かつ25 でELISAにおいて30 pM未満のIC₅₀でEr b B 3に対するNRG 1の結合を遮断する、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の抗体または抗原結合性フラグメント、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の抗体または抗原結合性フラグメント、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物。 10

【請求項 6】

請求項 3 に記載の抗体または抗原結合性フラグメント、および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 7】

それぞれ、配列番号：324 - 326 - 328 - 332 - 334 - 336のアミノ酸配列を有するHC DR 1 - HC DR 2 - HC DR 3 - LC DR 1 - LC DR 2 - LC DR 3ドメインを含む、請求項 2 に記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 8】

配列番号：322のアミノ酸配列を有するHCV R、および配列番号：330のアミノ酸配列を有するLCV Rを含む、請求項 3 に記載の単離された抗体または抗原結合性フラグメント。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はヒトEr b B 3に対して特異的である抗体およびその抗原結合フラグメントに関する。

【背景技術】

【0002】

Er b B 3 (HER 3としても知られる)は、受容体チロシンキナーゼ(RTK)のEr b B / HERファミリーのメンバーである。このファミリーの他のメンバーとしては、EGFR (Er b B 1またはHER 1としても知られる)、Er b B 2 (HER 2またはNeuとしても知られる)およびHER 4が挙げられる。Er b B受容体は、遺伝子発現の変化を導く細胞内シグナル伝達カスケードを活性化することによって細胞の増殖、生存および分化を調節する。 30

【0003】

Er b B受容体は、ホモまたはヘテロ二量体の形成によって活性化される。たとえば、Er b B 3がEr b B 2と共発現したとき、活性ヘテロ二量体型シグナル伝達複合体が形成される。Er b B 3二量体形成は、そのリガンド結合によって促進される。ニューレグリン1 (NRG 1)は、受容体のホモまたはヘテロ二量体化を促進するEr b B 3の一次リガンドである。 40

【0004】

Er b B 3は、乳がん、消化管がんおよび膵がんを含むさまざまながんタイプで過剰発現することが見出されている。抗Er b B 3抗体は、マウス異種移植モデルでいくつかのヒト腫瘍細胞系の増殖を阻害することが示されている。抗Er b B 3抗体は、たとえば、特許文献1；特許文献2；特許文献3；特許文献4；特許文献5；および特許文献6に記載されている。それにもかかわらず、がんおよび他の関連障害を治療するため、新規なEr b B 3アンタゴニスト、たとえば抗Er b B 3抗体が当分野で必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 5 】

【特許文献1】US 5, 480, 968

【特許文献2】US 5, 968, 511

【特許文献3】US 2004 / 0197332

【特許文献4】US 7, 332, 580

【特許文献5】US 7, 705, 130

【特許文献6】US 7, 846, 440

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明は、ヒト ErbB3 を結合する抗体を提供する。本発明の抗体は、とりわけ、ErbB3 介在性シグナル伝達の阻害ならびに ErbB3 活性および / またはシグナル伝達によって生じるか、またはそれに関連する疾患および障害の治療に有用である。

10

【 0 0 0 7 】

特定の実施態様による本発明の抗体は、ErbB3 と ErbB3 リガンド (たとえば、NRG1 および / または NRG2) との間の相互作用を遮断する。抗体は、たとえば、細胞表面 ErbB3 の内部移行の誘導、in vitro の NRG1 刺激性腫瘍増殖の阻害、および / または in vitro の腫瘍増殖の阻害といったような 1 つまたはそれ以上のさらなる生物学的性質を備えていてもよい。

【 0 0 0 8 】

本発明の抗体は、完全長 (たとえば、IgG1 または IgG4 抗体) であることができ、または抗原結合性部分 (たとえば、Fab、F(ab')₂ または scFv フラグメント) のみを含んでもよく、また、修飾して官能基に影響を及ぼしてもよく、たとえば残基のエフェクター機能を排除してもよい (Reddy et al., 2000, J. Immunol. 164:1925-1933)。

20

【 0 0 0 9 】

本発明は、配列番号: 2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、210、226、242、258、274、290、306、322、338、354、370、386、402、418、434、450、466 および 482 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する重鎖可変領域 (HCVR) を含む抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを提供する。

30

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、配列番号: 10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、186、202、218、234、250、266、282、298、314、330、346、362、378、394、410、426、442、458、474 および 490 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する軽鎖可変領域 (LCVR) を含む抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを提供する。

40

【 0 0 1 1 】

また、本発明は、配列番号: 2 / 10、18 / 26、34 / 42、50 / 58、66 / 74、82 / 90、98 / 106、114 / 122、130 / 138、146 / 154、162 / 170、178 / 186、194 / 202、210 / 218、226 / 234、242 / 250、258 / 266、274 / 282、290 / 298、306 / 314、322 / 330、338 / 346、354 / 362、370 / 378、386 / 394、402 / 410、418 / 426、434 / 442、450 / 458、466 / 474 および 482 / 490 からなる群から選択される HCVR および LCVR (HCVR / LCVR) 配列対を含む抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。

50

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、配列番号： 8、 24、 40、 56、 72、 88、 104、 120、 136、 152、 168、 184、 200、 216、 232、 248、 264、 280、 296、 312、 328、 344、 360、 376、 392、 408、 424、 440、 456、 472 および 488 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する重鎖 CDR3 (HCDR3) ドメイン；ならびに配列番号： 16、 32、 48、 64、 80、 96、 112、 128、 144、 160、 176、 192、 208、 224、 240、 256、 272、 288、 304、 320、 336、 352、 368、 384、 400、 416、 432、 448、 464、 480 および 496 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する軽鎖 CDR3 (LCDR3) ドメイン；を含む抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを提供する。

10

【 0 0 1 3 】

特定の実施態様において、抗体または抗体の抗原結合性部分は、配列番号： 8 / 16、 24 / 32、 40 / 48、 56 / 64、 72 / 80、 88 / 96、 104 / 112、 120 / 128、 136 / 144、 152 / 160、 168 / 176、 184 / 192、 200 / 208、 216 / 224、 232 / 240、 248 / 256、 264 / 272、 280 / 288、 296 / 304、 312 / 320、 328 / 336、 344 / 352、 360 / 368、 376 / 384、 392 / 400、 408 / 416、 424 / 432、 440 / 448、 456 / 464、 472 / 480 および 488 / 496 からなる群から選択される HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対を含む。

20

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、配列番号： 4、 20、 36、 52、 68、 84、 100、 116、 132、 148、 164、 180、 196、 212、 228、 244、 260、 276、 292、 308、 324、 340、 356、 372、 388、 404、 420、 436、 452、 468 および 484 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する重鎖 CDR1 (HCDR1) ドメイン；配列番号： 6、 22、 38、 54、 70、 86、 102、 118、 134、 150、 166、 182、 198、 214、 230、 246、 262、 278、 294、 310、 326、 342、 358、 374、 390、 406、 422、 438、 454、 470 および 486 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する重鎖 CDR2 (HCDR2) ドメイン；配列番号： 12、 28、 44、 60、 76、 92、 108、 124、 140、 156、 172、 188、 204、 220、 236、 252、 268、 284、 300、 316、 332、 348、 364、 380、 396、 412、 428、 444、 460、 476 および 492 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する軽鎖 CDR1 (LCDR1) ドメイン；ならびに配列番号： 14、 30、 46、 62、 78、 94、 110、 126、 142、 158、 174、 190、 206、 222、 238、 254、 270、 286、 302、 318、 334、 350、 366、 382、 398、 414、 430、 446、 462、 478 および 494 からなる群から選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似した配列を有する軽鎖 CDR2 (LCDR2) ドメイン；をさらに含む抗体またはそのフラグメントを提供する。

30

40

【 0 0 1 5 】

本発明の特定の非限定的な例となる抗体および抗原結合性フラグメントは、それぞれ、

50

配列番号：4 - 6 - 8 - 12 - 14 - 16（たとえばH4H2084P）；20 - 22 - 24 - 28 - 30 - 32（たとえばH4H2092P）；36 - 38 - 40 - 44 - 46 - 48（たとえばH4H2094P）；52 - 54 - 56 - 60 - 62 - 64（たとえばH4H2098P）；68 - 70 - 72 - 76 - 78 - 80（たとえばH4H2102P）；84 - 86 - 88 - 92 - 94 - 96（たとえばH4H2108P）；100 - 102 - 104 - 108 - 110 - 112（たとえばH4H2111P）；116 - 118 - 120 - 124 - 126 - 128（たとえばH4H2114P）；132 - 134 - 136 - 140 - 142 - 144（たとえばH4H2132P）；148 - 150 - 152 - 156 - 158 - 160（たとえば、H4H2138P）；164 - 166 - 168 - 172 - 174 - 176（たとえばH4H2140P）；180 - 182 - 184 - 188 - 190 - 192（たとえば、H4H2143P）；196 - 198 - 200 - 204 - 206 - 208（たとえばH4H2146P）；212 - 214 - 216 - 220 - 222 - 224（たとえばH4H2147P）；228 - 230 - 232 - 236 - 238 - 240（たとえばH4H2148P）；244 - 246 - 248 - 252 - 254 - 256（たとえばH4H2151P）；260 - 262 - 264 - 268 - 270 - 272（たとえばH4H2153P）；276 - 278 - 280 - 284 - 286 - 288（たとえばH4H2154P）；292 - 294 - 296 - 300 - 302 - 304（たとえばH4H2290P）；308 - 310 - 312 - 316 - 318 - 320（たとえばH1M1819N）；324 - 326 - 328 - 332 - 334 - 336（たとえばH2M1821N）；340 - 342 - 344 - 348 - 350 - 352（たとえばH2M1824N）；356 - 358 - 360 - 364 - 366 - 368（たとえばH2M1827N）；372 - 374 - 376 - 380 - 382 - 384（たとえばH1M1828N）；388 - 390 - 392 - 396 - 398 - 400（たとえばH2M1829N）；404 - 406 - 408 - 412 - 414 - 416（たとえばH2M1930N）；420 - 422 - 424 - 428 - 430 - 432（たとえばH2M1943N）；436 - 438 - 440 - 444 - 446 - 448（たとえばH2M1936N）；452 - 454 - 456 - 460 - 462 - 464（たとえばH2M1937N）；468 - 470 - 472 - 476 - 478 - 480（たとえばH2M1938N）；および484 - 486 - 488 - 492 - 494 - 496（たとえばH1M1940N）からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3ドメインを含む。

【0016】

関連した実施態様において、本発明は、ErbB3を特異的に結合する抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを含み、ここで、この抗体またはフラグメントは、配列番号：2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/202、210/218、226/234、242/250、258/266、274/282、290/298、306/314、322/330、338/346、354/362、370/378、386/394、402/410、418/426、434/442、450/458、466/474および482/490からなる群から選択される重鎖および軽鎖配列内に含まれる重鎖および軽鎖CDRドメインを含む。HCVRおよびLCVRアミノ酸配列内でCDRを同定する方法および技術は、当分野でよく知られており、本明細書に開示された特定のHCVRおよび/またはLCVRアミノ酸配列内でCDRを同定するために用いることができる。CDRの境界を同定するために用いることができる例となる規則としては、たとえば、カバット（Kabat）定義、チョシア（Chothia）定義およびAbM定義が挙げられる。一般的には、カバット定義は配列変異性に基づいており、チョシア定義は、構造ループ領域の位置に基づいており、AbM定義は、カバットとチョシアアプローチとの間の折衷案である。たとえば、Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); およびM

artin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)を参照のこと。また、抗体内のCDR配列の同定には公開データベースが利用可能である。

【0017】

別の態様において、本発明は、抗ErbB3抗体またはそのフラグメントをコードする核酸分子を提供する。また、本発明の核酸を担持している組換え発現ベクター、およびこのようなベクターが導入された宿主細胞も、本発明によって包含されており、抗体を産生できる条件下で宿主細胞を培養し、産生された抗体を回収することによって抗体を産生する方法も同様である。

【0018】

一実施態様において、本発明は、配列番号：1、17、33、49、65、81、97、113、129、145、161、177、193、209、225、241、257、273、289、305、321、337、353、369、385、401、417、433、449、465および481からなる群から選択される核酸配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたHCVRを含む抗体またはそのフラグメントを提供する。

10

【0019】

また、本発明は、配列番号：9、25、41、57、73、89、105、121、137、153、169、185、201、217、233、249、265、281、297、313、329、345、361、377、393、409、425、441、457、473および489からなる群から選択される核酸配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたLCVRを含む抗体またはそのフラグメントを提供する。

20

【0020】

また、本発明は、配列番号：7、23、39、55、71、87、103、119、135、151、167、183、199、215、231、247、263、279、295、311、327、343、359、375、391、407、423、439、455、471および478からなる群から選択されるヌクレオチド配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたHCDR3ドメイン；ならびに配列番号：15、31、47、63、79、95、111、127、143、159、175、191、207、223、239、255、271、287、303、319、335、351、367、383、399、415、431、447、463、479および495からなる群から選択されるヌクレオチド配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたLCDR3ドメイン；を含む抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを提供する。

30

【0021】

また、本発明は、配列番号：3、19、35、51、67、83、99、115、131、147、163、179、195、211、227、243、259、275、291、307、323、339、355、371、387、403、419、435、451、467および483からなる群から選択されるヌクレオチド配列またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたHCDR1ドメイン；配列番号：5、21、37、53、69、85、101、117、133、149、165、181、197、213、229、245、261、277、293、309、325、341、357、373、389、405、421、437、453、469および485からなる群から選択されるヌクレオチド配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコ

40

50

ードされたHCDR2ドメイン；配列番号：11、27、43、59、75、91、107、123、139、155、171、187、203、219、235、251、267、283、299、315、331、347、363、379、395、411、427、443、459、475および491からなる群から選択されるヌクレオチド配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたLCDR1ドメイン；ならびに配列番号：13、29、45、61、77、93、109、125、141、157、173、189、205、221、237、253、269、285、301、317、333、349、365、381、397、413、429、445、461、477および493からなる群から選択されるヌクレオチド配列、またはその少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の同一性を有する実質的に同一の配列によってコードされたLCDR2ドメイン；をさらに含む抗体またはそのフラグメントを提供する。

10

【0022】

特定の実施態様によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号：1および9（たとえばH4H2084P）、17および25（たとえばH4H2092P）、33および41（たとえばH4H2094P）、49および57（たとえばH4H2098P）、65および73（たとえばH4H2102P）、81および89（たとえばH4H2108P）、97および105（たとえばH4H2111P）、113および121（たとえばH4H2114P）、129および137（たとえばH4H2132P）、145および153（たとえばH4H2138P）、161および169（たとえばH4H2140P）、177および185（たとえばH4H2143P）、193および201（たとえばH4H2146P）、209および217（たとえばH4H2147P）、225および233（たとえばH4H2148P）、241および249（たとえばH4H2151P）、257および265（たとえばH4H2153P）、273および281（たとえばH4H2154P）、289および297（たとえばH4H2290P）、305および313（たとえばH1M1819N）、321および329（たとえばH2M1821N）、337および345（たとえばH2M1824N）、353および361（たとえばH2M1827N）、369および377（たとえばH1M1828N）、385および393（たとえばH2M1829N）、401および409（たとえばH2M1930N）、417および425（たとえばH2M1934N）、433および441（たとえばH2M1936N）、449および457（たとえばH2M1937N）、465および473（たとえばH2M1938N）または481および489（たとえばH1M1940N）の配列番号の核酸配列によってコードされた重鎖および軽鎖CDR配列を含む。

20

30

【0023】

本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗ErB3抗体を含む。いくつかの用途では、望ましくないグリコシル化部位を除去する修飾が、有用となることがあり、または、オリゴ糖鎖に存在するフコース部分が欠如した抗体は、たとえば、抗体依存性細胞傷害(ADCC)機能を高めるのに有用となることがある(Shield et al. (2002) JBC 277:26733を参照のこと)。別の用途において、ガラクトシル化の修飾は、補体依存性細胞傷害(CDC)を改良するために行うことができる。

40

【0024】

別の態様において、本発明は、ErB3を特異的に結合する組換えヒト抗体またはそのフラグメントおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。関連した態様において、本発明は、ErB3阻害剤と第2の治療剤との組合せである組成物を特徴とする。一実施態様において、ErB3阻害剤は、抗体またはそのフラグメントである。一実施態様において、第2の治療剤は、ErB3阻害剤と都合よく組み合わせた任意の薬剤である。ErB3阻害剤と都合よく組み合わせてもよい例となる薬剤としては、ErB3活性を阻害する他の薬剤(他の抗体またはその抗原結合性フラグメント、ペプチド阻害剤、小分子アンタゴニスト、などを含む)および/またはErB3上流または

50

下流シグナル伝達を妨げる薬剤が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【0025】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の抗ErbB3抗体または抗体の抗原結合性部分を用いるErbB3活性を阻害する方法を提供し、ここで、この治療方法は、本発明の抗体または抗体の抗原結合性フラグメントを含む医薬組成物の治療有効量を投与することを含む。治療される障害は、ErbB3活性の除去、阻害または減少によって改善、向上、阻害または予防されるあらゆる疾患または状態である。本発明の抗ErbB3抗体または抗体フラグメントは、ErbB3とErbB3結合パートナー（たとえば、ニューレグリン-1）との間の相互作用を遮断するために機能してもよいし、または、そうでない場合、ErbB3のシグナル伝達活性を阻害してもよい。

