

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4969440号
(P4969440)

(45) 発行日 平成24年7月4日(2012.7.4)

(24) 登録日 平成24年4月13日(2012.4.13)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/04
	A 6 1 P 35/00

請求項の数 26 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2007-507499 (P2007-507499)	(73) 特許権者	506340482
(86) (22) 出願日	平成17年4月7日(2005.4.7)		エイガス, デビッド, ビー.
(65) 公表番号	特表2007-532566 (P2007-532566A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 902
(43) 公表日	平成19年11月15日(2007.11.15)		01, ビバリーヒルズ, ノース クレス
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/011781		ント ドライブ 522
(87) 国際公開番号	W02005/099756	(74) 代理人	100109726
(87) 国際公開日	平成17年10月27日(2005.10.27)		弁理士 園田 吉隆
審査請求日	平成20年4月4日(2008.4.4)	(74) 代理人	100101199
(31) 優先権主張番号	60/561,076		弁理士 小林 義教
(32) 優先日	平成16年4月8日(2004.4.8)	(72) 発明者	エイガス, デビッド, ビー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 902
			01, ビバリーヒルズ, ノース クレス
			ント ドライブ 522
		審査官	安居 拓哉
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疼痛治療のための E r b B アンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量の E r b B 2 アンタゴニスト抗体を含有してなる、癌と診断された患者の癌関連疼痛治療薬であって、該癌が治療の間に寛解にないか又は増殖し続けるものである医薬。

【請求項 2】

前記治療の間、癌が寛解にない、請求項 1 の医薬。

【請求項 3】

前記治療の間、癌が増殖し続ける、請求項 1 の医薬。

【請求項 4】

癌が、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵癌、扁平上皮細胞癌、肺癌、腹膜癌、肝細胞性癌、胃癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門の上皮癌、陰茎上皮癌及び頭頸部癌からなる群から選択される、請求項 1 の医薬。

【請求項 5】

癌が転移性癌である、請求項 1 の医薬。

【請求項 6】

転移が軟組織転移である、請求項 5 の医薬。

【請求項 7】

転移が骨転移を含む、請求項 5 の医薬。

【請求項 8】

10

20

癌が前立腺癌である、請求項 4 の医薬。

【請求項 9】

癌がアンドロゲン非依存性前立腺癌である、請求項 8 の医薬。

【請求項 10】

治療の間、患者の P S A が低下を示さない、請求項 8 の医薬。

【請求項 11】

治療の間、患者の P S A が上昇する、請求項 8 の医薬。

【請求項 12】

抗体が 2 C 4 抗体である、請求項 1 ないし 11 の医薬。

【請求項 13】

抗体が、ヒト軽鎖及び重鎖 I g G 1 (非-A アロタイプ) 定常領域配列に融合した、それぞれ配列番号 3 及び 4 の可変軽鎖及び可変重鎖配列を含む r h u M A b 2 C 4 である、請求項 12 の医薬。

【請求項 14】

有効量の E r b B 2 アンタゴニスト抗体を含有してなる、癌と診断された患者の癌関連疼痛治療薬であって、該癌が治療の間に寛解にないか又は増殖し続けるものである医薬の製造における E r b B 2 アンタゴニストの使用。

【請求項 15】

前記治療の間、癌が寛解にない、請求項 14 の使用。

【請求項 16】

前記治療の間、癌が増殖し続ける、請求項 14 の使用。

【請求項 17】

癌が、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵癌、扁平上皮細胞癌、肺癌、腹膜癌、肝細胞性癌、胃癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門の上皮癌、陰茎上皮癌及び頭頸部癌からなる群から選択される、請求項 14 の使用。

【請求項 18】

癌が転移性癌である、請求項 14 の使用。

【請求項 19】

転移が軟組織転移である、請求項 18 の使用。

【請求項 20】

転移が骨転移を含む、請求項 18 の使用。

【請求項 21】

癌が前立腺癌である、請求項 17 の使用。

【請求項 22】

癌がアンドロゲン非依存性前立腺癌である、請求項 21 の使用。

【請求項 23】

治療の間、患者の P S A が低下を示さない、請求項 21 の使用。

【請求項 24】

治療の間、患者の P S A が上昇する、請求項 21 の使用。

【請求項 25】

抗体が 2 C 4 抗体である、請求項 14 ないし 24 の使用。

【請求項 26】

抗体が、ヒト軽鎖及び重鎖 I g G 1 (非-A アロタイプ) 定常領域配列に融合した、それぞれ配列番号 3 及び 4 の可変軽鎖及び可変重鎖配列を含む r h u M A b 2 C 4 である、請求項 25 の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

10

20

30

40

50

本発明は、疼痛治療のための E r b B アンタゴニストに関する。

【0002】

(発明の背景)

抗 E r b B 抗体と癌治療におけるこれらの使用

レセプターチロシンキナーゼの E r b B ファミリーは、細胞成長、分化及び生存の重要な介在物質である。該レセプターファミリーは、上皮細胞成長因子 (E G F R 又は E r b B 1)、H E R 2 (E r b B 2 又は p 1 8 5^{neu})、H E R 3 (E r b B 3)、及び H E R 4 (E r b B 4 又は tyro2) を含む 4 つの明らかなメンバーを含む。

e r b B 1 遺伝子にコードされる E G F R は、ヒト悪性腫瘍の原因と示唆されている。特に E G F R の発現の増加は、乳房、膀胱、肺、頭部、首及び胃癌、並びに膠芽細胞腫で観察されている。増大した E G F R 発現は、自己分泌刺激経路によるレセプターの活性化となる、同じ腫瘍細胞による E G F R リガンド、トランスフォーミング成長因子-α (T G F - α) の生成の増加にしばしば関連していると報告されている。Baselga 及び Mendelson *Pharmac Ther.*, 64:127-154 (1994)。E G F R、又はそのリガンド T G F - α 及び E G F に対するモノクローナル抗体は、そのような悪性腫瘍の治療における治療剤として評価されている。例えば、Baselga 及び Mendelson 上掲；Masui ら, *Cancer Research*, 44:1002-1007 (1984)；及び Wu ら, *J. Clin. Invest.*, 95:1897-1905 (1995) 参照。

【0003】

E r b B ファミリーの第 2 のメンバーである p 1 8 5^{neu} は、元々は、化学的に処理されたラットの神経芽細胞種由来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。neu プロト癌遺伝子の活性化型は、コードされたタンパク質の膜貫通領域の点突然変異 (バリンからグルタミン酸へ) から生じる。neu のヒト相同体の増幅は、乳房及び卵巣癌で観察され、乏しい予後と相関している (Slamon ら, *Science*, 235:177-182 (1987)；Slamon ら, *Science*, 244:707-712 (1989)；及び米国特許第 4,968,603 号)。今日まで、neu プロト癌遺伝子におけるものに類似した点突然変異はヒトの腫瘍に対しては報告されていない。E r b B 2 の過剰発現 (増幅のためしばしば見られるが均一にはない) が、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓及び膀胱の癌腫を含む他の癌腫においても観察されている。特に、King ら, *Science*, 229:974 (1985)；Yokota ら, *Lancet*, 1:765-767 (1986)；Fukushige ら, *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986)；Guerin 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)；Zhou ら, *Mol. Carcinog.*, 3:354-357 (1990)；Aasland ら, *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988)；Williams ら, *Pathobiology*, 59:46-52 (1991)；及び McCann ら, *Cancer*, 65:88-92 (1990) 参照。E r b B 2 は前立腺癌で過剰発現されうる (Gu ら *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996)；Ross ら *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997)；Ross ら *Cancer* 79:2162-70 (1997)；及び Sadasivan ら *J. Urol.* 150:126-31 (1993))。

【0004】

ラット p 1 8 5^{neu} 及びヒト E r b B 2 タンパク質産物に対する抗体が記述されている。Drebin とその仲間は、ラット neu 遺伝子産物である p 1 8 5^{neu} に対する抗体を言及している。例えば、Drebin ら, *Cell* 41:695-706 (1985)；Myers ら, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991)；及び W094/22478 参照。Derbin ら, *Oncogene* 2:273-277 (1988) は、p 1 8 5^{neu} の 2 つの異なる領域と反応性のある抗体混合物が、ヌードマウス中に移植された neu 形質転換 N I H - 3 T 3 細胞に相乗的な抗腫瘍効果を生じることを報告している。また 1998 年 10 月 20 日公開の米国特許第 5,824,311 号参照。

Hudziak ら, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989) には、ヒトの乳房腫瘍株化細胞 S K - B R - 3 を使用して特徴付けられた抗 - E r b B 2 抗体パネルの作成が記載されている。抗体への暴露に続いて S K - B R - 3 細胞の相対的細胞増殖が、72 時間後の単層のクリスタルバイオレット染色により測定された。このアッセイを使用して、4 D 5 と呼ばれる抗体により最大の阻害度が得られ、これは細胞増殖を 56% 阻害した。パネルの他の抗

体は、このアッセイにおいてより少ない度合いで細胞増殖を低減した。さらに、抗体 4 D 5 は、T N F - α の細胞障害効果に対し、E r b B 2 過剰発現乳房腫瘍株化細胞を感作させることが見出されている。また、1997年10月14日に公開された米国特許第5,677,171号参照。Hudziakらにより検討された抗-E r b B 2 抗体は、Fendlyら Cancer Research 50:1550-1558(1990) ; Kotts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) ; 及びSchaeferら Oncogene 15:1385-1394(1997)においてもさらに特徴付けられている。

【0005】

マウス抗-E r b B 2 抗体 4 D 5 の組換えヒト化体(h u M A b 4 D 5 - 8、r h u M A b H E R 2 又はハーセプチン(登録商標) ; 米国特許第5,821,337号)は、広範な抗癌治療を前に受けたE r b B 2 過剰発現転移性乳癌を持つ患者において臨床的に活性であった(Baselgaら, J. Clin. Oncol. 14:737-744(1996))。ハーセプチン(登録商標)は、腫瘍がE r b B 2 タンパク質を発現する転移性乳癌を有する患者の治療のために、1998年9月25日、食品医薬品局から販売許可を受けた。

様々な特性を有する他の抗-E r b B 2 抗体は、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) ; W094/00136 ; 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 ; 及びKlapperら Oncogene 14:2099-2109(1997)に記載されている。

【0006】

相同性スクリーニングは、結果的に他の2つのE r b B レセプターファミリーメンバーを同定した ; E r b B 3 (米国特許第5,183,884号及び第5,480,968号、並びにKrausら PNAS(USA) 86: 9193-9197(1989))、及びE r b B 4 (欧州特許出願第599,274号、Plowmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750(1993)、及びPlowmanら, Nature 366: 473-475(1993))。これらのレセプターはどちらも、少なくともいくつかの乳癌株での増加した発現を示す。

E r b B レセプターが一般に、細胞内の様々な組み合わせで発見され、ヘテロ二量化は様々なE r b B リガンドに対する細胞応答の相違を増加すると考えられる(Earpら Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132(1995))。E G F Rは6つの異なるリガンド ; 上皮成長因子 (E G F) ; トランスフォーミング成長因子アルファ (T G F - α)、アンフィレグリン、ヘパリン結合上皮細胞成長因子 (H B - E G F)、ベーターセルリン及びエピレグリンにより結合される(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ヘレグリンタンパク質のファミリーはE r b B 3 及びE r b B 4 のリガンドである。ヘレグリンファミリーは、 α 、 β 及び γ ヘレグリン (Holmesら, Science, 256:1205-1210(1992) ; 米国特許第5,641,869号 ; 及びSchaeferら Oncogene 15:1385-1394(1997)) ; n e u 分化因子 (N D F)、グリア成長因子 (C G F) ; アセチルコリンレセプター促進活性 (A R I A) ; 及び感覚、運動神経由来因子 (S M D F) を含む。概説については、Groenenら Growth Factors 11:235-257(1994) ; Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262(1996) 及びLeeら Pharm. Rev. 47:51-85(1995) 参照。最近になって更に3つのE r b B リガンドが同定された ; E r b B 3 又はE r b B 4 のどちらかに結合すると報告されたニューレグリン-2 (N R G - 2) (Changら Natu

re 387 509-512(1997);及びCarrawayら Nature 387:512-516(1997)) ; E r b B 4 に結合するニューレグリン-3 (Zhangら PNAS(USA)94(18):9562-7(1997)) ; 及びE r b B 4 に結合するニューレグリン-4 (Harariら Oncogene 18:2681-89(1999)) H B - E G F、ペータセルリン及びエピレグリンもまたE r b B 4 に結合する。

【0007】

E G F及びT G F α はE r b B 2 に結合しないが、E G Fはヘテロ二量体を形成するようにE G F R及びE r b B 2 を促進し、E G F Rを活性化し、その結果ヘテロ二量体でE r b B 2 のトランスリン酸化を生じる。ヘテロ二量体及び／又はトランスリン酸化はE r b B 2 チロシンキナーゼを活性化するように見える。上掲のEarpら、参照。同様に、E r b B 3 がE r b B 2 と共に発現しているとき、活性シグナル伝達複合体が形成され、E r b B 2 に対する抗体はこの複合体を分裂させる能力がある (Sliwowskiら, J. Biol. Chem., 269(20) :14661-14665(1994))。更に、ヘレグリン(H R G)に対するE r b B 3 の親和性はE r b B 2 と共に発現するときの高い親和性にまで増加される。また、E r b B 2 - E r b B 3 タンパク質複合体に関しては、Leviら, Journal of Neuroscience 15:1329-1340(1995) ; Morrisseyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1431-1435(1995) ; 及びLewisら, Cancer Res., 56:1457-1564(1996)参照。E r b B 3 と同様にE r b B 4 はE r b B 2 と活性シグナル伝達複合体を形成する(Carraway and Cantley, Cell 78:5-8(1994))。

【0008】

疼痛管理

慢性疼痛は様々な疾患及び病理学的状態の一般的な症状であって、侵害受容性疼痛（組織の損傷によって生じる疼痛）、神経障害疼痛（神経、脊髄又は脳の異常によって生じる疼痛）及び心因性疼痛（完全に又は主に心因性疾患に関したものが含まれる。侵害受容性疼痛は体性痛（骨、関節、筋肉、皮膚又は結合組織に起因するもの）及び内臓痛を含み、内臓器官、例えば胃腸管および膵臓に起因する。

軽度から中程度の疼痛は、一般的に非ステロイド性抗炎症薬（N S A I D）、例えばアセトアミノフェン、イブプロフェン、アスピリン、ケトロラック、エトドラクなど）によって治療される。より重度の慢性疼痛の治療は、オピエイトとN S A I Dの組合せ、例えばアスピリンとオキシコドン（(Percodan)、アセトアミノフェンとヒドロコドン(Vicodin and Lortab)）が含まれる。

また、疼痛は進行癌のよくある症状である。例えば、約60%のホルモン抵抗性前立腺癌患者は著しい疼痛で苦しむ。一般的に、疼痛は直接、癌（癌転移を含む）から生じるが、癌治療そのものと関連していることもある。例えば、癌の外科的除去の間に神経損傷があった場合、慢性疼痛が生じうる。また、化学療法が疼痛の原因になることもありうる。発疱薬と称される化学療法剤が、静脈から漏れると組織に害がありうるものもある。場合によっては、化学療法によって、口（口内炎）又は腸（粘膜炎）の内壁に疱疹が生じる。末梢性神経障害は特定の化学療法剤が高用量に長期間投与される場合に起こりうる。また、放射線治療は、治療される癌性腫瘍を囲む正常な細胞に影響するので、疼痛が生じうる。

【0009】

現在一般に、10段階の視覚アナログスケール(visual analog scale)でスコア3以下に疼痛を維持するためのオピエイト用量を投与することによって患者の疼痛を軽減するために、モルヒネやヒロインなどのオピエイト鎮痛剤によって癌関連の疼痛が管理されている。しかしながらこの治療は最適でない。一般的な副作用には睡魔及び便秘がある。加えて、患者は耐性になるものが多く、オピエイト鎮痛剤に身体的に依存するようになり、疼痛治療の有効性が低くなり、薬剤依存の深刻な問題が生じる。オピオイドを中断する場合、禁断症状が現れるかもしれない、その特徴や重症度は、中断される特定のオピオイド、中断されるオピオイドの一日量、オピオイド治療の継続期間及び薬剤に依存する個々の症状などの因子に依存する。禁断症状自体は重度の疼痛を含む症状と関連している。癌性疼痛の唯一の効果的な治療は、成功裏に行われる腫瘍の根絶であろう。

重症の、持続疼痛は、患者及びその介護者を衰弱させ、患者及び医学専門家のオピオイ

10

20

30

40

50

ド投与に対する恐れのために、治療されていないことが多い。現在の治療が不満足であるので、より効果的で、現在の治療に関連するリスクと望ましくない副作用がない、癌関連の疼痛を含む慢性疼痛の管理のための更なる治療様式を開発することが重要である。

【0010】

(発明の概要)

この発明は、少なくともある程度、r h u M A b 2 C 4と称するE r b Bアンタゴニストで治療される前立腺癌患者が、腫瘍が進行しているときでさえ痛覚消失の必要性が低くなるか疼痛が軽減されたという驚くべき所見に基づく。これはr h u M A b 2 C 4が痛覚消失性性質を有することを示す。

一態様では、本発明は、患者にE r b Bアンタゴニストの有効量を投与されることを含んでなる患者の疼痛を治療する方法に関する。

10

他の態様では、本発明は、患者の疼痛あるいは痛覚消失の必要性が軽減されるか又は取り除かれる用量のE r b Bアンタゴニストを患者に投与されることを含んでなる、患者の疼痛を治療する方法に関する。

一実施態様では、疼痛は疼痛を反映する疼痛スコア又は生活の質スコアで測定される。例えば、疼痛は0から5の6段階スケールのマギール疼痛評価(McGill Pain Index)により測定してもよい。あるいは、疼痛は、患者の疼痛の主観的感觉で表す0-100の視覚アナログスケール(visual analog scale)を用いて測定してもよい。痛覚消失の必要性は鎮痛スコアを用いて測定してもよい。特定の実施態様では、非ステロイド性鎮痛薬の1用量は鎮痛スコア1に対応し、モルヒネの1回10mg用量又は、他のオピエイト鎮痛薬の等価用量は鎮痛スコア2に対応する。

20

【0011】

他の実施態様では、疼痛は毎日モニターされる。

さらに他の実施態様では、痛覚消失の必要性も毎日モニターされる。

他の態様では、本発明は、癌と診断された患者の癌関連の疼痛を治療する方法であり、患者にE r b Bアンタゴニストの有効量が投与されることを含む方法に関するものであり、前記の癌は寛解でないか又は当該治療の間、成長し続ける。

前記方法の特定の実施態様では、癌は、前記治療の間寛解の状態にないか、又は治療の間に成長し続ける。

癌は何れの癌でもよく、例として、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、扁平上皮細胞癌、肺癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門の上皮癌、陰茎上皮癌ないし頭頸部癌が挙げられるが、これに限定されるものではない。

30

特定の実施態様では、癌は転移性癌である。

他の実施態様では、転移は軟組織転移である。

さらに他の実施態様では、転移は骨転移を含む。

好ましい実施態様では、癌は前立腺癌、特にアンドロゲン非依存性前立腺癌を含むものである。

他の実施態様では、癌は前立腺癌であり、患者のP S Aは治療の間に低減あるいは亢進を示す。

40

【0012】

更なる態様では、本発明は、患者にE r b Bアンタゴニストの有効量が投与されることを含んでなり、患者の非癌関連の疼痛を治療する方法に関する。

なお更なる態様では、本発明は、有効量のE r b Bアンタゴニスト、及び疼痛の治療のために該アンタゴニストを投与するようにという指示書を含んでなるキットに関する。

すべての態様では、E r b Bアンタゴニストは抗体であることが好ましい。抗体は、例えば、E r b Bを結合するモノクローナル抗体でもよい。他の実施態様では、抗体はE r b Bのリガンドの活性化をブロックする。さらに他の実施態様では、抗体はE r b Bヘテロ二量体の形成をブロックする。好ましい実施態様では、抗体はE r b B 2に対するモノ

50

クローナル抗体 2 C 4 の結合をブロックする。他の好ましい実施態様では、抗体はモノクローナル抗体 2 C 4 の生物学的特徴を有する。更なる好ましい実施態様では、抗体はモノクローナル抗体 2 C 4 又はヒト化 2 C 4 を含んでなる。

抗体は抗体断片、例として F a b 断片などであってもよく、細胞障害性薬剤とコンジュゲートしていてもしていなくてもよい。

本発明に従って治療される疼痛は、限定するものではないが侵害受容性疼痛、神経障害疼痛及び心因性疼痛などの急性の疼痛又は慢性の疼痛であってもよく、癌関連又は癌に関連しないものでもよい。疼痛が癌関連のものである場合、癌は場合によって、E r b B 2 及び／又は E G F R などの E r b B レセプターを発現する。特定の実施態様では、癌は転移性癌であり、この転移は軟組織及び／又は骨転移でありえる。

10

他の実施態様では、癌は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膵癌、扁平上皮細胞癌、肺癌、腹膜癌、肝細胞性癌、胃癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門の上皮癌、陰茎上皮癌及び頭頸部癌からなる群から選択される。

特定の実施態様では、癌は前立腺癌、例えばアンドロゲン非依存性前立腺癌である。

【0013】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

特に提言しない限り、本明細書中で使用した技術用語及び化学用語は本発明が属する分野の通常の技術者によって一般的に理解される意味と同じである。Singleton等., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第2版, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)により当分野の技術者は本開示内容に使用した多くの用語の一般的な理解が得られる。

20

【0014】

I. 定義

「疼痛」なる用語は、本明細書中で最も広義の意味で用いられ、侵害受容性疼痛、例えば体性痛覚及び内臓痛；神経障害疼痛、例えば中枢神経性疼痛及び末梢神経性疼痛；及び心因性疼痛などの急性疼痛及び慢性疼痛を含む全種類の疼痛を指す。前記用語は好ましくは慢性疼痛、最も好ましくは体性痛及び内臓痛を含む侵害受容性疼痛を指すものであり、それは癌に関連するもの、癌に関連しないもの、又は部分的に癌に関連するものでありうる。

30

「侵害受容性疼痛」なる用語は、限定するものではないが切断、挫傷、骨骨折、粉碎損傷、熱傷などを含む身体組織の損傷に起因するすべての疼痛を含むために用いられる。このタイプの疼痛は一般的に、うずいたり、刺すようなものだったり、ズキズキするようなものである。組織損傷（侵害受容器）の疼痛レセプターが、主に皮膚又は、内部臓器に位置する。

「体性痛」なる用語は、骨、関節、筋肉、皮膚又は結合組織に起因する疼痛を指すために用いられる。このタイプの疼痛は一般的にうずいたりズキズキする質のものであり、局所的なものである。

「内臓痛」なる用語は、内臓器官、例えば胃腸管及び膵臓に起因する疼痛を指すために、本願明細書において用いられる。内臓痛はうずくものを含み、臓器莢膜の腫瘍併発に起因する非常に局所的なものである。一般的に凹窩内臓の閉塞に起因する他のタイプの内臓痛は間欠的で締めつけるような特徴があり、あまり局所的な疼痛ではない。

40

【0015】

「神経障害疼痛」なる用語は、末梢神経系又は中枢神経系による感覚入力過程の異常から生じる疼痛を指すために、本願明細書において用いられる。

「痛覚消失」は、通常痛みを伴う刺激や鎮痛薬での治療に応答して疼痛が消失することを指すために用いられる。「鎮痛薬」なる用語及びその文語的に同義の用語は、痛覚消失を引き起こすことが可能である薬剤を指す。

患者の「痛覚消失の必要性」なる用語は、患者の疼痛を管理するために患者に鎮痛薬（E r b B アンタゴニスト以外）の投与が必要であることを意味するために、本願明細書に

50

において用いられる。

「処置」は治療的処置及び予防又は予防的処置を意味する。処置を必要とするものには、既に疼痛を持つもの並びに疼痛が予防されるべきものが含まれる。

「有効量」なる用語は、E r b Bアンタゴニストの投与前に、痛覚消失の下で経験されるような主観的な疼痛を感知するか又は疼痛スコアを同じに維持するか低くしつつ、少なくともある程度疼痛を軽減するために、又は痛覚消失の必要性を少なくするか除去するために有効なE r b Bアンタゴニストの量を意味する。疼痛及び疼痛の低減は、疼痛管理の分野で公知の任意の疼痛スコア系及び／又は疼痛の生活の質スコア系を用いて評価することができる。好ましくは、疼痛は6段階スケール(0-5)のマックギール疼痛評価(McGill Pain Index)に基づいて測定される。この評価では、0 = 疼痛なし、1 = 軽度の疼痛、2 = 不快にさせるような疼痛、3 = 苦しむような疼痛、4 = ひどい疼痛、5 = 耐えがたい疼痛である。疼痛の生活の質スコアは、0-100の視覚アナログスケールを用いて測定することができる。

10

【0016】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長により特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態に相当するか、または表すものである。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ悪性腫瘍が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平上皮癌(squamous cell cancer)(例えば、上皮性扁平上皮癌(epithelial squamous cell cancer))、小細胞肺癌、非小細胞肺癌を含む肺癌、肺の腺癌及び肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞癌、胃腸癌を含む胃(gastric又はstomach)癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓(kidney又はrenal)癌、前立腺癌、陰門癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌及び頭部及び頸部の癌が含まれる。

20

「P S A」なる用語は、前立腺特異的抗原試験によって測定されるような前立腺によって産生される血液中の前立腺特異的抗原のレベルを意味するために、本明細書中で用いられる。前立腺が癌の場合、この抗原の量が増加し、一般的に癌の進行につれて増加し続ける。

【0017】

「E r b B」は、E r b Bレセプターファミリーに属するレセプタープロテインキナーゼであり、E G R F、E r b B 2、E r b B 3及びE r b B 4レセプター及び今後同定されるこのファミリーの他のメンバーを含む。E r b Bは一般に、E r b Bリガンドと結合する細胞外ドメイン；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；及びリン酸化されうるいくつかのチロシンキナーゼ残基を抱合するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含んでなりうる。E r b Bは「天然配列」E r b B又はその「アミノ酸配列変異体」であってもよい。好ましくは、E r b Bは天然配列ヒトE r b Bである。

30

「E r b B 1」、「上皮成長因子レセプター」、「H E R 1」及び「E G F R」という用語は、ここで、互換的に使用され、Carpenterら, Ann. Rev. Biochem. 56:881-914(1987)に開示されているようなE G F Rに相当し、その自然発生突然変異体(例えば、Humphreyら, PNAS(USA) 87:4207-4211(1990)に記載されているような欠失変異体E G F R；I I型E G F R突然変異体(米国特許第6, 455, 498)等)を含む。e r b B 1は、E G F Rタンパク質産物をコードする遺伝子に相当する。

40

表記「E r b B 2」、「H E R 2」は、ここで互換的に使用され、例えばSembaら, PNAS(USA)82:6497-6501(1985)及びYamamotoら, Nature 319:230-234(1986)(Genebank受託番号 X03363)に記載されているヒトH E R 2タンパク質に相当する。「e r b B 2」という用語は、ヒトE r b B 2をコードする遺伝子に相当し、「n e u」はラットp 185^{ne}をコードする遺伝子に相当する。好ましくは、E r b B 2は天然配列ヒトE r b B 2である。

【0018】

50

「E r b B 3」及び「H E R 3」は、例えば、米国特許第5,183,884号及び第5,480,968号、並びにKrausら, PNAS(USA) 86: 9193-9197(1989)に開示されたレセプターポリペプチドに相当する。

ここでの用語「E r b B 4」及び「H E R 4」は、例えば、欧州特許出願599,274; Plowmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750(1993); 及びPlowmanら, Nature 366: 473-475(1993)に開示されたレセプターポリペプチドに相当し、例えば1999年4月22日公開の国際公報99/19488に開示されているような、そのアイソフォームを含む。

「E r b B リガンド」とは、E r b B レセプターに結合する及び／又は活性化するポリペプチドを意味する。この用語はE r b B リガンドの膜結合性前駆体型だけでなくE r b B リガンドのタンパク分解過程の可溶性型も含む。ここで特に対象とするE r b B リガンドは、例えば上皮細胞成長因子(E G F) (Savageら, J. Biol. Chem. 247: 7612-7672(1972)); トランスフォーミング成長因子- α (T G F- α) (Marquardtら, Science 223: 1079-1082 (1984)); シュワン細胞腫由来成長因子又はケラチノサイト自己分泌成長因子としても知られているアンフィレグリン(Shoyabら, Science 243:1074-1076(1989); Kimuraら, Nature 348:257-260(1990); 及びCookら, Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557(1991)); ベータセルリン(Shingら, Science 259:1604-1607(1993); 及びSasadaら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173(1993)); ヘパリン結合上皮細胞成長因子(H B-E G F)(Higashiyamaら, Science 251:936-939(1991)); エピレグリン(Toyodaら, J. Biol. Chem. 270: 7495-7500(1995); 及びKomurasakiら, Oncogene 15:2841-2848(1997)); ヘレグリン(以下参照); ニューレグリン-2 (N R G-2) (Carrawayら, Nature 387: 512-516(1997)); ニューレグリン-3 (N R G-3) (Zhangら, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 9562-9567(1997)); 及びニューレグリン-4 (N R G-4) (Harariら Oncogene 18:2681-89(1999))又はクリプト(C R-1) (Kannanら J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335(1997))のような天然配列ヒトE r b B リガンドである。E G F R に結合するE r b B リガンドは、E G F、T G F- α 、アンフィレグリン、ベータセルリン、H B-E G F 及びエピレグリンを含む。E r b B 3 に結合するE r b B リガンドは、ヘレグリンを含む。E r b B 4 に結合する能力のあるE r b B リガンドはベータセルリン、エピレグリン、H B-E G F、N R G-2、N R G-3、N R G-4 及びヘレグリンを含む。

【0019】

ここで使用される「ヘレグリン」(H R G)は、米国特許第5,641,869号又はMarchionniら, Nature, 362:312-318(1993)に開示されているようなヘレグリン遺伝子産物にコードされるポリペプチドに相当する。ヘレグリンの例は、ヘレグリン- α 、ヘレグリン- β 1、ヘレグリン- β 2、及びヘレグリン- β 3 (Holmesら, Science, 256:1205-1210(1992); 米国特許第5,641,869号); n e u 分化因子(N D F) (Pelesら, Cell 69:205-216(1992)); アセチルコリンレセプター誘発活性(A R I A) (Fallsら, Cell, 72:801-815(1993)); グリア成長因子(G G F) (Marchionniら, Nature, 362:312-318(1993)); 感覚及び運動神経由来因子(S M D F) (Hoら, J. Biol. Chem. 270:14523-14532(1995)); 及び γ -ヘレグリン (Schaeferら, Oncogene 15:1385-1394(1997))を含む。該用語は、天然配列H R G ポリペプチドの生物学的活性断片及び／又はアミノ酸配列変異体、例えばそれらのE G F 様ドメイン断片(例えばH R G β 1₁₇₇₋₂₄₄)が含まれる。

ここでの「E r b B ヘテロ-オリゴマー」は、少なくとも2つの異なるE r b B を含んでなる非共有的に関連したオリゴマーである。このような複合体は、2以上のE r b B を発現する細胞がE r b B リガンドに暴露すると形成される (Sliwkowskiら, J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665(1994))。このようなE r b B ヘテロ-オリゴマーの例はE G F R -E r b B 2、E r b B 2-E r b B 3 及びE r b B 3-E r b B 4 複合体を含む。更にE r b B ヘテロ-オリゴマーは、異なるE r b B レセプター、例えばE r b B 3、E r b B 4 又はE G F R と組み合わせられた2以上のE r b B 2 を含んでいてもよい。他のタンパク質、例えばサイトカインレセプターサブユニット(例えばg p 130)はヘテロ-オリゴマーに含まれる。ここで言う患者はE r b B ヘテロダイマー、特にE G F R -E r b B 2 および／またはE r b B 2-E r b B 3 ヘテロダイマーが患者細胞、例えば患者の患部組

組織内に存在するかどうかを決定するために分析する対象となりうる。

【0020】

「E r b Bのリガンド活性化」とは、対象とするE r b Bを含んでなるE r b Bヘテロ-オリゴマーに結合するE r b Bリガンドに媒介されるシグナル伝達(例えば、E r b B又は基質ポリペプチドのチロシン残基をリン酸化するE r b Bの細胞内キナーゼドメインにより引き起こされる)を意味する。一般に、これはヘテロ-オリゴマーの一又は複数のE r b Bのキナーゼドメインを活性化するE r b Bヘテロ-オリゴマーへのE r b Bリガンドの結合を含むことがあり、よってその結果、E r b Bの一又は複数のチロシン残基のリン酸化及び／又は更なる基質ポリペプチドのチロシン残基のリン酸化を生じる。E r b B活性は、様々なチロシンリン酸化アッセイを用いて定量化できる。

10

「E r b Bアンタゴニスト」は、一又は複数のE r b Bの生物学的活性をブロックする(低減する又は予防する)分子である。好ましくは、前記アンタゴニストはE r b Bのリガンド活性をブロックする(低減する又は予防する)。一般的に、前記アンタゴニストは、抗体、小ペプチド又は非ペプチド(有機)分子、アンチセンス分子、オリゴヌクレオチドおとり分子などであり、E r b Bレセプターの生物学的活性を阻害する。ゆえに、例えばアンタゴニストはE r b Bに結合するか別の方法で会合するかして、そのチロシンキナーゼ活性を減弱しうる。また、E r b Bアンタゴニストは、E r b Bリガンド又はE r b Bシグナル伝達経路の他のメンバーに結合しないしは会合することによってE r b Bの生物学的活性を阻害する分子が含まれる。好適なE r b Bアンタゴニストは、E r b B 2又は、E G F R又は、E r b B 2及び／又はE G F Rを含んでなるヘテロオリゴマー(例えばヘテロ二量体)に結合する抗体及びE r b Bのリガンド活性をブロックする抗体である。最も好適なアンタゴニストは、r h u M A b 2 C 4又はr h u M A b 2 C 4の生物学的特性を有する分子である。例として、アンタゴニストは、E G F R標的薬剤及び／又はチロシンキナーゼインヒビターであってもよい。

20

【0021】

ここで使用されるように、「E G F R標的薬」という用語は、E G F Rに結合し、場合によってはE G F R活性化を抑制する治療薬に相当する。このような薬剤の例は、E G F Rに結合する抗体及び小分子を含む。E G F Rに結合する抗体の例は、M A b 5 7 9(ATCC CRL HB8506)、M A b 4 5 5(ATCC CRL HB8507)、M a b 2 2 5(ATCC CRL 8509)、M A b 5 2 8(ATCC CRL HB8509)(米国特許第4,943,533号、Mendelsohnら参照)及びその変異体、例えばキメラ2 2 5(C 2 2 5またはセツキシマブ(Cetuximab)；E R B U T I X(登録商標)及び再構成ヒト2 2 5(H 2 2 5)(国際公報96/40210、Imclone Systems社参照)；タイプIIマウスEGFRに結合する抗体(米国特許第5,212,290号)；米国特許第5,891,996号に記載のE G F Rに結合するヒト化及びキメラ抗体；及びA B X-E G FのようなE G F Rに結合するヒト抗体(国際公報98/50433、Abgenix参照)を含む。抗E G F R抗体は、細胞障害剤とコンジュゲートされ、よって免疫コンジュゲートを作る(例えば、欧州特許第659,439号A2、Merck Patent GmbH)。E G F Rに結合する小分子の例は、Z D 1 8 3 9またはゲフィチニブ(Gefitinib)(I R E S S A^{T M}；Astra Zeneca)、C P-3 5 8 7 7 4(T A R C E V A^{T M}；Genentech/OSI)及びA G 1 4 7 8、A G 1 5 7 1(S U 5 2 7 1；Sugen)を含む。

30

40

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、E r b Bなどのチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子である。そのような阻害剤の例として、PD 153035、4-(3-クロロアニリン)キナゾリン等のキナゾリン、CGP 59326、CGP 60261、およびCGP 62706等のピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、ピルロロピリミジン(pyrrolopyrimidines)、およびピラゾロピリミジン(pyrazolopyrimidines)、4-(フェニルアミノ)-7H-ピルロロ[2,3-d]ピリミジン、カルシウム(ディフェルロイルメタン、4,5-bis(4-フルオロアニリノ)フタルイミド)、ニトロチオフエン成分を含むトリホスチン(tryphostines)；PD-0183805(Warner-Lambert)；アンチセンス分子(例えば、E r b Bコード化核酸に結合するもの)；キノキサリン(quinoxalines)(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(Astra Zeneca)；PTK-787(Novartis/Schering AG)；CI-1033(Pfizer)等

50

のpan-ErbB阻害剤；Affmitac (ISIS 3521; Isis/Lilly)；メシル酸イマチニブ (Gleevac；Novartis)；PKI 166 (Novartis)；GW2016 (Glaxo SmithKline)；CI-1033 (Pfizer)；EK B-569 (Wyeth)；セマキシニブ (Semaxanib) (Sugen)；ZD6474 (AstraZeneca)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；INC-1C11 (Imclone)；または以下に挙げるいずれかの特許文献に記載されているもの：米国特許第5,804,396号；国際公報99/09016 (American Cyanamid)；国際公報98/43960 (American Cyanamid)；国際公報97/38983 (Warner Lambert)；国際公報99/06378 (Warner Lambert)；国際公報99/06396 (Warner Lambert)；国際公報96/30347 (Pfizer, Inc)；国際公報96/33978 (Zeneca)；国際公報96/3397 (Zeneca)；及び国際公報96/33980 (Zeneca)だけでなく、前段落に記載したE G F R標的薬剤を含む。

【0022】

「天然配列」ポリペプチドは、天然由来の対応するポリペプチド(例えば、ErbB又はErbBリガンド)と同一のアミノ酸配列を有するものである。このような天然配列ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。従って、天然配列ポリペプチドは、自然発生ヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、又は特定の他の哺乳動物種のアミノ酸配列を有しうる。

「アミノ酸配列変異体」という用語は、天然配列ポリペプチド由来と或る程度異なっているアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。通常、アミノ酸配列変異体は天然のErbBリガンドの少なくとも1つのレセプター結合ドメインと又は天然のErbB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%の相同性を有しており、好ましくは該レセプター又はリガンド結合ドメインと少なくとも約80%、さらに好ましくは少なくとも約90%の相同性を有している。アミノ酸配列変異体は、天然アミノ酸配列のアミノ酸配列内の或る位置での置換、欠失及び／又は挿入を有している。

「相同性」は、配列を整列させ、必要な場合には最大パーセントの相同性を達成するために間隙を導入した後に、同一であるアミノ酸配列変異体中の残基のパーセントとして定義される。整列の方法およびコンピュータープログラムは当該分野で良く知られている。一つのこのようなコンピュータープログラムはジェネンテック (Genentech) Inc. の著作の「Align 2」であり、これは1991年12月10日に20559ワシントンDCの米国著作権庁に使用者用説明書と共に提出された。

【0023】

ここでの「抗体」という用語は最も広義に使用され、特に完全なモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの完全な抗体から形成された多重特異性抗体(例えば二重特異性抗体)、及びそれらが所望の生物活性を示す限り抗体断片も含む。

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、抗体産生の際に増加する突然変異体を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、一つの抗原部位に対している。更に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含む通常のポリクローナル抗体と比べて、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体によって汚染されないで合成される点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、実質的に均一な抗体集団から得られているという抗体の特徴を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、第1にKohlerら、Nature 256, 495 (1975)により開示されたハイブリドーマ法によって作ることができ、あるいは例えば組換えDNA法によって作ることができる(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。また「モノクローナル抗体」は、例えばClacksonら、Nature 352:624-628(1991)、及びMarksほか、J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリから単離することもできる。

【0024】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに

10

20

30

40

50

属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物活性を有する限りそれら抗体の断片を特に含む(米国特許第4,816,567号; Morris onほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象とするキメラ抗体は、非ヒト(例えばオナガザル、サルなど)及びヒト定常領域配列から誘導される可変ドメイン抗原結合配列を含んでなる「霊長類化」抗体を含む。

「抗体断片」は、完全な抗体の一部、好ましくはその抗原結合又は可変領域が含まんでなる。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及びF v断片; ダイアボディー(diabodies); 直鎖状抗体; 単鎖抗体分子; 及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

「完全な」抗体は、抗原結合可変領域、並びに軽鎖定常ドメイン(C_L)及び重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2 及びC_H3を含んでなるものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体でありうる。好ましくは、完全な抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

抗体「エフェクター機能」は抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰因するこれらの生物学的活性に関する。抗体エフェクター機能の例は、C1q結合; 補体依存性細胞障害活性; Fcレセプター結合; 抗体依存性細胞媒介細胞障害活性(ADCC); 食作用; 細胞表面レセプターのダウンレギュレーション(B細胞レセプター; BCR)、等を含む。

【0025】

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、完全な抗体は異なる「クラス」に分類できる。完全な抗体の五つの主要なクラス: I g A、I g D、I g E、I g G 及びI g Mがあり、それらの幾つかは更に「サブクラス」(アイソタイプ)、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 及びI g A 2に分類される。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれα、δ、ε、γ 及びμと称される。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。

「抗体依存性細胞媒介細胞障害活性」及び「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)を発現する非特異性細胞障害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応に関する。ADCCを媒介する第1の細胞であるNK細胞はFcγRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcγI、FcγII 及びFcγIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現はRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)の464ページの表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するために、例えば米国特許第5,500,362号又は5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。このアッセイで利用できるエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。他に、又はさらに対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)に記載されている様な哺乳動物のモデルでインビボの評価がされうる。

【0026】

「ヒトエフェクター細胞」は、一つ以上のFcRを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。好ましくは、細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、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細胞及び好中球を含む; PBMC類及びNK細胞が好まれる。エフェクター細胞は、その天然ソースより単離されてもよい; 例えばここにおいて記載の血液又はPBMC類である。

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、I g G抗体(γレセプター)に結合し、FcγRI、FcγRII 及びFcγRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcγRIIレセプターは、FcγRIIA(「活性化レセプター」) 及びFcγRIIB(「阻害レセプター」) を含み、それらは、主として

その細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化FcγRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcγRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンベース活性化モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)に概説されている)。FcRはRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capelら, Immunomethods 4:25-34 (1994);及びde Hasら, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。この用語は胎児への母性IgGsの移動の原因である新生児レセプター、FcRnもまた含む(Guyerら, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKimら, J. Immunol. 24:249 (1994))。

10

【0027】

「補体依存性細胞障害活性」又は「CDC」は、補体の存在下で目的物を溶解させる分子の能力に関する。補体活性化経路は、同系の抗原と複合体形成する分子(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等, J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されているようなCDCアッセイが実施されうる。

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び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糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン(V_H)を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(V_L)を、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

20

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、βシート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたβシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性(ADCC)への抗体の関与を示す。

30

【0028】

ここで使用される場合、「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合性を生じる抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34(L1)、50-56(L2)及び89-97(L3)及び重鎖可変ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3); Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991))又は「高頻度可変ループ」からの残基(すなわち、軽鎖可変ドメインの残基26-32(L1)、50-52(L2)及び91-96(L3)及び重鎖可変ドメインの残基26-32(H1)、53-55(H2)及び96-101(H3); Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))を含んでなる。「フレームワーク」又は「FR」残基はここに定義した高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

40

50

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「F c」断片と命名される。ペプシン処理はF(a b')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0029】

「F v」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むF vの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

10

またF a b断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(C H 1)を有する。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C H 1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でF a b断片とは異なる。F a b'-S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているF a b'に対するここでの命名である。F(a b')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

任意の脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

20

「一本鎖F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F vポリペプチドはV_H及びV_Lドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それはs c F vが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F vの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。抗-E r b B 2抗体s c F v断片は国際公報93/16185; 米国特許第5,571,894号; 及び米国特許第5,587,458号に記載されている。

【0030】

30

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖(V_H-V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディーは、例えば、欧州特許第404,097号; 国際公報93/11161; 及びHollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に更に詳細に記載されている。