10

【0026】

また、本発明は、患者におけるErbB3活性に関連するか、またはそれによって生じる疾患または障害の治療のための薬剤の製造における本発明の抗ErbB3抗体または抗体の抗原結合性部分の使用を含む。

【0027】

別の実施態様は、次の詳細な説明の総説から明らかになる。

【0028】

詳細な説明

本発明を記述する前に、記述された特定の方法および実験条件は変化することがあるため、本発明はこのような方法および条件に限定されないことを理解しなければならない。また、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書に用いる専門用語は、特定の実施態様を記述するためだけにあり、限定を意図しないことを理解しなければならない。

20

【0029】

特に明記しない限り、本明細書に用いるすべての技術および科学用語は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に用いるように、「約」という用語は、特定の列挙された数値に関して用いる場合、その値が列挙された値から1%を超えずに逸脱してもよいことを意味する。たとえば、本明細書に用いるように、「約100」という表現は、99および101ならびにその間のすべての値（たとえば、99.1、99.2、99.3、99.4、など）を含む。

30

【0030】

本発明の実施または試験においては、本明細書に記述したものと類似のまたは同等のあらゆる方法および材料を用いることができるが、好ましい方法および材料を、ここに記述する。

【0031】

定義

本明細書に用いる「ErbB3」および「ErbB3フラグメント」という発現は、非ヒト種からのもの（たとえば、「マウスErbB3」、「マウスErbB3フラグメント」、「サルErbB3」、「サルErbB3フラグメント」、など）であると明記されていないければ、ヒトErbB3タンパク質またはフラグメントのことをいう。ヒトErbB3の細胞外ドメインは、示されるアミノ酸配列を有する、例えば、配列番号のアミノ酸1-613:497-499。

40

【0032】

本明細書に用いる「ErbB3リガンド」という用語は、in vivoで生物学的シグナルを伝達するヒトErbB3タンパク質の細胞外ドメインに結合可能なタンパク質を意味する。「ErbB3リガンド」という用語は、ニューレグリン-1 (NRG1) およびニューレグリン-2 (NRG2) を包含する。

【0033】

本明細書に用いる「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に連結された4本のポリペプチド鎖、2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む免疫グロブリン

50

分子、ならびにその多量体（たとえば、IgM）のことをいうものとする。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではHCVRまたは V_H と略する）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、 C_H1 、 C_H2 および C_H3 を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVRまたは V_L と略する）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つのドメイン（ C_L1 ）を含む。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域（FR）と称する十分に保存される領域の間に散在する相補性決定領域（CDR）と称する超可変領域にさらに細かく分けることができる。 V_H および V_L は、それぞれ3つのCDRおよび4つのFRで構成されており、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置されている。本発明の異なる実施態様において、抗Erbb3抗体（またはその抗原結合性部分）のFRは、ヒト生殖系列配列と同一あってもよいし、または自然にもしくは人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸のコンセンサス配列は、2つまたはそれ以上のCDRの比較分析に基づいて定義してもよい。

10

【0034】

また、本明細書に用いる「抗体」という用語は、完全な抗体分子の抗原結合性フラグメントも包含する。本明細書に用いる抗体の「抗原結合性部分」、抗体の「抗原結合性フラグメント」などの用語は、抗原を特異的に結合して複合体を形成する、なんらかの天然の、酵素によって入手可能な、合成の、または遺伝子組換えのポリペプチドまたは糖タンパク質を包含する。抗体の抗原結合性フラグメントは、たとえば、タンパク分解のような任意の適した標準技術または抗体可変ドメインおよび場合により定常ドメインをコードするDNAの操作および発現を含む組換え遺伝子工学技術を用いて完全な抗体分子から誘導してもよい。このようなDNAは、知られており、かつ/または、たとえば、商業的な供給源、DNAライブラリー（たとえば、ファージ-抗体ライブラリーを含む）から容易に入手可能であり、または合成することができる。DNAを、化学的に、または分子生物学的技術を用いることによって配列決定し、操作して、たとえば、1つもしくはそれ以上の可変および/または定常ドメインを適した配置に配列するか、またはコドンを導入し、システイン残基を作製し、アミノ酸を修飾、付加、もしくは欠失させる、などしてもよい。

20

【0035】

抗原結合性フラグメントの非限定的な例としては、(i) Fabフラグメント；(ii) F(ab')₂フラグメント；(iii) Fdフラグメント；(iv) Fvフラグメント；(v) 単鎖Fv(scFv)分子；(vi) dAbフラグメント；および(vii) 抗体の超可変領域（たとえば、CDR3ペプチドのような単離された相補性決定領域（CDR））、または限定されたFR3-CDR3-FR4ペプチドを模倣するアミノ酸残基からなる最小限の認識単位が挙げられる。また、他の改変された分子、たとえばドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体（CDR-grafted antibodies）、二重特異性抗体、三重特性抗体、四重特異性抗体、ミニ抗体（minibodies）、ナノ抗体（nanobodies）（たとえば、一価のナノ抗体、二価のナノ抗体、など）、小モジュラー免疫医薬（small modular immunopharmaceuticals）（SMIP）、およびサメ可変IgNARドメイン（shark variable IgNAR domains）、も、また本明細書に用いる「抗原結合性フラグメント」の表現に包含される。

30

40

【0036】

抗体の抗原結合性フラグメントは、少なくとも1つの可変ドメインを典型的に含む。可変ドメインは、任意の寸法またはアミノ酸組成であってもよく、1つもしくはそれ以上のフレームワーク配列に隣接するか、またはそれを有するフレーム中にある少なくとも1つのCDRを一般に含むことになる。 V_L ドメインと会合した V_H ドメインを有する抗原結合性フラグメントにおいて、 V_H および V_L ドメインは、任意の適した配置で互いに相対した位置にあってもよい。たとえば、可変領域は、二量体であり、 V_H-V_H 、 V_H-V_L または V_L-V_L 二量体を含んでもよい。代わりに、抗体の抗原結合性フラグメントは、単量体の V_H または V_L ドメインを含んでもよい。

【0037】

50

特定の実施態様において、抗体の抗原結合性フラグメントは、少なくとも1つの定常領域に共有結合した少なくとも1つの可変ドメインを含んでもよい。本発明の抗体の抗原結合性フラグメントに見いだすことができる可変および定常ドメインの非限定的な例となる配置としては、(i) $V_H - C_H1$; (ii) $V_H - C_H2$; (iii) $V_H - C_H3$; (iv) $V_H - C_H1 - C_H2$; (v) $V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (vi) $V_H - C_H2 - C_H3$; (vii) $V_H - C_L$; (viii) $V_L - C_H1$; (ix) $V_L - C_H2$; (x) $V_L - C_H3$; (xi) $V_L - C_H1 - C_H2$; (xii) $V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (xiii) $V_L - C_H2 - C_H3$; および (xiv) $V_L - C_L$ が挙げられる。上記の例となる配置のいずれかを含む可変および定常ドメインの任意の配置において、可変ドメインと定常ドメインとは、互いに直接結合していてもよいし、または完全もしくは不完全なヒンジもしくはリンカー領域によって結合されてもよい。ヒンジ領域は、単一ポリペプチド分子中の隣接する可変ドメインおよび/または定常ドメイン間に柔軟性または半柔軟性の結合を生じる少なくとも2個(たとえば、5個、10個、15個、20個、40個、60個またはそれ以上)のアミノ酸からなってもよい。さらに、本発明の抗体の抗原結合性フラグメントは、上記の可変および定常領域配置のホモ二量体またはヘテロ二量体(または、他の多量体)を、互いにおよび/または1つもしくはそれ以上の単量体の V_H ドメインもしくは V_L ドメインとの非共有結合性会合状態(たとえば、ジスルフィド結合による)で含んでもよい。

10

【0038】

完全な抗体分子と同様に、抗原結合性フラグメントは、単一特異性または多重特異性(たとえば、二重特異性)であってもよい。抗体の多重特異性抗原結合性フラグメントは、典型的に少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、ここにおいて、それぞれの可変ドメインは、別々の抗原にまたは同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することができる。本明細書に開示された例示的な二重特異性抗体フォーマットを含む任意の多重特異性抗体フォーマットは、当分野で利用可能な常用技術を用いて本発明の抗体の抗原結合性フラグメントに関する使用に合わせてもよい。

20

【0039】

本発明の抗体は、補体依存性細胞傷害(CDC)または抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を通して機能してもよい。「補体依存性細胞傷害」(CDC)とは、補体の存在下での本発明の抗体による抗原発現細胞の溶解のことをいう。「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」(ADCC)とは、Fc受容体(FcR)を発現する非特異的な細胞傷害性細胞(たとえば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球およびマクロファージ)が標的細胞上に結合した抗体を認識し、それによって標的細胞の溶解を導く細胞媒介反応のことをいう。CDCおよびADCCは、当分野でよく知られており、かつ入手可能なアッセイを用いて測定することができる。(たとえば、米国特許第5,500,362号および同第5,821,337号ならびにClynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656を参照のこと)。抗体の定常領域は、補体を固定し、細胞依存性細胞傷害性を媒介する抗体の能力において重要である。したがって、抗体のアイソタイプは、抗体が細胞傷害性を媒介することが望ましいかどうかに基づいて選択してもよい。

30

【0040】

本明細書に用いる「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列から誘導された可変領域および定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体は、たとえばCDR、特にCDR3中にヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(たとえば、*in vitro*でのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、または*in vivo*での体細胞突然変異によって導入された突然変異)を含んでもよい。しかし、本明細書に用いる「ヒト抗体」という用語は、マウスのような他の哺乳動物種の生殖系列から誘導されたCDR配列をヒトフレームワーク配列に移植した抗体を含まないものとする。

40

【0041】

本明細書に用いる「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作製または単離されたすべてのヒト抗体、たとえば宿主細胞にトランスフェクトされた組

50

換え発現ベクターを用いて発現された抗体（さらに下に記述する）、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（さらに下に記述する）、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（たとえば、マウス）から単離された抗体（たとえば、Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295を参照のこと）、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含むなんらかの他の手段によって調製、発現、作製もしくは単離された抗体を含むものとする。このような組換えヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン生殖系列配列から誘導された可変および定常領域を有する。しかし、特定の実施態様では、このような組換えヒト抗体は、in vitroで突然変異誘発（または、ヒトIg配列についてトランスジェニックな動物を用いるときは、in vivoでの体細胞突然変異誘発）を受け、したがって、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列から誘導され、かつそれに関連するが、in vivoヒト抗体生殖系列レパートリー内で天然に存在しなくてもよい配列である。

10

【0042】

ヒト抗体は、ヒンジ不均一性（hinge heterogeneity）に伴って2つの形態で存在することができる。1つの形態では、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間重鎖ジスルフィド結合によって共に保持されている、約150～160kDaの安定な4つの鎖構築物を含む。第2の形態では、二量体が鎖間ジスルフィド結合を介して結合されておらず、約75～80kDaの分子が共有結合した軽鎖および重鎖（半分の抗体）で構成され形成されている。これらの形態は、アフィニティー精製の後でさえ、分離するのが極めて困難である。

20

【0043】

さまざまな無傷のIgGアイソタイプにおける第2の形態の出現頻度（frequency of appearance）は、限定されるわけではないが、抗体のヒンジ領域アイソタイプに伴う構造の違いによるものである。ヒトIgG4ヒンジのヒンジ領域における単一アミノ酸置換は、第2の形態の出現（Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105）を、ヒトIgG1ヒンジを用いて典型的に観察されるレベルに有意に低減することができる。本発明は、たとえば、産生において、所望の抗体形態の収率を改善するため、望ましいことでありうる、ヒンジ、C_H2またはC_H3領域中に1つまたはそれ以上の突然変異を有する抗体を包含する。

30

【0044】

本明細書に用いる「単離された抗体」は、その天然環境の少なくとも1つの成分から同定され、かつ分離および/または回収された抗体を意味する。たとえば、生物の少なくとも1つの成分から、または抗体が自然に存在するもしくは自然に産生される組織もしくは細胞から分離または除去された抗体は、本発明の目的の「単離された抗体」である。また、単離された抗体は、組換え細胞内の原位置の抗体を含む。単離された抗体は、少なくとも1つの精製または単離ステップにかけられた抗体である。特定の実施態様によれば、単離された抗体は、他の細胞物質および/または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

【0045】

「特異的に結合する」などの用語は、抗体またはその抗原結合性フラグメントが、抗原と生理学的条件下で比較的安定である複合体を形成することを意味する。抗体が抗原に特異的に結合するかどうかを決定する方法は、当分野でよく知られており、たとえば、平衡透折、表面プラスモン共鳴などが挙げられる。たとえば、本発明の文脈に用いる、ヒトEr b B 3を「特異的に結合する」抗体としては、表面プラスモン共鳴アッセイで測定して、約1000nM未満、約500nM未満、約300nM未満、約200nM未満、約100nM未満、約90nM未満、約80nM未満、約70nM未満、約60nM未満、約50nM未満、約40nM未満、約30nM未満、約20nM未満、約10nM未満、約5nM未満、約4nM未満、約3nM未満、約2nM未満、約1nM未満または約0.5nM未満のKDを有するヒトEr b B 3またはその一部を結合する抗体が挙げられる（たとえば、本明細書の実施例3を参照のこと）。しかし、ヒトEr b B 3を特異的に結合す

40

50

る単離された抗体は、他の（非ヒト）種からの E r b B 3 分子のような他の抗原に対する交差反応性を有する。

【 0 0 4 6 】

本明細書に用いる「中和」または「遮断」抗体は、E r b B 3 に結合すると (i) E r b B 3 または E r b B 3 フラグメントと E r b B 3 リガンド（たとえば、ニューレグリン 1）との間の相互作用を妨げる、および/または (i i) E r b B 3 の少なくとも 1 つの生物学的機能を阻害する抗体のことをいうものとする。E r b B 3 中和または遮断抗体によって生じる阻害は、適当なアッセイを用いて検出可能である限り、完全である必要はない。E r b B 3 阻害を検出するための例となるアッセイを本明細書に記述する。

【 0 0 4 7 】

本明細書に開示された抗 E r b B 3 抗体は、抗体が誘導された対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび/または C D R 領域中に 1 つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、挿入および/または欠失を含んでもよい。このような突然変異は、本明細書に開示されたアミノ酸配列を、たとえば公開された抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示されたアミノ酸配列のいずれかから誘導された抗体およびその抗原結合性フラグメントを含み、ここにおいて、1 つまたはそれ以上のフレームワークおよび/または C D R 領域内の 1 つまたはそれ以上のアミノ酸が、抗体が誘導された生殖系列配列の対応する残基に、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基に、または対応する生殖系列残留物の同類アミノ酸置換に突然変異する（このような配列変化は、本明細書においてひとまとめにして「生殖細胞突然変異」と称する）。当業者は、本明細書に開示された重鎖および軽鎖可変領域配列から出発して、1 つまたはそれ以上の個々の生殖系列突然変異またはその組合せを含む多くの抗体および抗原結合性フラグメントを容易に産生することができる。特定の実施態様において、V_H および/または V_L ドメイン内のフレームワークおよび/または C D R 残基のすべては、抗体が誘導された最初の生殖系列配列中に見いだされる残基に逆に突然変異する。別の実施態様では、特定の残基のみ、たとえば、F R 1 の最初の 8 つのアミノ酸内もしくは F R 4 の最後の 8 つのアミノ酸内に見いだされる突然変異残基のみ、または C D R 1、C D R 2 もしくは C D R 3 内に見いだされる突然変異残基のみ、最初の生殖系列配列に逆に突然変異する。別の実施態様では、1 つまたはそれ以上のフレームワークおよび/または C D R 残基が、異なる生殖系列配列（すなわち、最初に抗体が誘導された生殖系列配列と異なる生殖系列配列）の対応する残基に突然変異する。さらにまた、本発明の抗体は、フレームワークおよび/または C D R 領域内に 2 つまたはそれ以上の生殖系列突然変異の任意の組合せを含んでもよく、たとえば、ここでは、特定の個々の残基が、特定の生殖系列配列の対応する残基に突然変異する一方で、最初の生殖系列配列と異なる特定の他の残基が、維持されているか、または異なる生殖系列配列の対応する残基に突然変異する。1 つまたはそれ以上の生殖系列突然変異を含む抗体および抗原結合性フラグメントは、一旦得られたら、改善された結合特異性、増加した結合親和性、改善または増強されたアンタゴニストまたはアゴニストの生物学的性質（ありうる場合として）、低減された免疫原性などのような 1 つまたはそれ以上の所望の性質について容易に試験することができる。この一般的なやり方で得られる抗体および抗原結合性フラグメントは、本発明内に包含される。

【 0 0 4 8 】

また、本発明は、1 つまたはそれ以上の同類置換を有する、本明細書に開示された H C V R、L C V R および/または C D R アミノ酸配列のいずれかの変異体を含む抗 E r b B 3 抗体を包含する。たとえば、本発明は、本明細書に開示された H C V R、L C V R および/または C D R アミノ酸配列のいずれかと比較して、たとえば、10 またはそれより少ない、8 またはそれより少ない、6 またはそれより少ない、4 またはそれより少ない、などの同類アミノ酸置換を有する、H C V R、L C V R および/または C D R アミノ酸配列を有する抗 E r b B 3 抗体の使用を包含する。

【 0 0 4 9 】

10

20

30

40

50

本明細書に用いる「表面プラズモン共鳴」という用語は、たとえば、BIAcore™システム (Biacore Life Sciences division of GE Healthcare, Piscataway, NJ) を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度変化の検出によってリアルタイム相互作用の分析を可能にする光学的現象のことをいう。

【0050】

本明細書に用いる「 K_D 」という用語は、特定の抗体 - 抗原相互作用の平衡解離定数のことをいうものとする。

【0051】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして知られている抗体分子の可変領域中の特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基のことをいう。1つの抗原が複数のエピトープを有してもよい。したがって、異なる抗体が抗原上の異なる領域に結合してもよく、異なる生物学的作用を有してもよい。エピトープは、立体配置的または線状であってもよい。立体配置的エピトープは、線状ポリペプチド鎖の異なる部分からの空間的に並置されたアミノ酸によって生じる。線状エピトープは、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基によって生じたものである。特定の状況において、エピトープは、抗原上に糖類の部分、ホスホリル基またはスルホニル基を含んでもよい。

【0052】

「実質的同一性」または「実質的に同一の」という用語は、核酸またはそのフラグメントについて言及する場合、別の核酸（または、その相補的鎖）を用いて適当なヌクレオチド挿入物または欠失物を最適に整列したときに、任意のよく知られた配列同一性のアルゴリズム、たとえば以下で議論するFASTA、BLASTまたはGapによって測定して、ヌクレオチド塩基の少なくとも約95%、より好ましくは少なくとも96%、97%、98%または99%においてヌクレオチド配列同一性があることを示している。参照核酸分子と実質的同一性を有する核酸分子は、特定の例では、参照核酸分子によってコードされたポリペプチドと同一か、または実質的に類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしてもよい。

【0053】

ポリペプチドに適用されるように、「実質的類似性」または「実質的に類似した」という用語は、2つのペプチド配列が、デフォルトギャップ重量を用いて、たとえばプログラムGAPまたはBESTFITによって最適に整列させたときに、少なくとも95%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも98%または99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、同類アミノ酸置換によって異なる。「同類アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似した化学的性質（たとえば、電荷または疎水性）の側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般に、同類アミノ酸置換はタンパク質の機能的性質を実質的に変えないことになる。2つまたはそれ以上のアミノ酸配列が同類置換によって互いに異なる場合、パーセント配列同一性または類似性の程度を上向きに調整して置換の保存的性質（conservative nature）を補正してもよい。この調整を行う手段は、当業者によく知られている。たとえば、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331を参照のこと。類似した化学的性質の側鎖を有するアミノ酸基の例としては、（1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；（2）脂肪族 - ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；（3）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；（4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；（5）塩基性側鎖：リシン、アルギニンおよびヒスチジン；（6）酸性側鎖：アスパルテートおよびグルタメート、および（7）硫黄含有側鎖はシステインおよびメチオニンである、が挙げられる。好ましい同類アミノ酸置換基は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リシン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタメート - アスパルテートおよびアスパラギン - グルタミンである。あるいは、同類置換は、Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445に開示されたPAM250対数尤度マトリックスにおいて正の値を有する任意の変化である。「適度な同類」置換は、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負でない値を有す

10

20

30

40

50

る任意の変化である。

【0054】

ポリペプチドの配列類似性は、配列同一性とも呼ばれており、配列分析ソフトウェアを用いて典型的に測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、同類アミノ酸置換を含む、さまざまな置換、欠失および他の修飾に割り当てられる類似性の計測を用いて類似した配列をマッチングさせる。たとえば、GCGソフトウェアには、GapおよびBestfitのようなプログラムがあり、これらは、デフォルトパラメータを用いて異なる生物種からの相同性ポリペプチドのような密接に関連したポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその突然変異タンパク質との間の配列相同性または配列同一性を決定することができる。たとえば、GCGバージョン6.1を参照のこと。ポリペプチド配列は、FASTAを用い、デフォルトまたは推奨パラメータ、GCGバージョン6.1中のプログラムを用いて比較することもできる。FASTA（たとえば、FASTA2およびFASTA3）は、クエリーと探索配列との間の最良の重複部分の領域のアラインメントおよびパーセント配列同一性を提供する（前出、Pearson (2000)）。本発明の配列をさまざまな生物からの多数の配列を含むデータベースと比較するときの別の好ましいアルゴリズムは、コンピュータプログラムBLAST、特にBLASTPまたはTBLASTNであり、デフォルトパラメータを用いる。たとえば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 および Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402を参照のこと。

10

【0055】

抗体の生物学的特徴

20

本発明の抗体は、Erbb3とそのリガンドニューレグリン-1 (NRG1) との間の相互作用を遮断する。本明細書に用いるように、「Erbb3とNRG1との間の相互作用を遮断する」という表現は、Erbb3とNRG1との間の物理的相互作用を検出および/または定量化することができるアッセイにおいて、本発明の抗体を添加するとErbb3とNRG1との間の相互作用が少なくとも50%低減することを意味する。抗体がヒトErbb3とNRG1との間の相互作用を遮断するかどうかを決定するために用いることができる非限定的な例となるアッセイを、本明細書において実施例4に説明する。この実施例では、抗体をErbb3タンパク質と混合し、次いで抗体/Erbb3混合物をNRG1タンパク質でコーティングした表面に塗布する。非結合分子を洗浄した後、NRG1コーティングした表面に結合したErbb3の量を測定する。このアッセイフォーマットでは様々な量の抗体を用いて、NRG1に対するErbb3の結合の50%を遮断するのに必要な抗体の量を算出し、IC₅₀値として表すことができる。本発明は、上記のようなErbb3/NRG1結合アッセイ、または実質的に類似したアッセイにおいて試験したときに約600未満pMのIC₅₀を示す抗Erbb3抗体を含む。たとえば、本発明は、上記のようなErbb3/NRG1結合アッセイ、または実質的に類似したアッセイにおいて試験したときに、約600、500、400、300、290、280、270、260、250、240、230、220、210、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、18、16、14、12、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1pM未満のIC₅₀を示す抗Erbb3抗体を含む

30

40

【0056】

別法として、NRG1誘発性細胞内シグナル伝達における変化を検出する細胞ベースのアッセイフォーマットを用いて、抗体がErbb3とNRG1との間の相互作用を遮断するかどうかを決定することができる。このタイプの例となるアッセイフォーマットを、本明細書において実施例6および8に説明する。これらの実施例では、さまざまな量の抗Erbb3抗体の存在下でNRG1を用いて処置した後の、細胞中のキナーゼAktおよび/またはErbb3のリン酸化の程度を測定する。これらのアッセイフォーマットでは、抗Erbb3抗体の存在によって生じるAktおよび/またはErbb3リン酸化のパーセント阻害は、抗体がErbb3とNRG1との間の相互作用を遮断する程度の指標として役立つ。本発明は、上記のようなAktもしくはErbb3リン酸化アッセイ、または

50

実質的に類似したアッセイにおいて試験したときに、A k tまたはE r b B 3リン酸化を少なくとも60%阻害する抗体を含む。たとえば、本発明は、上記のようなA k tもしくはE r b B 3リン酸化アッセイ、または実質的に類似したアッセイにおいて試験したときに、A k tまたはE r b B 3リン酸化を少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%阻害する抗E r b B 3抗体を含む。

【0057】

また、本発明の抗E r b B 3抗体は、以下の性質の1つまたはそれ以上を示す：(1)細胞表面で発現したE r b B 3の内部移行を誘導する能力(たとえば、本明細書における実施例5を参照のこと)；(2)単独で、またはE G F R阻害と組み合わせたいずれかで、in vitroでN R G 1刺激性腫瘍細胞増殖を阻害する能力(たとえば、本明細書における実施例7を参照のこと)；および(3)動物における腫瘍増殖を阻害する能力(たとえば、本明細書における実施例9を参照のこと)。

10

【0058】

エピトープマッピングおよび関連技術

E r b B 3タンパク質は、すべてのE r b B / H E Rファミリーメンバーと同様に、「ドメインI」、「ドメインII」、「ドメインIII」および「ドメインIV」と称する4つの細胞外ドメインを含む。ドメインIは、配列番号：498のアミノ酸1~190によって表されるアミノ酸の配列であり；ドメインIIは、配列番号：498のアミノ酸191~308によって表されるアミノ酸の配列であり；ドメインIIIは、配列番号：498のアミノ酸309~499によって表されるアミノ酸の配列であり；そしてドメインIVは、配列番号：498のアミノ酸500~624によって表されるアミノ酸の配列である。

20

【0059】

本発明は、E r b B 3の細胞外ドメインのドメインIII中に見られる1つまたはそれ以上のエピトープと相互作用する抗E r b B 3抗体を含む。エピトープは、E r b B 3のドメインIII中にある3またはそれ以上の(たとえば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれ以上の)アミノ酸の1つまたはそれ以上の隣接配列からなってもよい。あるいは、エピトープは、E r b B 3のドメインIII中にある複数の非隣接アミノ酸(または、アミノ酸配列)のからなってもよい。本発明の特定の実施態様によれば、配列番号：498のアミノ酸345-367、配列番号：498のアミノ酸423-439；および配列番号：498のアミノ酸451-463からなる群から選択される1つまたはそれ以上のドメインIIIアミノ酸セグメント中にある1つまたはそれ以上のアミノ酸と相互作用する抗E r b B 3抗体が提供される。たとえば、本発明は、上記ドメインIIIアミノ酸セグメントのそれぞれの中(すなわち、配列番号：498のアミノ酸345-367、423-439および451-463のそれぞれの中)の少なくとも1つのアミノ酸と相互作用する抗E r b B 3抗体を含む。

30

【0060】

抗体がポリペプチドまたはタンパク質中の「1つまたはそれ以上のアミノ酸と相互作用する」かどうかを決定するためには、当業者に知られているさまざまな技術を用いることができる。例となる技術としては、たとえば、常用のクロスブロッキングアッセイ(cross-blocking assay)たとえば、Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)に記述されたもの、アラニンスキャニング突然変異解析(alanine scanning mutational analysis)、ペプチドプロット解析(peptide blots analysis) (Reineke, 2004, Methods Mol Biol 248:443-463)、およびペプチド切断解析(peptide cleavage analysis)が挙げられる。さらに、エピトープ切除、エピトープ抽出および抗原の化学修飾のような方法を用いることができる(Tomer, 2000, Protein Science 9:487-496)。抗体が相互作用するポリペプチド中のアミノ酸を同定するために用いることができる別の方法は、質量分析によって検出される水素/重水素交換である。(たとえば、本明細書における実施例11を参照のこと)。一般的には、水素/重水素交換方法は

40

50

、興味タンパク質を重水素標識し、続いて抗体を重水素標識タンパク質に結合することを含む。次に、タンパク質/抗体複合体を水に移し、抗体によって保護された残基（これは重水素標識されたままである）以外のすべての残基で水素-重水素交換を起こさせる。抗体の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断および質量分析にかけ、それによって抗体が相互作用する特異的アミノ酸に相当する重水素標識残基を明らかにする。たとえば、Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265Aを参照のこと。

【0061】

本発明は、本明細書に記述された特定の例となる抗体のいずれかと同じエピトープに結合する抗Erbb3抗体（たとえば、H1M1819N、H2M1821N、H2M1824N、H2M1827N、H1M1828N、H2M1829N、H2M1930N、H2M1934N、H2M1938N、H1M1940N、など）をさらに含む。同様に、本発明は、Erbb3またはErbb3フラグメントへの結合について、本明細書に記述された特定の例となる抗体のいずれかと競合する抗Erbb3抗体（たとえば、H1M1819N、H2M1821N、H2M1824N、H2M1827N、H1M1828N、H2M1829N、H2M1930N、H2M1934N、H2M1938N、H1M1940N、など）も含む。

【0062】

抗体が、参照抗Erbb3抗体と同じエピトープに結合するかどうか、またはそれとの結合について競合するかどうかは、当分野で知られている常法を用いることにより容易に決定することができる。たとえば、試験抗体が本発明の参照抗Erbb3抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するには、参照抗体を飽和条件下でErbb3タンパク質またはペプチドに結合させる。次に、Erbb3分子に結合する試験抗体の能力を評価する。参照抗Erbb3抗体で飽和結合後、試験抗体がErbb3に結合することができる場合、試験抗体が参照抗Erbb3抗体とは異なるエピトープに結合すると結論づけることができる。一方、参照抗Erbb3抗体で飽和結合後、試験抗体がErbb3に分子に結合することができない場合、試験抗体が本発明の参照抗Erbb3抗体によって結合されたエピトープと同じエピトープに結合している可能性がある。そこで、さらなる常用実験（たとえば、ペプチド変異および結合分析）を実施して、試験抗体の結合が観察されなかったのが実際に参照抗体と同じエピトープに結合したことによるものかどうか、または立体障害（または、別の現象）が、結合が観察されなかった原因であるかどうかを確認することができる。この種の実験は、ELISA、RIA、Biacore、フローサイトメトリーまたは当分野で利用可能な他のなんらかの定量的もしくは定性的抗体結合アッセイを用いて実施することができる。本発明の特定の実施態様によれば、競合的結合アッセイで測定して、たとえば、1倍、5倍、10倍、20倍または100倍過剰の1つの抗体が、他の結合を少なくとも50%、しかし、好ましくは75%、90%またはさらに99%阻害する場合、2つの抗体は、同じ（またはオーバーラップ）エピトープに結合している（たとえば、Junghans et al., *Cancer Res.* 1990:50:1495-1502を参照のこと）。あるいは、1つの抗体の結合を低減または排除する抗原中の本質的にすべてのアミノ酸変異が他の結合を低減または排除する場合、2つの抗体は同じエピトープに結合すると考えられる。1つの抗体の結合を低減または排除するアミノ酸変異のサブセットのみが他の結合を低減または排除する場合、2つの抗体は「オーバーラップエピトープ（overlapping epitopes）」を有すると考えられる。

【0063】

抗体が結合について参照抗Erbb3抗体と競合するかどうかを決定するため、上記の結合方法論を2つの方針で実施する。第1の方針では、参照抗体を飽和条件下でErbb3分子に結合させた後、Erbb3分子に対する試験抗体の結合を評価する。第2の方針では、試験抗体を飽和条件下でErbb3分子に結合させた後、Erbb3分子に対する参照抗体の結合を評価する。いずれの方針でも、最初の（飽和）抗体のみがErbb3分子に結合可能である場合、試験抗体および参照抗体は、結合についてErbb3と競合す

10

20

30

40

50

ると結論づけられる。当業者に認められるように、結合について参照抗体と競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同じエピトープに結合しなくてもよいが、しかし、オーバーラップまたは隣接エピトープを結合することによって参照抗体の結合を立体的に妨害することもある。

【0064】

ヒト抗体の調製

完全ヒトモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体を生成する方法は、当分野で知られている。本発明の文脈では、任意のこのような知られている方法を用いてヒトErbB3に特異的に結合するヒト抗体を作ることができる。

【0065】

VELOCIMMUNETM技術またはモノクローナル抗体を生成するための他のなんらかの知られている方法を用いて、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有する、ErbB3に対する高親和性キメラ抗体を最初に単離する。下の実験部分におけるように、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について抗体を特徴づけし、選択する。マウス定常領域を所望のヒト定常領域と置換して本発明の完全ヒト抗体、たとえば野生型または修飾されたIgG1またはIgG4を生成する。選択する定常領域は特定の使用に応じて変化してもよいが、高親和性の抗原結合性およびターゲット特異性の特徴は可変領域に存在する。

【0066】

生物学的同等性

本発明の抗ErbB3抗体および抗体フラグメントは、記述された抗体のものとは異なるが、ヒトErbB3を結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。このような変異抗体および抗体フラグメントは親配列と比較したときにアミノ酸の1つまたはそれ以上の付加、欠失または置換を含むが、記述された抗体のもの本質的に同等の生物活性を示す。同様に、本発明の抗ErbB3抗体をコードするDNA配列は、開示された配列と比較したときにヌクレオチドの1つまたはそれ以上の付加、欠失または置換を含むが、本発明の抗ErbB3抗体または抗体フラグメントと本質的に生物学的に同等である抗ErbB3抗体または抗体フラグメントをコードする配列を包含する。このような変異アミノ酸およびDNA配列の例は、上で議論されている。

【0067】

2つの抗原結合性タンパク質または抗体は、たとえば、類似の実験条件下、単一用量または複数用量のいずれかで、同モル用量で投与したときに、それらが、それらの吸収の速度および程度において有意差を示さない薬学的同等物または薬学的代替物である場合、生物学的に同等であると考えられる。いくつかの抗体は、それらがそれらの吸収の程度において同等であるが、それらの吸収速度ではそうではなくても、生物学的に同等であると考えてもよい場合、同等物または薬学的代替物であるとみなされることになり、その理由は、吸収速度におけるこのような違いが、意図的であり、かつ標識化において反映され、たとえば、慢性的使用において、有効な体の薬物濃度の達成に不可欠でなく、そして研究された特定の医薬品にとって医学的に重要でないと考えられるからである。