非ヒト(例えば齧歯動物)抗体の「ヒト化」形とは、非非と免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分においてヒト化抗体はレシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク領域残基(F R)は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体に、又はドナー抗体に見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全ての高頻度可変領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのF R領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた、場合によっては免疫グロブリン定常領域(F c)の少なくとも一部、典型的にはヒトの免疫グロブリンのものを含んでなる。さらなる詳細は、Jonesら, Nature 321, 522-525(1986); Reichmanら, Nature 332, 32

40

50

3-329(1988)及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596(1992)を参照。

【0031】

ヒト化抗-ErbB2抗体は、出展明示によりここに取り込まれる米国特許第5,821,337号の表3に記載されているようなhMAb4D5-1、hMAb4D5-2、hMAb4D5-3、hMAb4D5-4、hMAb4D5-5、hMAb4D5-6、hMAb4D5-7及びhMAb4D5-8(ハーセプチン(登録商標));ヒト化520C9(国際公報93/21319)及び以下に記載されるようなヒト化2C4抗体を含む。

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及びタンパク質様又は他の非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、(1)ローリー(Lowry)法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、(2)スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0032】

対象とする抗原、例えばErbB2抗原に「結合する」抗体は、抗体が抗原発現細胞を標的にしての治療剤として利用できる程、十分な親和性で抗原に結合することができるものである。抗体がErbB2に結合するものである場合、通常他のErbBに対してErbB2と特異的に結合し、EGFR、ErbB3又はErbB4などの他のタンパク質と有意には交差反応しないようなものである。このような実施態様では、これらの非ErbB2タンパク質に対する抗体の結合度合い(例えば内在性レセプターに対する細胞表面結合性)は、蛍光活性化細胞選別(FACS)分析又は放射性免疫沈降(RIA)による測定では約10%未満であろう。時として、抗-ErbB2抗体は、例えばSchechterら, Nature 312:513(1984)及びDrebinら, Nature 312:545-548(1984)に記載されているように、ラットneuタンパク質と有意には交差反応しない。

ErbBのリガンド活性化を「阻害する(ブロックする)」抗体は、上で定義したような活性化を減少又は防止するもので、ここで抗体は、実質的にモノクローナル抗体4D5よりも効果的に、例えばモノクローナル抗体7F3又は2C4又はそのFab断片と同じくらい効果的に、好ましくはモノクローナル抗体2C4又はそのFab断片と同じくらい効果的にErbBのリガンド活性化を阻害することができる。例えば、ErbBのリガンド活性化を阻害する抗体は、ErbBヘテロ-オリゴマーの阻害型で4D5よりも約50-100%効果的であるものでありうる。ErbBのリガンド活性化の阻害は、任意の方法により、例えばErbBに結合するリガンド、ErbB複合型、ErbB複合体のErbBのチロシンキナーゼ活性化及び／又はErbBでの又はによるチロシンキナーゼ残基のリン酸化を妨げることにより生じうる。ErbBのリガンド活性化を阻害する抗体の例は、モノクローナル抗体2C4及び7F3(ErbB2/ErbB3及び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, TGF- α 、アンフィレグリン、HB-EGF及び／又はエピレグリン活性化); EGFR、ErbB2、ErbB3及びErbB4を発現するT47D細胞に結合するEGF及びNDFを阻害する及びL26、L96及びL288抗体(Klapperら, Oncogene 14: 2099-2109(1997))を含む。

【0033】

命名された抗体の、例えば2C4と命名されたモノクローナル抗体の「生物学的特性」を有する抗体は、同じ抗体(例えばErbB2)に結合する他の抗体から識別する、抗体の一又は複数の生物学的特性を有するものである。例えば、2C4の生物学的特性を有する抗体は、ErbB2とErbB3又はErbB4を含むErbBヘテロ-オリゴマーのH

10

20

30

40

50

R G活性化を阻害しても；E G F R及びE r b B 2を含むE r b BのE G F、T G F- α 、H B-E G F、エピレグリン及び／又はアンフィレグリン活性化を阻害しても；M A P KのE G F、T G F- α 及び／又はH R G媒介活性化を阻害しても；及び／又は2 C 4により結合するようなE r b B 2の細胞外ドメインの同じエピトープに結合(例えば、モノクローナル抗体2 C 4のE r b B 2への結合を阻害する)してもよい。

特に示されなければ、表記「モノクローナル抗体2 C 4」は以下の実施例のマウス2 C 4抗体の、又は該抗体由来の抗原結合残基を有する抗体に相当する。例えば、モノクローナル抗体2 C 4は、マウスモノクローナル抗体2 C 4又はその変異体、例えばマウスモノクローナル抗体2 C 4の抗原結合アミノ酸残基を有するヒト化抗体2 C 4でありうる。ヒト化2 C 4抗体の例は、以下の実施例3で提供される。他に示されなければ、ここで使用される場合の発現「r h u M A b 2 C 4」はそれぞれ配列番号、3及び4の可変軽鎖(V_L)及び可変重鎖(V_H)配列を含み、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞により通常発現されるヒト軽鎖及び重鎖I g G 1(非-Aアロタイプ)定常領域配列に融合する抗体を意味する。

【0034】

特に示されなければ、「モノクローナル抗体4 D 5」という用語は、マウス4 D 5抗体(ATCC CRL10463)の、又は該抗体由来の抗原結合残基を有する抗体の相当する。例えば、モノクローナル抗体4 D 5はマウスモノクローナル抗体4 D 5又はその変異体、たとえばマウスモノクローナル抗体4 D 5の抗原結合残基を有するヒト化4 D 5であってもよい。ヒト化4 D 5抗体は、米国特許第5,821,337号に記載されているようなh u M A b 4 D 5-1、h u M A b 4 D 5-2、h u M A b 4 D 5-3、h u M A b 4 D 5-4、h u M A b 4 D 5-5、h u M A b 4 D 5-6、h u M A b 4 D 5-7及びh u M A b 4 D 5-8(ハーセプチン(商品名))を含み、ここで、h u M A b 4 D 5-8(ハーセプチン(登録商標))はヒト化4 D 5抗体であることが好ましい。

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、細胞、特にE r b B発現癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指すものである。よって、成長阻害剤とは、S期におけるE r b B発現細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。成長阻害剤の例には、細胞周期の進行を阻害する薬剤(S期以外のところで)、例えばG 1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ブロッカーには、ビンカ(ピンクリスチン及びビンブラスチン)、タキサン、及びトポ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、及びブレオマイシンが含まれる。またG 1を停止させるこれらの薬剤、例えばD N Aアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びa r a -CがS期停止に溢流する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞分裂周期の調節、癌遺伝子、及び抗新生物薬(Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs)」と題された、癌の分子的基础(The Molecular Basis of Cancer)、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders ; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

【0035】

「成長阻害」抗体の例は、E r b B 2に結合して、E r b B 2を過剰発現する癌細胞の成長を抑制するものである。好ましい成長阻害抗-E r b B 2抗体は、成長阻害がS K - B R - 3細胞の抗体への暴露から6日後に決定される場合に、抗体濃度約0.5から30 μ g/mlで20%よりも大きく、好ましくは50%よりも大きく(例えば約50%から100%)細胞培養物のS K - B R - 3乳癌細胞の成長を阻害する(1997年10月14日公開の米国特許第5,677,171号参照)。S K - B R - 3細胞成長阻害アッセイは、該特許及び以下に更に詳しく記載される。好ましい成長阻害抗体は、モノクローナル抗体4 D 5、例えばヒト化4 D 5である。

「細胞死を誘発」する抗体は、生存している細胞を生存不能とさせるものである。該細胞は一般に、E r b B 2レセプターを発現するもので、特に該細胞はE r b B 2レセプターを過剰発現する。好ましくは細胞は癌細胞、例えば乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺

、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロでは、細胞はSK-BR-3、BT474、Calu3、MDA-MB-453、MDA-MB-361又はSKOV3細胞でありうる。インビトロでの細胞死は、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で決定され、抗体依存性細胞障害活性(ADCC)又は補体依存性細胞障害活性(CDC)により誘発される細胞死と区別される。よって、細胞死に対するアッセイは、熱不活性化血清(すなわち補体の不在下)を使用し、免疫エフェクター細胞の不在下で行うことができる。抗体が細胞死を誘発可能であるか否かを測定するために、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンプルー(Mooreら, Cytotechnology 17:1-11(1995)を参照)又はFAADの取込みにより評価される膜インテグリティの損失度合いが未処理細胞と比較して評価される。好ましい細胞死誘発抗体は、BT474細胞におけるPI取込みアッセイにおいて、PIの取込みを誘発するものである(下記参照)。

10

【0036】

「アポトーシスを誘発」する抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び／又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常ErBB2レセプターを過剰発現するものである。好ましくは細胞は、腫瘍細胞、例えば乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロでは、細胞はSK-BR-3、BT474、Calu3細胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361又はSKOV3細胞でありうる。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(PS)転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化はDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核／染色質凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、BT474細胞を使用するアネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発する抗体は、未処理細胞の約2～50倍、好ましくは約5～50倍、最も好ましくは約10～50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである(下記参照)。時として、プロアポトーシス抗体は、ErBBのErBBリガンド活性化を更に阻害するであろう(例えば7F3抗体)；つまり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。場合によっては、抗体は、ErBBのErBBリガンド活性化を有意に阻害しないものであろう(例えば7C2)。さらに、抗体は、アポトーシスを誘発しながら、S期中の細胞のパーセントの大きな低減を誘発しない7C2のようなものでありうる(例えば、コントロールと比較してこれらの細胞を約0～10%の割合だけ低減するもの)。

20

30

【0037】

「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、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の交差ブロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がErBB2の2C4エピトープに結合するか否かを評価するために、エピトープマッピングを行うこともできる(例えば、ErBB2の約残基22から約残基584までを含む領域における任意の一又は複数の残基；図1A-B参照)。

40

「エピトープ4D5」は、抗体4D5(ATCC CRL 10463)が結合するErBB2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープはErBB2の膜貫通領域に近接している。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、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の交差ブロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がErBB2の4D5エピトープに結合するか否かを評価するために、エピトープマッピングを行うこともできる(例えば、約残基529から約残基625までを含む領域における任意の一又は複数の残基；図1A-B参照)。

「エピトープ3H4」は抗体3H4が結合するErBB2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、ErBB2の細胞外ドメインのアミノ酸配列のうち、約541

50

～約599の残基を含む；図1A－B参照。

「エピトープ7C2／7F3」は7C2及び／又は7F3抗体(各々以下のATCCで寄託)が結合するErbb2の細胞外ドメインのN末端領域である。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、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の変異ブロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がErbb2の7C2／7F3エピトープに結合するか否かを確認するために、エピトープマッピングを行うこともできる(例えば、Erbb2の約残基22から約残基53までの領域における任意の一又は複数の残基；図1A－B参照)。

【0038】

「Erbb発現癌」という用語は、抗Erbb2抗体が結合できるようにその細胞表面にErbbタンパク質の存在を有するものである。

Erbbの「過剰活性化により特徴づけられる」細胞は、その細胞のErbb活性化の範囲が、同じ組織型の正常細胞で該レセプターの活性化のレベルを十分に超えるものである。このような過剰な活性化は、Erbbの過剰発現あるいは過剰増幅及び／又は細胞のErbbを活性化する通常レベルよりも大きいErbbリガンド活性化により生じうる。このような過剰活性化は、細胞の悪性状態を引き起こす、及び／又はそれにより引き起こされうる。いくつかの実施態様としては、Erbbのこのような過剰活性化を生じるErbbの増幅及び／又は過剰発現が引き起こされるかどうかを決定するために、患者からの試料は診断又は予後予測のための対象となる。あるいは、又は加えて、レセプターの過剰活性化によるものである、患者におけるErbbリガンドの増幅、過剰発現及び／又はタンパク分解過程の増加が起こっているかどうかを決定するために、患者からの試料は診断又は予後予測のための対象となる。たびたび、レセプターの過剰活性化が自己分泌刺激性経路に起因する。

「自己分泌」促進経路において、Erbbリガンド及びその同族のErBの両方を産生する癌細胞の効力によって自己促進が引き起こされる。例えば、癌は、EGFRを発現又は過剰発現しても、又はEGFRリガンド(例えば、EGF、TGF- α 、又はHB-EGF)を発現又は過剰発現してもよい。他の実施態様では、癌はErbb2を発現又は過剰発現しても、又はヘレグリン(例えば、 γ -HRG)を発現又は過剰発現してもよい。

【0039】

Erbbを「過剰発現する」細胞は、同じ組織型の正常細胞と比較して、細胞表面のErbb、例えばErbb2の有意に高いレベルを有している。このような過剰発現は、遺伝子増幅により、又は転写又は翻訳を増加させることにより引き起こされてもよい。Erbb過剰発現は、細胞表面のErbbタンパク質存在の増加レベルを評価することにより、診断又は予後アッセイで決定されうる(例えば、免疫組織化学アッセイ；IHC、酵素抗体法、ウェスタンブロット法、リガンド結合、キナーゼ活性による)。あるいは、又は加えて、細胞のErbbコード化核酸のレベルを測定してもよい、例えば、蛍光インサイトハイブリダイゼーション(FISH；1998年10月公開の国際公報98/45479参照)、サザンブロット法、又はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、例えばリアルタイム定量PCR(RT-PCR)。また、血清のような生体液中の脱落抗原(例えば、Erbb細胞外ドメイン)を測定することにより(例えば、1990年6月12日に公開の米国特許第4,933,294号；1991年4月18日公開の国際公報91/05264；1995年3月28日公開の米国特許第5,401,638号；及びSiasら, J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990))Erbb過剰発現を研究してもよい。前記アッセイのみならず、様々なインビボアッセイが技術熟練者において利用できる。例えば、検知できるラベル、例えば放射性同位体で任意に標識された抗体に患者の体にある細胞を暴露してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば放射活性の外側スクリーニングにより、又は抗体に先に暴露された患者から得られたバイオプシーを分析することにより評価される。

【0040】

逆に、「Erbbの過剰発現により特徴付されない」細胞は、診断アッセイにおいて、

10

20

30

40

50

同組織型の正常細胞と比較して、E r b Bの通常のレベルよりも高く発現しないものである。

E r b Bリガンドを「過剰発現する」細胞は、同組織型の正常細胞に比較して十分に高いレベルのリガンドを産生するものである。このような過剰発現は、遺伝子増幅により、又は転写又は翻訳を増加することにより引き起こされうる。E r b Bリガンドの過剰発現は、患者のリガンド(又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、例えば、バイオプシーで、又はI H C、酵素抗体法、ウェスタンブロット法、リガンド結合、F I S H、サザンブロット法、P C R又は前記のインビボアッセイのような様々な診断アッセイにより診断的に決定してもよい。

ここで使用される「細胞障害性剤」という用語は、細胞機能を阻害又は抑制するか、及び／又は細胞の崩壊を引き起こす物質を意味する。その用語は放射性アイソトープ(例えばA t ²¹¹、I ¹³¹、I ¹²⁵、Y ⁹⁰、R e ¹⁸⁶、R e ¹⁸⁸、S m ¹⁵³、B i ²¹²、P ³²及びL uの放射性同位体)、化学療法剤、及び毒素、例えば細菌、真菌、植物又は動物由来の小分子毒又は酵素活性毒のような毒を含み、それらの断片及び／又は変異体を含むことを意図している。

【0041】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル類、；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)などのアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterrine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosphamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、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(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、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、キラマイシン(quelamycin)、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(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)などの抗生物質；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)などの抗-代謝産物；デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)などの葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン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(testolactone)などのアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)などの葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホス

10

20

30

40

50

ファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビスアントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；オキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；ミトグアゾン(mitogua zone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；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；P K S (登録商標)；ラゾキサラン(razoxane)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニウアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ペンデシン；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；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 (タキソール(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、及びドキセタキセル (タキソテレ(登録商標)、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンなどのプラチナ類似体；ビンブラスチン；プラチナ；エトポシド(V P-16)；イフォスファミド；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(novant ron)；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；C T P-11；トポイソメラーゼインヒビターR F S 2000；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタビン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。また、この定義には、細胞に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン(raloxifene)、4(5)-イミダゾール類を阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 117018、オナプリストーン(onapristone)、トレミフェン(Fareston)を含む抗エストロゲン；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)及びニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド(bicalutamide)、リュープロリド(leuprolide)及びゴセレリン(goserelin)；並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0042】

「抗-血管形成剤」は、血管の発達を阻害する、又はある程度妨げる化合物に相当する。抗-血管形成因子は、例えば、血管形成の促進に關与する成長因子又は成長因子レセプターに結合する小分子又は抗体でありうる。ここでの好ましい抗-血管形成因子は、組み換えヒト化抗V E G F抗体であるA V A S T I N^{T M} (Genentech)のような、血管内皮増殖因子(V E G F)に結合する抗体である。

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、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、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシニン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(F S H)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(T S H)、及び黄体形成ホルモン(L H)；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α 及び- β ；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(T P O)；N G F- β 等の神経成長因子；血小板成長因子；T G F- α あるいはT G F- β のようなトランスフォーミング成長因子(T G F)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(E P O)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン α 、 β 、 γ のよう

なインターフェロン；マクロファージ C S F (M-C S F) のようなコロニー刺激因子 (C S F)；顆粒球マクロファージ C S F (G M-C S F) 及び顆粒球 C S F (G-C S F)；I L-1、I L-1 α、I L-2、I L-3、I L-4、I L-5、I L-6、I L-7、I L-8、I L-9、I L-10、I L-11、I L-12 等のインターロイキン (I L)；腫瘍壊死因子、例えば T N F-α 又は T N F-β；及び L I F 及び キットリガンド (K L) を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0043】

「パッケージ挿入物」という用語は効能、用法、用量、投与方法、禁忌及び／又はかかる治療製品の使用に関する警告についての情報を含む、治療製品の市販用パッケージに通常含まれるインストラクションを意味するために使用される。

「心臓保護剤 (cardioprotectant)」は、患者へのアントラサイクリン抗生物質及び／又は抗-E r b B 2 抗体のような薬剤の投与に関連する心筋機能障害 (すなわち心筋症及び／又はうっ血性心不全) を予防する又は減じる化合物或いは組成物である。心臓保護剤は、例えば、フリーラジカル媒介心毒性効果を妨害又は減じ及び／又は酸化的ストレス障害を防止或いは減じる。現定義で包含される心臓保護剤の例は、イオンキレート剤 dexrazoxane (ICRF-187) (Seifert ら, The Annals of Pharmacotherapy 28:1063-1072 (1994))；脂肪低減剤及び／又はプロブコール (Singal ら, J. Mol. Cell Cardiol. 27:1055-1063 (1995)) のような抗酸化剤；アミフォスチン (amifostine) (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-二水素リン酸塩エステル、また WR-2721 と呼ばれている、及び WR-1065 と呼ばれる、その脱リン酸化細胞取り込み型) 及び 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；ジゴキシシン (Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. Drug-Induced Heart Disease. New York: Elsevier 191-215 [1980])；メトプロロール (Hjalmarson ら, Drugs 47: Suppl 4:31-9 [1994])；及び Shaddy ら, Am. Heart J. 129:197-9 [1995]) のようなベータブロッカー；ビタミン E；アスコルビン酸 (ビタミン C)；オレアノール酸、ウルソール酸及び N-アセチルシステイン (N A C) のようなラジカルスカベンジャー；アルファ-フェニル-ブチルニトロソ (P B N) のようなスピントラップ化合物 (Paracchini ら, Anticancer Res. 13:1607-1612 (1993))；P 2 5 1 (Elbesen) のようなセレン有機化合物；類似物を含む。

【0044】

II. 詳細な説明

膜貫通型チロシンキナーゼレセプターの E r b B (H E R) ファミリは 4 つのメンバー、E r b B 1 (H E R 1、E G F R)；E r b B 2 (H E R 2 又は p 1 8 5^{n e u})、E r b B 3 (H E R 3) 及び E r b B 4 (H E R 4 又は t y r o 2) から成る。

E r b B 2 / H E R 2 / p 1 8 5^{n e u} 及び E r b B 1 / E G F R は、ほとんどの上皮性悪性腫瘍、例として乳癌、頭頸部癌、胃癌、前立腺癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、膀胱、並びに膠芽腫において、有意に過剰発現する。H E R 2 は、ヘテロ二量体を形成することによって H E R ファミリの他のレセプターによって生じるシグナルを増幅する。H E R シグナル伝達ネットワークの H E R 2 の重要な役割によって癌治療のための抗 H E R 2 モノクローナル抗体 (M A b) が開発された。特に、ヒト化抗 E r b B 2 M A b (trastuzumab、ハーセプチン、Genentech, Inc.) は、H E R 2 を過剰発現する乳癌の女性の治療に広く使われている。Trastuzumab は H E R 2 レセプターの下流制御を誘発し、その結果、重要なシグナル伝達経路 (すなわち r a s - R a f - M A P K 及び P I 3 K / A k t) が阻害され、p 2 7 / C d k 2 複合体の形成を誘導することによる細胞周期の進行を阻害する。また、Trastuzumab は抗体誘導性レセプター下流制御に先行する H E R 2 切断を阻害する。この効果はいくつかの癌における抗腫瘍活性に寄与しうる。生体内で、trastuzumab は血管新生を阻害して、抗体依存性細胞障害を引き起こす。H E R 2 は、H E R 1 (E G F R)、H E R 3 又は H E R 4 とヘテロ二量体を形成することが知られている。2 C 4 と称す

10

20

30

40

50

るヒト化モノクローナル抗体は癌治療のための臨床研究の段階にある。2 C 4 は、trastuzumabよりHER2外部ドメインの異なるエピトープと結合して、立体配置的に他のHERレセプターとのヘテロ二量体のHER2漸増を妨げる。この結果、HER2発現が低い細胞においてもHER2発現が高い細胞においてもHER2-ベースのヘテロ二量体によるシグナル伝達が阻害される。インビトロ及びインビボでの抗腫瘍活性は、胸部腫瘍及び前立腺腫瘍のモデルの分野において報告された。また、小分子抗HER2／新規のペプチド模倣（anti-HER2/neu peptidomimetics、AHNP）が開発され、癌治療における有効性について試験された(Zhang等, Drug News Perspect. 13(6)325-9 (2000))。

【0045】

本発明は、少なくとも一部は、ErbbBアンタゴニストが痛覚消失効果を表すので、癌関連の疼痛などの慢性疼痛を含む疼痛管理に有用であるという予想外の発見に基づく。特に、本発明は、ヒト化抗ErbbB2抗体2C4で治療される前立腺癌患者はより少ない疼痛を記録し、PSA値が減少しない場合にさえも痛覚消失が軽減された。同様に、ヒト化2C4抗体の痛覚消失効果は脂肪肉腫の治療の間に観察された。

したがって、その最も広義の態様では、本発明はErbbBアンタゴニストを用いた疼痛管理に関する。特に、本発明は、癌関連又は癌に伴う急性及び慢性の疼痛を含む疼痛のErbbBアンタゴニストを用いた管理に関する。本発明は、限定するものではないが、侵害受容性疼痛、体性痛覚、内臓痛、神経障害疼痛、中枢神経に起因する疼痛（求心路遮断性疼痛及び交感神経性に維持された疼痛を含む）、及び末梢神経に起因する疼痛（痛みを伴う多発性神経炎及び痛みを伴う単神経障害を含む）を含む任意の種類の疼痛の治療に関する。

【0046】

ErbbBアンタゴニスト

本発明のErbbBアンタゴニストは、一以上のErbbBの生物学的活性をブロックする分子である。好ましくは、アンタゴニストはErbbBのリガンド活性をブロック（低減又は予防）する。特定の実施態様では、本発明のErbbBアンタゴニストは、ErbbB2（HER2）及び／又はErbbB1（EGFR）レセプター又はそれらレセプターを含んでなるレセプター複合体によって媒介される生物学的活性を阻害する。

本願明細書中のErbbBアンタゴニストとして、ポリペプチド（抗体及び抗体断片を含む）、ペプチド、ペプチド擬晶、非ペプチド小有機分子、アンチセンス分子及びオリゴヌクレオチドおとり分子が挙げられるが、これに限定されるものではない。

EGFRのキナーゼポケットへのATP結合と競合する小有機分子は、例えば、Arteaga CL., Exp. Cell. Res. 284(1): 122-30 (2003)に検討されている。小分子EGFRインヒビター、IressaTM (ZD1839, gefinitib, Astra-Zeneca)は、例えば、Kris M 等 JAMA, 290(16): 2149-2158 (2003)に記述される。更なる小分子EGFRアンタゴニストにはCP358,774 (TARCEVA(登録商標); Genentech/OSI) 及び、AG1478、AG1571 (SU5271; Sugen) が含まれる。

【0047】

また、抗EGFR抗体は従来技術において周知であり、例えば、Erbbitux(登録商標)(IMCC225、セツキシマブ、ImClone)、キメラ抗EGFR MA b、及び、再構築されたヒト225(H225)(国際公報96/40210(ImClone Systems Inc.))が含まれる。EGFRと結合する抗体の更なる例には、MA b 579(ATCC CRL HB 8506)、MA b 455(ATCC CRL HB 8507)、MA b 225(ATCC CRL 8508)、MA b 528(ATCC CRL 8509)(米国特許第4,943,533号、Mendelsohn等)及びその変異形、米国特許第5,891,996号に記載のようなEGFRを結合するヒト化抗体及びキメラ抗体、ABX-EGFなどのEGFRを結合するヒト抗体(国際公報98/50433、Abgeruxを参照)を含む。抗EGFR抗体は、細胞障害性薬剤とコンジュゲートされてもよく、したがって免疫コンジュゲートを生成する(EP659,439A2、Merck Patent GmbHを参照)。

EGFRチロシンキナーゼと関連するErbbB2の選択的阻害剤であるCP-6545

10

20

30

40

50

77 (Pfizer)は、例えば、Barbacci 等, Cancer Res. 63(15): 4450-9 (2003)に開示される。抗ErbB2ペプチド擬態の小分子型は、Zhang 等, Drug Nes Perspect 13(6): 325-9 (2000)に記述される。

【0048】

ErbBアンタゴニストの同定

EGFR及び／又はErbB2などのErbBレセプターの生物学的活性を標的として阻害する新規の薬剤を従来技術において周知の方法によって同定することができる。

一般に、新しいErbBアンタゴニストを同定する際の第一段階はインビトロスクリーニングであり、その後、適当な動物モデルでのインビボアッセイ、最終的にヒトの臨床試験である。

ErbBレセプター又はレセプター複合体と結合する化合物を同定するために、それぞれ天然の供給源から単離するか組み換えDNA技術及び／又は化学合成法によって産生したErbBレセプター又はレセプター複合体を用いてレセプター結合試験を行うことができる。候補化合物の結合能は、直接結合又は、間接的な、例えば競合的結合によって試験することができる。競合的結合実験において、レセプター結合する他の化合物の50%を置換するのに必要な化合物の濃度 (IC_{50}) は通常、結合親和性の測定値として用いられる。

他の方法では、新規のErbBアンタゴニストを同定するために、標的ErbBレセプター (例えばErbB2又はEGFR) をコードする配列をコードするDNAを、選択可能なマーカーを含有している発現ベクターにクローニングする。ベクターを用いて組換え宿主細胞の形質転換を行う。数回の選別後、ErbBレセプターを発現する安定株が同定される。次いで、新規なErbBアンタゴニストは、標的ErbBレセプターの公知のインヒビターと効果的に競合する能力によって同定されうる。公知の方法、例えばスキャッチャード分析によって、結合係数が測定されうる。

【0049】

また、標的ErbBレセプターを発現することが公知の細胞又は細胞株を用いて結合実験を行う。

ErbBのリガンド活性をブロックする候補分子を同定するために、ErbBを発現する細胞へのErbBリガンド結合をブロックする分子 (例えば、対象のErbBがErbBヘテロオリゴマーを形成する他のErbBとのコンジュゲート型) の能力が測定されてもよい。例えば、ErbBヘテロオリゴマーのErbBを天然に発現する細胞、又は発現するように形質転換された細胞は、候補分子と共にインキュベートし、次いで、標識したErbBリガンドにさらされてもよい。次いで、ErbBヘテロオリゴマーのErbBへのリガンド結合を遮断する候補分子の能力を評価してもよい。

あるいは、又はさらに、ErbBヘテロオリゴマに存在するErbBのErbBリガンド刺激性チロシンリン酸化をブロックする候補分子の能力を評価してもよい。例えば、ErbBを内生的に発現する細胞又はそれらが発現するように形質転換した細胞を候補分子と共にインキュベートし、次いで抗ホスホチロシンモノクローナル (場合によっては検出可能な標識とコンジュゲートしたもの) を用いてErbBリガンド依存性チロシンリン酸化活性について検定してもよい。また、米国特許第5,766,863号に記載のキナーゼレセプター活性化アッセイは、ErbB活性化の測定及びアンタゴニストによるその活性のブロックに利用できる。

【0050】

また、基本的に例えばSchaefer等 Oncogene 15:1385-1394 (1997)に記述されるように、MDA-MB-175細胞に対する候補分子の成長阻害効果を評価してもよい。このアッセイに記載のように、MDA-MB-175細胞は、候補アンタゴニストで処置して、クリスタルバイオレットで染色してもよい。候補アンタゴニストとのインキュベーションにより、モノクローナル抗体2C4によってディスプレイされるものと類似の細胞株に対する成長阻害効果が示されうる。さらなる態様では、外因性HRGはこの阻害を有意に逆転させない。好ましくは、外因的HRGの存在下及び欠如下において、アンタゴニストは、モノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体 4 D 5 より大きな程度に（及び場合によっては、モノクローナル抗体 7 F 3 より大きな程度に）MDA-MB-175細胞の細胞増殖を阻害することが可能でありうる。

一実施形態では、アンタゴニストは、モノクローナル抗体 4 D 5 より実質的に効果的に、そして、好ましくはモノクローナル抗体 7 F 3 より実質的に効果的に、実施例 2 に記述されるような共同免疫沈降実験で測定されるような、MCF7及びSK-BR-3細胞におけるErbb3とErbb2とのヘレグリン依存性対合をブロックしうる。

増殖阻害性性質を有するアンタゴニストを同定するために、Erbb2を過剰発現させる癌細胞の成長を阻害する抗体についてスクリーニングしてもよい。

【0051】

細胞死を誘発するアンタゴニストについて選択するために、例えばPI、トリパンプルー又は7AAD取り込みによって示される膜完全性の損失を対照との相対比で評価してもよい。好適なアッセイは、BT474細胞を用いたPI取り込みアッセイである。このアッセイの詳細、特に抗体に関連しては、以下に示す。

アポトーシスを引き起こすアンタゴニストを選択するために、例えばBT474細胞を用いたアネキシン結合実験又はBT474細胞を用いたDNA染色アッセイを使うことが可能であり、これらアッセイは、アポトーシス特性を有した抗体と共に以下に詳述する。

更なる方法によると、Erbb2及びEGFRアンタゴニストは、EGFR、TGF- α （EGFRのリガンド）及びErbb2 mRNA発現レベルを国立癌研究所（NCI）薬剤スクリーンデータベース（Wosikowski等，J. Natl. Cancer Inst. 89(20): 1505-15 (1997)）の49000の化合物の細胞障害性アッセイの結果と相関させることによって同定される。

インビトロアッセイにおける標的生物活性の阻害を測定した後に、対照の疼痛に対する候補アンタゴニストの能力を、疼痛のインビボモデルで試験することができる。

好ましい実施態様では、候補Erbbアンタゴニストの痛覚消失性活性は、疼痛研究において用いられる動物モデルで試験する。

【0052】

疼痛の動物モデル

(i) 有害疼痛

有害疼痛に好適な動物モデルは、「テールフリック」試験（Bass及びWanderbrook, J. A. in. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 41: 569-70 (1952)）である。この方法は、マウス又はラットが候補Erbbアンタゴニストの投与の有無にかかわらずそれらの尾部の小さい領域への加熱に反応するように、マウス又はラットの痛覚感受性の測定に基づく。前記試験は、放射熱の適用後の尾部の離脱症状時間の測定に基づくものであり、市販の道具、例えばTail Flick Analgesia Meter (SDI, San Diego, CA)を用いて行うことができる。

有害疼痛の他の動物モデルは、「ホットプレート足-なめること(hot plate paw-licking)」試験である。この試験では、動物（ラット又はマウス）を、ホットプレート上に別々に配置する後足舐めの第一徴候に対する刺激潜伏性、又は、ジャンプ応答が、侵害受容閾値の指標とされる。この閾値に対する薬剤投与の効果は、痛覚消失性応答の指標と考えられる。（O'Callaghan及びHolzman, J. Pharmacol. Exp. Ther. 192:497-505 (1975)）。投与経路は違ってよいが、一般的に皮下である。

足-圧(paw-pressure)、又は物理的な痛覚過敏試験は、後足上の又は一般的ではないが尾部上の点状領域に強さを増した圧を与える。実際には、足又は尾部は平面と平滑末端との間に置き、自動読み取りのために目盛りを付けた放射（Green等, Br. J. Pharmacol. 6: 572-85 (1957)）に従って置換したカーソルと共に、プラスチックコート部分を歯車のシステムの上に配置する。動物の尾部を除去するときに圧力の増加を中断して、応答の閾値のグラム力として動作を読み出した。

また、化学刺激を用いて動物の有害疼痛をモデル化することができる。一般的に、化合物は皮内又は腹腔内に投与される。例えば、ホルマリン（足）では、通常、0.5～15%（一般的に約3.5%）のホルマリン溶液をラット前足又は後足の背面又は足底表面へ

10

20

30

40

50

注入すると、約60分間、疼痛反応の増強強度及び減弱強度が生じる。代表的な応答は足のリフティング、舐める、かじる又は震えがあり、それは検体の欠如下及び存在下でモニターすることができる(Lariviere及びMelzack, Pain 66:271-7 (1996))。

【0053】

(ii) 内臓痛

内臓痛は、一般的に刺激物(Writhing Test)、例えば酢酸性／エタクリン酸又はフェニルベンゾキノンの腹腔内投与によって試験される。薬剤は齧歯動物において型どおりの応答を引き起こし、これらは腹部収縮、全身運動、腹筋のひきつり、減弱した運動活動性及び不調整に特徴がある。これらの応答は、内臓化学レセプターと関連する内臓痛の表れと思われる。曲げ試験を成功裏に用いて、ヒトの治療のための効果的な痛覚消失性用量を予測した(Dubinsky等, Agents Actions 20:50-60 (1987))。

10

(iii) 炎症性疼痛

炎症性疼痛は、一般的に、p-ベンゾキノン誘導性もがき試験又はカラゲナン誘導性後足浮腫モデル(DiRosa 等, J. Pathol. 101:15-29 (1971))を用いてモデル化する。

炎症性疼痛の他の動物モデルにおいて、カプサイシンの皮内注射を、神経原性炎症及び痛覚過敏に用いられる。本来、応答を観察し、視覚散布により定量化するが、サーモグラフィ及びレーザードプラフローメトリーの最近の発達により、神経原性炎症反応及び炎症反応を数量化する有用な手段であることが証明された。詳しくは、例えばSumikura 等, Pain 105(285-291 (2003)参照。

(iv) 舐める、ひっかき及びかみつき応答

20

このような応答は、例えば、気管内に注入される(i.t.)、特に高用量(3g/kg)のTNF- α (一般的に100pg)、IFN- γ (一般的に100pg)又はIL-1 β (一般的に100pg)によって誘発されうる。加えて、同様の応答は、グルタミン酸塩(20 μ g)、Nメチル-Dアスパラギン酸(50ng)、 α -アミノ-3-ヒドロシ-5-メチルイソキサゾール-4-プロピオン酸(13ng)又はカイニン酸の気管内注入、又はfo物質P(fo substance P)あるいはカプサイシンの投与によって誘発されうる。

(v) 神経障害疼痛

ラットの座骨神経の慢性収縮損傷(CCI)は、持続的で物理的な痛覚過敏及び異痛を誘発し、神経障害疼痛のモデルに広く使われている(Bennett及びXie, Pain 33:87-107 (1988))。

30

【0054】

(vi) 癌疼痛

癌疼痛の治療のための候補薬剤は、急性及び慢性の疼痛又は炎症性疼痛の上記した動物モデルで試験されうる。加えて、特に癌疼痛を試験するようにデザインされた有用な動物モデルが多くある。

例えば、Menendez 等, Brain Res. 969(102): 102-9 (2003)に記載されるように、候補ErbbBアンタゴニストは、骨癌疼痛のマウスモデルで試験されうる。この試験は、NC2472細胞を頸骨内投与された(i.t.)C3G/HeJマウスの有害な熱に対する反応性を調査した。NC2472細胞は骨肉腫を誘発することが可能で、接種の数週間後に軟組織約2に骨を突破する。そして、4週めから肢サイズの肉眼で見える増加を生産する。熱反応性は細胞移植後の初めの2週間に減少する。この痛覚過敏はナロキソン(10mg/kg)の投与によって逆転される。著者によると、NC2472細胞移植後第4週と第5週の間に、痛覚鈍麻の代わりに侵害受容の熱反応性の増加が観察された。この痛覚過敏は、モルヒネ(15mg/kg)の全身投与によって予防された。骨癌疼痛のこの動物モデルを用いて、骨癌疼痛、及び一般的に存在しうる癌疼痛の管理のためのErbbBアンタゴニストなどの新規の薬剤を同定して研究することができる。

40

同様に、Wacnik 等, Pain 101(1-2): 175-86 (2003)によって記述されるように、癌疼痛に対する候補ErbbBアンタゴニストの効果は腫瘍を移植したマウスで研究することができる。

神経障害癌疼痛のマウスモデルは、Shimoyama 等, Pain 99(1-2): 167-74 (2002)によ

50

って開発された。このモデルでは、M e t h A肉腫細胞が、B A L B / cマウスの坐骨神経の隣接部に接種されていた。成長する腫瘍は徐々に神経を圧縮し、それによって神経損傷を引き起こす。熱痛覚過敏の時間経過及びvon Frey hairに対する物理的な感受性を測定し、自然痛の徴候を評価する。

痛覚閾値研究のための突然変異体マウスを用いる例は、Guiherme 等, Nature Neurosci. 6:221-222 (2003)に記載される。

一般的な疼痛の動物モデルの概要のために、例えばEaton, M., J. of Rehabilitation Research and Development 40(4) Suppl. 1:41-54 (2003))を参照のこと。

【0055】

ヒト臨床試験

疼痛測定値は痛覚欠如を評価するために必須である。ヒト臨床試験において、個々の患者によって経験される疼痛は、視覚的アナログスケール (Visual Analog Scale、V A S)、図形描写スケール、数のスケール、機能障害評価アンケート (Health Assessment Questionnaire、H A Q) 疼痛指標などを含む一以上の公知の疼痛測定によって評価される。Initiative on Methods, Measurement, and Pain Assessment in Clinical Trials (IMMPACT) が後援するワークショップは、すべての慢性疼痛実験に伴うと思われる6のコンセンサスドメインを示した(Turk 等, Pain, 106(3): 337-45 (2003))。

疼痛は様々なスケール、例えば0～100又は0～10のスケールで記録されるV A Sを用いて評価されることが最も多い。そのスケールは、最も低いスケールが痛みなし、最も高いスケールが最も悪いと思われる痛みを表す。患者が100のレベルの疼痛を識別するのが困難であると報告されたので、最も頻繁に使われるV A S系は0～10のスケールである(Miller, GA, Psychological Review 63:81-97 (1956))。

図形スケールは一般的に以下の描写を含む：疼痛なし、軽度の疼痛、中程度の疼痛、重度の疼痛、非常に重度の疼痛及び最悪の疼痛。

好ましい実施態様では、本発明のE r b Bアンタゴニストは、抗E r b B 2抗体である。

【0056】

抗E r b B 2抗体の製造

本発明で使用される抗体を製造するための例示的な技術を以下に説明する。抗体の製造に使用されるE r b B 2抗原は、例えば所望のエピトープを含むE r b B 2の細胞外ドメイン又はそれらの一部の可溶形態のものであってよい。あるいは、抗体を産生するために、その細胞表面にE r b B 2を発現する細胞(例えばE r b B 2を過剰発現するように形質転換されたN I H - 3 T 3細胞；又は癌腫株化細胞、例えばS K - B R - 3細胞、Stancovskiら, PNAS(USA)88:8691-8695(1991)を参照)を使用することもできる。抗体の産生に有用な他の形態のE r b B 2は当業者には明らかであろう。

【0057】

(i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(s c)又は腹腔内(i p)注射することにより動物に産生される。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ベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに関連抗原を、二官能性又は誘導体形成剤、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(システイン残基による抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C 1²、又はRとR¹が異なったアルキル基であるR¹N=C=NRにより抱合させることが有用である。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 µg又は5 µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追

10

20

30

40

50

加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原のコンジュゲートであるが、異なったタンパク質にコンジュゲートさせた、及び／又は異なった架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートで追加免疫する。コンジュゲートはまたタンパク融合として組換え細胞培養中で調製することもできる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0058】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、抗体産生の際に増加する突然変異体を除いて同一である。よって、「モノクローナル」との修飾詞は、別個の抗体の混合物ではなく、抗体の特性を示すものである。

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法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4,816,567号)によって作製することができる。

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記したようにして免疫し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

【0059】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニジン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含むであろう(HAT培地)。

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及びアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、ロックヴィル、メリーランド、USAから入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものである。ヒト骨髓腫及びマウスーヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984); Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0060】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。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、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が包含される。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において

腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【0061】

モノクローナル抗体をコードしているDNAは、常法を用いて(例えば、マウスの重鎖及び軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に単離され配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、そうしないと免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中にトランスフェクトし、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を達成することができる。抗体をコードするDNAの細菌中での組換え発現に関する概説論文には、Skerraら, Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262(1993)及びPlueckthum, Immunol. Revs., 130:151-188(1992)がある。

更なる実施態様では、モノクローナル抗体又は抗体断片は、McCaffertyら, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリから単離することができる。Clacksonら, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marksら, J.Mol.Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の単離を記述している。続く刊行物は、鎖混合による高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生産(Marksら, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、並びに非常に大きなファージライブラリを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouseら, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266(1993))を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

DNAはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を、相同的マウス配列に代えて置換することにより(米国特許第4,816,567号; Morrisonら, Proc.Nat.Acad.Sci., USA, 81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部又は一部を共有結合させることで修飾できる。

典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインに置換され、又は抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0062】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は従来からよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmannほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, Science, 239:1534-1536(1988))を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくらかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。

次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領域(F R)として受け入れる(Simsほか, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothiaら, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導され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をいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carterほか, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 89:4285 (1992); Prestaほか, J. Immunol., 151:2623(1993))。

【0063】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、F R残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

以下の実施例3には、E r b B 2に結合し、E r b Bのリガンド活性化を阻害する例示的なヒト化抗-E r b B 2抗体の作成が記載される。ここで特に対象とするヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体2 C 4(又はそのF a b断片)と実質的に同じくらいの効果でE G F、T G F- α 及び／又はH R G媒介活性化を阻害し、及び／又はマウスモノクローナル抗体2 C 4(又はそのF a b断片)と実質的に同じくらいの効果でE r b Bに結合する。ここでのヒト化抗体は、例えば、ヒト可変重鎖ドメインに取り込まれた非ヒト高頻度可変領域を含んでいても良く、Kabatら, Sequences of Protains of Immunol Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)に示す可変ドメインの番号付けに従って、6 9 H、7 1 H及び7 3 Hからなる群から選択される位置で置換されたフレームワーク領域(F R)をさらに含んでいてもよい。ある実施態様では、ヒト化抗体は位置6 9 H、7 1 H及び7 3 Hの内の2つ又は全てでF R置換を含む。

【0064】

ここで対象とする例示的なヒト化抗体は、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 (配列番号: 1 4)、ここでXは好ましくはD又はS(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); 及び／又はN L G P S F Y F D Y(配列番号: 9)を含んでなり、場合によっては、これらのC D R残基のアミノ酸修飾を含んでなり、例えば、実質的に修飾は抗体の親和性を維持又は向上させる。例えば、対象とする抗体変異体は、前記の可変重鎖C D R配列で約1から約7又は約5のアミノ酸置換を有していてもよい。このような抗体変異体は、例えば以下に記載されるような親和性成熟により調製されうる。もっとも好ましいヒト化抗体は、配列番号: 4の可変重鎖ドメインアミノ酸配列を含む。