【0068】

一実施態様において、2つの抗原結合性タンパク質は、それらの安全性、純度および効力において臨床的に意義のある違いがない場合、生物学的に同等である。

【0069】

一実施態様において、2つの抗原結合性タンパク質は、患者が、参照生成物と生物学的生成物との間で1回またはそれ以上切り替えることができ、このようなスイッチングのない連続した療法と比較して、免疫原性における臨床的に有意な変化、または減少した有効性を含む、有害効果のリスクにおける予想された増加がない場合、生物学的に同等である。

【0070】

一実施態様において、2つの抗原結合性タンパク質は、それがいずれも、条件または

10

20

30

40

50

使用条件に共通の機構または作用機構によって、このような機構が知られている範囲で作用する場合、生物学的に同等である。

【0071】

生物学的同等性は、*in vivo*および*in vitro*方法によって示してもよい。生物学的同等性の計測としては、たとえば、(a)抗体またはその代謝産物の濃度を、時間の関数として血液、血漿、血清または他の生液体中で測定するヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験；(b)ヒト*in vivo*生物学的利用能データを関連づけて合理的に予測する*in vitro*試験；(c)抗体(または、その標的)の適当な急性薬理学的作用を時間の関数として測定するヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験；および(d)抗体の安全性、有効性または生物学的利用能または生物学的同等性を確立する管理良好の臨床試験が挙げられる。

10

【0072】

本発明の抗Er b B 3抗体の生物学的に同等な変異体は、たとえば、残基もしくは配列のさまざまな置換を行うか、または生物活性に必要でない末端もしくは内部の残基もしくは配列を欠失させることによって作製してもよい。たとえば、生物活性に必須でないシステイン残基は、欠失させるか、または他のアミノ酸と置換して再生時に不必要なもしくは間違っただ分子内ジスルフィド架橋の形成を防ぐことができる。他の文脈では、生物学的に同等な抗体は、抗体の糖鎖修飾の特徴を改良するアミノ酸変化、たとえば、糖鎖修飾を排除または除去する突然変異を含む抗Er b B 3抗体変異体を含んでもよい。

【0073】

種選択性および種交差反応性

本発明の特定の実施態様によれば、抗Er b B 3抗体は、ヒトEr b B 3に結合するが、他の種からのEr b B 3には結合しない。また、本発明は、ヒトEr b B 3に結合し、かつ1つまたはそれ以上の非ヒト種からのEr b B 3に結合する抗Er b B 3抗体を含む。たとえば、本発明の抗Er b B 3抗体は、ヒトEr b B 3に結合してもよく、かつ、場合によっては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルまたはチンパンジーのEr b B 3の1つまたはそれ以上に結合してもよいし、または結合しなくてもよい。

20

【0074】

免疫複合体

本発明は、サイトトキシン、化学療法薬、免疫抑制薬または放射性同位体のような治療部分に結合した抗Er b B 3モノクローナル抗体(「免疫複合体」)を包含する。細胞傷害性薬剤には、細胞に有害なあらゆる薬剤が含まれる。免疫複合体を形成するのに適した細胞傷害性薬剤および化学療法剤の例は、当分野で知られている(たとえば、WO 05 / 103081を参照のこと)。

30

【0075】

多重特異性抗体

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性であってもよい。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープについて特異的であってもよいし、または1つを超える標的ポリペプチドについて特異的な抗原結合性ドメインを含んでもよい。たとえば、Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22:238-244を参照のこと。本発明の抗Er b B 3抗体は、別の機能性分子、たとえば、別のペプチドまたはタンパク質に結合するか、またはそれと共に共発現することができる。たとえば、抗体またはそのフラグメントは、1つまたはそれ以上の他の分子単位、たとえば別の抗体または抗体フラグメントに機能的に結合して(たとえば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合的会合またはその他によって)、第2の結合特異性を有する二重特異性または多重特異性抗体を産生することができる。たとえば、本発明は、免疫グロブリンの1つのアームが、ヒトEr b B 3またはそのフラグメントについて特異的であり、かつこの免疫グロブリンの他のアームが第2の治療標的(たとえ

40

50

ば、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/HER2、ErbB4、VEGFまたはAng2)について特異的であるか、または治療部分に結合している二重特異性抗体を含む。

【0076】

本発明の文脈で用いることができる例となる二重特異性抗体フォーマットは、第1の免疫グロブリン(Ig)C_H3ドメインおよび第2のIgC_H3ドメインの使用を含み、ここで、第1および第2のIgC_H3ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸によって互いに異なり、そして少なくとも1つのアミノ酸の違いにより、アミノ酸の違いがない二重特異性抗体と比較してプロテインAに対する二重特異性抗体の結合が低減される。一実施態様において、第1のIgC_H3ドメインはプロテインAに結合し、第2のIgC_H3ドメインは、プロテインA結合を低減または消失させる突然変異、たとえばH95R修飾(IMGTEキソンナンバリングによる; EUナンバリングによるH435R)を含む。第2のC_H3は、Y96F修飾(IMGTEによる; EUによるY436F)をさらに含んでもよい。第2のC_H3中に見出されうるさらなる修飾としては、IgG1抗体の場合、D16E、L18M、N44S、K52N、V57MおよびV82I(IMGTEによる; EUによるD356E、L358M、N384S、K392N、V397MおよびV422I); IgG2抗体の場合、N44S、K52NおよびV82I(IMGTE; EUによるN384S、K392NおよびV422I); そしてIgG4抗体の場合、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79QおよびV82I(IMGTEによる; EUによるQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419QおよびV422I)が挙げられる。上述の二重特異性抗体フォーマットにおけるバリエーションは、本発明の範囲内に企図される。

【0077】

治療製剤および投与

本発明は、本発明の抗ErbB3抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、適した担体、賦形剤および改善された伝達、送達、耐性などをもたらす他の薬剤を用いて処方する。多くの適当な製剤は、すべての薬剤師に知られている処方集: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAに見出すことができる。これらの製剤としては、たとえば、散剤、ペースト剤、軟膏剤、ゼリー、ロウ、油、脂質、ベシクルを含む脂質(カチオン性またはアニオン性)(たとえばLIPOFECTIN™)、DNAコンジュゲート(DNA conjugates)、無水吸収ペースト剤、水中油型および油中水型乳剤、エマルジョンカーボワックス(emulsions carbowax)(さまざまな分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲルおよびカーボワックスを含む半固体混合物が挙げられる。また、Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311を参照のこと。

【0078】

患者に投与する抗体の用量は、患者の年齢およびサイズ、標的疾患、状態、投与経路などに応じて変化してもよい。好ましい用量は、典型的に体重または体表面積により算出される。本発明の抗体を成人患者におけるErbB3活性に関連する状態または疾患の治療に用いる場合、本発明の抗体を、通常、約0.01~約20mg/kg体重、より好ましくは約0.02~約7、約0.03~約5、または約0.05~約3mg/kg体重の単一用量で静脈内に投与することは好都合でありうる。頻度および治療期間は、状態の重症度に応じて調整することができる。抗ErbB3抗体の投与に有効な投与量およびスケジュールは、経験的に決定してもよく、たとえば、患者の経過を定期的評価によってモニターし、それに依りて用量を調整することができる。さらに、投与量の種間スケールリングは、当分野でよく知られた方法を用いて実施することができる(たとえば、Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)。

【0079】

さまざまな送達システム、たとえば、リポソーム中のカプセル化、微粒子、マイクロカ

10

20

30

40

50

プセル、変異ウイルスを発現可能な組換え細胞、受容体介在性エンドサイトーシス（たとえば、Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照のこと）が、知られており、本発明の医薬組成物の投与に用いることができる。導入方法としては、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。組成物は、任意の都合のよい経路によって、たとえば、注入またはボラス注射によって、上皮または粘膜皮膚内層（たとえば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜、など）を通じた吸収によって投与してもよく、他の生物学的に活性な薬剤と共に投与してもよい。投与は全身または局所であることができる。

【0080】

本発明の医薬組成物は、標準の針およびシリンジを用いて皮下または静脈内に送達することができる。さらに、皮下送達に関して、ペン型送達デバイスは、本発明の医薬組成物の送達における用途を容易に有する。このようなペン型送達デバイスは再使用可能または使い捨てであることができる。再使用可能なペン型送達デバイスは、一般に、医薬組成物を含む交換可能なカートリッジを用いる。カートリッジ内の医薬組成物をすべて投与してカートリッジが空になったら、空のカートリッジを直ちに捨てて医薬組成物を含む新たなカートリッジと交換することができる。その場合、ペン型送達デバイスは、再利用することができる。使い捨てのペン型送達デバイスでは、交換可能なカートリッジがない。つまり、使い捨てのペン型送達デバイスは、デバイス内のリザーバー中に保持された医薬組成物で予め充填されている。リザーバーから医薬組成物が空になったら、デバイス全体を廃棄する。

【0081】

多くの再使用可能なペンおよび自己注射器送達デバイスは、本発明の医薬組成物の皮下送達における用途を有する。例としては、ほんの少し例を挙げれば、AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC™ペン (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, スイス)、HUMALOG MIX 75/25™ペン、HUMALOG™ペン、HUMALIN 70/30™ペン (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPENTM I, II and III (Novo Nordisk, Copenhagen, デンマーク)、NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, デンマーク)、BD™ペン (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN™、OPTIPEN PRO™、OPTIPEN STARLET™、およびOPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, ドイツ) が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。本発明の医薬組成物の皮下送達における用途を有する使い捨てのペン型送達デバイスの例としては、ほんの少し例を挙げれば、SOLOSTAR™ペン (sanofi-aventis)、FLEXPEN™ (Novo Nordisk)、およびKWIKPEN™ (Eli Lilly)、SURECLICK™自己注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, ドイツ)、EPIPEN (Dey, L.P.)、およびHUMIRA™ペン (Abbott Labs, Abbott Park IL)、が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0082】

特定の状況では、医薬組成物を放出制御システムで送達することができる。一実施態様では、ポンプを用いてもよい (Langer, 前出; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201を参照のこと)。別の実施態様では、ポリマー物質を用いることができる; Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Press, Boca Raton, Florida参照。さらに別の実施態様では、放出制御システムを組成物の標的の近くに配置することができるため、全身用量の一部分しか必要としない (たとえば、Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138を参照のこと)。他の放出制御システムは、Langer, 1990, Science 249:1527-1533による総説に議論されている。

【0083】

注射用製剤は、静脈内、皮下、皮内および筋肉内注射、点滴注入などのための剤形を含んでもよい。これらの注射用製剤は、公知の方法によって製造してもよい。例として、注射用製剤は、たとえば、上記の抗体またはその塩を、注射に慣用的に用いられる滅菌水性媒体または油性媒体中に溶解、懸濁または乳化することによって製造してもよい。注射用

10

20

30

40

50

の水性媒体としては、たとえば、生理食塩水、グルコースおよび他の補助剤を含有する等張性溶液、などがあり、これらを、適当な可溶化剤、たとえばアルコール（たとえば、エタノール）、ポリアルコール（たとえば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤〔たとえば、ポリソルベート80、HCO-50（硬化ヒマシ油のポリオキシエチレン（50mol）付加物）〕、などと組み合わせて用いてもよい。油性媒体としては、たとえば、ゴマ油、ダイズ油、などが用いられ、これらを、可溶化剤、たとえば安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール、などと組み合わせて用いてもよい。このように製造された注射剤は、適当なアンプル中に充填するのが好ましい。

【0084】

上記の経口または非経口使用のための医薬組成物は、活性成分の用量を適合させるのに適した単位用量で剤形に製造することが有利である。単位用量のこのような剤形としては、たとえば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが挙げられる。含まれる前述の抗体の量は、一般に単位用量の剤形当たり約5～約500mg；特に注射剤の形態では、前述の抗体を、約5～約100mg、他の剤形については、約10～約250mg含むことが好ましい。

【0085】

抗体の治療上の使用

本発明の抗体は、とりわけ、Erbb3活性に関連するか、もしくはそれによって媒介されるか、またはErbb3とErbb3リガンド（たとえば、NRG1）との間に相互作用を遮断することによって治療できるあらゆる疾患または障害の治療、予防および/または回復に有用である。本発明の抗体および抗原結合性フラグメントは、たとえば、脳および髄膜、中咽頭、肺および気管支樹、消化管、男性および女性生殖器系、筋肉、骨、皮膚および付属器、結合組織、脾臓、免疫系、造血細胞および骨髄、肝臓および尿路、ならびに眼のような特殊な感覚器官に生じる原発性および/または転移性腫瘍の治療に用いてもよい。特定の実施態様では、本発明の抗体および抗原結合性フラグメントを、以下のがん：腎細胞がん、膵がん、乳がん、頭頸部がん、前立腺がん、悪性神経膠腫、骨肉腫、結腸直腸がん、胃がん（たとえば、MET増幅（amplification）による胃がん）、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん（たとえば、EGFR依存性非小細胞肺がん）、滑膜肉腫、甲状腺がんまたは黒色腫の1つまたはそれ以上の治療に用いる。

【0086】

また、本発明は、抗EGFRまたは抗HER2療法に対して抵抗性であるか、または抵抗性となった腫瘍を治療する方法を提供する。たとえば、本発明は、（a）抗EGFR抗体（たとえば、セツキシマブ）、EGFRの小分子阻害剤（たとえば、エルロチニブ）、抗HER2抗体（たとえば、トラスツズマブ）、および/またはHER2の小分子阻害剤の1つまたはそれ以上に対して抵抗性であるか、または抵抗性になった腫瘍を有する患者を確定すること；および（b）本発明の抗Erbb3抗体を、単独で、または抗EGFR抗体（たとえば、セツキシマブ）、EGFR（たとえば、エルロチニブ）の小分子阻害剤、抗HER2抗体（たとえば、トラスツズマブ）および/もしくはHER2の小分子阻害剤と組み合わせて患者に投与すること；を含む方法を含む。以下、併用療法をより詳細に議論する。

【0087】

併用療法

本発明は、本発明の抗Erbb3抗体を少なくとも1つのさらなる治療活性成分と併用して投与することを含む治療投与レジメンを含む。このようなさらなる治療活性成分の非限定的な例としては、他のErbb3アンタゴニスト（たとえば、第2の抗Erbb3抗体またはErbb3の小分子阻害剤）、Erbb2/HER2のアンタゴニスト（たとえば、抗HER2抗体〔たとえば、トラスツズマブ〕またはHER2活性の小分子阻害剤）、Erbb4のアンタゴニスト（たとえば、抗Erbb4抗体またはErbb4活性の小分子阻害剤）、上皮増殖因子受容体（EGFR）のアンタゴニスト（たとえば、抗EGF

10

20

30

40

50

R抗体[たとえば、セツキシマブまたはパニツムマブ]またはEGFR活性の小分子阻害剤[たとえば、エルロチニブまたはゲフィチニブ]、EGFRvIIIのアンタゴニスト(たとえば、EGFRvIIIを特異的に結合する抗体)、VEGFアンタゴニスト(たとえば、VEGF-Trap、たとえば、US7,087,411参照(本明細書においては「VEGF阻害性の融合タンパク質」とも称する)、抗VEGF抗体(たとえば、ビバシズマブ)、VEGF受容体の小分子キナーゼ阻害剤(たとえば、スニチニブ、ソラフェニブまたはパゾパニブ)、または抗DLL4抗体(たとえば、US2009/0142354に開示された抗DLL4抗体、たとえばREGN421)、など)が挙げられる。本発明の抗Erbb3抗体と併用して有益に投与してもよい他の薬剤としては、小分子サイトカイン阻害剤およびサイトカイン、たとえばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18またはそれらのそれぞれの受容体に結合する抗体を含む、サイトカイン阻害剤を含む。また、本発明は、本明細書に記載された抗Erbb3抗体のいずれかおよび1つまたはそれ以上のVEGF、DLL4、EGFRの阻害剤、または上記のサイトカインのいずれかを含む治療的併用を含み、ここで、阻害剤は、アプタマー、アンチセンス分子、リボザイム、siRNA、ペプチボディ(peptibody)、ナノ抗体または抗体フラグメント(たとえば、Fabフラグメント; F(ab')₂フラグメント; Fdフラグメント; Fvフラグメント; scFv; dAbフラグメント; または、他の改変分子、たとえば二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特性抗体、ミニ抗体および最小限の認識ユニット)である。また、本発明の抗Erbb3抗体は、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、コルチコステロイドおよび/またはNSAIDと併用して投与してもよい。本発明の抗Erbb3抗体は、放射線治療および/または従来の化学療法も含む治療レジメンの一部として投与してもよい。さらなる治療活性成分を、本発明の抗Erbb3抗体の投与の前に、同時に、または後に投与してもよい(本開示の目的では、このような投与レジメンは、本発明の治療活性成分「と併用した」抗Erbb3抗体の投与と考えられる)。