ヒト化抗体は、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: 1 0); S A S Y X¹ X² X³、ここでX¹は好ましくはR又はL、X²は好ましくはY又はE、及びX³は好ましくはT又はS(配列番号: 1 1); 及び／又はQ Q Y Y I Y P Y T(配列番号: 1 2)、例えば更に前段落の可変重鎖ドメインC D R残基を含んでなりうる。このようなヒト化抗体は、場合によっては、例えば、抗体の親和性を実質的に維持又は向上させるような前記C D R残基のアミノ酸修飾を含む。例えば、対象とする抗体変異体は、前記可変軽鎖C D R配列で約1から約7又は約5のアミノ酸置換を有していてもよい。このような抗体変異体は、例えば以下に記載されるような親和性成熟により調製されうる。もっとも好ましいヒト化抗体は、配列番号: 3の可変軽鎖ドメインアミノ酸配列を含む。

【0065】

本出願ではまた、E r b B 2 に結合し、E r b B のリガンド活性化を阻害する親和性成熟抗体が考えられる。親抗体はヒト抗体又はヒト化抗体、例えば、それぞれ配列番号、3 及び4 の軽鎖及び／又は重鎖配列を含むもの(つまり、変異体574)であってもよい。親和性成熟抗体は、好ましくはE r b B 2 レセプターにマウス2C4又は変異体574のものより優れた親和性(例えば、E r b B 2 細胞外ドメイン(E C D)E L I S A を用いて検討して、例えば約2又は約4倍から100倍又は約1000倍の向上した親和性)で結合する。置換のための例示的な可変重鎖C D R 残基は、H 2 8、H 3 0、H 3 4、H 3 5、H 6 4、H 9 6、H 9 9又は2以上(例えば、これらの残基の2、3、4、5、6、又は7)の組み合わせを含む。変化のための可変軽鎖C D R 残基の例は、L 2 8、L 5 0、L 5 3、L 5 6、L 9 1、L 9 2、L 9 3、L 9 4、L 9 6、L 9 7、又は2以上(例えば、これらの残基の2から3、4、5又は約10まで)の組み合わせを含む。

10

ヒト化抗体又は親和性成熟抗体の様々な形態が、考えられる。例えば、ヒト化抗体又は親和性成熟抗体は、抗体断片、例えばF a b、場合によっては免疫コンジュゲートを作成するために1又は複数の細胞障害剤でコンジュゲートされたものであってもよい。あるいは、ヒト化抗体又は、親和性成熟抗体は、完全な抗体、例えば完全なI g G 1であってもよい。

【0066】

(iv) ヒト抗体

ヒト化のための別法により、ヒト抗体を生産することができる。例えば、内因性の免疫グロブリン産生がなくともヒト抗体の全レパートリーを免疫化することで産生することのできるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが今は可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子の同型接合除去が内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。このような生殖系列突然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列の転移は、抗原投与時にヒト抗体の産生をもたらす。Jakobovitsら, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovitsら, Nature 362:255-258 (1993); Bruggermanら, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5,591,669号、同第5,589,369号及び同第5,545,807号を参照されたい。

20

あるいは、ファージディスプレイ技術(McCaffertyら, Nature 348:552-553(1990))を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13の大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のいずれかにおいてイン-フレームをクローンする。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖のDNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がなされる。よって、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる; 例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)を参照のこと。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clacksonら, Nature, 352:624-628(1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライブラリーからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成可能で、抗原(自己抗原を含む)とは異なる配列の抗体を、Marksら, J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)、又はGriffithら, EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第5,565,332号及び同5,573,905号を参照のこと。

30

40

前記したように、またヒト抗体は、活性化B細胞によりインビトロで生産してもよい(例えば米国特許第5,567,610号及び同第5,229,275号を参照)。

ヒト抗-E r b B 2 抗体は1998年6月30日発行の米国特許第5,772,997号; 1997年1月3日公開の国際公報97/00271; 及び2001年2月8日公開の国際公報01/09187(Medarex)に記載されている。

50

【0067】

(v) 抗体断片

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennanら, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、F a b'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(a b')₂断片を形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(a b')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖F v断片(s c F V)である。国際公開93/16185；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。E r b B 2に結合する単鎖細胞内抗体(s F v)は国際公報01/56604及び米国特許第6,028,059号に記載されている。

10

【0068】

(vi) 二重特異性抗体

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対して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、E r b B 2タンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体ではE G F R、E r b B 3及び／又はE r b B 4に対する結合部位と、E r b B 2結合部位とが結合しうる。あるいは、抗E r b B 2アームは、E r b B 2発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、F c γ R I (C D 6 4)、F c γ R I I (C D 3 2)及びF c γ R I I I (C D 1 6)等のI g G (F c γ R)に対するF c レセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばC D 2又はC D 3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はE r b B 2を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はE r b B 2結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン-α、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は全長抗体又は抗体断片(例えばF(a b')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

20

30

国際公報96/16673には、抗-E r b B 2／抗-F c γ R I I I抗体が記載され、米国特許第5,837,234号には、二重特異性抗-E r b B 2／抗-F c γ R I抗体が開示されている。二重特異性抗-E r b B 2／F c a抗体は国際公報98/02463、二重特異性抗-E r b B 2／抗-C D 3抗体を教示する米国特許第5,821,337号に示されている。

【0069】

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Milsteinら, *Nature*, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が国際公報93/8829及びTrauneckerら, *EMBO J.* 10:3655-3659(1991)に開示されている。

40

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C H 2及びC H 3領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免

50

疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0070】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報94/04690に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

米国特許第5,731,168号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0071】

二特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4,676,980号)及びHIV感染の治療(国際公報91/00360、国際公報92/200373及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されてる。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4,676,980号に記載されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, *Science*, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0072】

最近の進歩により、大腸菌からF a b'-SH断片の直接の回収が容易になり、これは科学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。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F(a b')₂分子の製造を記述している。各F a b'断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役させて二重特異性抗体を形成する。従って、形成された二重特異性抗体は、ヒト乳腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発すると同時に、E r b B 2レセプターを過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞へ結合することが可能であった。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelnyら, J.Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b ' 部分に結合させられた。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し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruberら, J.Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

10

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J.Immunol. 147:60(1991)。E r b B 2、E G F R、および F c R に結合する三重特異性抗体については2001年8月7日公開の米国特許第6,270,765号B1に記載されている。

【0073】

(vii) 他のアミノ酸配列の修飾

ここで記載の抗-E r b B 2 抗体のアミノ酸配列の修飾を考察する。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性が改善されることが望ましい。抗-E r b B 2 抗体のアミノ酸配列変異体は、適当なヌクレオチド変化を抗-E r b B 2 抗体核酸に導入することにより、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、例えば、抗-E r b B 2 抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び／又は挿入及び／又は置換を含む。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終構造物に達するまでなされるが、その最終構造物は所望の特徴を有する。また、アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数の変化などの変異抗体の翻訳後過程を変更しうる。

20

突然変異のための好ましい位置にある抗-E r b B 2 抗体の残基又は領域の同定のために有用な方法は、Cunningham及びWells, Science 244: 1081-1085 (1989)に記載されているように「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基又は基が同定され（例えば、arg, asp, his, lys, 及びglu等の荷電残基）、中性又は負荷電アミノ酸（最も好ましくはアラニン又はポリペプチドアニリン）に置換され、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。次いで置換に対する機能的感受性を示すこれらのアミノ酸の位置は、置換部位において又はそれに対して更に又は他の置換を導入することにより精密にされる。即ち、アミノ酸配列変異を導入する部位は予め決定されるが、変異自体の性質は予め決める必要はない。例えば、与えられた部位における性能を分析するために、a l a スキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された抗-E r b B 2 抗体変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

30

【0074】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び／又はカルボキシル末端融合物、並びに一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗-E r b B 2 抗体又は細胞障害ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗-E r b B 2 抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素(A D E P T)又はポリペプチドの抗-E r b B 2 抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

40

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗-E r b B 2 抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基が異なる残基が挿入されている。置換突然変異について最も関心ある部位は高度可変領域を含むが、F R 交互変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表1に示す。これらの置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表1に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類を参照して以下

50

に更に記載するような、より実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングしてよい。

【0075】

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
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

【0076】

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又はヘリックス構造、(b) 標的部位もしくは(c) 側鎖全体における分子の電荷又は疎水性、を維持する効果において実質的に異なる置換基を選択することに

10

20

30

40

50

より達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けできる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 中性の親水性：cys, ser, thr;
- (3) 酸性：asp, glu;
- (4) 塩基性：asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 鎖配向に影響する残基：gly, pro; 及び
- (6) 芳香族：trp, tyr, phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類のものに交換することが必要であろう。

抗-E r b B 2 抗体の適切な配置の維持に含まれない任意のシステイン残基は、一般的にセリンで置換し、分子の酸化的安定性を向上させて異常な架橋を防止する。逆に、抗体にシステイン結合を付加して、その安定性を向上させてもよい（特に、抗体がF v 断片などの抗体断片である場合）。

【0077】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体の一又は複数の高度可変領域残基の置換を含む（例えばヒト化又はヒト抗体）。一般的に、さらなる発展のために選択されて得られた変異体は、それらが生成された親抗体に比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法はファージディスプレイを使用する親和性突然変異である。簡単に述べれば、高度可変領域部位（例えば、6-7 部位）を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13 の遺伝子I I I 産物への融合物として一価形式で表示される。ファージディスプレイ変異体は、次いで、ここに開示されるような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。修飾の候補となる高度可変領域部位を同定するために、アラニンスクランニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトE r b B 2 との接点を同定するのが有利である。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

抗体のアミノ酸変異の他の型は、抗体の元のグリコシル化パターンを変更する。変更とは、抗体に見られる一又は複数の炭水化物部分の欠失、及び／又は抗体に存在しない一又は複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

【0078】

抗体のグリコシル化は、典型的には、N-結合又はO-結合の何れかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン（ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸）というトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O-結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、それが一又は複数の上述したトリペプチド配列(N-結合グリコシル化部位のもの)を含むように変化させることによって簡便に達成される。この変化は、元の抗体配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

抗-E r b B 2 抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、これらに限られないが、天然源からの単離（自然に生じるアミノ酸配列変異体の場合）又はオリゴヌクレオチド媒介（又は部

10

20

30

40

50

位指向性)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による初期調製された変異体又は抗-ErbB2抗体の非変異体の調製を含む。

【0079】

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)を増強することが望ましい。このことは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸置換基を導入することにより達成される。別に、又は付加的にシステイン残基(類)をFc領域に導入して、この領域における鎖間ジスルフィド結合を形成させる。このようにして産生されたホモダイマー抗体は改善された内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞死滅及び抗体依存性細胞障害(ADCC)を有しうる。Caron等, J. Exp. Med. 176:1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。抗腫瘍活性が高められたホモダイマー抗体は、Wolff等, Cancer Research 53:2560-2565(1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは二重Fc領域を有し、よって増強された補体溶解及びADCC能を有しうる抗体を設計することができる。Stevensonら, Anti-cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

10

Fc領域配列を変異させ、C1q結合を減少または改良した変異型抗体は国際公報99/51642に記載されている。Fc領域配列を変異させ、FcR結合機能を変異させた変異型抗体は国際公報00/42072に記載されている。

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して、抗体(特に抗体断片)にサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで用いられる場合、用語「サルベージレセプター結合エピトープ」は、IgG分子のインビボ血清半減期を向上させる原因となるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

20

【0080】

(viii) 所望の特性を有する抗体のスクリーニング

抗体を生産するための技術は上述した。所望する、任意の生物学的特徴を有する抗体がさらに選択される。

ErbBのリガンド活性化を阻害する抗体を同定するために、ErbBを発現する細胞に結合するErbBリガンドを阻害する抗体の能力(例えば、対象とするErbBがErbBヘテロ-オリゴマーを形成するための他のErbBとのコンジュゲーションで)が決定されうる。例えば、ErbBヘテロ-オリゴマーのErbBを自然に発現する、又は発現するように形質移入された細胞を、抗体とインキュベートし、ついで標識したErbBリガンドに暴露してもよい。次いで、抗-ErbB2抗体の、ErbBヘテロ-オリゴマーのErbBに結合するリガンドを阻害する能力が評価されうる。

30

例えば、抗-ErbB2抗体によりMCF7乳癌細胞株へのHRG結合の阻害は、以下の実施例1に記載のような24穴プレートフォーマットでの氷上単層MCF7培地を用いて実施されてもよい。抗-ErbB2モノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、30分間インキュベートししてもよい。¹²⁵I標識化rHRGβ1₁₇₇₋₂₂₄(25 pm)を、次に加え、インキュベーションを4から16時間続けてもよい。用量反応曲線が作成され、対象とする抗体のためにIC₅₀値を算出する。一実施態様では、ErbBのリガンド活性化を阻害する抗体は、このアッセイで約50 nM以下の、より好ましくは約10 nM以下のMCF7細胞へのHRG結合抑制のIC₅₀を有しうる。抗体が、Fab断片のような抗体断片である場合、このアッセイにおけるMCF7細胞へのHRG結合抑制のIC₅₀は、例えば約100 nM以下、より好ましくは50 nM以下である。抗体以外の他の候補ErbBアンタゴニストは同様の方法で試験されうる。

40

【0081】

あるいは、又は更に加えて、ErbBヘテロ-オリゴマーに存在するErbBのErbBリガンド刺激性チロシンリン酸化を阻害する抗-ErbB2抗体の能力が評価されうる。例えば、ErbBを内性的に発現する又はそれらを発現するように形質移入された細胞は、抗体と共にインキュベートされ、次いでErbBリガンド依存性チロシンリン酸化活

50

性を抗-ホスホチロシンモノクローナル(場合によっては、検出可能なラベルとコンジュゲートされたもの)を用いてアッセイされる。米国特許第5,766,863号に記載されるキナーゼレセプター活性アッセイもまた、E r b B活性化及び抗体による該活性の阻害を測定するのに利用できる。

一実施態様では、以下の実施例1に記載されるような本来M C F 7細胞のp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G促進を阻害する抗体をスクリーニングしてもよい。例えば、M C F 7細胞を24穴プレートに蒔き、E r b B 2に対するモノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、室温で30分間インキュベートし；次いで最終濃度が0.2 nMになるようにr H R G β 1₁₇₇₋₂₂₄をそれぞれの穴に加え、インキュベーションを8分間続けてもよい。培地をそれぞれの穴から吸引し、100 μ lのS D Sサンプル緩衝液(5% S D S、25 m M D T T、及び25 m M トリス-H C l、p H 6.8)を加えることで、反応を終了させる。それぞれのサンプル(25 μ l)を、4-12%勾配ゲル(Novex)で電気泳動し、二フッ化ビニリデン膜に電気泳動的に形質移入してもよい。抗リン酸化チロシン(1 μ g/ml)免疫ブロットが進み、M_r ~ 180,000の顕著な活性バンドの強度が反射率濃度測定により定量されうる。選択された抗体は、好ましくはこのアッセイのコントロールの約0-35%まで、p 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激を有意に抑制する。反射率濃度測定により決定されたp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激抑制の用量反応曲線が作成され、対象とする抗体のためにI C₅₀値を算出してもよい。一実施態様では、E r b Bのリガンド活性化を阻害する抗体は、このアッセイで約50 nM以下の、より好ましくは約10 nM以下のp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激抑制のI C₅₀を有しうる。抗体が、F a b断片のような抗体断片である場合、このアッセイにおけるp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激抑制のI C₅₀は、例えば約100 nM以下、より好ましくは50 nM以下である。

【0082】

例えば、基本的にSchaeferら、Oncogene 15:1385-1394(1997)に記載されているように、M D A-M B-175細胞での抗体の成長抑制効果を調べてもよい。このアッセイによると、M D A-M B-175細胞は抗-E r b B 2モノクローナル抗体(10 μ g/mL)で4日間処理され、クリスタルバイオレットで染色した。抗-E r b B 2抗体とのインキュベーションにより、この細胞株での成長抑制効果はモノクローナル抗体2 C 4により示されたものと同じように示されうる。更なる実施態様においては、外因性H R Gはこの抑制を有意に反転させない。好ましくは、抗体は、外因性H R Gのある又は無い両方の状態で、モノクローナル抗体4 D 5よりも広範囲に(及び場合によってはモノクローナル抗体7 F 3よりも広範囲に)M D A-M B-175細胞の細胞増殖を抑制することができるであろう。

一実施態様において、対象とする抗-E r b B 2抗体は、実質的にモノクローナル抗体4 D 5よりも効果的な、更に好ましくは実質的にモノクローナル抗体7 F 3よりも効果的な実施例2に記載されたような共免疫沈降実験で決定されているような、M C F 7とS K-B R-3細胞両方のE r b B 3を用いたE r b B 2のヘレグリン依存性結合を阻害してもよい。

成長抑制性抗-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成長を抑制する抗体をスクリーニングしてもよい。一実施態様において、選別した成長抑制性抗体は、約0.5から30 μ g/mlの抗体濃度で約20-100%、好ましくは約50-100%まで細胞培養物中のS K-B R-3細胞の成長を阻害することができる。このような抗体を同定するために、米国特許第5,677,171号に記載のS K-B R-3アッセイを実施することができる。このアッセイに従って、S K-B R-3細胞を10%のウシ胎児血清、グルタミン及びペニシリンストレプトマイシンを補ったD M E M及びF 12培地の1:1混合物で生育させる。S K-B R-3細胞を35 mmの細胞培養皿で20,000細胞を蒔く(2 ml/35 mm皿)。1皿当たり0.5から30 μ g/mlの抗E r b B 2抗体を追加する。6日後、未処理細胞と比べた細胞数を電子C O U L T E R(商品名)細胞カウンタを使用してカウントする。S K-B R-3細胞の成長を約20-100%、又は約50-100%阻害する抗体が、上述したアポトーシス抗体と組合せるために選択される。

【0083】

細胞死を誘発する抗体を選択するために、例えばP I、トリパンブルー又は7 A A Dの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いをコントロールと比較して求める。好ましいアッセイは「B T 4 7 4細胞を使用するP I取込みアッセイ」である。このアッセイでは、B T 4 7 4細胞(アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション[Rockville, MD])が、ダルベッコの変性イーグル培地(D-MEM)；10%の熱不活性化F B S (Hyclone)と2 mMのL-グルタミンを補ったハムのF-12(50:50)で培養される。(従って、アッセイは補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる)。B T 4 7 4細胞を100 x 20 mm皿に、皿当たり3 x 10⁶の密度で播種し、一晚付着させたままにする。ついで培地を除去し、新しい培地を単独で、又は10 µg/mlの適切なM A bを含む培地と取り替える。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、単層をP B Sで洗浄し、トリプシン処理により分離する。ついで、1200 rpm、5分間、4℃で細胞を遠心分離し、ペレットを3 mlのCa²⁺結合氷冷バッファー(10 mMのH e p e s、p H 7.4、140 mMのN a C l、2.5 mMのC a C l₂)に再懸濁させ、細胞凝塊除去のために35 mmのストレーナキャップ付き12 x 75チューブ(チューブ当たり1 ml、処理グループ当たり3チューブ)に等分する。サンプルをF A C S C A N(登録商標)フローサイトメータとF A C S C O N V E R T(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析する。P I取込みにより測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗体が選択される。

10

【0084】

20

アポトーシスを誘発する抗体を選択するためには、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できる。B T 4 7 4細胞を培養し、先の段落において記載したように皿に播種する。ついで培地を回収し、新しい培地を単独で、又は10 µg/mlの適切なM A bを含む培地と取り替える。3日間インキュベートした後、単層をP B Sで洗浄し、トリプシン処理により分離する。ついで細胞を遠心分離し、Ca²⁺結合氷冷バッファーに再懸濁させ、細胞死アッセイに対して上述したようにチューブに等分する。ついでチューブに標識化アネキシン(例えばアネキシンV-F T I C)(1 µg/ml)を入れる。サンプルをF A C S C A N(登録商標)フローサイトメータとF A C S C O N V E R T(登録商標)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析する。対照に対して、統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘発する抗体がアポトーシス誘発抗体として選択される。

30

アネキシン結合アッセイに加えて、B T 4 7 4細胞を使用するD N A染色アッセイが利用できる。このアッセイを行うために、先の2段落に記載したように関心のある抗体で処理されたB T 4 7 4細胞を、37℃で2時間、9 µg/mlのH O E C H S T 3 3 3 4 2(登録商標)と共にインキュベートし、ついでM O D F I T L T(登録商標)ソフトウェア(Verity Software House)を使用し、E P I C S E L I T E(登録商標)フローサイトメータ(Coulter Corporation)で分析する。このアッセイを使用し、未処理細胞(最大100%のアポトーシス細胞)よりも2倍又はそれ以上(好ましくは3倍以上)のアポトーシス細胞のパーセンテージの変化を誘発する抗体が、プロアポトーシス抗体として選択される。

40

関心のある抗体により結合したE r b B 2上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするため、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。別法として、従来から公知の方法により、エピトープマッピングを実施することもできる(例えば、ここで図1 A及び1 B参照)。

次いで、アンタゴニストとして同定した抗体は上記の何れかの疼痛の動物モデルで試験することができる。

【0085】

(ix) 免疫コンジュゲート

また本発明のE r b Bアンタゴニスト抗体は、細胞障害剤、例えば化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒又は小分子毒素、それらの断片及び

50

／又は変異形を含む)、又は放射性アイソトープ(すなわち、放射性コンジュゲート)に結合した抗体を含有する免疫コンジュゲートの形態でありうる。

このような免疫コンジュゲートの生成に有用な化学療法剤は上述している。抗体のコンジュゲート及び一つ以上の小分子毒素、例えばカリケアミシン(calicheamicin)、マイタンシン(maytansine)(米国特許第5,208,020号)、トリコテン(trichothene)及びCC1065もここにおいて考慮される。

本発明のひとつの好ましい実施態様では、抗体は、一つ以上のマイタンシン(maytansine)分子(例えば、抗体分子当たり約1から約10のマイタンシン分子)と共役している。マイタンシンは、例えばMay-SH3へ還元されるMay-SS-Meへ変換され、修飾抗体(Chariら, Cancer Research 52:127-131(1992))と反応してマイタンシノイド(maytansinoids)ー抗体免疫コンジュゲートを生じる。

10

その他の対象免疫コンジュゲートは、一つ以上のカリケアマイシン(calicheamicin)分子と共役している抗ErB2抗体を包含する。抗体のカリケアマイシンファミリーは、サブピコモル濃度で、二重鎖DNAの割れ目を作ることができる。使用されるであろうカリケアマイシンの構造類似体は、限定されるものではないが、 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-アセチル γ_1^I 、PSAG及び θ^I_1 (Hinmanら, Cancer Research 53:3336-3342(1993)及びLodeら, Cancer Research 58:2925-2928(1998))を含む。また、米国特許第5,714,586号; 5,712,374号; 5,264,586号; 及び5,773,001号参照、文献明示によりここに取り込む。

【0086】

20

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAP-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サパオナリア(sapaonaria)オフシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセンス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日に公開の国際公開第93/21232を参照のこと。

30

本発明は、更に、抗体と核酸分解性活性(例えば、リボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ; DNA分解酵素)をとともなう化合物との間に形成される免疫コンジュゲートについて考慮する。

種々の放射性核種が放射性コンジュゲート抗ErB2抗体の生成に利用できる。具体例にはAt²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²及びLuの放射線各種が含まれる。

【0087】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、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-ピリジルジチオール)プロピオナート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、スクシインミジル1-4-(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、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(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)ヘキサレンジアミン)、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、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開94/11026号を参照さ

40

50

りたい。

リンカーは、細胞内で細胞毒性薬剤を放出を容易にする「切断可能なリンカー」でもよい。例えば、酸に弱いリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chariら, Cancer Research 52:127-131[1992])を使用してもよい。

あるいは、抗 E r b B 2 抗体及び細胞毒性剤を含んでなる融合タンパク質を、例えば組み換え技術又はペプチド合成で製造してもよい。ケモカイン(例えば、RANTES)と融合した抗 E r b B 2 抗体の免疫コンジュゲートは国際公報98/33914に記載されている。

他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体がコンジュゲートされ得、ここで、抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄化(clearing)剤を使用し、循環から未結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0088】

(x) 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法(ADEPT)

また、本発明の抗体は、プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、国際公報81/01145を参照)を活性な抗癌剤に転化させるプロドラッグ活性化酵素に抗体をコンジュゲートさせることにより、ADEPTにおいて使用することができる。例えば国際公報88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素成分には、より活性な細胞毒形態に転化するように、プロドラッグに作用し得る任意の酵素が含まれる。

限定するものではないが、この発明の方法に有用な酵素には、ホスファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアルカリ性ホスファターゼ；スルファート含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なアリアルスルファターゼ；非毒性5-フルオロシトシンを抗癌剤5-フルオロウラシルに転化するのに有用なシトシンデアミナーゼ；プロテアーゼ、例えばセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ及びカテプシン(例えば、カテプシンB及びL)で、ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なもの；D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの転化に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；炭水化物切断酵素、例えばグリコシル化プロドラッグを遊離の薬剤に転化するのに有用なノイラミニダーゼ及びβガラクトシダーゼ；βラクタムで誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化させるのに有用なβラクタマーゼ；及びペニシリンアミダーゼ、例えばそれぞれフェノキシアセチル又はフェニルアセチル基で、それらのアミン性窒素において誘導体化された薬剤を遊離の薬剤に転化するのに有用なペニシリンVアミダーゼ又はペニシリンGアミダーゼが含まれる。あるいは、「アブザイム」としてもまた公知の酵素活性を有する抗体を、遊離の活性薬剤に本発明のプロドラッグを転化させるために使用することもできる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)を参照)。抗体-アブザイムコンジュゲートは、ここで記載されているようにして、腫瘍細胞個体群にアブザイムを送達するために調製することができる。

この発明の酵素は、当該分野においてよく知られている技術、例えば上で検討したヘテロ二官能性架橋試薬を使用することにより、抗 E r b B 2 抗体に共有的に結合させることができる。あるいは、本発明の抗体の少なくとも結合領域を本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部位に結合せしめてなる融合タンパク質を、当該技術においてよく知られている組換えDNA技術を使用して作成することができる(例えばNeubergerら, Nature 312:604-608(1984)参照)。

【0089】

(xi) 他の抗体修飾

抗体の他の修飾がここで検討される。例えば、抗体は、様々な非タンパク質性(nonproteinaceous)のポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーの1つに結合されてもよい。また抗体は、例えばコアセルベーション法又は界面

10

20

30

40

50

重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに、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ィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol編(1980)に開示されている。

ここで開示されている抗ErbB2抗体は、免疫リポソームとして処方することもできる。抗体を含有するリポソームは、例えばEpsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4,485,045号及び同4,544,545号に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化ホスファチジエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物を用いた逆相蒸発法により作製することができる。リポソームは孔径が定められたフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド交換反応を介して、Martinら, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)に記載されているようにしてリポソームにコンジュゲートすることができる。場合によっては、化学療法剤はリポソーム内に包含される。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)を参照されたい。

【0090】

医薬製剤

本発明のErbBアンタゴニストの治療用製剤は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed., (1980)に記載のような技術及び標準的な材料を用いて、医薬製剤として調整することができる。したがって、抗ErbB抗体は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、好適な製薬上受容可能な担体、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有するアンタゴニストとを混合することにより、保存用に調整される。受容可能な担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液; アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤; 防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; 塩化ヘキサメトニウム; 塩化ベンズアルコニウム; 塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチル又はベンジルアルコール; アルキルパラベン類、例えばメチル又はプロピルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; 及びm-クレゾール); 低分子量(残基数10個未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質; ポリビニルピロリドン等の親水性重合体; グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、ヒスチジン又はリシン等のアミノ酸; グルコース、マンノース又はデキストリン等の単糖類、二糖類又は他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン; 金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体); 及び/又はTWEEN(登録商標)、PLURONICS(登録商標)又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。好ましい凍結乾燥抗-ErbB2抗体の形態は、国際公報97/04801に記載され、文献明示によりここに取り込む。

ここで、製剤は、治療される特定の効能に必要な一以上の活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有し得る。例えば、ある製剤に、血管内皮増殖因子(VEGF)、又はEGFR、ErbB2(例えばErbB2の異なるエピトープに結合する抗体)、ErbB3、ErbB4に結合する抗体をさらに提供することが望ましい。あるいは、又は加えて、組成物は、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、EGFR標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害剤、免疫抑制剤、抗血管形成剤、及び/又は心臓保護剤を含有してもよい。このような分子は、好適には、意図した目的に有効な量で組合せて存在する。

【0091】

また活性成分は、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに、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ィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術は上掲のRemington's Pharmaceutical Sciencesに開示されている。

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例には、抗体を含む固体疎水性重合体の半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスはフィルム又はマイクロカプセル等の成形品の形態である。徐放性マトリックスの例には、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)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と γ -エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注入可能なミクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

インビボ投与に使用される製剤は、無菌にしなければならない。これは無菌濾過膜を通して濾過することにより容易に成される。

E r b Bアンタゴニストが小有機分子の場合、経口投与に好適な形態で調整するのが好ましいが、注射又は注入投与用に液体製剤として調整してもよい。

【0092】

E r b Bアンタゴニストと用いた治療

E r b Bアンタゴニストは周知の方法によってヒト患者に投与されうる。したがって、例えば、抗-E r b B (例えば抗-E r b B 2) 抗体を、例えばボーラスないしはある期間の連続注入による静脈注射で、又は筋肉内、腹膜内、脳髄内、皮下、関節内、滑膜内、クモ膜下腔内、経口、局所、又は吸入によって投与される。抗体の静脈投与又は皮下投与が好ましい。

最適用量は、適切な動物モデルの用量実験とヒト臨床試験での最終調整に基づいて決定されうる。一般的に、有効量は、患者の疼痛を、少なくとも1、好ましくは少なくとも2、より好ましくは少なくとも3段階軽減するものであり、その結果、疼痛スコア(0から10段階)を少なくとも5以下、より好ましくは4以下、さらにより好ましくは3以下、最も好ましくは2以下にするのが好ましい。また、有効量は初めの疼痛の性質及び重症度に依存するであろう。

候補E r b Bアンタゴニストの痛覚消失活性は、通常、二重盲検、無作為化、プラセボ対照臨床試験で試験される。無作為対照化試験の設定の概要については、例としてJadad AR, Haynes RB. Med Decis Making 1998;18.2-9を参照のこと。

【0093】

他の治療法を、抗-E r b B 2抗体などのE r b Bアンタゴニストの投与と組み合わせてもよい。組み合わせ投与は、別々の形態又は単一の製薬形態を用いた同時投与、及び好ましくは両方の(又は全てが)それらの生物学的活性を同時に発揮するような期間をもったそれぞれの順序での連続投与を含む。

一つの好ましい実施態様では、患者は2つの異なる抗-E r b B 2抗体で治療される。例えば、患者は、E r b Bのリガンド活性化を阻害する第1の抗-E r b B抗体、又はモノクローナル抗体2C4、並びに成長抑制のある第2の抗-E r b B 2抗体(例えば、ハーセプチン(登録商標))又はE r b B 2過剰発現細胞のアポトーシスを促進する抗-E r b B 2抗体(例えば7C2、7F3又はそのヒト化変異体)の生物学的活性を有する抗体で治療されてもよい。好ましくはこ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、ハーセプチン治療に应答しない患者を、ハーセプチン(登録商標)で治療した後、r h u M A b 2 C 4で治療する。他の実施態様では、患者をまずr h u M A b 2 C 4で処置してからハーセプチン(登録商標)治療を行う。また更に好ましい実施態様では、患者はr h u M A b 2 C 4とハーセプチン(登録商標)の両方で同時に治療されうる。

また、E G F R、E r b B 3、E r b B 4、又は血管内皮増殖因子(V E G F)に対する

抗体の投与とともに、抗-E r b B 2 抗体または複数の抗体を組み合わせることが望まれる。

【0094】

一実施態様では、本発明の治療は、抗-E r b B 2 抗体（または複数の抗体）、および一又は複数の化学療法剤、細胞障害性剤、又は成長阻害剤の組み合わせ投与を含んでなるものであり、異なる化学療法剤のカクテル同時投与含む。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の指示に従って使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service M.C.Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)に記載されている。

抗体は、抗-エストロゲン化合物、例えばタモキシフェン；抗プロゲステロン、例えばオナプリストン(onapristone)(欧州特許第616,812号を参照)；又は抗-アンドロゲン、例えばフルタミドの抗ホルモン化合物を、このような分子に対して既知の投薬量で組合せてもよい。

ときに、心臓保護剤(治療に関する心筋機能障害を防止する又は減少するために)又は一又は複数のサイトカインを患者にを同時投与することも適している。また抗-血管形成剤を同時投与してもよい。前記の治療法に加えて、患者は、外科手術、放射線療法又は光線療法を受けてもよい。

ここでの抗-E r b B 2 抗体はまた、相補的な、及び潜在的に相乗的な治療効果を生じるように、定義の章で前記したようなE G F R-標的薬、チロシンキナーゼ阻害剤及び／又は免疫抑制剤と組み合わせてもよい。

前記の同時投与される任意の薬剤の適した投与量は、現在使用されている投与量で、薬剤と抗-E r b B 2 抗体の組み合わせ作用(相乗効果)に応じて少なくしてもよい。

【0095】

前述のように、疼痛の予防又は治療のための抗体の適切な投与量は、治療される疼痛の重症度及び種類、抗体を防止目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。病気の種類及び重症度に応じて、疾患のタイプや重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ないし $15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば、好ましくは約0.1、又は0.5-約20又は $30\text{mg}/\text{kg}$)の抗体が患者への最初の投与量の候補である。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ あるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、症状に応じて、病気の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。抗体の好ましい投与量は、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ から約 $30\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $6\text{mg}/\text{kg}$ 、 $8\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、又は $15\text{mg}/\text{kg}$ の一又は複数の用量(又はその任意の組み合わせ)で、患者に投与されてもよい。これらの用量は、断続的に、例えば、毎週又は3週間毎、毎月又は3又は4か月毎に投与されうる(例えば、患者は、E r b B 2 抗体の約2から約20、例えば約6用量を受ける)。高い初負荷用量は、一又は複数の低用量の後に投与されうる。例示的な用法は、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初負荷用量を、毎週約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の抗-E r b B 2 抗体を維持した後に投与することを含む。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。この治療の進行状態は通常の技術やアッセイで容易にモニターされる。

【0096】

一方、ある実施態様では、投与される抗体は、好ましくは、「そのままの(naked)」または「細胞障害性剤とコンジュゲートさせない」ものであるが、細胞障害性剤とコンジュゲートさせた抗E r b B (例えば、抗E r b B 2) 抗体を含む免疫コンジュゲートを患者に投与する。好ましくは、結合された免疫コンジュゲート及び／又はE r b B 2 タンパク質は細胞内に取りこまれ、免疫コンジュゲートの治療の効果が上がる。好ましい実施態様では、細胞障害性剤は細胞内の核酸を標的とする又は干渉する。このような細胞障害性剤の例として、メイタンシノイド、カリチエアマイシン、リボヌクレアーゼ、及びDNAエ

ンドヌクレアーゼを含む。

患者への抗体タンパク質の投与のみならず、本出願は、遺伝子療法による抗体の投与についても検討する。抗体をコードする核酸のこのような投与は、「治療的効果量の抗体の投与」という表現に包含される。例えば、1996年3月14日に公開の国際公報96/07321、および遺伝子治療により投与されるHER2に対する抗体に関する2001年8月9日公開の国際公報01/56604参照。

【0097】

核酸（場合によってはベクター内に含まれたもの）を患者の細胞に入れるために：インビボ及びエキソビボという2つの主要な方法がある。インビボ送達では、核酸は、通常はアンタゴニストが必要とされている部位に直接注入される。エキソビボ処理では、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入し、修飾された細胞を患者に、直接、又は例えば患者に埋め込まれる多孔性膜にカプセル化して投与する（米国特許第4,892,538号及び第5,283,187号参照）。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ある。これらの技術は、核酸が培養された細胞にインビトロで移入されるか、又は対象とする宿主にインビボで移入されるかに依る。哺乳動物細胞にインビトロで核酸を移入するのに適した技術は、リボソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などを含む。遺伝子のエキソビボ送達に通常用いられるベクターはレトロウイルスである。

現在インビボ核酸移入技術で好ましいのは、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスIウイルス、又はアデノ関連ウイルス）、及び脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPC、及びDC-Cholである）での形質移入を含む。幾つかの状況では、核酸供給源を標的細胞をターゲティングする薬剤、例えば細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体又は標的細胞、標的細胞上のレセプターのリガンドなどとともに提供するのが望ましい。リボソームが用いられる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び／又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、国際公報 93/25673及びそこに引用された参考文献も参照。

【0098】

材料の寄託

以下のハイブリドーマ株化細胞を、アメリカ合衆国、バージニア20110-2209、マナッサス、ブルーバード大学 10801、アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション(ATCC)に寄託した。

抗体名	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 CRL 10463	1990年5月24日
2C4	ATCC HB-12697	1999年4月8日

本発明のさらなる詳細を、以下の非限定的な実施例により例証する。本明細書中で開示された全ての引用例は、出典明示によりここに特に取り入れている。

【0099】

実施例1

モノクローナル抗体2C4の作成と特徴付け

Erbb2の細胞外ドメインに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体2C4、7F3及び4D5を、Fendlyら, Cancer Research 50:1550-1558(1990)に記載されているよ

うにして作成した。簡単には、Hudziakら, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)84:7158-7163(1987)に記載されているようにして作成されたN I H 3 T 3 / H E R 2 - 3 4 0 0 細胞(約 1×10^5 E r b B 2 分子/細胞を発現)を25mMのE D T Aを含有するリン酸緩衝食塩水(P B S)で収集し、B A L B / c マウスを免疫化するために使用した。マウスに、0、2、5及び7週に、0.5mlのP B Sに 10^7 細胞が入ったものを腹腔内注射した。³²P標識化E r b B 2を免疫沈降させた抗血清を有するマウスに、9及び13週に、小麦芽凝集素-セファロース(W G A)精製E r b B 2膜抽出物を腹腔内注射した。続いて0.1mlのE r b B 2調製物を静脈内注射し、脾細胞をマウス骨髄腫株X 6 3 - A g 8 . 6 5 3と融合させた。

ハイブリドーマ上清をE L I S A及び放射性免疫沈降により、E r b B 2結合性についてスクリーニングした。

モノクローナル抗体2 C 4、7 F 3及び4 D 5に結合されるE r b B 2エピトープを、競合結合分析により決定した(Fendlyら Cancer Research 50:1550-1558(1990))。交差阻害研究は、量的蛍光のためのP A N D E X(商品名)スクリーン機を用いて完全な細胞上で蛍光検定することにより、抗体で実施された。それぞれのモノクローナル抗体は、確立した方法(Wofsyら Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel and Schiigi (eds.)San Francisco: W.J.Freeman Co. (1980))を用いて、フルオレセインイソチオシアネート(F I T C)とコンジュゲートした。N I H 3 T 3 / H E R 2 - 3 4 0 0 細胞の集密的な単層をトリプシン処理し、1回洗浄し、更に0.5%ウシ血清アルブミン(B S A)及び0.1%N a N ₃を含有する冷たいP B S中に、 1.75×10^6 細胞/mlで再懸濁した。最終濃度1%のラテックス粒子(I D C、ポートランド、O R)をP A N D E X(商品名)プレート膜の目詰まりを減少させるために追加した。懸濁液中の細胞、20 μ l、及び20 μ lの精製モノクローナル抗体(100 μ g/mlから0.1 μ g/ml)をP A N D E X(登録商標)プレートの穴に加え、30分間氷上でインキュベートした。所定希釈のF I T C標識されたモノクローナル抗体20 μ lをそれぞれの穴に加え、30分間インキュベートし、洗浄し、更に蛍光がP A N D E X(登録商標)で定量された。モノクローナル抗体は、無関係なモノクローナル抗体コントロールに比較して50%又はそれ以上で他の結合をそれぞれ阻害した場合に、エピトープを共有するとみなされた。この実験において、モノクローナル抗体4 D 5、7 F 3及び2 C 4はそれぞれ、エピトープI、G / F及びFを指定した。

【0100】

モノクローナル抗体2 C 4、7 F 3及び4 D 5の成長抑制特性は、乳癌細胞株、S K - B R - 3(Hudziakら Molec. Cell. Biol. 9(3):1165-1172(1989)参照)を用いて評価された。簡単には、S K - B R - 3細胞を0.25%(vol/vol)トリプシンで検定し、 4×10^5 細胞/mlの密度で培地体に完全に懸濁した。100 μ l(4×10^4 細胞)に等分したものを96穴微量希釈プレートに入れ、細胞を付着させ、ついで培地のみ又はモノクローナル抗体を含有する培地(最終濃度5 μ g/ml)100 μ lを加えた。72時間後、プレートをP B S(p H 7. 5)で2回洗浄し、クリスタルバイオレット(メタノール中0.5%)で染色し、Sugarmanら Science 230:943-945(1985)に記載されたようにして関連のある細胞増殖を分析した。モノクローナル抗体2 C 4及び7 F 3はS K - B R - 3関連細胞増殖をそれぞれ約20%及び約38%阻害したのに比べて、モノクローナル抗体4 D 5は56%阻害した。

モノクローナル抗体2 C 4、4 D 5及び7 F 3を、M C F 7細胞の全細胞溶解物からのM_r180,000の範囲のタンパク質のH R G促進性チロシンリン酸化を阻害する能力について評価した(Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996))。M C F 7細胞は既知のE r b Bをすべて発現するが、比較的低いレベルであることが報告されている。E r b B 2、E r b B 3、及びE r b B 4はほとんど同一の分子サイズを有し、全細胞溶解物をウエスタンブロット分析で評価する場合、タンパク質がリン酸化チロシンであると識別することはできない。

しかしながら、これらの細胞は、外因性付加H R Gが無い状態で使用されるアッセイ条

10

20

30

40

50

件下で、それらが M_r 180,000の範囲でチロシンリン酸化タンパク質の検出不可能な程低いレベルを示すために、HRGチロシンリン酸化アッセイに理想的である。

【0101】

MC F 7細胞を24穴プレートに蒔き、Er b B 2に対するモノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、室温で30分間インキュベートした；次いでrHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄を0.2 nMの最終濃度になるまでそれぞれの穴に加え、インキュベーションを8分続けた。培地をそれぞれの穴から注意深く取り除き、100 μ lのSDSサンプル緩衝液(5% SDS、25 mM DTT、及び25 mM トリス-HCl、pH 6.8)の付加により反応を停止した。それぞれのサンプル(25 μ l)を4-12% 勾配ゲル(Novex)で電気泳動し、次いでニフッ化ポリビニリデン膜に電気泳動的に移動した。前記したように(Holmesら Science 256:1205-1210(1992)；Sliwowskiら J. Biol. Chem. 269:14661-14665(1994))、抗リン酸化チロシン(4G10、UBI由来、1 μ g/mlで使用)イムノブロットを進め、 M_r ~180,000で顕著な反応バンドの強度を反射率濃度で定量した。

モノクローナル抗体2C4、7F3及び4D5は、 M_r 180,000でHRG促進チロシンリン酸化シグナルの生成を有意に抑制した。HRGの無い場合、これらの抗体は M_r 180,000の範囲のタンパク質のチロシンリン酸化を促進することができない。また、これらの抗体は、EGFR(Fendlyら Cancer Research 50:1550-1558(1990))、Er b B 3、又はEr b B 4と交差反応しない。抗体2C4及び7F3はコントロールの<25%でp180チロシンリン酸化のHRG促進を有意に阻害した。モノクローナル抗体4D5は、~50%までチロシンリン酸化のHRG促進を阻害することができた。図2Aは反射率濃度に決定されるp180チロシンリン酸化のHRG促進の2C4又は7F3阻害曲線を示す。4パラメーターフィットを用いたこれらの抑制曲線の評価から、それぞれ2C4及び7F3の 2.8 ± 0.7 nM及び 29.0 ± 4.1 nMの IC_{50} を得た。