【0088】

投与レジメン

本発明の特定の実施態様によれば、抗Erbb3抗体の複数用量(multiple doses)を、所定の時間経過にわたって対象に投与してもよい。本発明のこの態様による方法は、抗Erbb3抗体の複数用量を対象に順に投与することを含む。本明細書に用いるように、「順に投与する」とは、抗Erbb3抗体の各用量を、たとえば、予め定めた間隔(たとえば、時間、日、週あるいは月)をあけた異なる日の異なる時点で対象に投与することを意味する。本発明は、抗Erbb3抗体の1回の初期用量(initial dose)、続いて抗Erbb3抗体の1回またはそれ以上の二次用量(secondary dose)、場合により、続いて抗Erbb3抗体の1回またはそれ以上の三次用量(tertiary dose)を患者に順に投与することを含む方法を含む。

【0089】

「初期用量」、「二次用量」および「三次用量」という用語は、抗Erbb3抗体の投与の時系列のことをいう。したがって、「初期用量」は、治療レジメンの開始時に投与する用量(「ベースライン用量」とも称する)であり、「二次用量」は、初期用量の後に投与する用量であり、そして「三次用量」は、二次用量の後に投与する用量である。初期、二次および三次用量は、すべて同量の抗Erbb3抗体を含んでもよいが、投与の頻度に関しては互いに異なってもよい。しかし、特定の実施態様において、初期、二次および/または三次用量に含まれる抗Erbb3抗体の量は、治療の経過中に互いに変動する(たとえば、必要に応じて上または下に調整する)。特定の実施態様では、2回またはそれ以上の(たとえば、2、3、4または5回)用量を「負荷量」として治療レジメンの開始時に投与し、続いてより少ない頻度で投与するその後の用量(たとえば、「維持量」)を投与する。

【0090】

本発明の一例となる実施態様では、それぞれ二次および/または三次用量を、直前の用

10

20

30

40

50

量の 1 ~ 26 (たとえば、1、 $1\frac{1}{2}$ 、2、 $2\frac{1}{2}$ 、3、 $3\frac{1}{2}$ 、4、 $4\frac{1}{2}$ 、5、 $5\frac{1}{2}$ 、6、 $6\frac{1}{2}$ 、7、 $7\frac{1}{2}$ 、8、 $8\frac{1}{2}$ 、9、 $9\frac{1}{2}$ 、10、 $10\frac{1}{2}$ 、11、 $11\frac{1}{2}$ 、12、 $12\frac{1}{2}$ 、13、 $13\frac{1}{2}$ 、14、 $14\frac{1}{2}$ 、15、 $15\frac{1}{2}$ 、16、 $16\frac{1}{2}$ 、17、 $17\frac{1}{2}$ 、18、 $18\frac{1}{2}$ 、19、 $19\frac{1}{2}$ 、20、 $20\frac{1}{2}$ 、21、 $21\frac{1}{2}$ 、22、 $22\frac{1}{2}$ 、23、 $23\frac{1}{2}$ 、24、 $24\frac{1}{2}$ 、25、 $25\frac{1}{2}$ 、26、 $26\frac{1}{2}$ またはそれ以上) 週後に投与する。本明細書に用いる「直前の用量」という成句は、一連の複数投与において、介在用量のない順序ですぐ次の用量の投与前に患者に投与する抗 E r b B 3 抗体の用量を意味する。

【0091】

本発明のこの態様による方法は、任意の回数の二次および/または三次用量の抗 E r b B 3 抗体を患者に投与することを含んでもよい。たとえば、特定の実施態様では、1 回の二次用量のみを患者に投与する。別の実施態様において、2 回またはそれ以上の(たとえば、2、3、4、5、6、7、8 回またはそれ以上の)二次用量を患者に投与する。同様に、特定の実施態様では、1 回の三次用量のみを患者に投与する。別の実施態様において、2 回またはそれ以上の(たとえば、2、3、4、5、6、7、8 回またはそれ以上の)三次用量を患者に投与する。

10

【0092】

複数回の二次用量を含む実施態様では、それぞれの二次用量を他の二次用量と同じ頻度で投与してもよい。たとえば、それぞれの二次用量を、直前の用量の 1 ~ 2 週後に患者に投与してもよい。同様に、複数回の三次用量を含む実施態様では、それぞれの三次用量を他の三次用量と同じ頻度で投与してもよい。たとえば、それぞれの三次用量を、直前の用量の 2 ~ 4 週後に患者に投与してもよい。あるいは、二次および/または三次用量を患者に投与する頻度を、治療レジメンの経過にわたって変えることができる。また、投与の頻度を、臨床試験後に個々の患者の必要性に応じて医師による治療経過中に調整してもよい。

20

【0093】

また、前述の投与レジメンの文脈では、本明細書に開示した例となる抗 E r b B 3 抗体のいずれかをを用いてもよい。

【0094】

抗体の診断上の使用

30

また、本発明の抗 E r b B 3 抗体を、たとえば、診断目的で、試料中の E r b B 3 の検出および/または測定に用いてもよい。たとえば、抗 E r b B 3 抗体またはそのフラグメントを用いて E r b B 3 の異常発現(たとえば、過剰発現、過小発現、発現の欠如、など)を特徴とする状態または疾患を診断してもよい。E r b B 3 の例となる診断分析は、たとえば、患者から得た試料を、抗 E r b B 3 抗体が検出可能な標識またはレポーター分子で標識化された本発明の抗 E r b B 3 抗体と接触させることを含んでもよい。別法として、非標識抗 E r b B 3 抗体を、それ自体で検出可能に標識された二次抗体と併用して診断用途に用いることができる。検出可能な標識またはレポーター分子は、放射性同位体、たとえば ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S もしくは ^{125}I ；蛍光もしくは化学発光部分、たとえばフルオレセインイソチオシアネートもしくはローダミン；または、酵素、たとえばアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはルシフェラーゼであることができる。試料中の E r b B 3 を検出または測定するのに用いることができる具体例となるアッセイとしては、酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)、放射免疫測定法(RIA)および蛍光活性化セルソーター(FACS)が挙げられる。

40

【0095】

本発明による E r b B 3 診断分析に用いることができる試料としては、正常または病理学的条件下で、検出可能な量の E r b B 3 タンパク質またはそのフラグメントを含む、患者から入手可能な任意の組織または液体試料が挙げられる。一般に、健康な患者(たとえば、異常な E r b B 3 レベルまたは活性に関連する疾患または状態を患っていない患者)

50

から得られる特定の試料中の E r b B 3 のレベルを測定して最初にベースラインまたは標準 (E r b B 3 のレベル) を確立する。次いで、この E r b B 3 のベースラインレベルを、 E r b B 3 関連の疾患または状態を有することが疑われる個体から得た試料で測定した E r b B 3 のレベルと比較することができる。

【実施例】

【 0 0 9 6 】

以下の実施例は、当業者に本発明の方法および組成物を製造および使用方法の完全な開示および説明を提供するために記載するが、本発明者らが本発明とみなすものの範囲を限定しようとするものではない。使用した数 (たとえば、量、温度、など) に関しては、正確さを確保するように努めたが、しかし、ある程度の実験的な誤差および偏差を考慮しなければならない。特に明記しない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏の度であり、そして圧力は大気圧またはその近くである。

10

【 0 0 9 7 】

〔実施例 1〕ヒト E r b B 3 に対するヒト抗体の生成

ヒト E r b B 3 の外部ドメインを含む免疫原を、免疫応答を刺激するアジュバントと共に、ヒト免疫グロブリン重鎖およびカッパ軽鎖可変領域をコードする D N A を含む VELOCIMMUNE^(R) マウスに直接投与した。抗体免疫応答を、 E r b B 3 特異的免疫測定法によってモニターした。所望の免疫応答が達成されたら、脾細胞を集め、マウス骨髄腫細胞を融合させてその生存能力を維持し、ハイブリドーマ細胞系を形成する。ハイブリドーマ細胞系をスクリーニングし、選択して E r b B 3 特異的抗体を産生する細胞系を同定した。この技術をを用いて、いくつかの抗 E r b B 3 キメラ抗体 (すなわち、ヒト可変ドメインおよびマウス定常を備えた抗体) を得た。このように生成した例となる抗体を、以下のように表わした: H 1 M 1 8 1 9 N、H 2 M 1 8 2 1 N、H 2 M 1 8 2 4 N、H 2 M 1 8 2 7 N、H 1 M 1 8 2 8 N、H 2 M 1 8 2 9 N、H 2 M 1 9 3 0 N、H 2 M 1 9 3 4 N、H 2 M 1 9 3 6 N、H 2 M 1 9 3 7 N、H 2 M 1 9 3 8 N、および H 1 M 1 9 4 0 N。

20

【 0 0 9 8 】

また、U S 2 0 0 7 / 0 2 8 0 9 4 5 A 1 に記述されたように、骨髄腫細胞への融合なしに、抗原陽性 B 細胞から抗 E r b B 3 抗体を直接単離した。この方法を用いて、いくつかの完全ヒト抗 E r b B 3 抗体 (すなわち、ヒト可変ドメインおよびヒト定常ドメインを備えた抗体) を得た。このように生成した例となる抗体を、以下のように表わした: H 4 H 2 0 8 4 P、H 4 H 2 0 9 2 P、H 4 H 2 0 9 4 P、H 4 H 2 0 9 8 P、H 4 H 2 1 0 2 P、H 4 H 2 1 0 8 P、H 4 H 2 1 1 1 P、H 4 H 2 1 1 4 P、H 4 H 2 1 3 2 P、H 4 H 2 1 3 8 P、H 4 H 2 1 4 0 P、H 4 H 2 1 4 3 P、H 4 H 2 1 4 6 P、H 4 H 2 1 4 7 P、H 4 H 2 1 4 8 P、H 4 H 2 1 5 1 P、H 4 H 2 1 5 3 P、H 4 H 2 1 5 4 P、および H 4 H 2 2 9 0 P。

30

【 0 0 9 9 】

この実施例の方法に従って生成した例となる抗 E r b B 3 抗体の特定の生物学的性質を下記の実施例で詳細に記述する。

【 0 1 0 0 】

〔実施例 2〕重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列

40

表 1 に、選択された抗 E r b B 3 抗体の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列対ならびにそれらの対応する抗体識別子を記載する。

【 0 1 0 1 】

【表 1】

表 1

| 抗体表示 | 配列番号: | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| 2084P | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
| 2092P | 18 | 20 | 22 | 24 | 26 | 28 | 30 | 32 |
| 2094P | 34 | 36 | 38 | 40 | 42 | 44 | 46 | 48 |
| 2098P | 50 | 52 | 54 | 56 | 58 | 60 | 62 | 64 |
| 2102P | 66 | 68 | 70 | 72 | 74 | 76 | 78 | 80 |
| 2108P | 82 | 84 | 86 | 88 | 90 | 92 | 94 | 96 |
| 2111P | 98 | 100 | 102 | 104 | 106 | 108 | 110 | 112 |
| 2114P | 114 | 116 | 118 | 120 | 122 | 124 | 126 | 128 |
| 2132P | 130 | 132 | 134 | 136 | 138 | 140 | 142 | 144 |
| 2138P | 146 | 148 | 150 | 152 | 154 | 156 | 158 | 160 |
| 2140P | 162 | 164 | 166 | 168 | 170 | 172 | 174 | 176 |
| 2143P | 178 | 180 | 182 | 184 | 186 | 188 | 190 | 192 |
| 2146P | 194 | 196 | 198 | 200 | 202 | 204 | 206 | 208 |
| 2147P | 210 | 212 | 214 | 216 | 218 | 220 | 222 | 224 |
| 2148P | 226 | 228 | 230 | 232 | 234 | 236 | 238 | 240 |
| 2151P | 242 | 244 | 246 | 248 | 250 | 252 | 254 | 256 |
| 2153P | 258 | 260 | 262 | 264 | 266 | 268 | 270 | 272 |
| 2154P | 274 | 276 | 278 | 280 | 282 | 284 | 286 | 288 |
| 2290P | 290 | 292 | 294 | 296 | 298 | 300 | 302 | 304 |
| 1819N | 306 | 308 | 310 | 312 | 314 | 316 | 318 | 320 |
| 1821N | 322 | 324 | 326 | 328 | 330 | 332 | 334 | 336 |
| 1824N | 338 | 340 | 342 | 344 | 346 | 348 | 350 | 352 |
| 1827N | 354 | 356 | 358 | 360 | 362 | 364 | 366 | 368 |
| 1828N | 370 | 372 | 374 | 376 | 378 | 380 | 382 | 384 |
| 1829N | 386 | 388 | 390 | 392 | 394 | 396 | 398 | 400 |
| 1930N | 402 | 404 | 406 | 408 | 410 | 412 | 414 | 416 |
| 1934N | 418 | 420 | 422 | 424 | 426 | 428 | 430 | 432 |
| 1936N | 434 | 436 | 438 | 440 | 442 | 444 | 446 | 448 |
| 1937N | 450 | 452 | 454 | 456 | 458 | 460 | 462 | 464 |
| 1938N | 466 | 468 | 470 | 472 | 474 | 476 | 478 | 480 |
| 1940N | 482 | 484 | 486 | 488 | 490 | 492 | 494 | 496 |

【 0 1 0 2 】

抗体は、典型的に本明細書では以下の命名法にしたがって参照する：Fc 接頭辞（たとえば「H4H」、「H1M」、「H2M」）、の後に数値的識別子（たとえば、表 1 に示す「2084」）が続き、その後「P」または「N」の接尾辞が続く。したがって、この命名法によれば、本明細書において、たとえば、「H4H2084P」ように抗体を参照してもよい。本明細書に用いる抗体表示における H4H、H1M および H2M の接頭辞は、抗体の特定の Fc 領域を示す。たとえば、「H2M」抗体がマウス IgG2Fc を有

10

20

30

40

50

するのに対して、「H4H」抗体はヒトIgG4Fcを有する。当業者に認められるように、H1MまたはH2M抗体はH4H抗体に変換することができ、その逆も同じであるが、任意の事象において、表1に示す数値的識別子によって示される可変ドメイン(CDRを含む)は、同じままとなる。本明細書に用いる抗体表示におけるPおよびNの接尾辞は、同一のCDR配列を有するが、CDR配列の外側に区分される領域における(すなわち、フレームワーク領域における)配列変化を伴う重鎖および軽鎖を有する抗体のことをいう。したがって、特定の抗体のPおよびN変異体は、それらの重鎖および軽鎖可変領域内で同一のCDR配列を有するが、それらのフレームワーク領域内で互いに異なる。

【0103】

以下の実施例で用いる対照構築物

10

以下の実験には、比較のために、さまざまな対照構築物(抗Erbb3抗体)が含まれた。対照構築物は、以下のように表わす：

対照I：US7,846,440に記載された「Mab#6」の対応するドメインのアミノ酸配列を有する重鎖および軽鎖可変ドメインを有するヒト抗Erbb3抗体；

対照II：US7,705,130に記載された「U1-59」の対応するドメインのアミノ酸配列を有する重鎖および軽鎖可変ドメインを有するヒト抗Erbb3抗体；および

対照III：US7,705,130に記載された「U1-53」の対応するドメインのアミノ酸配列を有する重鎖および軽鎖可変ドメインを有するヒト抗Erbb3抗体。

【0104】

20

〔実施例3〕表面プラスモン共鳴から誘導されたヒトモノクローナル抗Erbb3の結合親和性および速度定数

ヒトモノクローナル抗Erbb3抗体の抗体結合親和性および速度定数を、25および37で表面プラスモン共鳴によって決定した(表2~4)。測定は、Biacore 2000またはT100機器において実施した。マウスFc(接頭辞H1M；H2M)またはヒトIgG4Fc(接頭辞H4H)を用いて発現させた抗体を、抗マウスまたは抗ヒトFcセンサー表面(Mabキャプチャーフォーマット)上で捕捉し、可溶性単量体(Erbb3.mmh；配列番号：497)または二量体(Erbb3-hFc；配列番号：498またはErbb3-mFc；配列番号：499)タンパク質を表面に注射した。動的結合(kinetic association)(k_a)および解離(dissociation)(k_d)速度定数(rate constants)は、スクラバー2.0曲線適合ソフトウェアを用いて、データを処理して1:1結合モデルに適合させることによって決定した。結合解離平衡定数(K_D)および解離半減期($t_{1/2}$)は、以下のように動的速度定数から算出した： $K_D(M) = k_d / k_a$ ；および $t_{1/2}(分) = (ln 2 / (60 * k_d))$ 。いくつかのクローンは、単量体(hErbb3.mmh)Erbb3タンパク質に対してナノモル以下の親和性を示した。