【0102】

抗-Er b B 2抗体によるMC F 7乳癌細胞株へのHRG結合の抑制は、24穴プレート形態の氷上単層培地で実施された(Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996))。抗-Er b B 2モノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、30分間インキュベートした。¹²⁵I-標識rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄(25 pM)が加えられ、インキュベーションを4から16時間続けた。図2Bには、MC F 7細胞に対するHRG結合の2C4又は7F3抑制の用量・反応曲線が示される。様々な濃度の2C4又は7F3を¹²⁵I-標識rHRG β 1の存在した状態でMC F 7細胞とインキュベートし、抑制曲線を図2Bに示した。これらのデータの分析から、それぞれ2C4及び7F3の 2.4 ± 0.3 nM及び 19.0 ± 7.3 nMの IC_{50} を得た。2C4及び7F3の最大抑制~74%は、チロシンリン酸化のデータと一致していた。

MC F 7細胞で見られる抗-Er b B 2抗体の効果が一般的な減少であるかどうかを決定するために、ヒト腫瘍細胞株を2C4又は7F3と共にインキュベートし、特定の¹²⁵I-標識rHRG β 1結合の程度が決定された(Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996))。この研究の結果は、図3に示される。Er b B 2をほとんど又は全く発現しないと報告されている乳癌細胞株MDA-MB-468を除いて、すべての細胞株で2C4又は7F3のどちらかにより¹²⁵I-標識rHRG β 1の結合を有意に抑制することができた。残りの細胞株においては、これらの細胞株にわたって広く変化するEr b B 2発現のレベルで、Er b B 2を発現することが報告される。実際に、試験された細胞株中のEr b B 2発現の程度は、2桁以上にまで変化する。例えば、BT-474及びSK-BR-3が~ 10^6 Er b B 2レセプター/細胞を発現するのに対して、BT-20、MC F 7、及びCao v 3は、~ 10^4 Er b B 2レセプター/細胞を発現する。これらの細胞の広範囲のEr b B 2発現及び前記のデータから、Er b B 2とEr b B 3又はEr b B 4の間の相互作用はそれ自体、原形質膜の表面にある高親和性相互作用であることが推論される。

【0103】

外因性rHRG β 1がある場合とない場合とで、MDA-MB-175及びSK-BR-3細胞上でのモノクローナル抗体2C4及び4D5の成長抑制効果を測定した(Schaeferら

Oncogene 15:1385-1394(1997))。MDA-MB-175細胞のErbb2レベルは、通常の乳房上皮細胞で見られるレベルよりも4-6倍高く、Erbb2-Erbb4レセプターは構成的にMDA-MB-175細胞のリン酸化チロシンである。MDA-MB-175細胞は抗-Erbb2モノクローナル抗体2C4及び4D5(10 µg/ml)と4日間処理された。クリスタルバイオレット染色アッセイにおいて、2C4でのインキュベーションはこの細胞株での強い成長抑制効果を示した(図4A)。外因性HRGはこの抑制を有意には反転しない。言い換えると、2C4はErbb2過剰発現細胞株SK-BR-3での抑制効果を示さない(図4B)。モノクローナル抗体2C4は外因性HRGのある場合と無い場合の両方で、モノクローナル抗体4D5よりもより広くMDA-MB-175細胞の増殖を抑制することができる。4D5による細胞増殖の抑制は、Erbb2発現のレベルに依存する(Lewisら Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263(1993))。SK-BR-3細胞で66%の最大抑制が示された(図4B)。しかしながらこの効果は外因性HRGによって得ることはできない。

【0104】

実施例2

モノクローナル抗体2C4に阻害されるErbb2のErbb3とのHRG依存性結合

Erbb2に結合するErbb3の能力を共免疫沈降実験で試験した。1.0 x 10⁶のMCF7又はSK-BR-3細胞を、10%ウシ血清(FBS)と10mM HEPES、pH7.2(成長培地)を含有する50:50のDMEM/Ham's F12培地の6穴細胞培養プレートに蒔き、一晚接触させた。細胞を実験開始前に血清なしの成長培地に2時間おいて枯渇させた。

細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で簡単に洗浄し、次いで10mM HEPES、pH7.2(結合緩衝液)、又は結合緩衝液のみ(コントロール)のどちらかを含有する0.2%w/vウシ血清アルブミン(BSA)、RPMI培地で希釈された100nMの指示抗体のそれぞれとともにインキュベートする。室温で1時間おいた後、HRGを半分の穴に5nMの最終濃度まで加える(+)。同量の結合緩衝液を他の穴に加える(-)。インキュベーションはおよそ10分間続けられた。

上澄みを吸引により取り除き、細胞を0.2mM PMSF、10 µg/mlロイペプチン、及び10TU/mlアプロチニンを含有するRPMI、10mM HEPES、pH7.2、1.0%v/vトリトンX-100(登録商標)、1.0%w/vCHAPS(溶解緩衝液)に溶解した。

【0105】

Erbb2を親和性ゲル(Affi-Prep10、Bio-Rad)に共有結合したモノクローナル抗体を用いて免疫沈降した。この抗体(Ab-3、Oncogene Science)は細胞質ドメインエピトープを認識する。免疫沈降は、それぞれの溶解物に固定された抗体、約8.5 µgを含有する10 µlのゲル懸濁液を加えることにより実施され、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り集めた。結合していない物質を取り除くために、ゲルを溶解緩衝液を用いてバッチ的に3回洗浄した。次いでSDSサンプル緩衝液を加え、サンプルを沸騰したウォーターバスの中で、軽く温めた。

上澄みを4-12%のポリアクリラミドゲル上に流し、ニトロセルロース膜上にエレクトロブロットした。Erbb3の存在は、その細胞質ドメインエピトープ(c-17、Santa Cruz Biotech)に対するポリクローナル抗体でのブロットをプローブすることにより調べられる。ブロットは、化学ルミネセント基質(ECL、Amersham)を用いて可視化した。

図5A及び5Bのコントロールのレーンに示されるように、それぞれMCF7及びSK-BR-3細胞において、Erbb3は、細胞がHRGで促進される場合にのみErbb2免疫沈殿物中に存在した。細胞が最初にモノクローナル抗体2C4とインキュベートされる場合、Erbb3シグナルはMCF7細胞で消滅する(図5A、レーン2C4+)かあるいはSK-BR-3細胞で減少する(図5B、レーン2C4+)。図5A-Bに示されるように、ハーセプチン(登録商標)よりも実質的に効果的に、モノクローナル抗体2C4はMCF7及びSK-BR-3の両方の細胞でErbb3のErbb2とのヘレグリン依存性結合を

阻害する。ハーセプチン(登録商標)と予めインキュベーションすると、M C F 7 溶解物で E r b B 3 シグナルを減少させるが、S K - B R - 3 溶解物由来の E r b B 3 共沈の量にはほとんど又は全く効果を有しない。E G F レセプターに対する抗体(Ab-1、Oncogene Science)とのプレインキュベーションは、どちらの細胞株においても E r b B 2 との共免疫沈降の E r b B 3 の能力に全く効果が無い。

【0106】

実施例3

ヒト化2C4抗体

最初にマウスモノクローナル抗体2C4の様々なドメインをマウス/ヒトキメラF a b 断片を生成させるベクターにクローン化した。全RNAを市販のプロトコールに続いてストラタジーンRNA抽出キットを用いてハイブリドーマ細胞から単離した。様々なドメインをR T - P C Rにより増幅し、ゲルを精製し、前記されるように(Caterら PNAS(USA)89: 4285(1992); 及び米国特許第5,821,337号)、ヒト κ 定常ドメイン及びヒトC_H1ドメインを含有するp U C 1 1 9をもとにしたプラスミドの誘導体に挿入した。その結果に生じたプラスミドをF a b 断片の発現のために大腸菌株16C9に移した。培養物の成長、タンパク質発現の誘発、及びF a b 断片の増幅については前に記載した(Wetherら J. Immunol. 157:4986-4995(1996); Prestaら Cancer Research 57:4593-4599(1997))。

精製したキメラ2C4F a b断片を、M C F 7細胞への¹²⁵I - H R G結合の抑制及びM C F 7細胞のp 1 8 0チロシンリン酸化のr H R G活性化の抑制の能力に関してマウス親抗体2C4と比較した。図6Aに示されるように、キメラ2C4F a b断片はヒト乳癌細胞株、M C F 7の高親和性E r b B 2 - E r b B 3結合部位の形成を妨害するのに非常に効果的である。無傷のマウス2C4から算出された関連するI C₅₀の値は、4. 0 ± 0. 4 nMであるのに対して、F a b断片からの値は7. 7 ± 1. 1 nMである。図6Bに示されるように、一価のキメラ2C4F a b断片は、H R G依存性r b B 2 - E r b B 3活性化を妨害するのに非常に効果的である。完全なマウスモノクローナル抗体2C4から算出されるI C₅₀の値は6. 0 ± 2 nMであるが、F a b断片からの値は15. 0 ± 2 nMである。

【0107】

キメラクロンのDNA配列により、C D R残基を同定することができる(Kabatら, Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))(図7A及びB)。オリゴヌクレオチド部位指定突然変異を用いて、これら6つのC D R領域の全てを、前記したようなプラスミドV X 4(Prestaら, Cancer research 57:4593-4599(1997))に含まれた完全なヒトフレームワーク(V_L κ サブグループI及びV_HサブグループIII)に導入した。結果物「C D R - スワップ」由来のタンパク質を発現し、前記のようにして精製した。結合研究は2つのバージョンを比較して実施した。簡単には、NUNC MAXISORP(商品名)プレートを1 μ g/mlのE r b B 2細胞外ドメイン(E C D; 国際公報90/14357に記載されたようにして作成)の50 mM炭酸緩衝液、pH 9. 6、4℃で一晩覆い、次いで、室温で1時間E L I S A希釈液(0. 5% B S A、0. 05%ポリソルベート20、P B S)で阻害した。E L I S A希釈液の連続希釈サンプルをプレート上で2時間インキュベートした。洗浄の後、結合したF a b断片をストレプトアビジンコンジュゲートホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(Sigma)に続いてビオチン化マウス抗-ヒト κ 抗体(I C N 6 3 4 7 7 1)を用いて検出し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersditch, MD)を基質として使用した。吸光度は450 nmで読取った。図8Aに示されるように、全ての結合は、C D R - スワップヒトF a b断片の構築に効果はなかった。

ヒト化F a bの結合を修復するために、C D R - スワップ由来のDNAを鋳型として用いて突然変異体を構築した。コンピューター作成モデル(図9)を用いて、これらの突然変異体は、変化がC D R構造又は抗体-抗原相互作用を変化させる位置にそれらのマウスの複製物のために、ヒトフレームワーク領域残基を変化させて生成した。突然変異体は表2に示す。

10

20

30

40

50

【0108】

表2 ヒト化2C4FR変異形の設定

変異主番号	フレームワーク領域(FR)置換
560	ArgH71Val
561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

10

20

【0109】

様々な突然変異体の結合曲線が、図8A-Cに示される。変化ArgH71Val、AspH73Arg及びIleH69Leuを持つヒト化Fabバージョン574は、元のキメラ2C4Fab断片のものに戻す結合を有するように見える。更なるFR及び／又はCDR残基は、例えば、L2、L54、L55、L56、H35及び／又はH48で、ヒト化抗体の結合を更に精練する又は向上させるために修飾されていてもよい(例えば次の置換-IleL2Thr; ArgL54Leu; TyrL55Glu; ThrL56Ser; AspH35Ser; 及びValH48Ile)。あるいは、又は更に加えて、ヒト化抗体をその親和性及び／又は他の生物学的活性を更に改善又は向上させるために親和性成熟(前記参照)させてもよい。

30

ヒト化2C4バージョン574をファージディスプレイ方法を用いて親和性成熟してもよい。簡単には、ヒト化2C4.574Fabを遺伝子III融合としてファージディスプレイベクター中に複製する。ファージ粒子をM13KO7ヘルパーファージの感染で誘発する場合、この融合がFabをファージテールファイバータンパク質、遺伝子IIIのN-末端に置かれるようにする(Bacaら J Biol Chem. 272:10678(1997))。

個々のライブラリを上で定義した6つのCDRのそれぞれで構築した。これらのライブラリにおいて、ErbB2に結合で潜在的に有意であるような、コンピューター作成モデル(図9)を用いて同定されるCDRのアミノ酸は、「NNS」を含有する糖をそれらのコドンとして用いてランダム化される。次いでライブラリを、全ての阻害溶液に代わって使用される0.2%のTWEEN20(登録商標)含有の3%乾燥ミルクのPBSを用いて、NUNC MAXISORPTTMに覆われるErbB2ECDに対してパニングした。2C4.574のものよりも高い親和性でファージを選択するために、パニングの回3、4、及び5において、可溶性ErbB2ECD又は可溶性Fab2C4.574を競合として洗浄段階の間に加えた。洗浄時間は室温で1時間まで延長した。

40

【0110】

5回のパニングの後、個々のクローンを再びファージELISAで分析した。個々のク

50

ローンをコスター 96 穴 U-型組織培養プレートで生育し、ファージをヘルパーファージの添加により促進した。一晩の生育の後、大腸菌細胞をペレット化し、ファージ含有上澄みを 96 穴プレートに移し、室温で 1 時間ファージを MPBST で阻害した。Er b B 2 E C D でコートされた N U N C M A X I S O R P^{T M} プレートもまた、前記のようにして MPBST で阻害した。阻害されたファージを 2 時間プレート上でインキュベートした。洗浄の後、結合したファージを、3,3',5,5',-テトラメチルベンジジン を基質として用いた後に MPBST で 1 : 5 0 0 0 に希釈したフォースラディッシュ・ペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗-M 1 3 モノクローナル抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01) を用いて検出した。吸光度は 450 nm で読取られた。

最も高いシグナルを持つ、それぞれのライブラリ由来の 48 クローンを DNA 配列決定した。最も頻繁に生じる配列を持つこれらのクローンは、前記したような可溶性 Fab の発現をするベクターにサブクローン化される。これらの Fab を促進し、精製されたタンパク質及び精製された Fab を前記したようにして E L I S A により結合を分析し、結合をスターティングヒト化 2 C 4 . 5 7 4 バージョンのものと比較する。

個々の C D R の所望の突然変異の後、それらの様々な組み合わせである更なる突然変異を構築し、前記のようにして試験した。574 に対して改善した結合を与える突然変異体は、表 3 に記載した。

【0111】

表 3 2 C 4 . 5 7 4 の親和性成熟からの変異形の設定

変異形名称	574 からの変異	変異形/574*
H3.A1	serH99trp, metH34leu	0.380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu	0.087
H1.3.B3	thrH28gln, thrH30ser, metH34leu	0.572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu	0.569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu	0.561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, metH34leu	0.552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, metH34leu	0.215
654	serL50trp, metH34leu	0.176
655	metH34ser	0.542
659	serL50trp, metH34ser	0.076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, serH99trp	0.175
L3.G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu, serH99trp	0.218
H1.3.B3.H3.A1	thrH28gln, thrH30ser, metH34leu, serH99trp	0.306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu, serH99trp	0.248
654.H3.A1	serL50trp, metH34leu, serH99trp	0.133
654.L3.G6	serL50trp, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0.213
654.L3.29	serL50trp, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0.236
654.L3.36	serL50trp, metH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0.141

*Er b 2 - E C D E L I S A において、標準曲線の間 OD を与えるのに必要な突然変異量の、標準曲線の間 OD を与えるのに必要な 574 の量に対する割合。1.0 よりも低い数字は、Er b B 2 に 574 よりもよく結合することを示す。

【0112】

次の突然変異体もまた構築し、評価している：

659.L3.G6	serL50trp, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys	
659.L3.G11	serL50trp, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly	
659.L3.29	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn	
659.L3.36	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	
L2F5.L3G6	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	
L2F5.L3G11	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly	10
L2F5.L29	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	
L2F5.L36	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	
L2F5.L3G6.655	serL50trp, tyrL53gly, methH35ser, tyrL92pro, ileL93lys	
L2F5.L3G11.655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly	
L2F5.L29.655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn	
L2F5.L36.655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	20

【 0 1 1 3 】

相同性スキャンにより次の突然変異体が構築されている：

678	thrH30ala	
679	thrH30ser	
680	lysH64arg	
681	leuH96val	
682	thrL97ala	30
683	thrL97ser	
684	tyrL96phe	
685	tyrL96ala	
686	tyrL91phe	
687	thrL56ala	
688	glnL28ala	40
689	glnL28glu	

【 0 1 1 4 】

H 3 4での好ましいアミノ酸配列はメチオニンである。この位置で酸化が見つかった場合にはロイシンに変化する。

A s n H 5 2 及び a s n H 5 3 は、結合に非常に好ましいことが分かった。これらの残基のアラニン又はアスパラギン酸への変化は結合を劇的に減少させる。

ヒト I g G 重鎖定常領域を有するヒト化バージョン 5 7 4 の可変軽鎖及び可変重鎖ドメインを含む完全な抗体が作成されている(米国特許第5,821,337号参照)。完全な抗体は、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞で作成された。該分子はここで r h u M A b 2

C 4 と称される。

【0115】

実施例 4

モノクローナル抗体 2 C 4 による M A P K の E G F、T G F- α 又は H R G 媒介活性化の阻害

多くの成長因子レセプターが、分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ(M A P K)経路を通して伝達される。これらの二重特異性キナーゼは、最終的に癌細胞を分裂するように誘発するシグナル伝達経路の鍵となる指標の一つである。M A P K の E G F、T G F- α 又は H R G 活性化を抑制する、モノクローナル抗体 2 C 4 又は H E R C E P T I N (商品名)の能力を次の方法で調べた。

M C F 7 細胞(10^5 細胞/穴)を 12 穴細胞培養プレートの血清含有培地に入れた。次の日、細胞培地を取り出し、0.1%の血清を含有する新しい細胞培地をそれぞれの穴に加えた。次いでこの方法をこの後の日も繰り返し、培地をアッセイする前に無血清結合緩衝液に再び入れた(Jonesら J. Biol.Chem.273:11667-74(1998); 及び Schaeferら J. Biol. Chem. 274:859-66(1999))。細胞を室温に平衡化させ、次いで 0.5 mL の 200 nM のハーセプチン(商品名)又はモノクローナル抗体 2 C 4 と 30 分間インキュベートした。次いで、細胞を 15 分間、1 nM E G F、1 nM T G F- α 、又は 0.2 nM H R G で処理した。細胞培地を吸引して反応を止め、次いで 1% D T T を含有する 0.2 mL の S D S - P A G E サンプル緩衝液を加えた。M A P K 活性化を前記したようにして(Jonesら J. Biol. Chem. 273:11667-74(1998))抗-活性 M A P K 抗体(Promega)を用いたウェスタンブロット法により調べた。

【0116】

図 10 に示されるように、モノクローナル抗体は、ハーセプチン(商品名)よりも大きな程度で M A P K の E G F、T G F- α 及び H R G 媒介活性化を有意に阻害した。これらのデータは、モノクローナル抗体 2 C 4 が E R F G 又は E r b B 3 のどちらかとの結合に使用される E r b B 2 の表面に結合し、従ってシグナル伝達レセプター複合体の生成を妨げることが示唆した。

モノクローナル抗体 2 C 4 もまた、ヘレグリン(H R G)依存性 A k t 活性化を阻害することが示された。P I 3 キナーゼシグナル伝達経路の活性化は細胞生存にとって重要である(Carrawayら J. Biol. Chem. 270:7111-6(1995))。腫瘍細胞において、P I 3 キナーゼ活性化は浸潤性表現型の役割を担う(Tanら Cancer Research. 59:1620-1625,(1999))。生存経路はセリン/チロシンキナーゼ A K T に主に媒介される(Bosら Trends Biochem Sci. 20: 441-442(1995))。E r b B 2 と E r b B 3 又は E G F R のどちらかの間で形成される複合体は、それぞれヘレグリン又は E G F に関するこれらの経路を開始させることができる(Olayioyeら Mol. & Cell. Biol. 18:5042-51(1998); Karunagaranら, EMBO Journal. 15:254-264(1996); 及び Krymskayaら Am. J. Physiol. 276: L246-55(1999))。2 C 4 を有する M C F 7 乳癌細胞のインキュベーションはヘレグリン媒介 A K T 活性化を抑制する。更に、ヘレグリン添加の無い場合に存在する A K T 活性化の基本的なレベルは、2 C 4 の添加により更に減少する。これらのデータは、2 C 4 が P I 3 キナーゼの E r b B リガンド活性化を阻害し、これがアポトーシスを招きうることを示唆する。増加したアポトーシスに対する感受性は化学療法の毒性影響に対する腫瘍細胞のより高い感受性において顕著である。

したがって、モノクローナル抗体 2 C 4 は 2 つの主なシグナル伝達経路 M A P キナーゼ(主な増殖経路)及び P I 3 キナーゼ(主な生存/抗アポトーシス経路)を通して E r b B シグナル伝達を開始するリガンドを阻害する。

【0117】

実施例 5

癌関連疼痛の治療のための r h u M A b 2 C 4

脂肪肉腫と診断されて 2 年間化学療法を受けている 43 歳男性患者が左足の深い創傷のために入院し、パックする前にオピエイト鎮痛の必要があった。腫瘍病変のサイズは 6.