30

【0105】

【表 2】

表 2 25℃でのハイブリドーマAb(H1MおよびH2M)のBiacore結合親和性

| 25℃での結合 / Mab キャプチャーフォーマット | | | | | |
|----------------------------|------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| 抗体 | 検体 | ka (M 秒 ⁻¹) | kd (秒 ⁻¹) | K _D (モル) | T _{1/2} |
| H1M1819N | hErbB3.mmh | 3.19E+05 | 3.22E-04 | 1.01E-09 | 36 |
| | hErbB3.hFc | 4.80E+05 | 5.88E-05 | 1.22E-10 | 196 |
| H2M1821N | hErbB3.mmh | 2.29E+05 | 1.99E-04 | 8.67E-10 | 58 |
| | hErbB3.hFc | 4.61E+05 | 1.90E-05 | 4.13E-11 | 608 |
| H2M1824N | hErbB3.mmh | 2.23E+05 | 4.56E-05 | 2.05E-10 | 254 |
| | hErbB3.hFc | 4.31E+05 | 1.44E-06 | 3.34E-12 | 8026 |
| H2M1827N | hErbB3.mmh | 2.19E+05 | 8.96E-05 | 4.09E-10 | 129 |
| | hErbB3.hFc | 4.39E+05 | 7.58E-06 | 1.73E-11 | 1524 |
| H1M1828N | hErbB3.mmh | 5.13E+05 | 2.65E-04 | 5.15E-10 | 44 |
| | hErbB3.hFc | 1.56E+06 | 4.34E-05 | 2.79E-11 | 266 |
| H2M1829N | hErbB3.mmh | 2.30E+05 | 6.46E-05 | 2.81E-10 | 179 |
| | hErbB3.hFc | 4.36E+05 | 8.61E-06 | 1.98E-11 | 1341 |
| H2M1930N | hErbB3.mmh | 1.96E+05 | 1.09E-04 | 5.59E-10 | 106 |
| | hErbB3.hFc | 4.04E+05 | 8.27E-06 | 2.05E-11 | 1396 |
| H2M1934N | hErbB3.mmh | 1.68E+05 | 7.35E-05 | 4.38E-10 | 157 |
| | hErbB3.hFc | 3.59E+05 | 7.97E-06 | 2.22E-11 | 1450 |
| H2M1936N | hErbB3.mmh | 4.32E+04 | 2.85E-04 | 6.59E-09 | 41 |
| | hErbB3.hFc | 6.41E+04 | 6.97E-05 | 1.09E-09 | 166 |
| H2M1937N | hErbB3.mmh | 8.26E+04 | 5.63E-05 | 6.82E-10 | 205 |
| | hErbB3.hFc | 1.10E+05 | 1.27E-05 | 1.16E-10 | 908 |
| H2M1938N | hErbB3.mmh | 2.41E+05 | 1.44E-04 | 5.99E-10 | 80 |
| | hErbB3.hFc | 4.51E+05 | 1.36E-05 | 3.01E-11 | 851 |
| H1M1940N | hErbB3.mmh | 2.89E+05 | 1.38E-04 | 4.77E-10 | 84 |
| | hErbB3.hFc | 4.60E+05 | 2.43E-05 | 5.29E-11 | 475 |
| 対照 I | hErbB3.mmh | 5.14E+04 | 2.15E-04 | 4.18E-09 | 54 |
| | hErbB3.hFc | 4.63E+04 | 1.63E-05 | 3.51E-10 | 711 |
| 対照 II | hErbB3.mmh | 1.41E+05 | 3.24E-04 | 2.30E-09 | 36 |
| | hErbB3.hFc | 1.53E+05 | 4.28E-05 | 2.80E-10 | 270 |
| 対照 III | hErbB3.mmh | 1.54E+06 | 3.15E-02 | 2.05E-08 | 0.4 |
| | hErbB3.hFc | 3.78E+06 | 8.84E-05 | 2.34E-11 | 131 |

【 0 1 0 6 】

【表3】

表3 25℃でのヒトFc mAb (H4H) のBiacore結合親和性

| 25℃での結合 / Mab キャプチャーフォーマット | | | | | |
|----------------------------|------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|-------|
| | 検体 | ka (M 秒 ⁻¹) | kd (秒 ⁻¹) | K _D (モル) | T½ |
| H4H1819N | hErbB3.mmh | 8.10E+06 | 3.51E-04 | 4.35E-11 | 33 |
| | hErbB3.mFc | 1.64E+07 | 1.54E-05 | 9.43E-13 | 748 |
| H4H1821N | hErbB3.mmh | 3.80E+06 | 1.92E-04 | 5.10E-11 | 60 |
| | hErbB3.mFc | 1.22E+07 | 4.33E-06 | 3.55E-13 | 2665 |
| H4H2084P | hErbB3.mmh | 2.49E+06 | 5.96E-05 | 2.39E-11 | 179 |
| | hErbB3.mFc | 3.83E+06 | 3.95E-06 | 1.03E-12 | 2695 |
| H4H2092P | hErbB3.mmh | 3.72E+06 | 1.03E-04 | 2.78E-11 | 103 |
| | hErbB3.mFc | 5.16E+06 | 7.46E-06 | 1.45E-12 | 1429 |
| H4H2094P | hErbB3.mmh | 1.89E+06 | 1.37E-05 | 7.22E-12 | 780 |
| | hErbB3.mFc | 3.03E+06 | 1.37E-06 | 4.52E-13 | 7779 |
| H4H2098P | hErbB3.mmh | 1.14E+06 | 7.89E-05 | 6.90E-11 | 135 |
| | hErbB3.mFc | 2.21E+06 | 8.97E-06 | 4.06E-12 | 1188 |
| H4H2102P | hErbB3.mmh | 8.86E+05 | 4.88E-05 | 5.51E-11 | 218 |
| | hErbB3.mFc | 1.58E+06 | 2.26E-06 | 1.43E-12 | 4721 |
| H4H2108P | hErbB3.mmh | 1.95E+06 | 8.13E-05 | 4.18E-11 | 131 |
| | hErbB3.mFc | 2.96E+06 | 4.33E-06 | 1.46E-12 | 2458 |
| H4H2111P | hErbB3.mmh | 2.21E+06 | 1.18E-04 | 5.31E-11 | 91 |
| | hErbB3.mFc | 3.50E+06 | 8.69E-06 | 2.49E-12 | 1225 |
| H4H2114P | hErbB3.mmh | 9.29E+05 | 9.88E-05 | 1.06E-10 | 108 |
| | hErbB3.mFc | 1.48E+06 | 7.98E-06 | 5.41E-12 | 1335 |
| H4H2132P | hErbB3.mmh | 2.16E+06 | 3.81E-05 | 1.77E-11 | 279 |
| | hErbB3.mFc | 3.49E+06 | 3.35E-06 | 9.58E-13 | 3183 |
| H4H2138P | hErbB3.mmh | 2.39E+06 | 5.01E-05 | 2.09E-11 | 213 |
| | hErbB3.mFc | 3.71E+06 | 5.46E-06 | 1.47E-12 | 1952 |
| H4H2140P | hErbB3.mmh | 1.66E+06 | 3.27E-05 | 1.98E-11 | 326 |
| | hErbB3.mFc | 2.51E+06 | 9.86E-07 | 3.93E-13 | 10797 |
| H4H2143P | hErbB3.mmh | 1.83E+06 | 9.73E-05 | 5.31E-11 | 109 |
| | hErbB3.mFc | 2.86E+06 | 4.63E-06 | 1.75E-12 | 2302 |

【 0 1 0 7 】

10

20

30

40

【表 4】

| | | | | | |
|----------|------------|----------|----------|----------|-------|
| H4H2146P | hErbB3.mmh | 2.79E+06 | 3.46E-05 | 1.24E-11 | 308 |
| | hErbB3.mFc | 4.54E+06 | 1.98E-06 | 4.35E-13 | 5392 |
| H4H2147P | hErbB3.mmh | 2.47E+06 | 1.08E-04 | 4.38E-11 | 98 |
| | hErbB3.mFc | 3.33E+06 | 4.58E-06 | 1.50E-12 | 2325 |
| H4H2148P | hErbB3.mmh | 3.98E+06 | 3.47E-05 | 8.71E-12 | 307 |
| | hErbB3.mFc | 5.91E+06 | 1.74E-06 | 2.95E-13 | 6110 |
| H4H2151P | hErbB3.mmh | 3.04E+06 | 2.86E-05 | 9.42E-12 | 372 |
| | hErbB3.mFc | 4.48E+06 | 9.52E-07 | 2.13E-13 | 11186 |
| H4H2153P | hErbB3.mmh | 2.94E+06 | 3.43E-05 | 1.17E-11 | 311 |
| | hErbB3.mFc | 3.67E+06 | 1.24E-06 | 3.37E-13 | 8603 |
| H4H2154P | hErbB3.mmh | 2.13E+06 | 3.73E-05 | 1.76E-11 | 285 |
| | hErbB3.mFc | 3.25E+06 | 9.77E-07 | 3.00E-13 | 10901 |
| H4H2290P | hErbB3.mmh | 5.82E+05 | 6.72E-05 | 1.15E-10 | 159 |
| | hErbB3.mFc | 8.00E+05 | 1.13E-05 | 1.40E-11 | 945 |

10

20

【 0 1 0 8 】

【表 5】

表 4 選択 mAb の 37℃での Biacore 結合親和性

| 37℃での結合 / Mab キャプチャーフォーマット | | | | | |
|----------------------------|------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| | 検体 | ka (M 秒 ⁻¹) | kd (秒 ⁻¹) | K _D (モル) | T _{1/2} |
| H4H1819N | hErbB3.mmh | 1.21E+07 | 1.56E-03 | 1.29E-10 | 7 |
| | hErbB3.mFc | 3.68E+07 | 5.62E-05 | 1.53E-12 | 206 |
| H4H1821N | hErbB3.mmh | 6.49E+06 | 1.08E-03 | 1.67E-10 | 11 |
| | hErbB3.mFc | 1.87E+07 | 3.55E-05 | 1.89E-12 | 326 |
| 対照 I | hErbB3.mmh | 1.58E+05 | 5.48E-04 | 3.47E-09 | 21 |
| | hErbB3.mFc | 2.60E+05 | 1.01E-04 | 3.90E-10 | 114 |
| 対照 II | hErbB3.mmh | 3.23E+05 | 1.34E-03 | 4.13E-09 | 9 |
| | hErbB3.mFc | 1.44E+06 | 1.37E-04 | 9.50E-11 | 84 |
| 対照 III | hErbB3.mmh | 3.40E+06 | 7.90E-02 | 2.40E-08 | 0.1 |
| | hErbB3.mFc | 1.05E+07 | 1.77E-04 | 1.68E-11 | 65 |

30

40

【 0 1 0 9 】

表 2 ~ 4 に示すように、本実施例で試験した例となる抗体の多くは、試験した対照抗体の結合親和性よりも優れたまたは同等の、ErbB3 に結合する高い親和性を示した。注目すべきことに、本発明の抗 ErbB3 抗体のいくつかは、単量体 (hErbB3.mmh) ErbB3 タンパク質に対してナノモル以下の親和性を示した。

【 0 1 1 0 】

〔実施例 4〕抗 ErbB3 抗体は、ヒト ErbB3 にニューレグリン 1b 結合を遮断する

50

さらに本発明の抗hErB3mAbを特徴づけるため、リガンド結合を遮断するそれらの能力をELISAにより試験した。プレートをニューレグリン1b(1 μ g/ml)で一夜コートし、次いで、抗体(0~50nM)を、50pM ErB3-hFc(配列番号:498;ハイブリドーマ用)または50pM ErB3-mFc(配列番号:499;hIgG4抗体用)のいずれかと共にインキュベートし(1時間、25 $^{\circ}$ C)、次いで、コーティングしたプレートに加え、25 $^{\circ}$ Cでさらに1時間インキュベートするにまかせた。プレートを洗浄し、非隔絶(non-sequestered)(プレート結合した)ErB3を、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)と結合した抗Fcポリで検出した。プレートをTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)で展開し、硫酸で中和した後、Victor X5プレートリーダー上450nmで吸光度を読み取った。データ分析は、Prismソフトウェア内のシグモイド型用量反応モデルを用いた。算出されたIC₅₀値は、最大遮断を達成するのに必要な抗体濃度の50%として定義され、効力を遮断する指標として用いた。各抗体の最大遮断は、阻害曲線上のゼロから50nM抗体までの吸光度の差を、用量曲線上の50pMからゼロErB3までの吸光度の差によって割ることによって算出した。結果を表5および6に示す。

【0111】

【表6】

表5 抗ErB3ハイブリドーマmAb(H1MおよびH2M)のIC₅₀値

| 抗体 | IC ₅₀ (M) | 最大遮断(%) |
|----------|----------------------|---------|
| H1M1819N | 3.15E-11 | 92 |
| H2M1821N | 2.85E-11 | 96 |
| H2M1824N | 2.51E-11 | 99 |
| H2M1827N | 2.29E-11 | 98 |
| H1M1828N | 3.00E-11 | 95 |
| H2M1829N | 2.38E-11 | 98 |
| H2M1930N | 2.22E-11 | 87 |
| H2M1934N | 2.61E-11 | 80 |
| H2M1936N | 5.27E-10 | 91 |
| H2M1937N | 4.40E-11 | 95 |
| H2M1938N | 2.49E-11 | 85 |
| H1M1940N | 5.30E-10 | 80 |

【0112】

【表 7】

表 6 抗 E r b B 3 ヒト F c m A b (H 4 H) の I C₅₀ 値

| 抗体 | IC50(M) | 最大遮断(%) |
|----------|----------|---------|
| H4H1819N | 2.00E-11 | 99 |
| H4H1821N | 1.80E-11 | 99 |
| H4H2084P | 8.73E-11 | 95 |
| H4H2092P | 5.94E-11 | 100 |
| H4H2094P | 9.00E-11 | 92 |
| H4H2098P | 1.35E-10 | 95 |
| H4H2102P | 1.86E-10 | 90 |
| H4H2108P | 1.16E-10 | 91 |
| H4H2111P | 4.97E-11 | 92 |
| H4H2114P | 1.63E-10 | 91 |
| H4H2132P | 9.57E-11 | 94 |
| H4H2138P | 1.06E-10 | 96 |
| H4H2140P | 9.46E-11 | 83 |
| H4H2143P | 8.35E-11 | 92 |
| H4H2146P | 1.77E-10 | 83 |
| H4H2147P | 5.06E-11 | 99 |
| H4H2148P | 5.08E-11 | 100 |
| H4H2151P | 7.51E-11 | 85 |
| H4H2153P | 7.40E-11 | 82 |
| H4H2154P | 9.01E-11 | 91 |
| H4H2290P | 6.64E-11 | 99 |
| 対照 I | 5.74E-10 | 98 |
| 対照 III | 8.32E-11 | 96 |

【 0 1 1 3 】

表 5 および 6 に示すように、本発明のいくつかの抗 E r b B 3 抗体は、強力な遮断を示し、アッセイの理論的最低値 (2 5 p m) とする I C₅₀ 値を有した。

【 0 1 1 4 】

〔実施例 5〕抗 E r b B 3 m A b は、細胞表面 E r b B 3 を効果的に内部移行する

抗 E r b B 3 m A b が細胞表面結合した E r b B 3 を効果的に内部移行するかどうかを決定するため、M C F - 7 細胞を選択抗 E r b B 3 抗体 (1 0 μ g / m l) と共に氷上で 3 0 分間インキュベートし、洗浄し、次いで氷上で 3 0 分間、Dylight 488 結合抗ヒト F

10

20

30

40

50

a b (1 0 μ g / m l) で染色した。次いでチューブを洗浄し、氷上と 3 7 °C のインキュベーションとの間は、1 時間離した。インキュベーション後、すべてのチューブを氷上に置き、Dylight 488クエンチング抗体 (5 0 μ g / m l) を加えた。溶液を氷上でさらに 1 時間インキュベートした。蛍光シグナルは、Accuri 流量血球計算器を用いて測定した。

【 0 1 1 5 】

抗体結合およびその後の 3 7 °C でのインキュベーションにより内部移行した E r b B 3 の相対的尺度として、内部移行した平均蛍光強度 (M F I) を以下のように算出した：

【表 8】

| |
|----------------------------------------------------------|
| 内部移行 M F I = 総 M F I - 表面 M F I |
| ここで： |
| 表面 M F I = (総 M F I - クエンチ試料の M F I) / Q E |
| および |
| Q E = 1 - [4 °C のクエンチ試料の M F I / 4 °C の非クエンチ試料の M F I] |

10

【 0 1 1 6 】

Q E (クエンチング効率) の算出は、内部移行が 4 °C で起こらないと仮定する。表 7 は

20

、試験したすべての抗体が H E R 3 内部移行を誘発することを示す。

【 0 1 1 7 】

【表 9】

表 7 3 7 °C で抗体によって誘発された H E R 3 内部移行

| 抗体 | 総 MFI 平均値±S.D. | 表面 MFI 平均値±S.D. | 内部移行 MFI 平均値±S.D. | 内部移行% 平均値±S.D. |
|----------|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| H4H1819N | 39233±9261 | 22663±5026 | 16570±5329 | 42±7 |
| H4H1821N | 32351±5658 | 11607±4781 | 20744±4993 | 64±14 |
| 対照 I | 19004±5903 | 11598±6602 | 7406±1776 | 42±20 |
| 対照 II | 41517±5696 | 23540±11994 | 17977±6299 | 45±21 |
| 対照 III | 27349±5310 | 8010±729 | 19338±5934 | 69±8 |