10

20

30

40

50

6 cmであった。モノクローナル抗体 2 C 4 (10 mg/kg) で2サイクル治療した後、更に鎮痛薬を投与することなく患者の創傷をバックすることができた。腫瘍そのものは 2 C 4 抗体治療に応じなかったが、2 C 4 は痛覚消失活性を表した。

【0118】

実施例 6

アンドロゲン依存性前立腺癌に関連する疼痛の治療のための r h u M A b 2 C 4

タキサンベースの化学療法後に進行した骨転移を有するホルモン耐性（アンドロゲン非依存性）前立腺癌と診断された患者を r h u M A b 2 C 4 で治療した。r h u M A b 2 C 4 の投与を開始する前にすべての患者は現疼痛強度スコア (Present Pain Intensity Score) の6段階のうち1又はそれ以上を示した。

0 = 疼痛なし

1 = 軽度の疼痛

2 = 不快にさせるような疼痛

3 = 苦しむような疼痛

4 = ひどい疼痛

5 = 耐えがたい疼痛

患者の鎮痛効果は毎日日記を付けることで測定した。非ステロイド性鎮痛薬の1用量ではスコア1であり、モルヒネの10 mgの1用量又は他のオピエイト鎮痛薬の等用量ではスコア2であった。

r h u M A b 2 C 4 は840 mg 充填ボーラス用量で初めて、その後3週間毎に420 mg 静脈内用量を投与した。

【0119】

ある患者は痛覚消失の必要性が最も緩やかに減少し、疼痛スコアが3から1となった。この効果は24週間続いた。この患者はP S Aの上昇率の減少を示したが、絶対値は低下しなかった。

ある患者は安定して疼痛スコア2を示したが、痛覚消失は全く停止した。P S Aの進行にもかかわらずこの効果は24週目にも継続した。

ある患者は初期には痛覚消失の必要性が50%以上低下する（スコア2から1への低下）という疼痛の改善を示した。この治療は患者のP S Aに対して効果がなかった。疼痛に値する効果は6週間持続し、疾患は進行し、疼痛は増加した。

このデータは、前立腺癌が寛解になく、進行し続けている場合でさえも、r h u M A b 2 C 4 が患者の疼痛を低減させ安定させることができたことを示す。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図1A】トランケーション突然変異分析及び部位特異的突然変異誘発(Nakamuraら J. of Virology 67(10):6179-6191(1993); 及びRenzら J. Cell Biol. 125(6):1395-1406(1994))により決定されたE r b B 2の細胞外ドメイン(E C D)(シグナル配列を含み、図1Aに示される、アミノ酸配列)内の残基22-645のエピトープマッピングを示した。種々のE r b B 2-E C D切断又は点変異を、ポリメラーゼ連鎖反応法を使用してc D N Aから調製した。E r b B 2変異体は、哺乳類発現プラスミドにおけるg D融合タンパク質として発現された。この発現プラスミドとして、挿入c D N Aの下流に位置するポリアデニル化シグナルとS V 40末端を有するサイトメガロウイルスのプロモーター／エンハンサーが使用される。プラスミドD N Aを293 S細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション1日後、細胞を、³⁵Sメチオニン及び³⁵Sシステインを各々25 µCiと、透析されたウシ胎児血清を1%含むメチオニン及びシステインフリーの低グルコースD M E M中で、一晩かけて代謝標識した。上清を回収し、E r b B 2 M A b又は対照抗体のいずれかを上清に添加し、4℃で2-4時間インキュベートした。複合体を沈殿させ、10-20%のトリシンS D S勾配ゲルに塗布し、100 Vで電気泳動にかけた。ゲルは膜上にエレクトロブロットされ、これをオートラジオグラフィーで分析した。

【図1B】トランケーション突然変異分析及び部位特異的突然変異誘発(Nakamuraら J. o

f Virology 67(10):6179-6191(1993); 及びRenzら J. Cell Biol. 125(6):1395-1406(1994))により決定されたE r b B 2の細胞外ドメイン(E C D)(シグナル配列を含み、図1 Aに示される、アミノ酸配列)内の残基22-645のエピトープマッピングを示した。種々のE r b B 2-E C D切断又は点変異を、ポリメラーゼ連鎖反応法を使用してc D N Aから調製した。E r b B 2変異体は、哺乳類発現プラスミドにおけるg D融合タンパク質として発現された。この発現プラスミドとして、挿入c D N Aの下流に位置するポリアデニル化シグナルとS V 40末端を有するサイトメガロウイルスのプロモーター／エンハンサーが使用される。プラスミドD N Aを293 S細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション1日後、細胞を、 ^{35} Sメチオニン及び ^{35} Sシステインを各々25 μ C iと、透析されたウシ胎児血清を1%含むメチオニン及びシステインフリーの低グルコースD M E M中で、一晩かけて代謝標識した。上清を回収し、E r b B 2 M A b又は対照抗体のいずれかを上清に添加し、4℃で2-4時間インキュベートした。複合体を沈殿させ、10-20%のトリシンS D S勾配ゲルに塗布し、100 Vで電気泳動にかけた。ゲルは膜上にエレクトロブロットされ、これをオートラジオグラフィーで分析した。図1 Bに示されるように抗-E r b B 2抗体7 C 2、7 F 3、2 C 4、7 D 3、3 E 8、4 D 5、2 H 1 1及び3 H 4は様々なE r b B 2 E C Dエピトープに結合する。

【図2 A】M C F 7細胞のr H R G β 1活性化での抗-E r b B 2モノクローナル抗体2 C 4及び7 F 3を示す。図2 Aはチロシンリン酸化のH R G刺激の2 C 4又は7 F 3抑制の反応曲線を示す。

【図2 B】M C F 7細胞のr H R G β 1活性化での抗-E r b B 2モノクローナル抗体2 C 4及び7 F 3を示す。図2 Bは2 C 4又は7 F 3によりM C F 7細胞に結合される ^{125} I-標識r H R G β 177-244の抑制の反応曲線を示す。

【図3】抗-E r b B 2モノクローナル抗体2 C 4及び7 F 3によりヒト癌細胞株のパネルに結合した特異的 ^{125} I-標識r H R G β 177-244の抑制を示す。モノクローナル抗体コントロールは、r H R G結合を阻害しないアイソタイプ適合マウスモノクローナル抗体である。非特異的 ^{125} I-標識r H R G β 177-244結合は、100 nMのr H R G β 1の存在下で実施された並行したインキュベーションから決定された。非特異的 ^{125} I-標識r H R G β 177-244結合の値は、試験された全ての細胞株全体の1%よりも小さかった。

【図4 A】M D A-M B-1 7 5細胞の増殖でのモノクローナル抗体2 C 4及び4 D 5の効果を示す。実験は1%の血清を含む培地で実施された。抗-E r b B 2抗体又は培地のみを加え、細胞を37℃で2時間インキュベートした。置換r H R G β 1(1 nM)又は培地のみを加え、細胞を4日間インキュベートした。単層を洗浄し、0.5%クリスタルバイオレットで染色／固定した。細胞増殖を決定するために吸高度を540 nMで測定した。

【図4 B】S K-B R-3細胞の増殖でのモノクローナル抗体2 C 4及び4 D 5の効果を示す。実験は1%の血清を含む培地で実施された。抗-E r b B 2抗体又は培地のみを加え、細胞を37℃で2時間インキュベートした。置換r H R G β 1(1 nM)又は培地のみを加え、細胞を4日間インキュベートした。単層を洗浄し、0.5%クリスタルバイオレットで染色／固定した。細胞増殖を決定するために吸高度を540 nMで測定した。

【図5 A】低／標準レベルにE r b B 2を発現するM C F 7細胞のE r b B 2のE r b B 3とのヘレグリン(H R G)依存性関連のモノクローナル抗体2 C 4、ハーセプチン(商品名)抗体又は抗E G F R抗体の効果を示す；前記実施例2を参照。

【図5 B】高レベルにE r b B 2を発現するS K-B R-3細胞のE r b B 2のE r b B 3とのヘレグリン(H R G)依存性関連のモノクローナル抗体2 C 4、ハーセプチン(商品名)抗体又は抗E G F R抗体の効果を示す；前記実施例2を参照。

【図6 A】完全なマウスモノクローナル抗体2 C 4(μ 2 C 4)及びキメラ2 C 4 F a b断片の活性を比較する。図6 Aは、キメラ2 C 4 F a b又は完全なマウスモノクローナル抗体2 C 4によるM A C F 7細胞に結合する ^{125} I-H R Gの抑制を示す。M C F 7細胞を24穴プレート(1 x 10⁵細胞／穴)に蒔き、約85%集密性まで2日間、生育した。結合実験は、Lewsら Cancer Research 56:1457-1465(1996)に記載されるようにして実施された。

10

20

30

40

50

【図 6 B】完全なマウスモノクローナル抗体 2 C 4 (μ 2 C 4) 及びキメラ 2 C 4 F a b 断片の活性を比較する。図 6 B は、Lewsら Cancer Research 56:1457-1465(1996)に記載されるようにして実施された M C F 7 細胞の p 1 8 0 チロシンリン酸化の r H R G β 1 活性化の抑制を示す。

【図 7 A】マウスモノクローナル抗体 2 C 4 可変軽鎖 (V_L) (配列番号. 1) ; ヒト化 2 C 4 バージョン 5 7 4 の V_L ドメイン (それぞれ配列番号. 3) 、及びヒト V_L コンセンサスフレームワーク (h u m κ 1 、軽 κ サブグループ I) (配列番号. 5) のアミノ酸配列の配置を示す。相補正決定領域 (C D R) はブラケットにある。

【図 7 B】マウスモノクローナル抗体 2 C 4 可変重鎖 (V_H) ドメイン (配列番号. 2) ; ヒト化 2 C 4 バージョン 5 7 4 の V_H ドメイン (配列番号. 4) 、及びヒト V_H コンセンサスフレームワーク (h u m I I I 、重鎖サブグループ I I I) (配列番号. 6) のアミノ酸配列の配置を示す。相補正決定領域 (C D R) はブラケットにある。

【図 8 A】実施例 3 の E L I S A により決定されるキメラ F a b 2 C 4 (F a b . v 1) 及び E r b B 2 細胞外ドメインに対するいくつかのヒト化 2 C 4 変異体の結合を示す。

【図 8 B】実施例 3 の E L I S A により決定されるキメラ F a b 2 C 4 (F a b . v 1) 及び E r b B 2 細胞外ドメインに対するいくつかのヒト化 2 C 4 変異体の結合を示す。

【図 8 C】実施例 3 の E L I S A により決定されるキメラ F a b 2 C 4 (F a b . v 1) 及び E r b B 2 細胞外ドメインに対するいくつかのヒト化 2 C 4 変異体の結合を示す。

【図 9】標識された白の C D R 主鎖 (L 1 、 L 2 、 L 3 、 H 1 、 H 2 、 H 3) を有するモノクローナル抗体 2 C 4 の V_L 及び V_H ドメインのリボン・ダイアグラムである。ヒト化する間に突然変異誘発により評価された V_H 側鎖 (実施例 3 、表 2 参照) も、示された。

【図 1 0】モノクローナル抗体 2 C 4 又は E G F 、 T G F - α 上のハーセプチン (商品名) 、又は分裂促進活性化プロテインキナーゼ (M A P K) の H R G - 媒介活性化の効果を示す。

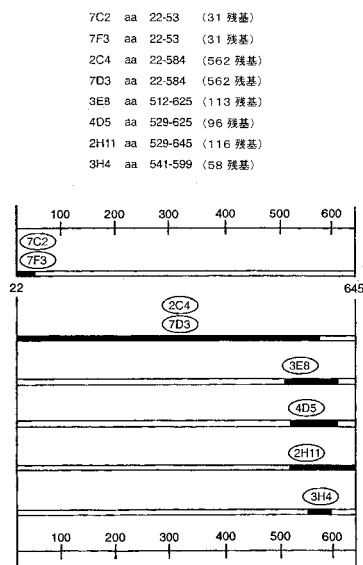
【図 1 A】

```

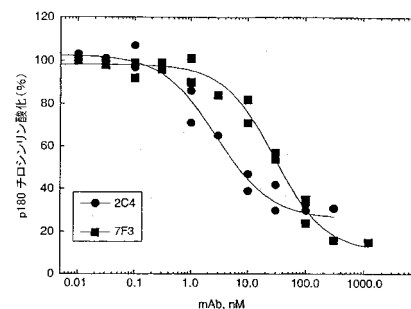
1  MELAALCHNG LLLALLPFGA ASTQVCTQYD MKLRAPASE THDMHMLV QCCQVQGNL ELTYLPTNS LSEIQDQEV QGVVLIANQ VROVPLQLRL
101 IVRGTLQFED NYALAVLNG DPLMTPTPT GASFGGLREL QLRSLTEILK GOVLQRNPQ LCYQOTIMK DIFKHONQLA LGLIDTNRSR ACHPCSPHCK
201 GSRMGESSE DQPSUTWVC AGGCARCXGP LPTCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELNCPA UVTYDTOTFE SHNPFEGRYT FGASCVIACF
301 VNYLSTVGS CTIACPLINQ DUTAEODTOR CEKSKFKAR VYVGLGHEHS REYRANVSAN IQEFAACKKI PGLSLFLES FGDSPASNTA FLQPEQLQVF
401 ETLREITGVY LISAMPDPLP DLSEVQNLQW IGRILWNGA YSLTLQGLGI SWGLRLSIRE LSGGLALLHH NTHLCFVHTV PHDQLFRNPH QALLNFANRP
501 EDECVGEOLA CHQLCARGHC MGFQPTQCVN CSQPLRQEC VEECRVLQGL PREYVNAHHC LPHCEPCQRP NSVYTCQFE ADQVACANY KDPFCVYARC
601 PSQVRFPLST HFENKPFDEE GACQPCPCIN THSCVLDLCK GCPAE ( 配列番号: 13 )

```

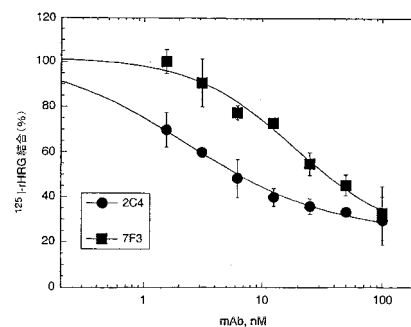
【図 1 B】



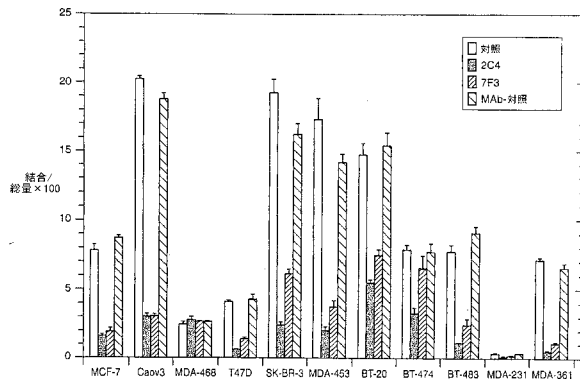
【図 2 A】



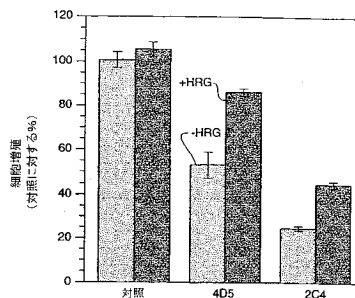
【図 2 B】



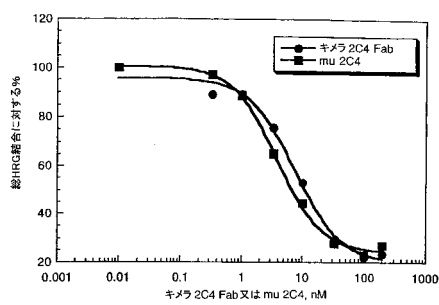
【図 3】



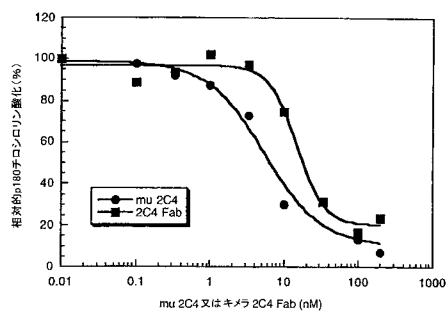
【図 4 A】



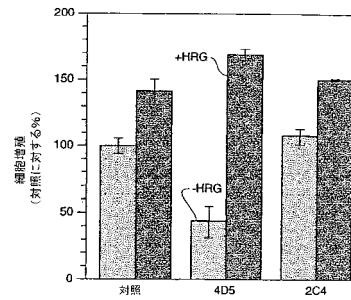
【図 6 A】



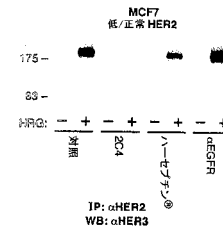
【図 6 B】



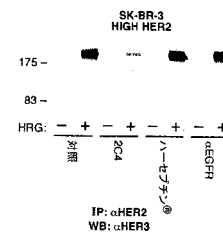
【図 4 B】



【図 5 A】



【図 5 B】



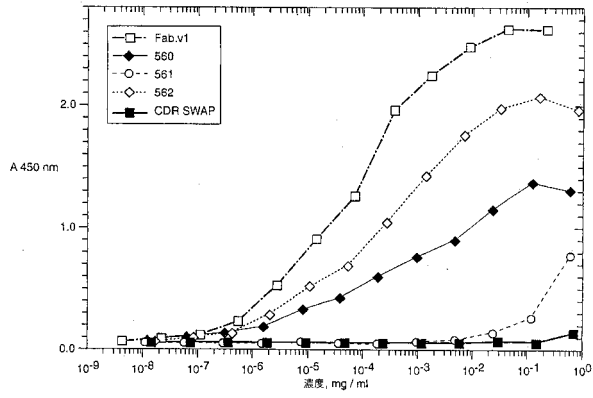
【図 7 A】

可変領域	10	20	30	40
2C4	DIYMTQSHKIMSTSVGDRVSTIC	(KASQDVSIGVA)	WYQQR	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(KASQDVSIGVA)	WYQQR	
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(RASQTSINYL)	WYQQR	
2C4	QSPKLLIY (SASYRYT)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLVQR		
574	GKAPKLLIY (SASYRYT)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLVQR		
hum KI	GKAPKLLIY (AASSLES)	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLVQR		
2C4	EDIAVYVC (QQYIYIPYT)	FGQGTKLEIK (SEQ ID NO:1)		
574	EDFATYYC (QQYIYIPYT)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)		
hum KI	EDFATYYC (QQYNSLEWT)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)		

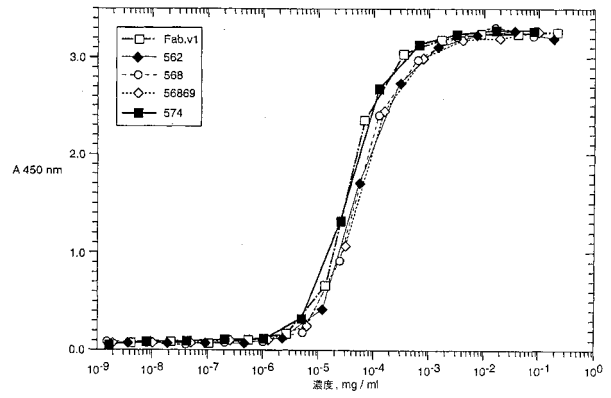
【図 7 B】

可変領域	10	20	30	40
2C4	EVQLQSGPELVKPGTSTKISKAS	(GFTFTDYM)	WYQQR	
574	EVQLQSGPELVKPGTSTKISKAS	(GFTFTDYM)	WYQQR	
hum III	EVQLQSGPELVKPGTSTKISKAS	(GFTFTDYM)	WYQQR	
2C4	HGKLEWIG (DVNPNSSGSIYNQRFKG)	KASLTVDNRSSRIYVM		
574	FGKLEWVA (DVNPNSSGSIYNQRFKG)	REFLSVDRSKNTLYL		
hum III	FGKLEWVA (VISGDGSIYADSVKG)	REFLSVDRSKNTLYL		
2C4	ELRSLEFEDTAVYYCAR (NLGPFYFDY)	WGQGLTVYSS (SEQ ID NO:2)		
574	QNSLRAEDTAVYYCAR (NLGPFYFDY)	WGQGLTVYSS (SEQ ID NO:4)		
hum III	QNSLRAEDTAVYYCAR (GRVGSYLDY)	WGQGLTVYSS (SEQ ID NO:6)		

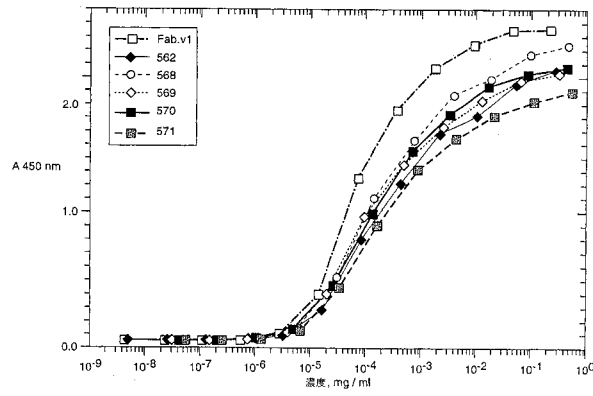
【図 8 A】



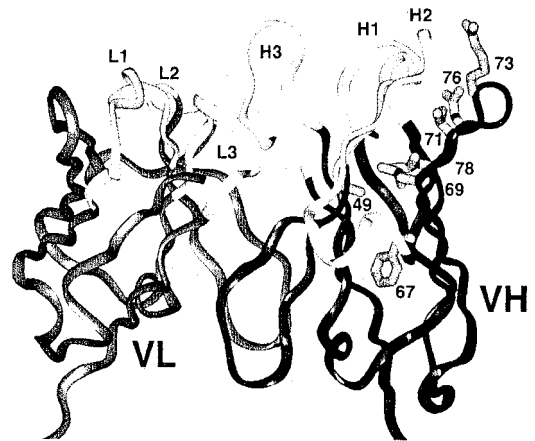
【図 8 C】



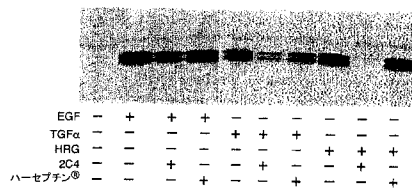
【図 8 B】



【図 9】



【図 10】



【配列表】

0004969440000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 特表2003-503361 (JP, A)

米国特許出願公開第2002/0002276 (US, A1)

特表2006-516117 (JP, A)

TAKAHASHI MASATO, BREAST CANCER, 日本, 2003年 4月, V10 N2, P170-174

RATHORE RITESH, BLOOD, 2002年11月16日, V100 N11, P.ABSTRACT NO.3684

JAMES N D, BRITISH JOURNAL OF CANCER, 英国, 2001年 7月20日, V85 N2, P152-156

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/395

A61K 45/00

A61P 25/04

A61P 35/00

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)