30

【 0 1 1 8 】

〔実施例 6〕抗 E r b B 3 抗体による N R G 1 依存性 A k t リン酸化の阻害

抗 E r b B 3 抗体を、D U 1 4 5 前立腺がん細胞中の A k t のリン酸化を阻害するそれらの能力について試験した。E r b B 3 に対する N R G 1 の結合は、E r b B 3 リン酸化を生じ、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (P I 3 - K) の漸増および活性化を導く。活性化された P I 3 - K はキナーゼ A k t をリン酸化し、活性化する。したがって、A k t リン酸化は、E r b B 3 受容体活性化の下流マーカーである。D U 1 4 5 細胞を 9 6 ウェルプレートに接種し、1 % F B S を含有する培地中で一夜、血清不足にした。次いで、0 . 5 μ g / m l のヒト F c 対照タンパク質または 0 . 0 1、0 . 1 もしくは 0 . 5 μ g / m l の濃度のさまざまな抗 E r b B 3 抗体の存在下で 3 0 分間、細胞を 0 . 5 n M N R G 1 (R & D Systems) で刺激した。抗体の各濃度を 3 回試験した。細胞を溶解し、ホスホ A k t 細胞ベースの E L I S A キット (R & D Systems) を用い、製造元の説明書にしたがって、リン酸化された A k t の相対レベルを決定した。各抗 E r b B 3 抗体対 F c

40

50

対照基についてのAktリン酸化の平均パーセント阻害を表8に示す。

【0119】

【表10】

表8 抗ErbB3抗体によるAktリン酸化の阻害

| 抗体 | Aktリン酸化のパーセント阻害 | | |
|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0.1 µg/ml ErbB3 抗体 | 0.1 µg/ml ErbB3 抗体 | 0.5 µg/ml ErbB3 抗体 |
| H1M1819N | 29 | 72 | 75 |
| H2M1821N | 11 | 68 | 73 |
| H2M1824N | 25 | 63 | 74 |
| H2M1827N | 16 | 73 | 75 |
| H1M1828N | 22 | 66 | 75 |
| H2M1829N | 22 | 74 | 74 |
| H2M1930N | 39 | 64 | 66 |
| H2M1934N | 20 | 56 | 67 |
| H2M1936N | 6 | 30 | 67 |
| H2M1937N | -13 | 41 | 71 |
| H2M1938N | 40 | 63 | 74 |
| H1M1940N | 13 | 50 | 68 |
| 対照 I | -1 | 46 | 60 |
| 対照 II | 4 | 7 | 51 |
| 対照 III | 3 | 45 | 55 |

10

20

30

【0120】

本実施例は、本発明の抗ErbB3抗体のいくつかはAktリン酸化において対照抗ErbB3抗体よりも強力な遮断を示すことを説明している。たとえば、抗体H1M1819N、H2M1821N、H2M1824N、H2M1827N、H1M1828N、H2M1829N、H2M1930NおよびH2M1938Nは、0.1 µg/mlの用量でAktリン酸化を少なくとも60%阻害するのに対して、その用量で46%を超える阻害を達成した対照ErbB3抗体はなかった。

【0121】

〔実施例7〕抗ErbB3抗体による腫瘍細胞増殖の阻害

選択抗ErbB3抗体を、EGFR遮断剤と併用して用いたときのA431表皮がん細胞の成長を阻害するそれらの能力について試験した。96ウェルプレート中のA431細胞を、0.5%FBSを含有する培地中でインキュベートし、抗EGFR抗体(1 µg/ml)、抗ErbB3抗体(1 µg/ml)または抗EGFR(1 µg/ml)+抗ErbB3抗体の存在下、0.05、0.25または1.0 µg/mlで1nMニューレグリン-1(NRG1)により刺激した。リガンド(NRG1)および遮断抗体(EGFR及びErbB3)を、72時間実験中0、24および48時間で加えた。処置開始から72時間の時点までに達成された生細胞数における相対変化を、標準的な方法(Cell Proliferation Assay Kit; Promega)を用いて決定した。各抗ErbB3抗体対アイソタイプ対照群についての細胞増殖における平均パーセント減少を表9に示す。

40

50

【 0 1 2 2 】

【 表 1 1 】

表 9 抗 E r b B 3 抗体による A 4 3 1 細胞増殖の阻害

| 抗体 | A431 細胞の増殖におけるパーセント減少 | | | |
|----------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| | 1.0 µg/ml ErbB3 抗体 | 抗 EGFR 抗体+ 0.05 µg/ml ErbB3 抗体 | 抗 EGFR 抗体+ 0.25 µg/ml ErbB3 抗体 | 抗 EGFR 抗体+ 1.0 µg/ml ErbB3 抗体 |
| H1M1819N | 34 | 61 | 78 | 91 |
| H2M1821N | 16 | 35 | 62 | 85 |
| H2M1824N | 33 | 45 | 68 | 85 |
| H2M1827N | 15 | 53 | 75 | 84 |
| H1M1828N | 30 | 55 | 73 | 85 |
| H2M1829N | 31 | 53 | 76 | 89 |
| H2M1930N | 3 | 23 | 36 | 39 |
| H2M1934N | -3 | 24 | 30 | 28 |
| H2M1938N | 5 | 37 | 56 | 60 |
| H1M1940N | -4 | 19 | 20 | 19 |
| 対照 I | 19 | 31 | 37 | 56 |
| 対照 III | 7 | 22 | 21 | 32 |

10

20

【 0 1 2 3 】

本実施例は、本発明の抗 E r b B 3 抗体のいくつかは、A 4 3 1 細胞増殖において対照抗 E r b B 3 抗体より強力な阻害を示したことを説明している。たとえば、抗体 H 1 M 1 8 1 9 N、H 2 M 1 8 2 1 N、H 2 M 1 8 2 4 N、H 2 M 1 8 2 7 N、H 1 M 1 8 2 8 N および H 2 M 1 8 2 9 N は、抗 E G F R 抗体と併用したとき、0 . 2 5 µ g / m l の用量で細胞増殖を少なくとも 6 0 % 阻害したのに対して、対照抗体 I および I I I は、それぞれ、これらの実験条件下で細胞増殖を 3 7 % および 2 1 % しか阻害しなかった。

30

【 0 1 2 4 】

〔実施例 8〕抗 E r b B 3 抗体による E r b B 3 および A k t リン酸化の阻害

選択抗 E r b B 3 抗体を、A 4 3 1 類表皮がんおよび M C F 7 乳がん細胞における E r b B 3 および A k t の N R G 1 刺激性リン酸化を阻害するその能力について試験した。第 1 の実験では、A 4 3 1 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、完全培地中で一夜インキュベートした。次いで、細胞を 1 時間血清不足 (0 . 5 % F B S) にし、5 . 0 µ g / m l のアイソタイプ対照または 0 . 0 5、0 . 2 5 もしくは 5 . 0 µ g / m l の抗 E r b B 3 抗体の存在下で 1 n M N R G 1 (R & D Systems) を用いて 3 0 分間刺激した。細胞を溶解し、E r b B 3 および A k t に対する抗体ならびにそれらのリン酸化形態を用い、標準方法を用いてウェスタンブロットを実施した。全 E r b B 3 または A k t に対するリン酸化された E r b B 3 または A k t の比率を算出し、これを用いてアイソタイプ対照と比較した抗 E r b B 3 抗体のそれぞれについての A k t または E r b B 3 リン酸化のパーセント阻害を決定した。A 4 3 1 細胞における E r b B 3 または A K T リン酸化の阻害についての結果を、それぞれ表 1 0 および 1 1 に示す。

40

【 0 1 2 5 】

【表 1 2】

表 1 0 A 4 3 1 細胞における E r b B 3 リン酸化のパーセント阻害

| 抗体 | 0.05 µg/ml | 0.25 µg/ml | 5.0 µg/ml |
|----------|------------|------------|-----------|
| H4H1819N | 98 | 105 | 107 |
| H4H1821N | 63 | 113 | 120 |
| 対照 I | -11 | 14 | 72 |
| 対照 III | -30 | -9 | -57 |

10

【 0 1 2 6】

【表 1 3】

表 1 1 A 4 3 1 細胞における A k t リン酸化のパーセント阻害

| 抗体 | 0.05 µg/ml | 0.25 µg/ml | 5.0 µg/ml |
|----------|------------|------------|-----------|
| H4H1819N | 84 | 104 | 113 |
| H4H1821N | 67 | 106 | 117 |
| 対照 I | 32 | 47 | 75 |
| 対照 III | 43 | 51 | 58 |

20

【 0 1 2 7】

類似の実験において、M C F 7 細胞を 6 ウェルプレート中に播種し、完全培地中で 2 日間インキュベートした。次いで、細胞を 1 時間血清不足 (serum-starved) (0.5% F B S) にし、次いで、5.0 µg/ml のアイソタイプ対照または 0.05、0.25、1.0 もしくは 5.0 µg/ml の抗 E r b B 3 抗体の存在下で 1 nM N R G 1 (R&D S ystems) を用いて 30 分間刺激した。A 4 3 1 細胞を用いて実施したそれらの実験と同様のやり方でウェスタンブロットおよびデータ分析を実施した。M C F 7 細胞における E r b B 3 または A K T リン酸化の阻害について結果を、それぞれ表 1 2 および 1 3 に示す。

【 0 1 2 8】

【表 1 4】

表 1 2 M C F 7 細胞における E r b B 3 リン酸化のパーセント阻害

| 抗体 | 0.05 µg/ml | 0.25 µg/ml | 1.0 µg/ml | 5.0 µg/ml |
|----------|------------|------------|-----------|-----------|
| H4H1819N | 37 | 79 | 92 | 96 |
| H4H1821N | 57 | 92 | 96 | 97 |
| 対照 I | 0 | 17 | 44 | 81 |
| 対照 III | 4 | 12 | 60 | 61 |

40

【 0 1 2 9】

【表 15】

表 13 MCF7細胞におけるAktリン酸化のパーセント阻害

| 抗体 | 0.05 µg/ml | 0.25 µg/ml | 1.0 µg/ml | 5.0 µg/ml |
|----------|------------|------------|-----------|-----------|
| H4H1819N | 13 | 36 | 80 | 90 |
| H4H1821N | 17 | 69 | 82 | 89 |
| 対照 I | 21 | 29 | 34 | 46 |
| 対照 III | 35 | 28 | 29 | 35 |

10

【0130】

本実施例は、本発明の代表的な抗Erbb3抗体が、試験したほとんどの実験条件下で対照抗体と比較して、Erbb3およびAktのリン酸化を阻害する優れた能力を示したことを説明している。A431細胞では、たとえば、H4H1819NおよびH4H1821Nは、0.25 µg/mlでErbb3およびAktリン酸化を完全に阻害したのに対して、対照抗体は5.0 µg/mlでも完全阻害を達成することができなかった。同様に、MCF7細胞では、1.0 µg/mlのH4H1819NおよびH4H1821Nは、5.0 µg/mlの対照抗Erbb3抗体のいずれかよりも大幅にErbb3およびAktリン酸化を阻害した。

20

【0131】

〔実施例9〕抗Erbb3抗体による腫瘍増殖の阻害

選択抗Erbb3抗体を、免疫不全マウスにおいてヒト腫瘍異種移植片の増殖を阻害するその能力について試験した。簡潔には、 $1 \sim 5 \times 10^6$ のA431ヒト表皮がん細胞またはA549ヒト非小細胞肺癌細胞(ATCC)を、6~8週齢SCIDマウスの側腹部に皮下移植した(Taconic, Hudson, NY)。腫瘍が $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ の平均体積に達した後、マウスを処置のため群($n = 1$ 群につき6匹のマウス)に無作為化した。第1の実験では、A431腫瘍を有するマウスに、ヒトFc(配列番号:500、 12.5 mg/kg)、または抗Erbb3抗体(0.5 または 12.5 mg/kg)を投与した。すべての抗体は、週2回の皮下注射により約3週間投与した。腫瘍体積を、実験経過の間、週2回測定し、実験の終わりに腫瘍を切除して腫瘍重量を決定した。Fc処置群と比較した平均腫瘍寸法の他に最終的な腫瘍重量を各群について算出した。結果を表14にまとめる。

30

【0132】

【表 16】

表 14 SCIDマウス (ハイブリドーマ mAb-H1M および H2M) における A431 腫瘍増殖の阻害

| 抗体 (mg/kg) | 処置開始からの腫瘍増殖 mm ³ (平均値±S.D.) | 腫瘍増殖における平均%減少 | 平均腫瘍重量(g) | 腫瘍重量における平均%減少 |
|----------------|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| hFc 対照(12.5) | 860 ± 358 | - | 0.778 ± 0.268 | - |
| H1M1819N (0.5) | 355 ± 178 | 59 | 0.520 ± 0.155 | 33 |
| H2M1821N (0.5) | 280 ± 131 | 67 | 0.428 ± 0.209 | 45 |
| H2M1827N (0.5) | 246 ± 71 | 71 | 0.432 ± 0.152 | 45 |
| H2M1829N (0.5) | 392 ± 265 | 54 | 0.480 ± 0.283 | 38 |
| 対照 I (0.5) | 862 ± 199 | 0 | 0.815 ± 0.190 | -5 |
| 対照 I (12.5) | 299 ± 139 | 65 | 0.438 ± 0.217 | 44 |

10

【0133】

類似の実験では、ヒト IgG4 フォーマットにおいて選択された抗体を用いて、類似の結果を得、表 15 にまとめた。

20

【0134】

【表 17】

表 15 SCIDマウス (ヒト Fc mAb-H4H) における A431 腫瘍増殖の阻害

| 抗体 (mg/kg) | 処置開始からの腫瘍増殖 mm ³ (平均値±S.D.) | 腫瘍増殖における平均%減少 | 平均腫瘍重量(g) | 腫瘍重量における平均%減少 |
|-----------------|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| hFc 対照(12.5) | 797 ± 65 | - | 1.31 ± 0.142 | - |
| H4H1819N (0.5) | 161 ± 69 | 80 | 0.453 ± 0.010 | 65 |
| H4H1819N (12.5) | 110 ± 47 | 86 | 0.458 ± 0.108 | 65 |
| H4H1821N (0.5) | 148 ± 73 | 81 | 0.482 ± 0.058 | 63 |
| H4H1821N (12.5) | 74 ± 100 | 91 | 0.392 ± 0.117 | 70 |
| 対照 I (0.5) | 675 ± 228 | 15 | 0.928 ± 0.215 | 29 |
| 対照 I (12.5) | 95 ± 51 | 88 | 0.361 ± 0.063 | 72 |
| 対照 III (0.5) | 409 ± 254 | 49 | 0.687 ± 0.269 | 48 |
| 対照 III (12.5) | 219 ± 129 | 73 | 0.545 ± 0.096 | 58 |

30

40

【0135】

類似の実験において、A549 腫瘍異種移植片の増殖におけるさまざまな抗 ErbB3 抗体の効果を決定し、表 16 にまとめた。

【0136】

【表 18】

表 16 SCIDマウスにおけるA549腫瘍増殖の阻害

| 抗体 (mg/kg) | 処置開始からの腫瘍増殖 mm ³ (平均値±S.D.) | 腫瘍増殖における平均%減少 | 平均腫瘍重量(g) | 腫瘍重量における平均%減少 |
|----------------|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| hFc 対照(12.5) | 727 ± 184 | - | 1.27 ± 0.332 | - |
| H4H1821N (0.2) | 366 ± 90 | 50 | 0.811 ± 0.145 | 37 |
| H4H1821N (0.5) | 347 ± 52 | 52 | 0.820 ± 0.245 | 36 |
| H4H1821N (2.5) | 346 ± 106 | 52 | 0.783 ± 0.175 | 39 |
| 対照 I (0.5) | 719 ± 230 | 1 | 1.328 ± 0.363 | -3.78 |
| 対照 I (2.5) | 614 ± 177 | 15 | 0.985 ± 0.198 | 23 |

10

【0137】

本実施例で示すように、抗体H4H1819NおよびH4H1821Nは、それぞれ、*in vivo*腫瘍増殖を、試験した対照抗ErB3抗体の投与で観察された腫瘍増殖阻害の程度よりも優れた、または同等の程度まで有意に阻害した。

20

【0138】

〔実施例10〕他のErBファミリーメンバーを遮断する薬剤と併用した抗ErB3抗体による腫瘍増殖の阻害

ヒト腫瘍異種移植片増殖におけるH4H1821N + 阻害性抗EGFR抗体（「抗EGFRmAb」）との併用治療の効果を試験した。簡潔には、 2×10^6 のFaDuヒト下咽頭がん細胞（ATCC）を、6～8週齢SCIDマウス（Taconic, Hudson, NY）の側腹部に皮下移植した。腫瘍が150～200 mm³の平均体積に達した後、マウスを、処置のための群（n = 1群につき6匹のマウス）に無作為化した。マウスに、ヒトFc対照タンパク質（12.5 mg/kg）、H4H1821N（2.5 mg/kg）、抗EGFRmAb（10 mg/kg）またはH4H1821N + 抗EGFRmAb（2.5 + 10 mg/kg）の組合せを投与した。すべての抗体は、週2回皮下注射により投与した。腫瘍体積を、実験経過の間、週2回測定し、実験の終わりに腫瘍を切除して腫瘍重量を決定した。処置開始からの腫瘍増殖の平均（平均値 + / - 標準偏差）および腫瘍重量を、各処置群について算出した。腫瘍増殖および腫瘍重量のパーセント減少をFc対照基との比較から算出した。結果を表17に示す。

30

【0139】

【表 19】

表 17 SCIDマウスにおけるF a D u腫瘍異種移植片増殖の阻害

| 抗体 (mg/kg) | 処置開始からの腫瘍増殖 mm ³ (平均値±S.D.) | 腫瘍増殖における平均%減少 | 平均腫瘍重量(g) | 腫瘍重量における平均%減少 |
|----------------------------------|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| hFc 対照(12.5) | 1099 ± 186 | - | 0.993 ± 0.176 | - |
| H4H1821N (2.5) | 284 ± 175 | 74 | 0.522 ± 0.177 | 47 |
| 抗 EGFR mAb (10) | 55 ± 115 | 95 | 0.215 ± 0.120 | 78 |
| H4H1821N + 抗 EGFR mAb (2.5 + 10) | -199 ± 38 | 118 | 0.024 ± 0.020 | 98 |

10

【0140】

類似の実験では、ヒト腫瘍異種移植片増殖において、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 (1992)に記述された阻害性抗HER2抗体クローン4D5v8およびH4H1821Nを用いた併用処置の効果を試験した。簡潔には、 1×10^7 BT474のヒト乳がん細胞(ATCC)を、6~8週齢NCRヌードマウス(Taconic, Hudson, NY)の側腹部に皮下移植した。腫瘍が $150 \sim 200 \text{ mm}^3$ の平均体積に達した後、マウスを、処置のため群(n=1群につき5匹のマウス)に無作為化した。マウスに、ヒトFc対照タンパク質(25 mg/kg)、H4H1821N(12.5 mg/kg)、4D5v8(12.5 mg/kg)またはH4H1821N+4D5v8(12.5+12.5 mg/kg)の組合せを投与した。すべての抗体は、週2回皮下注射により投与した。腫瘍体積を、実験経過の間、週2回測定した。処置開始からの平均(平均値+/-標準偏差)腫瘍増殖を、各治療群について算出した。腫瘍増殖のパーセント減少を、Fc対照群との比較から算出した。結果を表18に示す。

20

【0141】

【表 20】

表 18 ヌードマウスにおけるBT474の腫瘍異種移植片増殖の阻害

| 抗体 (mg/kg) | 処置開始からの腫瘍増殖 mm ³ (平均値±SD) | 腫瘍増殖における平均%減少 |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| hFc 対照(25) | 194 ± 39 | - |
| H4H1821N (12.5) | 137 ± 65 | 29 |
| 4D5v8 (12.5) | 34 ± 121 | 82 |
| H4H1821N + 4D5v8 (12.5 + 12.5) | -79 ± 39 | 141 |

30

40

【0142】

本実施例は、H4H1821Nおよび抗EGFRまたは抗HER2抗体の併用処置が、単一薬剤処置よりも、より強力な腫瘍増殖の阻害を提供することを説明している。FaduおよびBT474パーツの腫瘍異種移植片では、いずれも、併用治療により平均腫瘍増殖が縮小(腫瘍退縮)したが、単一薬剤ではそうならなかった。

【0143】

〔実施例11〕H/D交換によるErbb3に対するH4H1821N結合のエピトープ

50

マッピング

H 4 H 1 8 2 1 N が相互作用する E r b B 3 のアミノ酸残基を決定するために実験を行った。この目的のために、H / D 交換エピトープマッピングを実施した。H / D 交換方法の一般的な説明は、たとえば、Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259 ; および Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A に記載されている。

【 0 1 4 4 】

H / D 交換により E r b B 3 における抗体 H 4 H 1 8 2 1 N の結合エピトープをマップするため、C 末端 m y c - m y c - ヘキサヒスチジン標識 (「 h E r b B 3 - m m H 」) 付きの h E r b B 3 (配列番号 : 4 9 8 のアミノ酸 1 - 6 1 3) の細胞外ドメインからなる組換え構築物を用いた。最初に、h E r b B 3 - m m H を、天然条件下で PNGase F (New England BioLabs) により脱グリコシルした。抗体 H 4 H 1 8 2 1 N を N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) アガロースビーズ (GE Lifescience) に共有結合で取り付けた。

10

【 0 1 4 5 】

「オン - 溶液 / オフ - ビーズ (on-solution/off-beads) 」実験 (溶液中のオン - 交換 (on-exchange) に続いてビーズ上でオフ - 交換 (off-exchange))、リガンド (脱グリコシル化 h E r b B 3 - m m H) を、D₂O で調製した P B S 緩衝液中で 5 分または 1 0 分間、重水素化し、次いで、2 分のインキュベーションを通して H 4 H 1 8 2 1 N ビーズに結合させた。E r b B 3 結合したビーズを、P B S 水性緩衝液 (H₂O で調製した) で洗浄し、オン - 交換時間の半分の間、P B S 緩衝液中でインキュベートした。オフ - 交換後、結合した E r b B 3 を、低 pH の氷冷 T F A 溶液を用いてビーズから溶離した。溶離した E r b B 3 を、次いで固定化ペプシン (Thermo Scientific) で 5 分間消化した。得られたペプチドを、Z i p T i p^(R) クロマトグラフィーピペットチップを用いて脱塩し、UltrafleXtreme マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (M A L D I T O F) 質量分析 (M S) によって直ちに分析した。

20

【 0 1 4 6 】

「オン - ビーズ / オフ - ビーズ (on-beads/off-beads) 」実験 (ビーズ上のオン - 交換に続いてビーズ上のオフ - 交換) では、E r b B 3 を最初に H 4 H 1 8 2 1 N ビーズに結合し、次いで、オン - 交換のため D₂O 中で 5 分または 1 0 分間インキュベートした。以下のステップ (オフ - 交換、ペプシン消化および M S 分析) は、「オン - 溶液 / オフ - ビーズ」手順について記述したとおり実施した。検出されたすべてのペプチドの重心値 (centroid values) または平均質量電荷比 (m / z) を算出し、これらの 2 セットの実験間で比較した。

30

【 0 1 4 7 】

結果を表 1 9 にまとめる。これは、H / D 交換およびペプシン消化手順後に液体クロマトグラフィー - マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (L C - M A L D I) M S によって確認されたすべての検出ペプチドについての重心 m / z 値の比較を提供する。観察された消化ペプチドの大部分では、オン - 溶液 / オフ - ビーズおよびオン - ビーズ / オフ - ビーズ実験の両方について、類似した重心値を得たが、E r b B 3 (配列番号 : 4 9 8) の細胞外ドメインの残基 3 4 5 - 3 6 7、4 2 3 - 4 3 9 および 4 5 1 - 4 6 3 に対応する 3 つのセグメントは、「5 分オン - / 2 . 5 分オフ - 交換」実験 (実験 I) および「1 0 分オン - / 5 分オフ - 交換」実験 (実験 II) の両方において、0 . 2 0 m / z より大きいまたはそれと等しいデルタ重心値 () を有した。本実施例の目的では、両方の実験において少なくとも 0 . 2 0 m / z のプラスの差 () は、抗体結合によって保護されたアミノ酸を示す。この基準を満たすセグメントは、表 1 9 において太字テキストおよびアスタリスク (*) によって示す。

40

【 0 1 4 8 】

【表 2 1】

表 1 9 h E r b B 3 - m m H に対する H 4 H 1 8 2 1 N 結合

| 残基 (配列番号: 498 の) | 実験 I | | | 実験 II | | |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------|-------------------------|--------------------------|----------|
| | 5 分オン / 2.5 分オフ交換 | | | 10 分オン / 5 分オフ交換 | | |
| | オン 溶液 / オフ ビーズ | オン ビーズ / オフ ビーズ | Δ | オン 溶液 / オフ ビーズ | オン ビーズ / オフ ビーズ | Δ |
| 46-57 | 1287.52 | 1287.41 | 0.11 | 1287.58 | 1287.64 | -0.06 |
| 58-63 | 844.97 | 844.97 | 0.00 | 845.04 | 844.99 | 0.06 |
| 58-66 | 1102.34 | 1102.25 | 0.09 | 1102.25 | 1102.30 | -0.05 |
| 58-67 | 1265.65 | 1265.60 | 0.05 | 1265.57 | 1265.50 | 0.07 |
| 58-69 | 1477.84 | 1477.77 | 0.07 | 1477.79 | 1477.79 | 0.01 |
| 59-69 | 1364.46 | 1364.48 | -0.02 | 1364.39 | 1364.42 | -0.03 |
| 61-69 | 1050.70 | 1050.67 | 0.03 | 1050.75 | 1050.68 | 0.07 |
| 75-96 | 2509.35 | 2509.27 | 0.08 | 2509.21 | 2509.21 | 0.01 |
| 76-96 | 2362.11 | 2362.09 | 0.01 | 2362.11 | 2361.97 | 0.14 |
| 84-96 | 1526.22 | 1526.05 | 0.16 | 1526.09 | 1526.08 | 0.01 |
| 84-98 | 1710.14 | 1710.11 | 0.03 | 1710.17 | 1710.07 | 0.11 |
| 84-99 | 1857.37 | 1857.34 | 0.03 | 1857.39 | 1857.33 | 0.06 |
| 86-96 | 1270.52 | 1270.50 | 0.02 | 1270.50 | 1270.45 | 0.05 |
| 100-114 | 1750.75 | 1750.60 | 0.15 | 1750.85 | 1750.75 | 0.11 |
| 100-114 | 1766.52 | 1766.55 | -0.03 | 1766.63 | 1766.47 | 0.16 |
| 100-120 | 2476.03 | 2475.80 | 0.23 | 2476.04 | 2475.96 | 0.08 |
| 103-117 | 1789.63 | 1789.48 | 0.14 | 1789.69 | 1789.44 | 0.24 |
| 112-120 | 1142.00 | 1141.95 | 0.05 | 1142.01 | 1142.06 | -0.05 |
| 144-154 | 1431.72 | 1431.72 | 0.00 | 1431.76 | 1431.67 | 0.08 |
| 345-365 | 2328.64 | 2328.64 | 0.00 | 2328.57 | 2328.64 | -0.07 |
| 345-367* | 2542.60 | 2542.34 | 0.26 | 2542.67 | 2542.47 | 0.20 |
| 366-378 | 1568.81 | 1568.70 | 0.11 | 1568.88 | 1568.78 | 0.10 |
| 368-373 | 807.97 | 807.95 | 0.02 | 807.94 | 807.88 | 0.06 |
| 368-376 | 1079.25 | 1079.30 | -0.04 | 1079.38 | 1079.30 | 0.08 |
| 368-377 | 1242.49 | 1242.40 | 0.09 | 1242.48 | 1242.43 | 0.05 |
| 368-378 | 1355.82 | 1355.68 | 0.14 | 1355.70 | 1355.73 | -0.03 |
| 368-379 | 1469.55 | 1469.56 | -0.01 | 1469.63 | 1469.57 | 0.06 |
| 368-380 | 1583.09 | 1583.10 | -0.01 | 1583.04 | 1583.03 | 0.01 |
| 369-378 | 1208.29 | 1208.25 | 0.03 | 1208.33 | 1208.30 | 0.03 |
| 397-408 | 1295.45 | 1295.47 | -0.01 | 1295.41 | 1295.36 | 0.05 |
| 397-411 | 1643.12 | 1643.04 | 0.08 | 1643.03 | 1642.98 | 0.05 |
| 397-412 | 1756.26 | 1756.08 | 0.18 | 1756.18 | 1756.04 | 0.14 |
| 405-411 | 857.06 | 856.97 | 0.09 | 857.09 | 857.02 | 0.07 |

【 0 1 4 9 】

【表 2 2】

| | | | | | | |
|----------|---------|---------|------|---------|---------|-------|
| 423-435 | 1434.94 | 1434.82 | 0.11 | 1434.96 | 1434.78 | 0.18 |
| 423-436* | 1598.08 | 1597.89 | 0.20 | 1598.27 | 1598.06 | 0.21 |
| 424-439* | 1812.55 | 1812.27 | 0.28 | 1812.76 | 1812.37 | 0.39 |
| 423-439* | 1869.57 | 1869.29 | 0.28 | 1869.79 | 1869.41 | 0.38 |
| 424-435 | 1377.85 | 1377.69 | 0.16 | 1378.16 | 1377.93 | 0.22 |
| 424-436* | 1541.12 | 1540.90 | 0.21 | 1541.20 | 1541.00 | 0.20 |
| 425-439* | 1665.29 | 1665.04 | 0.26 | 1665.55 | 1665.22 | 0.33 |
| 451-463* | 1585.74 | 1585.51 | 0.23 | 1585.77 | 1585.53 | 0.24 |
| 618-641 | 2828.04 | 2827.98 | 0.06 | 2827.98 | 2827.89 | 0.10 |
| 621-629 | 989.16 | 989.14 | 0.02 | 989.27 | 989.28 | -0.01 |
| 621-641 | 2498.60 | 2498.59 | 0.01 | 2498.65 | 2498.53 | 0.12 |

10

【0150】

表19にまとめたH/D交換結果は、配列番号：498のアミノ酸345 - 367、423 - 439および451 - 463に対応する3つの領域が、オン - 交換後のErBB3に対するH4H1821N結合によって完全なオフ - 交換から保護されることを示している。重要なことに、3つのすべての領域は、ErBB3細胞外ドメインのドメインIII内にある。したがって、本実施例は、抗体H4H1821Nが、これらの3つのアミノ酸セグメントからなるヒトErBB3細胞外ドメインのドメインIII内の不連続エピトープに結合するか、または、そうでない場合、（たとえば、抗体結合による立体配置的变化またはアロステリズム効果を介して）これらの残基をH/D交換から保護することになることを示唆している。

20

【0151】

〔実施例12〕進行結腸直腸がん（CRC）、非小細胞肺癌（NSCLC）または頭頸部がん（SCCHN）を有する患者におけるエルロチニブまたはセツキシマブと併用した抗ErBB3抗体の臨床試験

進行結腸直腸がん（CRC）、非小細胞肺癌（NSCLC）または頭頸部がん（SCCHN）を有する患者において例となる抗ErBB3抗体H4H1821Nを用いて臨床試験を行う。試験を、二相：用量漸増相および安全性拡張相（safety expansion phase）に分ける。用量漸増相では、すべての患者に、最初にH4H1821Nを3、10または20mg/kgの用量で静脈内に（IV）投与する。H4H1821Nの初期用量の後、治療レジメンは、がんタイプに基づいて変更する。NSCLC患者では、1日1回150mgのエルロチニブを、14日毎に1回、3、10または20mg/kgのIVのH4H1821Nと併用したレジメンを開始し；CRCおよびSCCHN患者では、週1回IVセツキシマブ250mg/m²を14日毎に1回、3、10または20mg/kgのIVのH4H1821Nと併用したレジメンを開始する。安全性拡張相では、NSCLC患者は、14日毎に1回のIVのH4H1821N（推奨された第2相の用量）を1日1回150mgのエルロチニブと併用して受け；CRCおよびSCCHN患者は、14日毎に1回、IVのH4H1821N（推奨された第2相の用量で）を週1回IVセツキシマブ250mg/m²と併用して受ける。

30

40

【0152】

抗ErBB3抗体H4H1821Nおよびエルロチニブまたはセツキシマブを含む併用療法は、NSCLC、CRCおよび/またはSCCHNを有する患者においてエルロチニブまたはセツキシマブ単独による単剤治療よりも大幅に観察可能な臨床的な改善をもたらすことが期待される。

【0153】

本発明は、本明細書に記述した特定の実施態様によって範囲を限定されることはない。

50

実際に、本明細書に記述したものに加えて本発明のさまざまな変更は、前述の説明および添付の図面から当業者に明らかになる。このような変更は添付の特許請求項の範囲内に帰属するものとする。

【配列表】

0006271432000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 1 2 1

(31)優先権主張番号 61/541,312

(32)優先日 平成23年9月30日(2011.9.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 クリストファー・ダリー
アメリカ合衆国ニューヨーク州10021・ニューヨーク・イーストセブンティセカンドストリート315・アパートメント7エイチ

(72)発明者 ダグラス・マクドナルド
アメリカ合衆国ニューヨーク州10023・ニューヨーク・ウェストエンドアベニュー260・アパートメント10シー

(72)発明者 シュインバオ・ドワン
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19044・ホーシャム・ビーバーヒルロード15

審査官 伊藤 良子

(56)参考文献 特表2009-521913(JP,A)
特表2010-518820(JP,A)
国際公開第2011/044311(WO,A1)
国際公開第2011/076683(WO,A1)
SCHOEBERL BIRGIT, CANCER RESEARCH, 米国, 2010年 3月15日, Vol.70, No.6, P.2485-2494
G SALA, ONCOGENE, 2011年 8月 8日, Vol.31, No.10, P.1275-1286
MAITREYEE K. JATHAL, IMMUNOLOGY ENDOCRINE & METABOLIC AGENTS - MEDICINAL CHEMISTRY, 2011年 6月 1日, Vol.11, No.2, P.131-149

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 16/30

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq