

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-509593

(P2014-509593A)

(43) 公表日 平成26年4月21日(2014.4.21)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 45/06</b> (2006.01)	A 61 K 45/06	4 B 02 4
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 08 4
<b>A61K 39/395</b> (2006.01)	A 61 K 39/395	E 4 C 08 5
<b>A61K 31/5377</b> (2006.01)	A 61 K 39/395	T 4 C 08 6
<b>A61K 31/517</b> (2006.01)	A 61 K 31/5377	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 62 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-558187 (P2013-558187)	(71) 出願人	508044829 メリマック ファーマシューティカルズ インコーポレーティッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ワン ケンドル スクエア スイート ピー-7201
(86) (22) 出願日	平成24年3月15日 (2012.3.15)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成25年10月28日 (2013.10.28)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/029292	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02012/125864	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成24年9月20日 (2012.9.20)		
(31) 優先権主張番号	61/452,976		
(32) 優先日	平成23年3月15日 (2011.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/452,974		
(32) 優先日	平成23年3月15日 (2011.3.15)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E r b B 経路阻害剤に対する耐性の克服

## (57) 【要約】

E G F R 阻害剤またはH E R 2 阻害剤などのE r b B 経路阻害剤に対する耐性を克服するための方法を提供する。耐性は、ゲフィチニブに対する獲得耐性などの、E G F R 阻害剤に対する獲得耐性であり得る。提供する方法において、E r b B 経路阻害剤に対する耐性を示す対象を選択し、E r b B 3 阻害剤と、E G F R 阻害剤またはH E R 2 阻害剤などの第2のE r b B 経路阻害剤との両方を対象に投与する。T 7 9 0 M E G F R 変異を含む腫瘍をE r b B 3 阻害剤およびE G F R 阻害剤と接触させることによって、腫瘍の成長を阻害する方法も提供する。E r b B 3 阻害剤と、E G F R 阻害剤またはH E R 2 阻害剤などの第2のE r b B 経路阻害剤との両方を含むE r b B 経路阻害剤に対する耐性を克服するための組成物も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ErbB経路阻害剤に対する対象の腫瘍の耐性を克服するための方法であって、ErbB経路阻害剤に対する耐性を示す腫瘍を有する対象を選択する工程と、前記対象に(i)ErbB3阻害剤および(ii)ErbB経路阻害剤を投与する工程とを含む方法。

## 【請求項 2】

前記ErbB経路阻害剤に対する耐性が獲得耐性である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記獲得耐性が、EGFR阻害剤に対する獲得耐性である、請求項2に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

前記獲得耐性が、腫瘍細胞におけるT790M EGFR変異と関連する、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記獲得耐性が、腫瘍細胞におけるKRAS変異と関連する、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記KRAS変異が、G12S、G12C、またはG12VのKRAS変異である、請求項5に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記KRAS変異が、Q61R KRAS変異である、請求項5に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

前記獲得耐性が、ゲフィチニブ、トラスツズマブ、またはラパチニブに対する耐性である、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記獲得耐性が、HER2阻害剤に対する獲得耐性である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記耐性が、前記対象の腫瘍細胞におけるPI3K/AKTシグナル伝達の再活性化と関連する、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記対象に投与されるErbB3阻害剤が抗ErbB3抗体である、請求項1に記載の方法。

30

## 【請求項 12】

前記対象に投与されるErbB3阻害剤が、二重特異性抗ErbB3、抗ErbB2抗体である、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記抗ErbB3抗体が、配列番号1および配列番号2にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記抗ErbB3抗体が、配列番号3～5にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>CDR1配列、V<sub>H</sub>CDR2配列およびV<sub>H</sub>CDR3配列、ならびに配列番号6～8にそれぞれ示されるV<sub>L</sub>CDR1配列、V<sub>L</sub>CDR2配列およびV<sub>L</sub>CDR3配列を含む抗体を含む、請求項12に記載の方法。

40

## 【請求項 15】

前記抗ErbB3抗体が、配列番号9および配列番号10にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記抗ErbB3抗体が、配列番号17および配列番号18にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記抗ErbB3抗体が、配列番号25および配列番号26にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配

50

列および  $V_L$  配列を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗  $E_{r b B} 3$  抗体が、配列番号 3 3 および配列番号 3 4 にそれぞれ示される  $V_H$  配列および  $V_L$  配列を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記抗  $E_{r b B} 3$  抗体が、AV - 203、mAb 1B4C3、mAb 2D1D12、AMG - 888、mAb 205.10.1、mAb 205.10.2、mAb 205.10.3、およびヒト化 mAb 8B8 からなる群から選択される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記  $E_{r b B} 3$  阻害剤が PI3K / AKT シグナル伝達を阻害する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記  $E_{r b B}$  経路阻害剤が EGFR 阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 EGFR 阻害剤が抗 EGFR 抗体である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記抗 EGFR 抗体がセツキシマブを含む、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗 EGFR 抗体が、MM - 151、Sym004、マツズマブ、パニツムマブ、ニモツズマブおよび mAb 806 からなる群から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記対象に投与される EGFR 阻害剤が、EGFR シグナル伝達の小分子阻害剤である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 EGFR シグナル伝達の小分子阻害剤がゲフィチニブである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 EGFR シグナル伝達の小分子阻害剤が、ラバチニブ、カネルチニブ、C I - 1033 (PD - 183805)、エルロチニブ、PKI - 166、PD - 158780、ペリチニブ、EK B - 569、およびチルホスチン AG - 1478 からなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記対象に投与される  $E_{r b B}$  経路阻害剤が HER2 阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 HER2 阻害剤が抗 HER2 抗体である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記抗 HER2 抗体がトラスツズマブまたはペルツズマブである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記腫瘍が肺癌である、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記肺癌が非小細胞肺癌 (NSCLC) である、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記 NSCLC が腺癌である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 NSCLC が扁平上皮癌である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 NSCLC が大細胞癌である、請求項 3 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 3 6】

前記対象が、結腸直腸癌、頭頸部癌、膵癌および乳癌からなる群から選択される癌を有する、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

T 7 9 0 M E G F R 変異、G 1 2 S、G 1 2 C、もしくはG 1 2 V のK R A S 変異、およびQ 6 1 R K R A S 変異のうちの1つまたは複数を含む腫瘍の成長、浸潤または転移を阻害する方法であって、

前記腫瘍を(i) E G F R 阻害剤および(ii) E r b B 3 阻害剤と接触させる工程を含む方法。

## 【請求項 3 8】

前記E r b B 3 阻害剤が抗E r b B 3 抗体を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 3 9】

前記E r b B 3 阻害剤が二重特異性抗E r b B 3、抗E r b B 2 抗体を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

前記抗E r b B 3 抗体が、配列番号1および配列番号2にそれぞれ記載されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む、請求項 3 8 に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

前記二重特異性抗E r b B 3、抗E r b B 2 抗体が、配列番号4 4 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

前記抗E r b B 3 抗体が、m A b 1 B 4 C 3、m A b 2 D 1 D 1 2、A M G - 8 8 8、A v - 2 0 3、m A b 2 0 5 . 1 0 . 1、m A b 2 0 5 . 1 0 . 2、m A b 2 0 5 . 1 0 . 3、およびヒト化m A b 8 B 8 からなる群から選択される、請求項 3 8 に記載の方法。

## 【請求項 4 3】

前記二重特異性抗E r b B 3、抗E r b B 2 抗体が、A L M、A 5 - H S A - M L 3 . 9、A 5 - H S A - B 1 D 2、B 1 2 - H S A - B 1 D 2、A 5 - H S A - F 5 B 6 H 2、H 3 - H S A - F 5 B 6 H 2、およびF 4 - H S A - F 5 B 6 H 2 を含む群から選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記E r b B 3 阻害剤が、前記腫瘍のP I 3 K / A K T シグナル伝達を阻害する、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

前記腫瘍を、抗E G F R 抗体を含むE G F R 阻害剤と接触させる、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 6】

前記抗E G F R 抗体がセツキシマブを含む、請求項 4 5 に記載の方法。

## 【請求項 4 7】

前記抗E G F R 抗体が、M M - 1 5 1、S y m 0 0 4、マツズマブ、パニツムマブ、ニモツズマブおよびm A b 8 0 6 からなる群から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

## 【請求項 4 8】

前記腫瘍を、E G F R シグナル伝達の小分子阻害剤を含むE G F R 阻害剤と接触させる、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 9】

前記E G F R シグナル伝達の小分子阻害剤がゲフィチニブである、請求項 4 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 0】

前記E G F R シグナル伝達の小分子阻害剤が、アファチニブ、ラバチニブ、カネルチニブ、エルロチニブH C L、ペリチニブ、P K I - 1 6 6、P D 1 5 8 7 8 0、およびチル

10

20

30

40

50

ホスチン A G 1478 からなる群から選択される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記腫瘍が肺癌腫瘍である、請求項 37 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 52】

前記肺癌が非小細胞肺癌 (NSCLC) である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

前記 NSCLC が腺癌である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 54】

前記 NSCLC が扁平上皮癌である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 55】

前記 NSCLC が大細胞癌である、請求項 51 に記載の方法。

10

【請求項 56】

前記腫瘍が、結腸直腸癌、頭頸部癌、乳癌、および肺癌からなる群から選択される癌である、請求項 37 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

対象の腫瘍を治療する方法であって、

T790M EGFR 変異、G12S、G12C、もしくは G12V の Kras 変異、および Q61R Kras 変異のうちの 1 つまたは複数を含む腫瘍を有する対象を選択する工程と、

前記対象に (i) EGFR 阻害剤および (ii) Erbb3 阻害剤を投与する工程とを含む方法。

20

【請求項 58】

前記対象に投与される Erbb3 阻害剤が、抗 Erbb3 抗体である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

前記抗 Erbb3 抗体が、配列番号 1 および配列番号 2 にそれぞれ記載される VH 配列および VL 配列を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

前記抗 Erbb3 抗体が、配列番号 3 ~ 5 にそれぞれ示される VH CDR1 配列、VH CDR2 配列および VL CDR1 配列、ならびに配列番号 6 ~ 8 にそれぞれ示される VL CDR1 配列、VL CDR2 配列および VL CDR3 配列を含む抗体を含む、請求項 58 に記載の方法。

30

【請求項 61】

前記抗 Erbb3 抗体が、配列番号 9 および配列番号 10 にそれぞれ示される VH 配列および VL 配列を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 62】

前記抗 Erbb3 抗体が、配列番号 17 および配列番号 18 にそれぞれ示される VH 配列および VL 配列を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 63】

前記抗 Erbb3 抗体が、配列番号 25 および配列番号 26 にそれぞれ示される VH 配列および VL 配列を含む、請求項 58 に記載の方法。

40

【請求項 64】

前記抗 Erbb3 抗体が、配列番号 33 および配列番号 34 にそれぞれ示される VH 配列および VL 配列を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 65】

前記抗 Erbb3 抗体が、mAb 1B4C3、mAb 2D1D12、AMG-888、AV-203、mAb 205.10.1、mAb 205.10.2、mAb 205.10.3、およびヒト化 mAb 8B8 からなる群から選択される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 66】

50

前記 E r b B 3 阻害剤が、前記腫瘍の細胞における P I 3 K / A K T シグナル伝達を阻害する、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記対象に投与される E G F R 阻害剤が抗 E G F R 抗体である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記抗 E G F R 抗体が、M M - 1 5 1 、S y m 0 0 4 、マツズマブ、パニツムマブ、ニモツズマブおよびm A b 8 0 6 からなる群から選択される、請求項 6 7 に記載の方法。

10

【請求項 7 0】

前記対象に投与される E G F R 阻害剤が E G F R シグナル伝達の小分子阻害剤である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記 E G F R シグナル伝達の小分子阻害剤がゲフィチニブである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記 E G F R シグナル伝達の小分子阻害剤が、アファチニブ、ラバチニブ、カネルチニブ、エルロチニブH C L 、ペリチニブ、P K I - 1 6 6 、P D 1 5 8 7 8 0 、およびA G 1 4 7 8 からなる群から選択される、請求項 7 0 に記載の方法。

20

【請求項 7 3】

前記腫瘍が肺癌である、請求項 5 7 ~ 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記肺癌が非小細胞肺癌 ( N S C L C ) である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記 N S C L C が腺癌である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記 N S C L C が扁平上皮癌である、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記 N S C L C が大細胞癌である、請求項 7 4 に記載の方法。

30

【請求項 7 8】

前記対象が、結腸直腸癌、頭頸部癌、乳癌、および肺癌からなる群から選択される癌を有する、請求項 5 7 ~ 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

E r b B 経路阻害剤に対する腫瘍の耐性を克服するための医薬組成物であって、E r b B 3 阻害剤、E r b B 経路阻害剤および少なくとも 1 種類の医薬担体を含む医薬組成物。

【請求項 8 0】

E r b B 3 阻害剤およびE r b B 経路阻害剤が、単一組成物中に少なくとも 1 種類の医薬担体と共に製剤化される、請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 1】

前記 E r b B 3 阻害剤が、医薬担体と共に製剤化されて第 1 の組成物を形成し、前記 E r b B 経路阻害剤が、医薬担体と共に製剤化されて第 2 の組成物を形成し、かつ第 1 の組成物および第 2 の組成物が、任意で一緒に包装される、請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 8 2】

前記 E r b B 3 阻害剤が抗 E r b B 3 抗体である、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 3】

前記 E r b B 3 阻害剤が抗 E r b B 3 抗体である、請求項 8 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 4】

前記抗 E r b B 3 抗体が、配列番号 1 および配列番号 2 にそれぞれ記載される V H 配列

50

および  $V_L$  配列を含む、請求項 8 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 5】

前記  $ErbB3$  阻害剤が、二重特異性抗  $ErbB3$ 、抗  $ErbB2$  抗体である、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 6】

前記二重特異性抗  $ErbB3$ 、抗  $ErbB2$  抗体が、配列番号 4 4 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 8 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 7】

前記二重特異性抗  $ErbB3$ 、抗  $ErbB2$  抗体が、HER2 媒介シグナル伝達に重大な作用を示さない、請求項 8 5 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 8 8】

前記  $ErbB3$  阻害剤が、PI3K/AKT シグナル伝達を阻害する、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 9】

前記組成物に含まれる  $ErbB$  経路阻害剤が抗  $EGFR$  抗体である、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 0】

前記抗  $EGFR$  抗体がセツキシマブを含む、請求項 8 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 1】

前記組成物に含まれる  $ErbB$  経路阻害剤が、 $EGFR$  シグナル伝達の小分子阻害剤である、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 9 2】

前記  $EGFR$  シグナル伝達の小分子阻害剤がゲフィチニブである、請求項 9 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 3】

前記組成物に含まれる  $ErbB$  経路阻害剤が抗  $HER2$  抗体である、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9 4】

前記抗  $HER2$  抗体がトラスツズマブを含む、請求項 9 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 5】

前記腫瘍が肺癌である、請求項 7 9 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 9 6】

前記肺癌が、腺癌、扁平上皮癌および大細胞癌から選択される非小細胞肺癌である、請求項 9 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 7】

前記腫瘍が、T790M EGFR 変異、G12S、G12C、もしくは G12V の Kras 変異、および Q61R Kras 変異のうちの 1 つまたは複数を含む腫瘍細胞を含む、請求項 9 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 9 8】

前記腫瘍が、腺癌、扁平上皮癌および大細胞癌から選択される非小細胞肺癌であり、かつ前記腫瘍が、T790M EGFR 変異、G12S、G12C、もしくは G12V の Kras 変異、および Q61R Kras 変異のうちの 1 つまたは複数を含む腫瘍細胞をさらに含む、請求項 9 5 に記載の医薬組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

受容体チロシンキナーゼの  $ErbB$  ファミリーには、 $EGFR$  (HER1)、 $HER2$  ( $ErbB2$ )、 $ErbB3$  (HER3)、および  $ErbB4$  (HER4) が含まれる。過去 10 年間で、多くの上皮癌が、それらの成長および生存のために  $EGFR$  または  $HE$

50

R2のシグナル伝達を必要とすることが明らかになってきている。EGFRを標的とする薬剤は、肺癌、結腸直腸癌、頭頸部癌、および典型的には、ゲムシタビンと併用して、膵癌などの癌の治療のために広く使用されるようになってきた。例えば、EGFRシグナル伝達経路を下方制御する小分子チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)、例えば、非小細胞肺癌の治療に適応されるゲフィチニブ(イレッサ(登録商標))、非小細胞肺癌および膵癌の治療に適応されるエルロチニブ(タルセバ(登録商標))、およびHER2陽性乳癌の治療に適応されるラバチニブ(タイケルブ(登録商標))が開発された。さらに、EGFRに特異的な抗体、例えば、結腸直腸癌および頭頸部癌の治療に適応されるヒト化モノクローナル抗体セツキシマブ(アービタックス(登録商標))が開発された。HER2を標的とする薬剤は、乳癌などの癌の治療にも広く用いられるようになってきた。HER2を標的とする薬剤の例としては、HER2過剰発現乳癌の治療のために世界中で用いられているヒト化抗HER2モノクローナル抗体トラスツズマブ(ハーセプチニ(登録商標))が挙げられる。

10

20

30

40

50

#### 【0002】

最近の研究により、EGFR阻害剤に対して感受性のある癌は、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)シグナル伝達が、EGFRの単独制御下にあるという点で特有であることが明らかになった。EGFR阻害剤が有効であるためには、EGFR阻害剤は、PI3K/AKT経路を下方制御させなければならない(Bianco, R. et al. (2003) Oncogene 22: 2812-2822)。EGFRによって促進される癌を有する患者は、最初は、EGFR標的療法に十分に反応するが、時間と共に、最初に反応していた多くの患者は再発に苦しみ、元の治療に対して耐性のある腫瘍を発症する場合が多い。さらに、特定のEGFR陽性癌は、EGFR標的療法に対する耐性の素因を示す。かかる耐性の発症を観察した一つの方法は、EGFRの変異を介した方法である。これには「T790M EGFR変異」が含まれ、野生型EGFRの790位に存在するスレオニンのメチオニンへの変化によって識別される。この変異は、EGFRのキナーゼドメインに位置し、例えば、Kobayashi, S. et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352: 786-792およびPao, W. et al. (2005) PLoS Med. 2: 225-235で説明されている。

#### 【0003】

erbB3を介するPI3Kシグナル伝達経路の持続的活性化は、ゲフィチニブ耐性とも関連している(Engelman et al. (2005)上記; Engelman et al. (2007)上記)。

#### 【0004】

トラスツズマブおよびラバチニブなどのHER2阻害剤に対する耐性も報告されている。EGFR阻害剤耐性と同様に、PI3K/AKTシグナル伝達経路の持続的活性化は、HER2阻害剤に対する獲得耐性について報告されている機構のうちの少なくとも1つである。

#### 【0005】

複数の研究が、erbBファミリーのキナーゼ欠損メンバー(kinase-dead member)であるerbB3を、EGFR依存性癌におけるPI3K/AKTシグナル伝達の活性化因子として同定した(Engelman, J. A. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 3788-3793; Engelman, J. A. et al. (2007) Science 316: 1039-1045)。これらの細胞において、erbB3は、EGFR依存的にチロシンがリン酸化され、その後、PI3Kに直接結合する。EGFR阻害の際に、erbB3リン酸化が失われ、erbB3はPI3Kに結合せず、PI3K/AKTシグナル伝達が損失する(Engelman, J. A. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 3788-3793; Engelman, J. A. et al. (2007) Science 316: 1039-1045)。さらに、低分子ヘアピン型RNA(shRNA)を用いたerbB3の下方制御により、EGFR依存性癌

におけるAKTリン酸化が減少する(Engelman, J. A. et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 3788-3793)。同様に、Erbb3は、HER2増幅乳癌におけるPI3Kの主要な活性化因子である。トラスツズマブ治療により、これらの癌においてErbb3リン酸化が失われ、Erbb3とPI3Kが解離し、AKTリン酸化が失われる。したがって、Erbb3を介するシグナル伝達は、EGFRおよびHER2の両方によって促進される癌におけるPI3K/AKT活性化の主要メカニズムであると考えられる。

#### 【0006】

Erbb3の再活性化にEGFR、HER2およびMETを結び付ける耐性の例もある(Engelman, J. A. et al. (2006) J. Clin. Invest. 116: 2695-2706; Engelman, J. A. et al. (2007) Science 316: 1039-1045; Ritter, C. A. et al. (2007) Clin. Cancer Res. 13: 4909-4919; Sergina, N. V. et al. (2007) Nature 445: 437-441)。さらに、HER2-Erbb3ヘテロダイマーのヘレグリン誘導性活性化は、EGFR阻害剤に対する耐性にも関連している(Zhou, B. B. et al. (2006) Cancer Cell 10: 39-50)。

10

#### 【0007】

上記のことを考えると、(TKIおよび抗EGFR抗体などの)EGFR阻害剤ならびに(TKIおよび抗HER2抗体などの)HER2阻害剤を含むErbb経路阻害剤に対する耐性を克服するための組成物および方法は、標的癌治療の有効性を拡大または回復する見込みがあるので、積極的に求められている。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

##### 概要

Erbb経路阻害剤に対する耐性を克服するための方法、およびかかる方法の実施に使用できる医薬組成物を提供する。本明細書に提供する方法および組成物は、少なくとも部分的に、Erbb経路阻害剤と組み合わせてErbb3阻害剤を使用すると、Erbb経路阻害剤に対する腫瘍耐性を克服することができるという本発明者らの発見に基づく。例えば、抗EGFR抗体と組み合わせて二重特異性抗Erbb3、抗Erbb2抗体(または抗Erbb3抗体)を使用すると、小分子EGFR阻害剤ゲフィチニブに対するインビボでの獲得耐性を克服することが実証されている。

30

#### 【0009】

したがって、一態様では、対象のErbb経路阻害剤に対する腫瘍の耐性を克服または予防するための方法であって、

Erbb経路阻害剤に対する耐性を示す腫瘍を有するか、または発症するリスクのある対象を選択する工程と、

この対象に(i)Erbb3阻害剤および(ii)Erbb経路阻害剤を投与する工程とを含む方法を提供する。

40

#### 【0010】

典型的には、対象に投与するErbb経路阻害剤は、対象が耐性を示すErbb経路阻害剤と同じErbb経路に対して指向されるが、対象に投与するErbb経路阻害剤は、対象が耐性を示すErbb経路阻害剤と同じである必要はない。例えば、EGFR経路阻害剤ゲフィチニブに対して耐性を示す対象には、Erbb3阻害剤とEGFR阻害剤を同時に投与してもよく、このEGFR阻害剤は、例えば、ゲフィチニブまたは抗EGFR抗体セツキシマブであり得る。

#### 【0011】

特定の実施形態では、Erbb経路阻害剤に対して対象が示す耐性は獲得耐性である。一実施形態では、この獲得耐性は、腫瘍中のEGFRが、T790M EGFR変異を含むEGFR遺伝子を含む腫瘍細胞を含む獲得耐性などの、EGFR阻害剤に対する獲得耐

50

性である。別の実施形態では、この腫瘍は、少なくとも1つのK R A S変異、例えば、G 1 2 S、G 1 2 C、もしくはG 1 2 VのK R A S変異またはQ 6 1 R K R A S変異を含むK R A S遺伝子を含む腫瘍細胞を含む。一実施形態では、この獲得耐性は、ゲフィチニブに対する耐性である。別の実施形態では、この獲得耐性は、トラスツズマブに対する獲得耐性などのH E R 2阻害剤に対する獲得耐性である。様々な実施形態では、対象が示す耐性は、対象の腫瘍細胞におけるP I 3 K / A K Tシグナル伝達の再活性化と関連する。

#### 【0 0 1 2】

一実施形態では、対象に投与するE r b B 3阻害剤は、抗E r b B 3抗体である。代表的な抗E r b B 3抗体は、配列番号1および配列番号2にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含むM M - 1 2 1 (A b # 6)である。あるいは、抗E r b B 3抗体は、M M - 1 2 1の重鎖CDRおよび軽鎖CDRを含む抗体である(すなわち、抗E r b B 3抗体は、配列番号3~5にそれぞれ示されるV<sub>H</sub> C D R 1配列、V<sub>H</sub> C D R 2配列およびV<sub>H</sub> C D R 3配列、ならびに配列番号6~8にそれぞれ示されるV<sub>L</sub> C D R 1配列、V<sub>L</sub> C D R 2配列およびV<sub>L</sub> C D R 3配列を含む)。別の実施形態では、抗E r b B 3抗体は、(配列番号9および配列番号10にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む)A b # 3、(配列番号17および配列番号18にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む)A b # 1 4、(配列番号25および配列番号26にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む)A b # 1 7または(配列番号33および配列番号34にそれぞれ示されるV<sub>H</sub>配列およびV<sub>L</sub>配列を含む)A b # 1 9である。さらに他の実施形態では、抗E r b B 3抗体は、m A b 1 B 4 C 3もしくはm A b 2 D 1 D 1 2またはそのヒト化バージョン、m A b 2 0 5 . 1 0 (例えば、m A b 2 0 5 . 1 0 . 1、m A b 2 0 5 . 1 0 . 2、もしくはm A b 2 0 5 . 1 0 . 3) (Roche - Glycart社)、A M G - 8 8 8 (U 3 - 1 2 8 7、U 3 Pharma AG社およびAmgen社)、A V - 2 0 3 (A veo P harmaceuticals社)ならびにヒト化m A b 8 B 8から選択される。典型的には、E r b B 3阻害剤は、P I 3 K / A K Tシグナル伝達を阻害する。

#### 【0 0 1 3】

一実施形態では、対象に投与するE r b B 3阻害剤は、配列番号44に記載の、ヒト血清アルブミン(H S A)コンジュゲート中に2つのs c F vを含むM M - 1 1 1などの二重特異性抗E r b B 3、抗E r b B 2抗体である。M M - 1 1 1は、E r b B 2生物活性に顕著な影響を与えることなく、E r b B 2 / E r b B 3へのヘレグリン結合を抑制し、E r b B 2 / E r b B 3のヘレグリン活性化を阻害する。(B 2 B 3 - 1とも称される)M M - 1 1 1、ならびにA 5 - H S A - M L 3 . 9、A 5 - H S A - B 1 D 2、B 1 2 - H S A - B 1 D 2、A 5 - H S A - F 5 B 6 H 2、H 3 - H S A - F 5 B 6 H 2、およびF 4 - H S A - F 5 B 6 H 2を含む、s c F v H S Aコンジュゲートである多くの二重特異性抗E r b B 2 / 抗E r b B 3抗体については、同時係属中の米国特許出願公開第2 0 1 1 0 0 5 9 0 7 6号およびP C T公開番号W O 2 0 0 9 / 1 2 6 9 2 0に記載されている。他の適切な二重特異性抗E r b B 2 / 抗E r b B 3抗体については、米国特許第7,332,580号および同第7,332,585号に開示され、請求されている。M M - 1 1 1は、現在、臨床試験を受けており、これには、進行性で、難治性のH E R 2陽性癌患者におけるM M - 1 1 1のオープンラベルフェーズ1 - 2試験および薬理学的研究、ならびに進行性H E R 2陽性乳癌患者における、トラスツズマブ(ハーセプチニ(登録商標))と組み合わせたM M - 1 1 1のオープンラベルフェーズ1 - 2試験が含まれる。特定の実施形態では、E r b B 3阻害剤は、P I 3 K / A K Tシグナル伝達を阻害する。

#### 【0 0 1 4】

一実施形態では、対象に投与するE r b B経路阻害剤は、E G F R阻害剤である。例えば、このE G F R阻害剤は、セツキシマブなどの抗E G F R抗体であり得る。他の代表的な抗E G F R抗体は、M M - 1 5 1、S y m 0 0 4、マツズマブ、パニツムマブ、ニモツ

10

20

30

40

50

ズマブおよびmAb 806である。

【0015】

別の実施形態では、対象に投与するEGFR阻害剤は、ゲフィチニブなどのEGFRシグナル伝達の小分子阻害剤である。EGFRシグナル伝達の他の代表的な小分子阻害剤は、アファチニブ、ラパチニブ、カネルチニブ、エルロチニブHCL、ペリチニブ、PKI-166、PD158780、およびAG1478である。

【0016】

別の実施形態では、対象に投与するErbbB経路阻害剤は、HER2阻害剤である。例えば、このHER2阻害剤は、トラスツズマブなどの抗HER2抗体であり得る。あるいは、対象に投与するHER2阻害剤は、ラパチニブなどのHER2シグナル伝達の小分子阻害剤であり得る。

10

【0017】

別の態様では、T790M EGFR変異細胞を含む腫瘍含有細胞の成長を阻害する方法であって、この腫瘍を(i)EGFR阻害剤、および(ii)ErbbB3阻害剤と接触させる工程を含む方法を開示する。一実施形態では、このErbbB3阻害剤は、上記の抗ErbbB3抗体のうちの1つまたは複数などの抗ErbbB3抗体を含む。別の実施形態では、このErbbB3阻害剤は、上記の二重特異性抗体のうちの1つまたは複数などの二重特異性抗ErbbB3、抗ErbbB2抗体を含む。一実施形態では、このErbbB3阻害剤は、PI3K/AKTシグナル伝達を阻害する。別の実施形態では、このEGFR阻害剤は、上記の抗体のうちの1つまたは複数などの抗EGFR抗体を含む。さらに別の実施形態では、このEGFR阻害剤は、上記の小分子阻害剤のうちの1つまたは複数などのEGFRシグナル伝達の小分子阻害剤を含む。

20

【0018】

さらに別の態様では、対象の腫瘍を治療する方法であって、T790M EGFR変異に陽性を示す生検によって担癌対象を選択する工程と、この対象に(i)EGFR阻害剤、および(ii)ErbbB3阻害剤を投与する工程とを含む方法を提供する。

30

【0019】

特定の実施形態では、対象に投与するErbbB3阻害剤は、上記の抗ErbbB3抗体のうちの1つまたは複数などの抗ErbbB3抗体を含む。特定の実施形態では、対象に投与するErbbB3阻害剤は、上記の二重特異性抗体のうちの1つまたは複数などの二重特異性抗ErbbB3、抗ErbbB2抗体を含む。代表的なErbbB3阻害剤は、PI3K/AKTシグナル伝達を阻害する。別の実施形態では、対象に投与するEGFR阻害剤は、上記の抗体のうちの1つまたは複数などの抗EGFR抗体を含む。さらに別の実施形態では、対象に投与するEGFR阻害剤は、上記の小分子阻害剤のうちの1つまたは複数などのEGFRシグナル伝達の小分子阻害剤を含む。

30

【0020】

本明細書に提供する組成物および方法を用いて、腫瘍の成長、浸潤または転移を阻害するか、またはErbbB経路阻害に対して耐性を示す腫瘍を有する対象を治療することができる。一実施形態では、この腫瘍は、非小細胞肺癌(NSCLC)腫瘍、例えば、腺癌NSCLC、扁平上皮癌NSCLC、または大細胞癌NSCLCなどの肺癌腫瘍である。他の実施形態では、この腫瘍は、結腸直腸癌、頭頸部癌、膀胱または乳癌の腫瘍であり得る。

40

【0021】

別の態様では、ErbbB経路阻害剤に対する耐性を克服するための医薬組成物を提供する。これらの医薬組成物は、上記のErbbB3阻害剤および上記のErbbB経路阻害剤のうちの1つまたは複数を含む。一実施形態では、このErbbB3阻害剤およびErbbB経路阻害剤は、単一組成物中に医薬担体と共に製剤化される。別の実施形態では、このErbbB3阻害剤は、第1の医薬担体と共に製剤化されて第1の組成物を形成し、このErbbB経路阻害剤は、第2の医薬担体と共に製剤化されて第2の組成物を形成し、この第1の

50

組成物および第2の組成物は、任意で一緒に包装される。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】抗ErbB3抗体MM-121によって、ACHN、DU145およびOvCAR8の細胞株におけるErbB3(pErbB3)、AKT(pAKT)およびERK(pERK)のヘレグリン誘導性リン酸化の阻害を示すELISAアッセイ結果の一連のグラフである。データは、2つの独立した実験の平均値±SDを表す。

【図2】EGFR野生型NSCLC細胞株を用いたスフェロイドアッセイを示す一連のグラフである。スフェロイド細胞培養物を、EGF(10nM)で処理するか、ヘレグリン1-1(HRG)(10nM)で処理するか、EGFとHRG(10nM)の両方で処理するか、または外因性リガンドで処理しないか、ならびにエルロチニブ(1μM)で処理するか、MM-121(1μM)で処理するか、これらの2種類(それぞれ1μM)の組み合わせで処理するか、または薬物を含めないで処理した。試験した細胞株には、腺癌細胞株NCI-H322M(図2A)、EKVX(図2B)、A549(図2C)、H358(図2D)、および扁平上皮細胞株SW-900(図2E)が含まれる。y軸は、相対生細胞密度を表す。

【図3】EGFR野生型NSCLC細胞株を用いたスフェロイドアッセイを示す一連のグラフである。スフェロイド細胞培養物を、ヘレグリン1-1(HRG)の非存在下または存在下のいずれかで、ならびにMM-121の非存在下または存在下のいずれかで、0~10μの範囲の用量のエルロチニブで処理した。試験した細胞には、腺癌細胞株NCI-H322M(図3A)、EKVX(図3B)、A549(図3C)、NCI-H358(図3D)、およびNCI-H441(図3E)、NCI-H2347(図3F)、扁平上皮癌細胞株NCI-H2170(図3G)、および大細胞癌細胞株NCI-H661(図3H)が含まれる。y軸は、相対生細胞密度を表す。

【図4】シスプラチン処理後のシスプラチン感受性細胞(A2780)および耐性細胞(A2780cis)の細胞生存率を示すグラフである。細胞生存率(Y軸)を、培地対照に対する生存率(%)として与え、薬物濃度(10gμ)に対してプロットする。

【図5】抗pAKTをプローブにした3つのウェスタンプロットの画像である。シスプラチンで処理したA2780細胞(図5A)、シスプラチンで処理したA2780cis細胞(図5B)、MM-121で処理したA2780cis細胞(図5C)の溶解物中のpAKTレベルを示す。Sは、未処理の感受性細胞対照を示し、Rは、未処理の耐性細胞対照を示す。X軸は、薬物処理後に溶解物を収集した時間(h)を示し、Y軸は薬物濃度(μ)を示す。

【図6】ラバチニブ(図6A)、トラスツズマブ(図6B)、またはMM-111(図6C)による処理後の、インビトロでのBT474-M3細胞の(対照に対する割合(%)としての)細胞生存率(Y軸)を示す一連のグラフである。それぞれの図について、X軸は薬物濃度(nM)を示す。

【図7】ラバチニブ(図7A)、トラスツズマブ(図7B)での処理後の、ヘレグリン刺激BT474-M3細胞におけるAKTの活性化の阻害を示す2つのグラフ(Y軸、pAKTの標準化量)である。それぞれの図について、X軸は、示したとおりのErbB経路阻害剤濃度を示す。図7AにおいてX軸に沿って示したそれぞれのラバチニブ濃度については、グループ化したバーは、左から右に読んで、0nM、1nM、4nM、16nM、63nM、250nM、および1000nのMM-111濃度に対応する。図7BにおいてX軸に沿って示したトラスツズマブ濃度については、グループ化バーは、左から右に読んで、0nM、1nM、10nM、100nM、および1000nのトラスツズマブ濃度に対応する。「基底」と印をつけた線は、ヘレグリンで刺激せず、MM-111、ラバチニブ、またはトラスツズマブで処理しなかった細胞中のpAKTレベルを示す。

【図8】MM-111、ラバチニブ、またはMM-111とラバチニブの組み合わせ(図8A)、MM-111、トラスツズマブ、またはMM-111とトラスツズマブの組み合わせ(図8B)での処理後の、BT474-M3異種移植乳癌異種移植モデルにおける腫

10

20

30

40

50

腫瘍体積の減少を示す2つのグラフである。Y軸は平均腫瘍体積( $\text{mm}^3$ )を表し、X軸は、腫瘍移植後の時間(日数)を表す。

【図9】トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞内のErbb受容体のFACS解析を示す3つのプロットである。それぞれの図について、細胞数(Y軸)を、以下の蛍光色素の発光強度(X軸)に対してプロットする：図9A、Erbb2の受容体の状態-太い黒色の実線=Erbb2について染色したトラスツズマブ耐性細胞、細い灰色の実線=トラスツズマブ耐性細胞(未染色)、点線=Erbb2について染色した非耐性細胞、破線=非耐性細胞(未染色)；図9B、EGFRの状態-太い黒色の実線=EGFRについて染色したトラスツズマブ耐性細胞、細い灰色の実線=トラスツズマブ耐性細胞(未染色)、点線=EGFRについて染色した非耐性細胞、破線=非耐性細胞(未染色)；図9C、Erbb3状態Erbb3受容体状態-太い黒色の実線=Erbb3について染色したトラスツズマブ耐性細胞、細い灰色の実線=トラスツズマブ耐性細胞(未染色)、点線=Erbb3について染色した非耐性細胞、破線=非耐性細胞(未染色)。

【図10】トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞の細胞成長を阻害するトラスツズマブ(図10A)およびMM-111(図10B)の能力を比較した2つのグラフである。それらの図について、親(非耐性)BT474-M3細胞およびトラスツズマブ耐性BT474-M3細胞の成長を、トラスツズマブ(A)またはMM-111(B)の用量範囲(X軸、トラスツズマブまたはMM-111(nM))で処理した後の対照(トラスツズマブまたはMM-111を添加していない)細胞に対する割合(%) (Y軸)として示す。

【図11】トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞スフェロイドにおける細胞成長を阻害するトラスツズマブ(図11A)およびMM-111(図11B)の能力を比較した2つのグラフである。親(非耐性)BT474-M3細胞スフェロイドおよびトラスツズマブ耐性BT474-M3細胞スフェロイドの成長を、薬物の用量範囲(X軸、トラスツズマブまたはMM-111(nM))で処理した後の対照(トラスツズマブまたはMM-111を添加していない)細胞に対する割合(%) (Y軸)として示す。

【図12】300nMのエルロチニブ(図12A)または100nMのゲフィチニブ(図12B)と組み合わせた場合の、トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞スフェロイドの細胞成長に対するMM-111またはトラスツズマブの効果を比較した2つのグラフである。これらの細胞スフェロイドの成長を、対照に対する割合(%)として示す(破線、薬物添加なし)。エルロチニブ単独またはゲフィチニブ単独で処理した細胞スフェロイドの成長を鎖線で示す。X軸は、MM-111および/またはトラスツズマブのそれぞれの濃度(nM)の対数目盛であり、Y軸は、対照スフェロイドサイズに対する割合(%)としてのスフェロイドサイズである。

【図13】BT474-M3異種移植モデルにおける腫瘍成長阻害に対するMM-111、ラパチニブ、およびタモキシフェンの効果を示す一連のグラフである。図13A、13B、および13Cにおいて、左側のパネルは、緑色蛍光タンパク質を発現するように遺伝子操作したBT474-M3細胞の異種移植片の腫瘍体積を示し、右側のパネルは、GFPおよびヘレグリン1を発現するように遺伝子操作したBT474-M3細胞の異種移植片の腫瘍体積を示す。図13Aは、マウスをMM-111(48mpk)、ラパチニブ(150mpk)およびタモキシフェン(5mg)で治療したBT474-M3-GFP腫瘍およびBT474-M3-GFP-HRG腫瘍の腫瘍成長曲線を示す。図13Bは、マウスをMM-111(48mpk)+ラパチニブ(150mpk)、MM-111+タモキシフェン(5mg)、およびラパチニブ+タモキシフェンの併用療法で治療したBT474-M3-GFP腫瘍およびBT474-M3-GFP-HRG腫瘍の腫瘍成長曲線を示す。図13Cは、マウスをラパチニブ+タモキシフェンおよびMM-111+ラパチニブ+タモキシフェンの併用療法で治療したBT474-M3-GFP腫瘍およびBT474-M3-GFP-HRG腫瘍の腫瘍成長曲線を示す。対照マウスには治療を行わなかった。X軸は時間(日数)であり、Y軸は、接種後17日目または20日目の治療開始時の腫瘍体積と比較した腫瘍体積(「D17に対する比」または「D20に対する比」)であ

10

20

30

40

50

る。

【図14】B T 4 7 4 - M 3 - G F P 腫瘍（左パネル）およびB T 4 7 4 - M 3 - G F P - H R G 腫瘍（右パネル）における、H R G 誘導性シグナル伝達に対するM M - 1 1 1、ラパチニブおよびタモキシフェンの単剤療法ならびにM M - 1 1 1、ラパチニブおよびタモキシフェンの併用療法の効果を示す一連のグラフである。図14 Aはp E r b B 3 レベル（p g / m l）を示し、図14 Bは、全E r b B 3（t E r b B 3）レベル（p g / m l）を示し、図14 Cは、リン酸化E r b B 3と全E r b B 3の比を示し、図14 Dは、リン酸化A k t（p A k t）レベル（p g / m l）を示し、図14 Eは、全A k t（t A k t）レベル（p g / m l）を示し、図14 Fは、p A k tとt A k tの比を示し、図14 Gは、増殖性細胞核抗原（P C N A）レベルで標準化したリン酸化E R K 1 / 2（p E R K）レベルを示し、図14 Hは、P C N Aレベルで標準化した全E R K 1 / 2（全E R K）レベルを示し、図14 Iは、p E R Kレベルと全E R Kレベルの比を示す。x軸は、担癌マウスが受けた療法を表す。対照マウスには治療を行わなかった。

【図15】N C I - N 8 7 異種移植片モデルにおける腫瘍成長曲線を示す一連のグラフである。図15 Aは、治療をしない（対照）か、またはトラスツズマブ（3 . 5 m p k）+5 - フルオロウラシル（5 - F U；1 2 m p k 5日 / 週）、トラスツズマブ+5 - F U+シスプラチニブ（5 m p k）、第1のM M - 1 1 1（9 6 m p k）+トラスツズマブ+5 - F U、第2のM M - 1 1 1+トラスツズマブ+5 - F Uおよび第2のM M - 1 1 1+トラスツズマブ+5 - F U+シスプラチニブで治療した担癌マウスを示す。第1の治療から第2の治療への切り替えおよび化学療法の中止を矢印で示す。図15 Bは、トラスツズマブ+5 - F Uおよび第2のM M - 1 1 1+トラスツズマブ+5 - F Uで治療したN C I - N 8 7 腫瘍の腫瘍成長曲線を示す。図15 Cは、トラスツズマブ+5 - F U+シスプラチニブおよび第2のM M - 1 1 1+トラスツズマブ+5 - F U+シスプラチニブで治療したN C I - N 8 7 腫瘍の腫瘍成長曲線を示す。x軸は時間（日数）であり、y軸は腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）である。

【図16】B T 4 7 4 - M 3 - G F P 腫瘍（左パネル）およびB T 4 7 4 - M 3 - G F P - H R G 腫瘍（右パネル）のH R G 誘導性シグナル伝達におけるM M - 1 1 1、ラパチニブおよびタモキシフェンの単剤療法ならびにM M - 1 1 1、ラパチニブおよびタモキシフェンの併用療法の効果を示す一連のグラフである。担癌マウスを、M M - 1 1 1、ラパチニブおよびトラスツズマブの単剤療法（図16 A）、M M - 1 1 1+ラパチニブ、M M - 1 1 1+トラスツズマブ、およびラパチニブ+トラスツズマブの併用療法（図16 B）、またはラパチニブ+トラスツズマブおよびM M - 1 1 1+ラパチニブ+トラスツズマブの併用療法（図16 C）で治療した。x軸は時間（日数）であり、y軸は、接種後17日目の治療の開始時の腫瘍体積と比較した腫瘍体積である（「比」）。

【図17】N C I - N 8 7 異種移植片モデルにおける腫瘍成長曲線を示すグラフである。担癌マウスを、治療しない（対照）か、またはパクリタキセル（2 0 m p k）、トラスツズマブ（3 . 5 m p k）+パクリタキセル、またはM M - 1 1 1（4 8 m p k）+トラスツズマブ+パクリタキセルで治療した。x軸は時間（日数）であり、y軸は腫瘍体積（mm<sup>3</sup>）である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 3】

詳細な説明

E r b B 経路阻害剤に対する耐性を克服するための方法、およびかかる方法において使用することができる医薬組成物を提供する。実施例でさらに説明するとおり、E r b B 3 阻害剤、例えば、抗E r b B 3 抗体または二重特異性抗E r b B 3、抗E r b B 2 抗体は、インビトロとインビボの両方のE r b B 経路標的療法（例えば、E G F R 標的療法）に対するリガンド誘導性（例えば、ヘレグリン誘導性）耐性を克服することができることをここで証明してきた。したがって、E r b B 3 阻害剤とE r b B 経路阻害剤とを組み合わせて使用することによって、E r b B 経路阻害剤に対する耐性を克服するための方法を本明細書に提供する。

10

20

30

40

50

## 【0024】

メカニズムに限定されることも、操作のいかなる理論に拘束されることもないが、本明細書に記載のErbB3阻害剤がErbB経路阻害剤に対する耐性を克服する能力は、少なくとも部分的に、ErbB3阻害剤が、PI3K/AKTシグナル伝達の再活性化につながるErbB3シグナル伝達のリガンド依存的再活性化を阻止する能力によるものであると考えられる。

## 【0025】

この開示がより容易に理解されるように、特定の用語を最初に定義する。

## 【0026】

本明細書で使用する「阻害剤」という用語は、受容体または他のシグナル伝達タンパク質によって媒介されるシグナル伝達を含む、受容体または他のシグナル伝達タンパク質の活性を阻害、下方調節、抑制、または下方制御する治療薬を示す。この用語は、小分子阻害剤（例えば、小分子チロシンキナーゼ阻害剤）および抗体、干渉RNA（shRNA、siRNA）、ならびに可溶性受容体などを包含する。

10

## 【0027】

「ErbB経路阻害剤」は、EGFR（ErbB1/HER1）シグナル伝達経路またはHER2（ErbB2、neu）シグナル伝達経路などの1つまたは複数のErbBシグナル伝達経路のうちの1つまたは複数のタンパク質に作用する阻害剤である。

## 【0028】

「EGFR阻害剤」は、EGFRに作用する。

20

## 【0029】

「HER2阻害剤」は、HER2（ErbB2）に作用する。

## 【0030】

「ErbB3阻害剤」は、ErbB3に作用する。

## 【0031】

「抗体」は、抗体全体またはその任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）もしくその一本鎖である。「抗体」という用語は、(i)モノクローナル抗体、(i i)組換え抗体（すなわち、組換え手段によって調製、発現、作製または単離される抗体）、(i i i)キメラ抗体（すなわち、可変ドメイン（複数可）が一方の種に由来し、定常ドメイン（複数可）がもう一方の種に由来する抗体）、(i v)ヒト化抗体（すなわち、追加のFR置換、ドナー置換または非ドナー置換/非アクセプター置換のいずれか一方が組み込まれてもよいが、CDRのみがドナー種に由来し、抗体構造の残りの部分はヒトである抗体）、(v)完全ヒト抗体（すなわち、可変領域CDRおよびFRが、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する抗体）、ならびに(v i)二重特異性抗体および多重特異性抗体（すなわち、異なる抗原結合特異性を有する2つ以上の結合部位を有する抗体）を包含する。本明細書で使用する、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」という用語は、抗原（例えば、ErbB3）に特異的に結合する能力を保持する抗体のうちの1つまたは複数の断片を指す。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、(i)Fab断片、VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインからなる一価断片、(i i)F(ab')<sub>2</sub>断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片、(i i i)VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片、(i v)抗体の單一アームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片、(v)VHドメインおよびVLドメインを含むdAb、(v i)VHドメインからなるdAb断片、(v i i)VHドメインまたはVLドメインからなるdAb断片、ならびに(v i i i)例えば、合成リンカーによって結合している2つ以上の単離されたCDRの組み合わせが挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは、別々の遺伝子によってコードされるが、VL領域およびVH領域が対になり、一価分子を形成する（一本鎖Fv（scFv）として知られる）單一タンパク質鎖として作られることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いてVLおよびVHを結合させることができる。かかる一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部

30

40

50

分」という用語に包含されることも意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を用いて得ることができ、かつこれらの断片を、インタクトな抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングすることができる。抗原結合部分は、組換えDNA技術によって、またはインタクトな免疫グロブリンの酵素的切断または化学的切断によって生成することができる。

【0032】

「ErbB経路阻害剤に対する耐性」という（例えば、「ErbB経路阻害剤に対する耐性を示す」の中の）用語は、より早い時点の同じ細胞と比較するか、またはErbB経路阻害剤に反応するのと同じ種類の他の細胞と比較して、細胞が、（例えば、阻害剤の細胞成長または細胞増殖を阻害する能力によって測定されるとおり）ErbB経路阻害剤に対する反応性の低下、減少または欠如を示す細胞（例えば、癌細胞）の特性を指す。この細胞は、組織、例えば、腫瘍組織内に存在し得る。さらに、組織、例えば、腫瘍組織は、対象がErbB経路阻害剤に対して耐性を示すと言われる場合には、対象に存在し得る。

10

【0033】

本明細書で使用する「獲得耐性」という用語は、ErbB経路阻害剤に対する細胞の反応が、治療開始時の阻害剤に対するかかる細胞の反応と比較して、経時的に減少するような、経時的に、典型的には、ErbB経路阻害剤による治療の過程において細胞内で発生する、ErbB経路阻害剤に対する耐性を指す。あらかじめ反応細胞において経時的に発生するこの「獲得耐性」は、ErbB経路阻害剤に対する「耐性の素因」となる細胞とは対照的であり、ErbB経路阻害剤に対して反応性を示す細胞（すなわち、その成長および/または増殖が、ErbB経路阻害剤によって著しく阻害される細胞）と比較して、ErbB経路阻害剤での治療に対するこれらの細胞の反応性の固有の欠如を、または著しい低下を指す。

20

【0034】

阻害剤、例えば、ErbB経路阻害剤に対する、本明細書で使用する「耐性の克服」および「耐性を克服する」という用語は、細胞が、その耐性状態の細胞と比較して、同じシグナル伝達経路を阻害する同じ阻害剤または別の阻害剤に対して測定可能な程度の反応性（または反応性の増加）を示すように、あらかじめ耐性のある細胞内の阻害剤に対する耐性のレベルもしくは量または程度が、減少、低下、または逆転する現象を指す。例えば、耐性が示されている阻害剤が、例えば、ゲフィチニブである細胞における「EGFR経路阻害剤に対する耐性の克服」は、その耐性状態の細胞と比較して、ゲフィチニブまたは（抗EGFR抗体セツキシマブなどの）別のEGFR経路阻害剤に対する測定可能な程度の反応性を示す細胞をもたらす。

30

【0035】

本明細書で使用する「対象」という用語には、本明細書に提供する方法を用いて、ErbB経路阻害剤に対する耐性に取り組むことができる、かかる耐性を示す腫瘍を有する対象または患者などの、疾患または障害を有する任意のヒトまたは非ヒト哺乳類が含まれる。

40

【0036】

I. ErbB3阻害剤

本明細書でさらに詳細に説明するように、本明細書に提供する方法および組成物は、1つまたは複数のErbB3阻害剤の使用を含む。

【0037】

MM-121は、現在フェーズII臨床試験を受けている完全ヒト抗ErbB3抗体である。（「Ab#6とも称される」）MM-121および関連するヒト抗ErbB3抗体については、米国特許第7,846,440号、米国特許出願公開第20090291085号、同第20100056761号、および同第20100266584号、ならびにPCT公開番号WO2008/100624で詳細に説明されている。開示される組み合わせで使用することができる他の抗ErbB3抗体には、Ab#3、Ab#14、Ab#17もしくはAb#19などの、米国特許第7,846,440号に記載の他の抗Erb

50

b B 3 抗体またはE r b B 3との結合についてA b # 3、A b # 1 4、A b # 1 7もしくはA b # 1 9と競合する抗体の全てが含まれる。本明細書に開示される方法にしたがって投与することができる抗E r b B 3抗体のさらなる例としては、米国特許第7,285,649号、米国特許出願公開第20100310557号、および同第20100255010号に開示される抗体、ならびに抗体1B4C3(カタログ番号sc-23865、Santa Cruz Biotechnology社)および2D1D12(U3 Pharma AG社)(これらの両方は、例えば、米国特許出願公開第20040197332号で説明されており、(DSMZに寄託された)ハイブリドーマ細胞株DSMA ACC 2527もしくはDSM ACC 2517によって生成される)、米国特許第7,705,130号に開示される抗E r b B 3抗体が挙げられ、例えば、米国特許第7,705,130号に記載のAMG 888(U3-1287、U3 Pharma AG社およびAmgen社)と称される抗E r b B 3抗体、米国特許出願公開第20110256154号に記載のAV-203(Aveo Pharmaceuticals社)と称される抗E r b B 3抗体、米国特許第5,968,511号に記載の8B8(ATCC(登録商標)HB-12070(商標))、および、例えば、米国特許出願公開第20110171222号に記載の抗E r b B 3抗体mAb 205.10(例えば、mAb 205.10.1、mAb 205.10.2、またはmAb 205.10.3)(Roche-Glycart社)などのモノクローナル抗体(そのヒト化型を含む)を含むが、これらに限定されない。他のこののような例としては、多特異性抗体であり、少なくとも第2の治療抗体または追加の治療剤に連結された少なくとも1つの抗E r b B 3抗体(例えば、上述の抗E r b B 3抗体のうちの1つ)を含む抗E r b B 3抗体が挙げられる。さらなる他の適切な抗E r b B 3抗体は、以下のもののいずれかを含む:1)それぞれ配列番号45および配列番号46に記載の核酸配列によってコードされる可変重鎖(VH)領域および/もしくは可変軽鎖(VL)領域、または2)それぞれ配列番号1および配列番号2に記載のアミノ酸配列を含むVHおよび/もしくはVL領域、または3)配列番号3(CDRH1)、配列番号4(CDRH2)および配列番号5(CDRH3)に記載のアミノ酸配列を含むCDRH1配列、CDRH2配列、およびCDRH3配列、ならびに/または配列番号6(CDRL1)、配列番号7(CDRL2)および配列番号8(CDRL3)に記載のアミノ酸配列を含むCDRL1配列、CDRL2配列、およびCDRL3配列、ならびにヒトE r b B 3に結合し、上述の抗体1)、2)、または3)と少なくとも90%の可変領域配列同一性を有する抗体。別の実施形態において、この抗体は、上述の抗体のいずれか1つと同じヒトE r b B 3上のエピトープと結合について競合する、かつ/または同じヒトE r b B 3上のエピトープに結合する。この抗体がMM-121である場合、エピトープは、典型的には、ヒトE r b B 3(配列番号41)の残基92-104を含む。他の実施形態において、この抗体は、E r b B 3に結合する完全ヒトモノクローナル抗体であり、生細胞において、a)E r b B 2/E r b B 3複合体形成を阻害するか、b)以下のヘレグリン、EGF、TGF、ベータセルリン、ヘパリン結合上皮成長因子、ビレグリン(biregulin)、エピジエン、エピレグリン、およびアンフィレグリンのそれぞれの形態のいずれかによって誘導されるE r b B 3の細胞内リン酸化を阻止するか、またはa)とb)の両方を行う。

#### 【0038】

上記の抗E r b B 3抗体は、例えば、原核細胞または真核細胞において、例えば、CHO細胞などのタンパク質をグリコシル化できる細胞株において、当業者に周知の方法を用いて産生することができる。

#### 【0039】

(B2B3-1とも称される)MM-111については、同時係属中の米国特許出願第12/757,801号およびPCT公開番号WO2009/126920に記載されている。その中で、scFv HSAコンジュゲートであり、A5-HSA-ML3.9、A5-HSA-B1D2、B12-HSA-B1D2、A5-HSA-F5B6H2、H3-HSA-F5B6H2、およびF4-HSA-F5B6H2を含む、本明細書に提供

10

20

30

40

50

する方法および組成物における使用に適する他の二重特異性抗ErbB2/抗ErbB3抗体も開示されている。本明細書に提供する方法および組成物における使用に適する他の二重特異性抗ErbB2/抗ErbB3抗体には、ALMおよびH3xB1D2が含まれ、それぞれ、抗ErbB2抗体に連結した抗ErbB3抗体を含み、これらについては、米国特許第7,332,585号および同第7,332,580号、ならびにPCT出願番号PCT/US2007/024287でさらに説明されている。

#### 【0040】

さらに別の実施形態において、この二重特異性抗ErbB3、抗ErbB2抗体は、2種類以上の二重特異性抗ErbB3、抗ErbB2抗体の混合物、すなわちカクテルを含むことができ、これらの各々は、ErbB3上の異なるエピトープに結合する。一実施形態において、この混合物、すなわちカクテルは、3種類の二重特異性抗ErbB3、抗ErbB2抗体を含み、これらの各々は、ErbB3上の異なるエピトープに結合する。

10

#### 【0041】

別の実施形態において、このErbB3阻害剤は、ErbB3の発現または活性を阻害するRNA分子などの核酸分子を含む。ErbB3のRNAアンタゴニストについて記載されている（例えば、米国特許出願公開第20080318894号参照）。さらに、ErbB3の発現および/または活性を特異的に阻害するshRNAまたはsiRNAなどの、ErbB3に特異的な干渉RNAについて記載されている（例えば、Sergina, N. V. et al. (2007) *Nature* 445: 437-441; Liu, B. et al. (2007) *Int. J. Cancer* 120: 1874-1882; Frolov, A. et al. (2007) *Cancer Biol. Ther.* 6: 548-554; Sithanandam, G. and Anderson, L. M. (2008) *Cancer Gene Ther.* 15: 413-418; Lee-Hoefflich, S. J. et al. (2008) *Cancer Res.* 68: 5878-5887参照）。

20

#### 【0042】

さらに別の実施形態において、このErbB3阻害剤は、ErbB3の経路を介したシグナル伝達を阻害するErbB3受容体の可溶型を含む。かかる可溶性ErbB3分子については、当技術分野において記載されている（例えば、それぞれMaihleらによる米国特許第7,390,632号、米国特許出願公開第20080274504号、および米国特許出願公開第20080261270号、ならびにZhouによる米国特許出願公開第20080057064号参照）。

30

#### 【0043】

別の実施形態において、このErbB3阻害剤は、ErbB3の発現または活性を阻害する、RNA分子などの核酸分子を含む。ErbB3のRNAアンタゴニストについて記載されている（例えば、米国特許出願公開第20080318894号参照）。さらに、ErbB3の発現および/または活性を特異的に阻害するshRNAまたはsiRNAなどの、ErbB3に特異的な干渉RNAについて記載されている（例えば、Sergina, N. V. et al. (2007) *Nature* 445: 437-441; Liu, B. et al. (2007) *Int. J. Cancer* 120: 1874-1882; Frolov, A. et al. (2007) *Cancer Biol. Ther.* 6: 548-554; Sithanandam, G. and Anderson, L. M. (2008) *Cancer Gene Ther.* 15: 413-418; Lee-Hoefflich, S. J. et al. (2008) *Cancer Res.* 68: 5878-5887参照）。

40

#### 【0044】

さらに別の実施形態において、このErbB3阻害剤は、ErbB3の経路を介したシグナル伝達を阻害するErbB3受容体の可溶型を含む。かかる可溶性ErbB3分子については、当技術分野において記載されている（例えば、それぞれMaihleらによる米国特許第7,390,632号、米国特許出願公開第20080274504号、およ

50

び米国特許出願公開第20080261270号、ならびにZhouによる米国特許出願公開第20080057064号参照)。

【0045】

I I . E r b B 経路阻害剤

本明細書でさらに詳細に説明するとおり、本明細書に提供する方法および組成物は、1つまたは複数のE r b B 経路阻害剤の使用を含む。

【0046】

一実施形態において、このE r b B 経路阻害剤は、EGFR 阻害剤(すなわち、EGFRを阻害し、それによってEGFR 経路シグナル伝達を阻害する阻害剤)である。

【0047】

一実施形態において、このEGFR 阻害剤は、抗EGFR 抗体を含む。1つの有用な抗EGFR 抗体はセツキシマブ(アービタックス(登録商標)、Imclone社)である。抗EGFR 抗体の他の例としては、(Bukhaldらによって2011年7月5日に出願された、同時係属中の同一出願人による米国特許出願第61/504,633号に詳細に記載されている)MM-151、Sym004(Sympogen社, Pederson et al., Cancer Research January 15, 2010 70; 588、米国特許第7,887,805号も参照されたい)、マツズマブ(EMD72000)、パニツムマブ(ベクティビックス(登録商標)；アムジェン社)；ニモツズマブ(TheracIM社)およびmAb806(Mishima, K. et al. (2001) Cancer Res. 61: 5349-5354)が挙げられる。

。

【0048】

別の実施形態では、このEGFR 阻害剤は、EGFR シグナル伝達経路を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)などのEGFR シグナル伝達経路の小分子阻害剤を含む。EGFR シグナル伝達経路の小分子阻害剤の例としては、ゲフィチニブ(イレッサ(登録商標)、AstraZeneca社およびTeva社)が挙げられる。EGFR の小分子阻害剤の他の例としては、エルロチニブHCL(OSI-774；タルセバ(登録商標)；OSI Pharma社)、ラパチニブ(タイケルブ(登録商標)、G1axoSmithKline社)、カネルチニブ(PD183805；Pfizer社)、PKI-166(Novartis社)、PD158780、ペリチニブ、およびAG-1478(4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)が挙げられる。

【0049】

別の実施形態では、このE r b B 経路阻害剤は、HER2 阻害剤(すなわち、HER2 経路シグナル伝達を阻害する阻害剤)である。

【0050】

一実施形態では、このHER2 阻害剤は、抗HER2 抗体を含む。抗HER2 抗体の例としては、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))が挙げられる。ハーセプチンは、Genentech社から市販されている。抗HER2 抗体の別の例としては、ペルツズマブ(オムニターグ(登録商標)、Genentech社)が挙げられる。

【0051】

別の実施形態では、このHER2 阻害剤は、HER2 シグナル伝達を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)などのHER2 の小分子阻害剤を含む。HER2 シグナル伝達の小分子阻害剤の限定されない例としては、ラパチニブ(タイケルブ(登録商標)、G1axoSmithKline社)、CI-1033(PD 183805；Pfizer社)、PKI-166(Novartis社)およびペリチニブEKB-569が挙げられる。

【0052】

I I I . 方法

一態様では、対象におけるE r b B 経路阻害剤に対する耐性を克服する方法であって、E r b B 経路阻害剤に対する耐性を示す対象を選択する工程と、

10

20

30

40

50

この対象に (i) E r b B 3 阻害剤および (ii) E r b B 経路阻害剤を投与する工程とを含む方法を提供する。

【0053】

典型的には、対象に投与する E r b B 経路阻害剤は、対象が耐性を示す E r b B 経路阻害剤と同じ E r b B 経路に対して指向されるが、対象に投与する E r b B 経路阻害剤は、対象が耐性を示す E r b B 経路阻害剤と同じである必要はない。例えば、EGFR 経路阻害剤ゲフィチニブに対して耐性を示す対象には、E r b B 3 阻害剤と EGFR 阻害剤を同時投与してもよく、この EGFR 阻害剤は、例えば、ゲフィチニブまたは抗 EGFR 抗体セツキシマブであり得る。

【0054】

E r b B 3 阻害剤および E r b B 経路阻害剤を対象に同時投与することができるか、または、もう 1 つの方法として、E r b B 3 阻害剤は、E r b B 経路阻害剤の投与に先立って投与することができる。E r b B 3 阻害剤および E r b B 経路阻害剤は、対象への阻害剤の効果的な送達に適する任意の経路により、対象に投与することができる。例えば、多くの小分子阻害剤は、経口投与に適している。抗体および他の生物学的製剤は、典型的には、静脈内、腹腔内または筋肉内に投与される。

【0055】

E r b B 経路阻害剤に対して耐性を示す対象の同定は、当技術分野で周知の標準的な方法によって達成することができる。例えば、E r b B 経路阻害剤が対象の腫瘍細胞（またはインビトロで培養された対象由来の腫瘍細胞試料）の成長および／または増殖を阻害することができない（またはその能力が低下する）ことは、耐性を示し得る。

【0056】

いくつかの実施形態では、E r b B 経路阻害剤に対する耐性は獲得耐性であり、例えば、EGFR 阻害剤に対する獲得耐性、例えば、ゲフィチニブに対する獲得耐性である。別の実施形態では、EGFR 阻害剤に対する獲得耐性は、対象における、例えば、対象の腫瘍における T790M EGFR 変異と関連する。別の実施形態において、この獲得耐性は、HER2 阻害剤に対してである。

【0057】

対象が示す耐性は、PI3K/AKT シグナル伝達の再活性化と関連する耐性であってよく、E r b B 3 阻害剤は、PI3K/AKT シグナル伝達を阻害する。実施例で詳細に記載するアッセイなどの、E r b B 3 阻害剤の PI3K/AKT シグナル伝達を阻害する能力を評価するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、E r b B 3 阻害剤の AKT リン酸化を阻害する能力は、当技術分野で公知の標準技術を用いて評価することができる。

【0058】

別の実施形態では、対象に投与する E r b B 3 阻害剤は、抗 E r b B 3 抗体である。有用な抗 E r b B 3 抗体は、配列番号 1 および配列番号 2 にそれぞれ示される V<sub>H</sub> 配列および V<sub>L</sub> 配列を含む MM-121、または配列番号 3～5 にそれぞれ示される V<sub>H</sub> CDR 1 配列、V<sub>H</sub> CDR 2 配列および V<sub>H</sub> CDR 3 配列、ならびに配列番号 6～8 にそれぞれ示される V<sub>L</sub> CDR 1 配列、V<sub>L</sub> CDR 2 配列および V<sub>L</sub> CDR 3 配列（すなわち、MM-121 の V<sub>H</sub> CDR および V<sub>L</sub> CDR）を含む抗体を含む。別の実施形態では、この抗 E r b B 3 抗体は、それぞれ配列番号 42 および配列番号 43 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖を有する抗体である。さらなる限定されない代表的な抗 E r b B 3 抗体および E r b B 3 阻害剤の他の形態については、上記のサブセクション I に詳細に記載されている。

【0059】

別の実施形態では、対象に投与する E r b B 経路阻害剤は、EGFR 阻害剤である。有用な EGFR 阻害剤は、抗 EGFR 抗体、例えば、セツキシマブである。さらなる限定されない代表的な抗 EGFR 抗体については、上記のサブセクション II に詳細に記載されている。

10

20

30

40

50

## 【0060】

別の実施形態では、対象に投与する  $E_{rb}B$  経路阻害剤は、上記のサブセクションIIに記載したように、EGFRシグナル伝達の小分子阻害剤である。EGFRシグナル伝達の有用な小分子阻害剤は、ゲフィチニブである。追加の限定されない代表的なEGFRシグナル伝達の小分子阻害剤については、上記のサブセクションIIに詳細に記載されている。

## 【0061】

さらに別の実施形態では、対象に投与する  $E_{rb}B$  経路阻害剤は、HER2阻害剤である。有用なHER2阻害剤には、ラバチニブおよび抗HER2抗体、例えば、トラスツズマブが含まれる。さらなる限定されない代表的な抗HER2阻害剤については、上記のサブセクションIIに詳細に記載されている。

10

## 【0062】

別の態様では、T790M EGFR変異を含む細胞を含む腫瘍の成長、浸潤または転移を阻害する方法であって、この腫瘍（またはその細胞）を（i）EGFR阻害剤、および（ii） $E_{rb}B3$ 阻害剤と接触させる工程を含む方法を提供する。

## 【0063】

特定の実施形態では、 $E_{rb}B3$ 阻害剤は、PI3K/AKTシグナル伝達を阻害する。実施例で詳細に記載するアッセイなどの、 $E_{rb}B3$ 阻害剤のPI3K/AKTシグナル伝達を阻害する能力を評価するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、 $E_{rb}B3$ 阻害剤のAKTリン酸化を阻害する能力は、当技術分野で公知の標準技術を用いて評価することができる。

20

## 【0064】

一実施形態では、この腫瘍（またはその細胞）を、上記のサブセクションIに詳細に記載したような抗 $E_{rb}B3$ 抗体を含む $E_{rb}B3$ 阻害剤と接触させる。

## 【0065】

別の実施形態では、この腫瘍（または腫瘍細胞）を、上記サブセクションIIに詳細に記載したような抗EGFR抗体を含むEGFR阻害剤と接触させる。別の実施形態では、この腫瘍（または腫瘍細胞）を、上記サブセクションIIに詳細に記載したようなEGFRシグナル伝達の小分子阻害剤を含むEGFR阻害剤と接触させる。

30

## 【0066】

さらに別の態様では、対象の腫瘍を治療する方法であって、  
T790M EGFR変異を含む腫瘍を有する対象を選択する工程と、  
この対象に（i）EGFR阻害剤、および（ii） $E_{rb}B3$ 阻害剤を投与する工程とを含む方法を提供する。

## 【0067】

$E_{rb}B3$ 阻害剤およびEGFR阻害剤を対象に同時投与することができるか、または、もう1つの方法として、 $E_{rb}B3$ 阻害剤は、EGFR阻害剤の投与に先立って投与することができる。 $E_{rb}B3$ 阻害剤およびEGFR阻害剤は、対象への阻害剤の効果的な送達に適する任意の経路により、対象に投与することができる。例えば、多くの小分子阻害剤は、経口投与に適している。抗体および他の生物学的製剤は、典型的には、静脈内、腹腔内または筋肉内に投与される。

40

## 【0068】

T790M EGFR変異を含む腫瘍を有する対象の同定は、対象の腫瘍細胞試料（例えば、生検）中のゲノムDNA、またはその試料から調製されるEGFRをコードするcDNAの分析などによる（例えば、PCRおよび配列決定による）当技術分野で周知の方法を用いて達成することができる。

## 【0069】

有用な $E_{rb}B3$ 阻害剤は、PI3K/AKTシグナル伝達を阻害するものである。実施例に詳細に記載するアッセイなどの、 $E_{rb}B3$ 阻害剤のPI3K/AKTシグナル伝達を阻害する能力を評価するための方法は、当技術分野で周知である。

50

## 【0070】

対象に投与する  $E_{rb}B_3$  阻害剤は、抗  $E_{rb}B_3$  抗体、例えば、配列番号 1 および配列番号 2 にそれぞれ示される  $V_H$  配列および  $V_L$  配列を含む MM-121 を含んでよく、またはこの  $E_{rb}B_3$  阻害剤は、配列番号 3 ~ 5 にそれぞれ示される  $V_H$  CDR 1 配列、 $V_H$  CDR 2 配列および  $V_H$  CDR 3 配列、ならびに配列番号 6 ~ 8 にそれぞれ示される  $V_L$  CDR 1 配列、 $V_L$  CDR 2 配列および  $V_L$  CDR 3 配列（すなわち、MM-121 の  $V_H$  CDR および  $V_L$  CDR）を含む抗体であってよい。さらなる限定されない代表的な抗  $E_{rb}B_3$  抗体および  $E_{rb}B_3$  阻害剤の他の形態については、上記のサブセクション I に詳細に記載されている。

## 【0071】

10

別の実施形態では、対象に投与する EGFR 阻害剤は、上記サブセクション II に詳細に記載したような抗 EGFR 抗体を含む。別の実施形態では、対象に投与する EGFR 阻害剤は、上記のサブセクション II に詳細に記載したような EGFR シグナル伝達の小分子阻害剤を含む。

## 【0072】

20

本明細書に開示する方法は、本方法が用いられる疾患は典型的には癌であるが、かかる耐性が観察される、基本的に全ての疾患または障害における  $E_{rb}B$  経路阻害剤に対する耐性の克服に使用するのに適する。耐性が EGFR 阻害剤である状況では、この癌は、典型的には、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、結腸直腸癌、頭頸部癌および肺癌からなる群から選択される。耐性が HER2 阻害剤に対する状況では、この癌は、典型的には乳癌である。

## 【0073】

30

## IV. 医薬組成物

別の態様では、本明細書に提供する方法で使用できる医薬組成物、すなわち、 $E_{rb}B$  経路阻害剤に対する耐性を克服するための医薬組成物を提供する。これらの医薬組成物は、典型的には、（上記のセクション I に詳細に記載したような） $E_{rb}B_3$  阻害剤、（上記のセクション II に詳細に記載したような） $E_{rb}B$  経路阻害剤および医薬担体を含む。 $E_{rb}B_3$  阻害剤および  $E_{rb}B$  経路阻害剤は、単一組成物中に医薬担体と共に製剤化することができる。もう 1 つの方法として、この  $E_{rb}B_3$  阻害剤は、医薬担体と共に製剤化されて第 1 の組成物を形成することができ、この  $E_{rb}B$  経路阻害剤は、医薬担体と共に製剤化されて第 2 の組成物を形成することができ、この第 1 の組成物および第 2 の組成物を一緒に包装することができる。さらに、この医薬組成物は、例えば、 $E_{rb}B$  経路阻害剤に対する耐性を克服するために、この組成物の使用説明書を含むことができる。

## 【0074】

40

本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」には、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、ならびに生理学的に適合性のある他の賦形剤が含まれる。好ましくは、この担体は、非経口投与、経口投与、または局所投与に適する。投与経路に依存して、活性化合物、例えば、小分子または生物製剤は、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護する物質でコーティングしてもよい。

## 【0075】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、および無菌の注射可能な溶液もしくは分散液の即時調製のための無菌粉末、ならびに錠剤、丸剤、およびカプセル剤などの調製用の従来の賦形剤が含まれる。薬学的に活性のある物質の製剤化のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当技術分野で知られている。任意の従来の媒体または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除き、本明細書に開示する医薬組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性化合物も、この組成物に組み込むことができる。

## 【0076】

50

薬学的に許容される担体には、薬学的に許容される抗酸化剤が含まれ得る。薬学的に許容される抗酸化剤の例としては、（1）アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリ

ウム、二亜硫酸ナトリウム、および亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤、(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、および-トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤、ならびに(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、およびリン酸などの金属キレート剤が挙げられる。

#### 【0077】

本明細書に開示する医薬組成物に用いることができる適切な水性担体および非水性担体の例としては、水、エタノール、(グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレン glycol など)ポリオール、およびそれらの適切な混合物、オリーブ油などの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散液の場合には必要な粒径の維持によって、かつ界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール類、または塩化ナトリウムを、組成物中に含めることが有用である。注射用組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによってもたらされ得る。

10

#### 【0078】

これらの組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などの機能性賦形剤を含んでもよい。

20

#### 【0079】

治療用組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌であり、非発熱性であり、かつ安定でなければならない。この組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、または高い薬物濃度に適する他の秩序構造として製剤化することができる。

30

#### 【0080】

無菌の注射可能な溶液は、上記に列挙した成分の1つまたは複数の組合せを、適切な溶媒中に必要量の活性化合物を組み込み、その後、必要に応じて、滅菌、例えば、精密濾過によって調製することができる。一般に、分散液は、塩基性分散媒体および上記に列挙したものからの必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合には、調製の代表的な方法は、有効成分と、その予め滅菌濾過した溶液由来の任意のさらなる所望の成分の粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥(freeze-drying)(凍結乾燥(frozen desiccation))である。

30

#### 【0081】

微生物の存在の防止は、上記の滅菌手順、ならびに様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、およびソルビン酸などを含めることの両方によって確実にすることができる。

40

#### 【0082】

本明細書に開示する医薬組成物は、本明細書に記載のerbB3阻害剤およびerbB経路阻害剤以外の他の薬剤と組み合わせて投与することもできる。例えば、併用療法には、erbB3阻害剤およびerbB経路阻害剤、ならびに、当技術分野で知られる1つまたは複数の化学療法剤などの少なくとも1つまたは複数の追加の治療剤との組み合わせが含まれ得る。本明細書に開示する医薬組成物およびその組み合わせは、放射線療法および/または外科手術と組み合わせて投与することもできる。

#### 【0083】

投薬計画は、最適な所望の反応(例えば、治療反応)を提供するように調整される。例えば、単一のボーラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を経時に投与してもよく、または治療状況の緊急性に応じて、投与量を比例的に減少または増加させることができる。

#### 【0084】

投与および用量の均一性を容易にするために、本明細書に開示する非経口組成物を投与

50

単位形態で製剤化することが特に都合がよい。本明細書で使用する投与単位形態は、治療される対象のための単位投与量として適する物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な医薬担体と共同で所望の治療効果が生じるように計算された所定量の活性化合物を含む。投与単位形態の仕様は、(a)活性化合物のユニークな特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに(b)個体の感受性の治療のためにかかる活性化合物を配合する際の、当技術分野に特有の制限によって指示され、それらに直接依存する。

#### 【0085】

本明細書に提供する医薬組成物中の有効成分の実際の投薬レベルは、患者に毒性がなく、特定の患者、組成物、および投与方法に求められる治療反応を達成するのに有効な有効成分量が得られるように変えることができる。

10

#### 【0086】

本明細書で使用する「非経口投与」および「非経口投与する」という語句は、経腸投与および局所投与以外の、通常は注射による投与方法を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内への注射ならびに注入を含むがこれらに限定されない。

#### 【0087】

活性化合物は、滅菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要とされ得る任意の保存剤、緩衝剤、または噴射剤と混合されてもよい。

20

#### 【0088】

本明細書に提供する化合物をヒトまたは動物に医薬品として投与する場合、それらは、単独で、または、例えば、薬学的に許容される担体と組み合わせて、0.001~90%（例えば、0.005~70%もしくは0.01~30%）の有効成分を含む医薬組成物として与えることができる。

#### 【0089】

以下の実施例は、上記の開示をさらに限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に引用するそれぞれのおよび全ての特許出願および特許公開ならびに発行された特許は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【実施例】

#### 【0090】

パートI：ErbB経路阻害剤に対する耐性を克服するための抗ErbB3抗体の使用  
実施例1：MM-121は、ErbB3のリガンド誘導性活性化を阻止する

30

この実施例では、ErbB3リン酸化およびシグナル伝達のリガンド誘導性活性化を阻害する抗ErbB3モノクローナル抗体MM-121（Ab#6、米国特許第7,846,440号に開示されている）の能力を、一連のインビトロ実験で調べた。

#### 【0091】

ELISA法により測定されるインビトロシグナル伝達試験

実験の第1のセットにおいて、米国立癌研究所の発達治療プログラム（Developmental Therapeutics Program）から入手した3種類の癌細胞株であるACHN（腎細胞腺癌、ATCC（登録商標）#CRL-1611（商標））、DU145（前立腺癌、ATCC（登録商標）#HTB-81（商標））およびOVCA-R8（卵巣腺癌、ATCC（登録商標）#HTB-161（商標））の細胞株を、96ウェルプレートに1ウェル当たり35,000細胞で播種し、一晩増殖させた（維持培地は、10%ウシ胎児血清、2mMのL-グルタミン、およびPen-Strepを補充したRPMI-1640培地であり、細胞は、5%CO<sub>2</sub>、95%空気、37°の加湿雰囲気中で成長させた）。細胞を、20~24時間の血清飢餓により同調させた。次いで、これらの細胞を、30分間、MM-121の2mMから7.6pMの範囲の4倍段階希釈物でプレインキュベートした。次いで、これらの細胞を、10分間、25nMのヘレグリン（HRG）-1ベータで刺激し、冷PBSで1回洗浄し、MPER溶解緩衝液（Pierce Chemical社）に溶解した。

40

50

## 【0092】

細胞溶解物のELISA分析のために、ErbB1 (R&D Systems社、AF231)、ErbB2 (R&D Systems社、MAB1129)、ErbB3 (R&D Systems社、MAB3481) およびAKT (Upstate社、05-591MG) に対する捕捉抗体を、室温で一晩、384ウェルの黒色平底ポリスチレン高結合プレート (Corning社、3708) 中でインキュベートした。ELISAを、一時間、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の2%ウシ血清アルブミン (BSA) でブロックし、次いで、室温で2時間、2%BSA、0.1%Tween-20 およびPBSで希釈した溶解物とインキュベートした。インキュベーションステップの間に、プレートを、PBS中0.5%のTween-20で3回洗浄した。リン酸化ErbB1、リン酸化ErbB2 およびリン酸化ErbB3 を測定するELISAを、2時間、リン光体チロシン西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合モノクローナル抗体 (R&D Systems社、HAM1676) とインキュベートした。リン光体AKTを測定するELISAを、2時間、セリン473特異的抗リン酸化AKTマウスモノクローナル1次抗体 (Cell Signaling Technologies社、5102) とインキュベートし、次いで、30分間、ストレプトアビシン-HRP (DY998) とインキュベートした。全てのELISAを、スーパーシグナル (SuperSignal (登録商標)) ELISAピコ化学発光基質 (ELISA Pico Chemiluminescent Substrate) (Pierce社、カタログ番号37069) で可視化し、発光シグナルを、ルミノメーターを用いて測定した。

10

20

30

## 【0093】

細胞溶解物のELISA分析を、図1に示すグラフにまとめる。このデータは、MM-121を含まない25nMのHRG対照と比較して、MM-121が、HRGに誘導されるErbB3、AKT およびERKのリン酸化を阻害することを示す。阻害剤のIC<sub>50</sub>値を、シグモイド曲線 (グラフパッドプリズム (GraphPad Prism (登録商標))、GraphPad Software社、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州) を用いて用量反応データを最小二乗適合により計算した。多くの場合に、MM-121を用いたpErbB3、pAKT およびpERKの最大阻害は、刺激していない対照細胞によって測定されるシグナル伝達の基礎レベル近くまたはそれ以下で生じた。したがって、図1の結果は、ACHN、Dul45 およびOVCAR8 細胞において、MM-121が、ErbB3ならびに下流のAKT およびERKのリン酸化を刺激するヘレグリンの能力を阻止し、非刺激細胞と同等またはそれ以下までシグナル伝達レベルを低下させたことを示す。

40

## 【0094】

実施例2：MM-121は、EGFR野生型非小細胞肺癌のインビトロモデルにおいて、エルロチニブに対する耐性を克服する

## 方法

以下の9種類の非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株を、アメリカン・タイプ・カルチャーコレクションから入手した：A549 (ATCC (登録商標) # CCL-185 (商標))、EKVX (NCI vial 0502454)、NCI-H2170 (ATCC (登録商標) # CRL-5928 (商標))、NCI-H2347 (ATCC (登録商標) # CRL-5942 (商標))、NCI-H322M (ATCC (登録商標) # CRL-5806 (商標))、NCI-H358 (ATCC (登録商標) # CRL-5806 (商標))、NCI-H441 (ATCC (登録商標) # HTB-174 (商標))、NCI-H661 (ATCC (登録商標) # HTB-183 (商標)) およびSW-900 (ATCC (登録商標) # HTB-59 (商標))。これらの細胞株は、それらのEGFR遺伝子内に変異を有しておらず、3つの異なる組織学的サブタイプを表す (以下の表Xを参照)。Ras変異を有する細胞を示す。

40

## 【0095】

細胞を、96ウェルの3次元培養系 (低結合性ナノカルチャー (Nanoculture (登録商標)) プレート、Scivax社)において、1ウェル当たり5,000細胞

50

で播種し、10%ウシ胎児血清およびPen-Strepを補充した RPMI-1640 培地中で、37℃で増殖させた。スフェロイドを形成した後の48時間後に、血清を2%まで低下させ、細胞を37℃で6日間、リガンドおよび薬物と共にインキュベートした。次いで、相対生細胞密度を、セルタイター(CellTiter)Glo(登録商標)試薬(Promega社)を用いて測定した。

## 【0096】

2セットの実験を行った。第1のセットにおいて、細胞を、EGF(10nM)で処理するか、ヘレグリン1-1(HRG)(10nM)で処理するか、2種類のリガンドのプール(各リガンド10nM)で処理するか、または外因性リガンドを含めないか、エルロチニブ(1μM)で処理するか、MM-121(1μM)で処理するか、これらの2種類の薬物(各薬物1μM)の組み合わせで処理するか、または薬物を含めないで処理した。実験の第2のセットにおいて、細胞を、10nMのヘレグリン1-1の非存在下または存在下のいずれかで、かつ1μMのMM121の非存在下または存在下のいずれかで、0~10μMの範囲の用量のエルロチニブで処理した。

10

## 【0097】

(表1) EGFR野生型NSCLC細胞株

細胞株	EGFRの変異状態	K-Ras/H-Ras/N-Rasの変異状態	組織学的サブタイプ
A549	野生型	K-Ras G12S	腺癌
EKVK	野生型	WT	腺癌
H2170	野生型	WT	扁平上皮癌
H2347	野生型	N-Ras Q61R	腺癌
H322M	野生型	WT	腺癌
H358	野生型	K-Ras G12C	腺癌
H441	野生型	K-Ras G12V	腺癌
H661	野生型	WT	大細胞癌
SW-900	野生型	K-Ras G12V	扁平上皮癌

20

30

## 【0098】

## 結果

エルロチニブ(タルセバ(登録商標))は、非小細胞肺癌患者の治療に適応され、EGFR変異を保有する腫瘍を有する患者に有効であることが示されているが、診療所において、野生型EGFRを有する腫瘍を有する患者は、エルロチニブに対する反応速度が低いことが示されており、EGFR治療中の一部の患者は、新しいT790M変異の出現により耐性を発現する(Hammerman et al., (2009) Clinical Cancer Research 15(24), 7502-7509)。インビトロで、EGFR野生型NSCLC細胞株は、実質的にエルロチニブに対する感受性が低く、EGFR活性化変異を保有する細胞株よりもG150が数ケタ分高い。Ras癌遺伝子の活性化変異(H-Ras、N-Ras、およびK-Ras)が、肺癌、特に、肺腺癌におけるK-Ras変異と関連することも示されている。腺癌以外のNSCLCサブタイプが、臨床試験においてエルロチニブに対する反応の乏しさと相關することも見出されている。

40

## 【0099】

複数の組織学的サブタイプを有するEGFR野生型NSCLC細胞において、エルロチニブに対する耐性を克服することにおけるMM-121の有効性を実証するために、MM-121を、腺癌、扁平上皮癌、または大細胞癌の組織学的サブタイプを有する9種類のEGFR野生型NSCLC細胞株において試験した。これらの細胞株は、表1に示すRa

50

s 癌遺伝子について野生型であるか、またはK - R a s 変異もしくはN - R a s 変異を有する。

【 0 1 0 0 】

5種類の細胞株を、それぞれスフェロイドとして成長させ、上記のとおり、上皮成長因子( E G F )、ヘレグリン1 - 1 ( H R G )、リガンドのプール( E G F + H R G )で処理するか、または外因性リガンドで処理しないか( 培地 )、エルロチニブ、MM - 1 2 1 、エルロチニブとMM - 1 2 1 の組み合わせで処理するか、または薬物を含めないで処理した。次いで、腫瘍サイズを、生細胞密度を測定することによって決定した。図2に示すとおり、エルロチニブは、外因性リガンドの非存在下およびE G F の存在下で細胞の成長を阻害したが、H R G の存在下で成長した細胞の成長阻害には効果的ではなかった。MM - 1 2 1 とエルロチニブの組み合わせは、いくつかの細胞株において、E G F 刺激細胞の細胞成長を阻害するのにより効果的であったが、MM - 1 2 1 は、H R G 刺激細胞においてエルロチニブに対する細胞の感受性を大幅に向上させることができた。このことは、腺癌細胞株N C I - H 3 2 2 M ( 図2 A )、E K V X ( 図2 B )、A 5 4 9 ( 図2 C )、H 3 5 8 ( 図2 D )、および扁平上皮細胞株S W - 9 0 0 ( 図2 E )を含む試験した全ての細胞スフェロイドについて当てはまった。K - R a s 遺伝子の変異状態は、エルロチニブに対する細胞の感受性の増加におけるMM - 1 2 1 の有効性に影響を与えたなかった。

10

【 0 1 0 1 】

次いで、8種類の細胞株を、上記のとおり、それぞれスフェロイドとして成長させ、ヘレグリン - 1 - 1 ( H R G )の非存在下または存在下のいずれかで、かつMM - 1 2 1 の非存在下または存在下のいずれかで、0 ~ 1 0  $\mu$  Mの範囲の用量のエルロチニブで処理した。図3に示すとおり、エルロチニブは、高濃度を除き、H R G 刺激細胞における細胞成長を阻害することができなかったが、MM - 1 2 1 の添加により、H R G の存在下で、エルロチニブに対するスフェロイドの感受性を回復することができた。このことは、腺癌細胞株N C I - H 3 2 2 M ( 図3 A )、E K V X ( 図3 B )、A 5 4 9 ( 図3 C )、N C I - H 3 5 8 ( 図3 D )、N C I - H 4 4 1 ( 図3 E )、N C I - H 2 3 4 7 ( 図3 F )、扁平上皮癌細胞株N C I - H 2 1 7 0 ( 図3 G )、および大細胞癌細胞株N C I - H 6 6 1 ( 図3 H )を含む、試験した全ての細胞スフェロイドについて当てはまった。K - R a s 遺伝子の変異状態は、エルロチニブに対する細胞の感受性の増加におけるMM - 1 2 1 の有効性に影響を与えたなかった。

20

30

【 0 1 0 2 】

これらの結果は、H R G 媒介シグナル伝達が、E G F R 野生型細胞におけるエルロチニブに対する耐性に役割を果たし得ることを示す。これらのデータは、さらに、MM - 1 2 1 が、併用療法においてエルロチニブに対する腫瘍細胞の感受性を回復するのに有効であることを示す。

【 0 1 0 3 】

実施例3：インビトロでのヒト卵巣癌細胞におけるp A K T 生成の阻害

材料および方法

A 2 7 8 0 ヒト卵巣癌細胞株は、もともと未治療患者の腫瘍組織から樹立された。A 2 7 8 0 c i s 細胞株は、シスプラチニン耐性である( カタログ番号9 3 1 1 2 5 1 7 、S i g m a 社 )。A 2 7 8 0 c i s 細胞株は、シスプラチニンの濃度の増加に親シスプラチニン感受性A 2 7 8 0 細胞株( カタログ番号9 3 1 1 2 5 1 9 、S i g m a 社 )を慢性曝露することによって作られた。A 2 7 8 0 c i s は、メルファラン、アドリアマイシンおよび照射に対して交叉耐性を示す。耐性を維持するために、接着後、2 ~ 3 繼代ごとにシスプラチニンを培地に添加する。

40

【 0 1 0 4 】

シスプラチニンに対する耐性を、72時間、段階希釈したシスプラチニン( 0 . 0 1 ~ 1 0  $\mu$  )でA 2 7 8 0 細胞およびA 2 7 8 0 c i s 細胞を処理することによって確認した。細胞生存率を、製造業者の説明書に従って、セルタイターグロアッセイ( C e l l T i t e r G l o a s s a y ) ( カタログ番号G 7 5 7 0 、P r o m e g a 社 )を用いて

50

測定する。

【0105】

A K T 経路に対するシスプラチニの効果を、1時間、4時間、24時間または72時間、インビトロでシスプラチニの用量範囲(0.1~10μ)で感受性細胞(A2780)および耐性細胞(A2780cis)を処理することによって決定する。インキュベーション後、細胞溶解物を調製し、ウェスタンプロットによりpAKT(ser473)(カタログ番号9271、Cell Signaling Technologies社)について分析する。

【0106】

A K T 経路に対するMM-121の効果を、1時間、4時間、24時間または72時間、インビトロでMM-121の用量範囲(0.01~1μ)で感受性細胞(A2780)および耐性細胞(A2780cis)を処理することによって決定する。インキュベーション後、細胞溶解物を調製し、ウェスタンプロットによりpAKT(ser473)(カタログ番号9271、Cell Signaling Technologies社)について分析する。

【0107】

結果

シスプラチニ処理に対する細胞株A2780cisの耐性を、上記の方法またはそれを少し改良した方法により評価した。耐性A2780cis細胞および感受性A2780細胞を播種し、段階希釈したシスプラチニ(0.01~10μ)で、インビトロで72時間処理した。細胞生存率は、ATPを定量化することにより代謝的に活性のある細胞を測定するセルタイターグロッセイによって測定した。図4に示すとおり、A2780cis細胞は、感受性株A2780よりもはるかに高い生存率(培地対照に対する割合として示す)を有した。

【0108】

インビトロでAKT経路に対するシスプラチニの効果を特徴付けるために、A2780細胞およびA2780cis細胞を、上記のとおり、1時間、4時間(A2780cisのみ)、24時間、または72時間、シスプラチニの用量範囲で処理した。シスプラチニに対して感受性を示す細胞は、特に、処理の24時間後および/または高シスプラチニ濃度(10μ)でpAKT生成の減少を示したが(図8A)、シスプラチニ耐性細胞は、pAKT生成に影響を示さなかった(図8B)。図8Cに示すとおり、これらの細胞は、MM-121での処理後、AKTリン酸化の減少を示した。A2780cis細胞を、上記のとおり、1時間、4時間、24時間または72時間、MM-121の用量範囲で処理した。細胞は、全ての用量レベルでpAKT生成の漸減、および経時的増加を示した。

【0109】

実施例4: MM-121は、インビトロでヒト卵巣癌細胞株におけるシスプラチニ耐性を救出する

MM-121が、インビトロでA2780cis細胞のシスプラチニ耐性表現型を救出することができるかどうかを決定するために、耐性A2780cis細胞および感受性A2780細胞を上記のとおり播種し、シスプラチニ、MM-121、またはそれらの組み合わせの用量範囲で1時間、4時間、24時間、または72時間処理した。細胞溶解物をpAKTについてウェスタンプロットによって分析する。シスプラチニに対して感受性を示す細胞は、シスプラチニおよびMM-121での処理後にpAKTレベルの減少を示し、かつシスプラチニとMM-121の両方で処理した細胞については、pAKTのさらなる大幅な減少を示す。シスプラチニに対して耐性を示す細胞は、シスプラチニでの処理後にpAKTの減少を示さず、かつMM-121での処理後にpAKTの適度な量の減少を示す。MM-121とシスプラチニの組み合わせで処理したA2780cis細胞は、MM-121単独で処理した細胞よりも治療後にpAKTの量の大幅な減少を示し、このことは、PI3K/AKTシグナル伝達の阻害およびシスプラチニに対する感受性の回復における相加効果を示唆する。

10

20

30

40

50

## 【0110】

パートII : E r b B 経路阻害剤に対する耐性を克服するための二重特異性抗E r b B 3, 抗E r b B 2抗体の使用

## 方法

## インビトロ乳癌モデル

B T 4 7 4 - M 3 細胞 (N o b l e , C a n c e r C h e m o t h e r . P h a r m a c o l . 2 0 0 9 6 4 : 7 4 1 - 5 1 参照) を、5 n M のヘレグリンの存在下または非存在下で、ラパチニブ、トラスツズマブまたはM M - 1 1 1 の用量範囲で処理する。生存細胞を、処理の6日後に数える。A K T リン酸化の阻害に対するラパチニブまたはトラスツズマブと組み合わせたM M - 1 1 1 の効果を、ヘレグリン刺激B T 4 7 4 - M 3 細胞において、用量範囲にわたって評価する。

10

## 【0111】

## インビボ乳癌異種移植モデル

B T 4 7 4 - M 3 細胞 (1匹のマウスあたり $2 \times 10^7$ 細胞) を、N u / N u 免疫不全マウスに皮下接種し、実験前日に、エストロゲンペレット (0.72 m g ; 60日放出) を移植する。腫瘍を7日後に測定し、マウスを4群に無作為化する：これらを、プラセボ、M M - 1 1 1 (66 m g / k g, q 7 d) 、ラパチニブ (150 m g / k g, q 1 d) 、またはM M - 1 1 1 とラパチニブの組み合わせで治療する。腫瘍を週に2回測定し、実験を40日で終了する。B T 4 7 4 - M 3 乳房腫瘍異種移植モデルも、M M - 1 1 1 (3 m g / k g, q 3 d) 、トラスツズマブ (1 m g / k g, q 7 d) またはこれらの用量の両薬物の組み合わせで治療する。

20

## 【0112】

## トラスツズマブ耐性細胞株の開発

トラスツズマブ耐性細胞を樹立するために、B T 4 7 4 - M 3 細胞を、6ヶ月間、100 n M のトラスツズマブを有するR P M I 1 6 4 0 培地中で培養し、2ヶ月間、200 n M のトラスツズマブを有するR P M I 1 6 4 0 培地中で培養し、その後、用量レベルを500 n M まで増加する。細胞を定期的に細胞増殖についてアッセイし、トラスツズマブに対する耐性レベルを確認する。

30

## 【0113】

## 細胞増殖アッセイ

B T 4 7 4 - M 3 の親細胞 (野生型) およびトラスツズマブ耐性細胞を、96 ウェルプレート (3 0 0 0 細胞 / ウェル) に播種する。一晩インキュベーションした後、細胞をトラスツズマブまたはM M - 1 1 1 の一連の希釈物で処理する。治療の5日後、細胞生存率を、製造業者の説明書に従って、W S T - 1 (R o c h e 社、カタログ番号5 0 1 5 9 4 4 0 0 1) によって測定する。対照 (10% F B S を有するR P M I 1 6 4 0) で処理した細胞を100%として設定し、他の処理物を、対照に対する割合として表す。

30

## 【0114】

## フローサイトメトリー分析

B T 4 7 4 - M 3 の親細胞およびトラスツズマブ耐性細胞上の受容体の状態を決定するために、細胞をトリプシン処理し、F A C S 緩衝液で洗浄する。次いで、細胞を、4で1時間、アレクサフルオル (A l e x a F l u o r (登録商標)) 6 4 7 標識マウス抗E r b B 2 抗体 (バイオレジェンド (B i o L e g e n d (登録商標)) カタログ番号3 2 4 4 1 2) 、セツキシマブ抗体 (抗E G F R) 、およびB 1 2 抗体 (抗E r b B 3) でインキュベートする。F A C S 緩衝液で洗浄後、細胞をF A C S C a l i b u r (商標) (B D b i o s c i e n c e 社) により分析した。

40

## 【0115】

## スフェロイドアッセイ

B T 4 7 4 - M 3 の野生型細胞およびトラスツズマブ耐性細胞 (2 0 0 0 細胞 / ウェル) を、超低クラスター (U l t r a L o w C l u s t e r) 96 ウェルプレート (コースター (C o s t a r (登録商標)) 、C o r n i n g 社、ニューヨーク州) に播種す

50

る。一晩インキュベーションした後、トラスツズマブまたはMM-111の一連の希釈物をプレートに導入する。細胞を6日間培養する。次いで、スフェロイドをニコン顕微鏡で調べ、MetaMorph(登録商標)画像解析ソフトウェア(Molecular Devices社)により分析する。10%FBSを含む培地で培養した細胞のスフェロイドサイズを、対照として設定する。

【0116】

実施例5：Her2指向薬剤のトラスツズマブおよびラパチニブの活性は、ヘレグリン刺激Erbb3シグナル伝達によって減弱するが、MM-111は活性を保持する

ヘレグリン存在下でのMM-111、ラパチニブおよびトラスツズマブの細胞増殖を阻害する能力を試験した。基底条件下では、ラパチニブ(図6A)、トラスツズマブ(図6B)およびMM-111(図6C)は、BT474-M3細胞増殖を、それぞれ、50%、32%および24%阻害することが見出された。細胞を、5nMのヘレグリン存在下で培養した時、ラパチニブとトラスツズマブの両方の効果が減少し、その結果、細胞増殖阻害は、それぞれ、23%および9%まで減少した。逆に、MM-111による腫瘍細胞成長の阻害は、ヘレグリンが存在する場合には保持され、33%の成長阻害が観察された。

【0117】

実施例6：ラパチニブまたはトラスツズマブへのMM-111の添加は、pAkt阻害を増加させる

MM-111とラパチニブの組み合わせまたはMM-111とトラスツズマブの組み合わせのインビボでAktリン酸化(活性化)を阻害する能力を調べた。ラパチニブ単独では、ヘレグリン存在下でAktのリン酸化を阻害するが、MM-111とラパチニブの組み合わせは、治療的に適切な濃度で、基底レベルをはるかに下回るほどAktリン酸化を非常に効果的に阻害することが見出された(図7A)。トラスツズマブは、ヘレグリン刺激後に、Aktリン酸化を阻害しなかった(図7B)。しかし、トラスツズマブにMM-111を添加すると、ほぼ基底レベルまでpAktを阻害するトラスツズマブ単独について観察されたヘレグリン刺激Aktリン酸化の阻害を改善し、このことは、この組み合わせの相加効果を示唆した(図7B)。

【0118】

実施例7：ラパチニブまたはトラスツズマブへのMM-111の添加は、インビボ活性を増強する

トラスツズマブとMM-111の組み合わせまたはラパチニブとMM-111の組み合わせについて、BT474-M3乳癌異種移植モデルを用いてインビボで調べた。MM-111(3日ごとに3mg/kgを投与)およびトラスツズマブ(毎週1mg/kgを投与)の準最適単剤療法用量を、単剤療法群および併用療法群間の全ての活性の違いの観察を可能にする組み合わせ実験のために選択した。マウスにおける各薬剤の異なる薬物動態学的特性により、3日ごとに3mg/kgで投与したMM-111は、週用量の1mg/kgのトラスツズマブと同様の暴露をもたらした。3mg/kgのMM-111および1mg/kgのトラスツズマブの組み合わせで投与した群における腫瘍成長阻害は、MM-111単独およびトラスツズマブ単独に比べてより強力であり、統計的有意性に達した。さらに、完全縮小が観察されない単剤療法治療群と比較して、併用治療により完全縮小した腫瘍の数の増加が観察された(図8A)。MM-111およびラパチニブを、それぞれ、毎週および毎日、最適有効用量で投与した。MM-111およびラパチニブの組み合わせは、いずれかの薬物単独と比較してより高い効力をもたらした(図8B)。

【0119】

実施例8：MM-111は、トラスツズマブ耐性細胞株において活性がある

野生型BT474-M3細胞株およびトラスツズマブ耐性BT474-M3細胞株における受容体の状態を決定するために、フローサイトメトリー分析を行った。野生型細胞またはトラスツズマブ耐性細胞を、アレクサフルオル(登録商標)647で標識したマウスの抗Erbb2抗体、抗セツキシマブ抗体(抗EGFR)、または抗B12抗体(抗Erbb3)で染色した。トラスツズマブ耐性細胞では、Erbb2レベル(図9A)がわず

10

20

30

40

50

かに減少したが、EGFR（図9B）およびErbb3（図9C）は変わらなかった。

【0120】

トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞増殖の阻害におけるMM-111の有効性を決定するために、親の野生型BT474-M3細胞およびトラスツズマブ耐性BT474-M3細胞を、MM-111またはトラスツズマブのいずれかの一連の希釈物で上記のとおり処理した。トラスツズマブは、親細胞における細胞増殖を著しく阻害するが、その阻害効果は、トラスツズマブ耐性細胞において著しく減少した（図10A）。対照的に、MM-111は、親細胞およびトラスツズマブ耐性細胞の両方において同様の阻害活性を維持し（図10B）、したがって、MM-111は、トラスツズマブへの反復暴露後に、細胞によって発達した耐性機構を回避することができることを示した。

10

【0121】

MM-111のトラスツズマブ耐性細胞における細胞成長を阻害する能力をさらに調べるために、親の野生型BT474-M3細胞およびトラスツズマブ耐性BT474-M3細胞の多細胞スフェロイドを、上記の方法またはその少し改良した方法を用いて調製し、MM-111またはトラスツズマブのいずれかの一連の希釈物で処理した。トラスツズマブの阻害効果は、トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞で減少したが、BT474-M3親細胞のスフェロイド成長を著しく阻害した（図11A）。対照的に、MM-111は、トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞および野生型BT474-M3細胞の両方のスフェロイド成長を著しく減少させた（図11B）。野生型細胞におけるその阻害活性と比較した時、トラスツズマブ耐性細胞におけるその阻害活性がわずかに改善された。

20

【0122】

前述の実施例のデータは、MM-111が、トラスツズマブに対する耐性を発現した細胞における細胞成長を阻害するのに有効であることを示す。

【0123】

実施例9：トラスツズマブではなくMM-111が、トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞における抗EGFR治療薬と組み合わさる

EGFR阻害剤と組み合わせる場合に、細胞成長を阻害するMM-111およびトラスツズマブの能力を比較するために、トラスツズマブ耐性BT474-M3細胞のスフェロイドを上記の方法を用いて調製し、300nMのエルロチニブ（図12A）または100nMのゲフィチニブ（図12B）のいずれかの存在下で、MM-111およびトラスツズマブの一連の希釈物で処理した。図12Aおよび12Bに示すとおり、トラスツズマブではなくMM-111をエルロチニブまたはゲフィチニブと組み合わせることで、トラスツズマブ耐性細胞スフェロイドにおける細胞成長を低減することができた。これらのデータは、MM-111とEGFR阻害剤の組み合わせが、トラスツズマブに対する耐性を発現した細胞における細胞成長を阻害するのに有効であることを示す。さらに、EGFR阻害剤とトラスツズマブの組み合せは、これらの細胞の耐性を克服するのに十分ではなかった。

30

【0124】

実施例10：ヘレグリンの存在下または非存在下での、BT474-M3腫瘍異種移植片におけるMM-111、ラバチニブおよびタモキシフェンとの併用療法  
方法

40

GFPを発現するように遺伝子操作した $1.5 \times 10^6$ 個のBT474-M3細胞（BT474-M3-GFP）またはGFPおよびヘレグリン1を発現するように遺伝子操作した $1.5 \times 10^6$ 個のBT474-M3細胞（BT474-M3-GFP-HRG）を、エストロゲン（60日の徐放性生分解性担体中の17-エストラジオール0.72mg）を補充したメスのNCr/NU-マウス（Taconic Farms社）の乳腺脂肪体に移植した。腫瘍体積が、平均 $516 \text{ mm}^3$ （腫瘍移植後17日目のBT474-M3-GFP-HRG）または $422 \text{ mm}^3$ （腫瘍移植後20日目のBT474-M3-GFP）に達した時に、マウスを、10~15匹の8群に分けた。これらの群を治療しない（対照）か、MM-111（48mpk q3d i.p.（3日ごとに腹腔内投与））、ラ

50

パチニブ ( 150 m p k q d p . o . ( 毎日経口投与 ) ) 、タモキシフェン ( 60 日の徐放性生分解性担体中の遊離塩基タモキシフェン 5 m g ) 、 MM - 111 とラパチニブ、 MM - 111 とタモキシフェン、ラパチニブとタモキシフェンまたは MM - 111 、ラパチニブならびにタモキシフェンのいずれかで治療した。腫瘍を、デジタル口径測定器を用いて週 2 回測定した。

#### 【 0125 】

研究の最後 ( B T 474 - M 3 - G F P - H R G と B T 474 - M 3 - G F P それぞれについて、治療開始後 21 日目または 25 日目 ) に、腫瘍試料を ( 最後の MM - 111 投与後 24 時間および最後のラパチニブ投与後 6 時間に ) 収集し、目的の、下流のシグナル伝達阻害について分析した。 E r b B 3 および A k t の全タンパク質レベルならびにリン酸化タンパク質レベルを、サスペンションアレイ技術 ( s u s p e n s i o n a r r a y t e c h n o l o g y ) ( L u m i n e x 社 ) によって腫瘍溶解物から分析し、 E r k 1 / 2 の全タンパク質レベルならびにリン酸化タンパク質レベルを、 P C N A を用いるウェスタンプロットにより分析し、結果を標準化した。

10

#### 【 0126 】

##### 結果

インビボでヘレグリン ( H R G ) 刺激細胞の腫瘍成長を低減するための、 MM - 111 併用療法の有効性を実証するために、併用療法を、上記の方法にしたがって、 B T 474 - M 3 - G F P および B T 474 - M 3 - G F P - H R G 異種移植モデルにおいて試験した。図 13 A に示すとおり、 B T 474 - M 3 - G F P および B T 474 - M 3 - G F P - H R G の担癌マウスを、 MM - 111 ( 48 m p k ) 、ラパチニブ ( 150 m p k ) およびタモキシフェン ( 5 m g ) の単剤療法で治療した。腫瘍性の H R G 過剰発現は、タモキシフェンの有効性を改善し、 MM - 111 の有効性をわずかに改善した。次いで、 B T 474 - M 3 - G F P および B T 474 - M 3 - G F P - H R G の担癌マウスを、 MM - 111 ( 48 m p k ) + ラパチニブ ( 150 m p k ) 、および MM - 111 + タモキシフェン ( 5 m g ) 、ならびにラパチニブ + タモキシフェンの併用療法で治療した。図 13 B に示すとおり、腫瘍性 H R G 過剰発現は、 MM - 111 + タモキシフェンの併用療法の有効性をわずかに改善した。次いで、 B T 474 - M 3 - G F P および B T 474 - M 3 - G F P - H R G の担癌マウスを、ラパチニブ + タモキシフェンおよび MM - 111 + ラパチニブ + タモキシフェンの併用療法との組み合わせで治療した。図 13 C に示すとおり、 MM - 111 は、両方の腫瘍モデルにおいて、ラパチニブ + タモキシフェンの併用療法の有効性を大幅に高め、このことは、 MM - 111 が、腫瘍性 H R G 発現にかかわらず、最大抗腫瘍効果に必要であることを示した。

20

#### 【 0127 】

次いで、 B T 474 - M 3 - G F P および B T 474 - M 3 - G F P - H R G の担癌マウス ( それぞれ図 14 の左パネルおよび右パネル ) を、 ( 左から右へ ) 対照 ( 未治療 ) 、 MM - 111 、ラパチニブ、およびタモキシフェンの単剤療法、 MM - 111 + ラパチニブ、 MM - 111 + タモキシフェン、およびラパチニブ + タモキシフェンの 2 つの組み合わせ、ならびに 3 つの組み合わせで治療した。リン酸化 E r b B 3 ( p E r b B 3 ) を示す図 14 A に示すとおり、腫瘍性 H R G 発現により、 E r b B 3 のリン酸化タンパク質レベルが増加し、 p E r b B 3 レベルの低下における MM - 111 単剤療法および MM - 111 併用療法の有効性が高まった。腫瘍性 H R G 発現により、 p E r b B 3 レベルの低下におけるラパチニブおよびラパチニブ + タモキシフェンの活性が減少した。図 14 B に示すとおり、 MM - 111 の単剤療法および MM - 111 の併用療法は、両方の腫瘍モデルにおいて全 E r b B 3 発現を増加させた。 p E r b B 3 と全 E r b B 3 ( t E r b B 3 ) の比を示す図 14 C に示すとおり、 MM - 111 単剤療法および MM - 111 併用療法の両方は、 H R G の存在下でさえ E r b B 3 活性を減少させるが、ラパチニブおよびラパチニブ + タモキシフェンの有効性は、 H R G の存在下で低減した。

30

#### 【 0128 】

リン酸化 A k t ( p A k t 、図 14 D ) と全 A k t ( t A k t または全 A k t 、図 14

40

50

E) の比を示す図 14 F に示すとおり、HRG の腫瘍性発現により、Akt のリン酸化タンパク質レベル / 全タンパク質レベルが増加し、ラパチニブ療法およびラパチニブ + タモキシフェン療法の有効性を減少させたが、MM-111 の単剤療法および併用療法は、HRG の存在下で pAkt 生成の減少に有効であった。

#### 【0129】

リン酸化 ERK (ERKt、図 14 G) と全Akt (全ERK、図 14 H) の比を示す図 14 I に示すとおり、HRG の腫瘍性発現は、ERK1/2 のリン酸化タンパク質レベル / 全タンパク質レベルを増加させ、ラパチニブ療法およびラパチニブ + タモキシフェン療法の有効性を減少させたが、MM-111 の単剤療法および併用療法は、HRG の存在下で pERK 生成の減少に有効であった。

10

#### 【0130】

実施例 11 : NCI - N87 腫瘍異種移植片における ToGA 投薬計画と組み合わせた MM-111

ToGA 研究 (Hoffmann - La Roche 社、Clinical Trials.gov Identifier NCT01041404) は、HER2 陽性進行胃癌患者において、化学療法単独と比較した、化学療法と組み合わせたトラスツズマブの研究であった。その研究では、トラスツズマブを、3 週間毎に、6 mg / kg (負荷用量 8 mg / kg) の静脈内注射として投与した。この化学療法は、フルオロウラシル (3 週間毎に 800 mg / m<sup>2</sup> / 日の静脈内注射) およびシスプラチン (3 週間毎に 80 mg / m<sup>2</sup> の静脈内注射)、またはカペシタビン (3 週間毎に 14 日間は 1 日 2 回、1000 mg / m<sup>2</sup> p.o.) ならびにシスプラチン (3 週間毎に 80 mg / m<sup>2</sup> の静脈内注射) の 6 サイクルの組み合わせからなっていた。トラスツズマブによる治療は、疾患進行まで継続した。この治療計画を、以下の方法に従って、NCI - N87 胃癌異種移植モデルにおいて繰り返した。

20

#### 【0131】

##### 方法

7.5 × 10<sup>6</sup> 個の NCI - N87 細胞 (ATCC (登録商標) カタログ番号 CRL - 5822 (商標)) を、メスの Nu / Nu マウス (Charles River Laboratories 社) の脇腹に皮下移植した。腫瘍体積が平均 325 mm<sup>3</sup> に達した時 (腫瘍移植後 18 日目)、マウスを 8 ~ 35 匹の 4 群に分けた。

30

#### 【0132】

MM-111 を、マウスの初期治療で第 1 の治療としてまたは第 2 の治療として投与し、MM-111 を治療計画に追加した (矢印参照、図 15 A)。これらの群を治療しない (対照) か、トラスツズマブ (3.5 mpk q 3d i.p.) + 5-FU (12 mpk q d、1 週間に 5 回、i.p.)、トラスツズマブ (3.5 mpk q 3d i.p.) + 5-FU (12 mpk q d、1 週間に 5 回、i.p.) + シスプラチン (5 mpk q 7d i.p.) または第 1 の MM-111 (9.6 mpk q 3d i.p.) + トラスツズマブ (3.5 mpk q 3d i.p.) + 5-FU (12 mpk q d、1 週間に 5 回、i.p.) で治療した。腫瘍を、デジタル口径測定器を用いて週 2 回測定した。

40

#### 【0133】

29 日目の継続的な腫瘍成長時に、トラスツズマブ + 5-FU 治療群を、a) トラスツズマブ + 5-FU または b) 第 2 の MM-111 + トラスツズマブ + 5-FU のいずれかを受け取る 2 つの治療群に分けた (矢印参照、29 日目)。同様に、54 日目の継続的な腫瘍成長時に、トラスツズマブ + 5-FU + シスプラチン治療群を、a) トラスツズマブ + 5-FU + シスプラチンまたは b) 第 2 の MM-111 + トラスツズマブ + 5-FU + シスプラチンのいずれかを受け取る 2 つの治療群に分けた (矢印参照、54 日目)。化学療法に起因する毒性の徵候を示した動物によって、シスプラチン投与は 52 日目に中止しなければならず、5-FU 投与は 64 日目に中止しなければならなかった。化学療法の中止を、図 15 A に矢印で示す。

50

## 【0134】

## 結果

図15Aは、上記のとおりに治療したNCI-N87腫瘍の腫瘍成長曲線を示す。図15B～図15Dは、それぞれ、図15Aに示したデータのサブセットを強調したものである。図15Bに示すとおり、トラスツズマブ+5-FUで治療したマウスに与えられる第2の治療としてMM-111を加えると、トラスツズマブ+5-FU単独による治療で進行した腫瘍の腫瘍細胞成長阻害における有効性が増加した。同様に、図15Cに示すとおり、トラスツズマブ+5-FU+シスプラチニンで治療したマウスに与えられる第2の治療としてMM-111を加えると、トラスツズマブ+5-FU+シスプラチニン単独による治療で進行した（治療に抵抗した）腫瘍の腫瘍細胞成長阻害における有効性が増加した。最終的に、図15Dに示したとおり、腫瘍体積が治療の最初から増加したトラスツズマブ+5-FUの併用治療とは対照的に、第1の治療としてトラスツズマブおよび5-FUと組み合わせたMM-111による治療は、治療の最初の60日間、腫瘍成長を防いだ。

## 【0135】

実施例12：NCI-N87腫瘍異種移植片におけるトラスツズマブおよびパクリタキセルと組み合わせたMM-111

## 方法

7.5×10<sup>6</sup>個のNCI-N87細胞を、メスのNu/Nuマウスの脇腹に皮下移植した。腫瘍体積が平均341mm<sup>3</sup>に達した時（腫瘍移植後24日目）、マウスを10匹の4群に分けた。これらの群を治療しない（対照）か、パクリタキセル（20mpk q7d i.p.）、トラスツズマブ（3.5mpk q3d i.p.）+パクリタキセルまたはMM-111（48mpk q3d i.p.）+トラスツズマブ+パクリタキセルで治療した。腫瘍を、デジタル口径測定器を用いて週2回測定した。

## 【0136】

## 結果

図16に示すとおり、トラスツズマブ+パクリタキセルをMM-111と組み合わせると、NCI-N87腫瘍の腫瘍細胞成長阻害における有効性が増加し、パクリタキセル単独およびトラスツズマブ+パクリタキセルとは対照的に継続的な腫瘍退縮が生じ、せいぜい腫瘍鬱血のみを引き起こした。

## 【0137】

実施例13：BT474-M3（±HRG）腫瘍異種移植片におけるMM-111/ラパチニブ/トラスツズマブ

## 方法

GFPを発現するように遺伝子操作した15×10<sup>6</sup>個のBT474-M3細胞（BT474-M3-GFP）またはGFPおよびヘレグリン1を発現するように遺伝子操作した15×10<sup>6</sup>個のBT474-M3細胞（BT474-M3-GFP-HRG）を、エストロゲン（60日の徐放性生分解性担体中の17-エストラジオール0.72mg）を補充したメスのNCR/Nuマウスの乳腺脂肪体に移植した。腫瘍体積が、平均286mm<sup>3</sup>（腫瘍移植後14日目のBT474-M3-GFP-HRG）または305mm<sup>3</sup>（腫瘍移植後16日目のBT474-M3-GFP）に達した時に、マウスを8匹の8群に分けた。これらの群を治療しない（対照）か、MM-111（48mpk q3d i.p.）、ラパチニブ（150mpk qd p.o.）、トラスツズマブ（3.5mpk q3d i.p.）、MM-111+ラパチニブ、MM-111+トラスツズマブ、ラパチニブ+トラスツズマブまたはMM-111+ラパチニブ+トラスツズマブで治療した。腫瘍を、デジタル口径測定器を用いて週2回測定した。

## 【0138】

## 結果

BT474-M3-GFP担癌マウスおよびBT474-M3-GFP-HRG担癌マウスを、MM-111、ラパチニブおよびトラスツズマブの単剤療法（図17A）、MM-111+ラパチニブ、MM-111+トラスツズマブ、ならびにラパチニブ+トラスツ

10

20

30

40

50

ズマブの併用療法(図17B)、およびラパチニブ+トラスツズマブならびにMM-111+ラパチニブ+トラスツズマブの併用療法(図17C)で治療した。図17Bに示したとおり、腫瘍性HRG過剰発現は、MM-111+トラスツズマブの組み合わせの有効性を増加させ、トラスツズマブ+ラパチニブの組み合わせの有効性を減少させた。

【0139】

さらに、図17Cに示すとおり、MM-111が、BT474-M3-GFP-HRG腫瘍モデルにおいて、ラパチニブ+トラスツズマブの併用療法の有効性を著しく増強させたことは、BT474-M3腫瘍がヘレグリン1を過剰発現する時に、MM-111が最大抗腫瘍効果に必要であることを示した。

【0140】

前述の実施例の結果は、他の治療薬に対する耐性の発達を防ぐための第1の治療および他の治療薬による治療に対して腫瘍細胞を再感作させるための第2の治療の両方としての併用治療におけるMM-111の有効性を示す。

【0141】

等価物

当業者は、単なる日常的な実験を用いて、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態の多くの等価物を認識するか、または確かめることができる。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されると意図される。全ての独立請求項および従属請求項のいずれかに開示される実施形態のうちの1つまたは複数の任意の組合せも、本発明の範囲内であると企図される。

【0142】

参照による組み込み

本明細書で言及されるそれぞれのおよび全ての特許、係属中の特許出願、および出版物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0143】

配列表の概要

MM-121 (Ab # 6) V<sub>H</sub> アミノ酸配列(配列番号1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISSGGWT  
LYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLVT  
VSS

MM-121 (Ab # 6) V<sub>L</sub> アミノ酸配列(配列番号2)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSQYQQHPGKAPKLIYEVQRPSGV  
NRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKVTLV

MM-121 (Ab # 6) V<sub>H</sub> CDR1 (配列番号3)

HYVMA

10

MM-121 (Ab # 6) V<sub>H</sub> CDR2 (配列番号4)

SISSSGGWTLYADSVKG

MM-121 (Ab # 6) V<sub>H</sub> CDR3 (配列番号5)

GLKMATIFDY

MM-121 (Ab # 6) V<sub>L</sub> CDR1 (配列番号6)

TGTSSDVGSYNVVS

MM-121 (Ab # 6) V<sub>L</sub> CDR2 (配列番号7)

EVSQRPS

20

MM-121 (Ab # 6) V<sub>L</sub> CDR3 (配列番号8)

CSYAGSSIFVI

## MM-121 重鎖アミノ酸配列(配列番号42)

1 EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYVMAWVRQA PGKGLEWVSS  
51 ISSSSGGWTLY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCTRGL  
101 KMATIFDYWG QGTLTVSSA STKGPSVPL APCSRSTSES TAALGCLVKD  
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSSVVTY PSSNFGTQTY  
201 TCNVDHKPSN TKVDKTVERK CCVECPCPA PPVAGPSVFL FPPPKDLM  
251 ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV  
301 VSVLTVVHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTL  
351 PSREEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TPPMMLDSDG  
401 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK

30

## MM-121 軽鎖アミノ酸配列(配列番号43)

1 QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVVSQYQQ HPGKAPKLI  
51 YEVSQRPSGV SNRFSGSKSG NTASLTISGL QTEDEADYYC CSYAGSSIFV  
101 IFGGGTKVTV LGQPKAAPSV TLFPPSSEEL QANKATLVCL VSDFYPGAVT  
151 VAWKADGSPV KVGVETTKPS KQSNNKYAAS SYLSLTPEQW KSHRSYSCRV  
201 THEGSTVEKT VAPAECS

40

## MM-121 (Ab # 6) 重鎖ヌクレオチド配列(配列番号45)

gagggtcagc tgctggagag cggcgagggg ctgggtccagc caggcgccag cctgaggctg  
tcctgcggccg ccagcggtt caccgtcage cactacgtga tggcctgggt gcccggcc  
ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccagc atcagcagca gcccggctg gaccctgtac  
gccgacacgcg tgaagggcag gttcaccate agcagggaca acagcaagaa caccctgtac  
ctgcagatga acagcctgag gcccgaggac acggcggtg actactgcac cagggccctg

aagatggcca ccacatccga ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagc

MM-121 (Ab # 6) 軽鎖ヌクレオチド配列 (配列番号46)

cagtccggcc tgacccagcc cgccagcgtg agcggcagcc cagggcagag catcaccatc  
agctgcacccg gcaccaggcag cgacgtgggc agctacaacg tggtgccctg gtatcagcag  
caccggca aggccccaa gctgatcatc tacgagggtgt cccagaggcc cagggcgctg  
agcaacagggtt ctagggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagggcctg  
cagaccgagg acgaggccga ctactactgc tgcagctacg cggcagcag catctcgtg  
atcttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc cta

10

Ab # 3 V<sub>H</sub> アミノ酸配列 (配列番号9)

EVQLLESGGGLVQPGGLSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGGAT  
RYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDVWGQGTLV  
TVSS

Ab # 3 V<sub>L</sub> アミノ酸配列 (配列番号10)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSDSNIGRNYIYWYQQFPGTAPKLLIYRNNQRPSGV  
DRISGSKSGTSASLAISGLRSEDEAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

Ab # 3 V<sub>H</sub> CDR1 (配列番号11)

AYNMR

20

Ab # 3 V<sub>H</sub> CDR2 (配列番号12)

VIYPSGGATRYADSVKG

Ab # 3 V<sub>H</sub> CDR3 (配列番号13)

GYYYYYGMDV

Ab # 3 V<sub>L</sub> CDR1 (配列番号14)

SGSDSNIGRNYIY

Ab # 3 V<sub>L</sub> CDR2 (配列番号15)

RNNQRPS

30

Ab # 3 V<sub>L</sub> CDR3 (配列番号16)

GTWDDSLSGPV

Ab # 14 V<sub>H</sub> アミノ酸配列 (配列番号17)

EVQLLESGGGLVQPGGLSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGHT  
KYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLETGLVDAFDIWGQGT  
MVTVSS

40

Ab # 14 V<sub>L</sub> アミノ酸配列 (配列番号18)

QYELTQPPSVSVPQQTASITCSGDQLGSKFVSWYQQRPGQSPVLVMYKDKRRPSEIPE  
RFSGSNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSSTYVFGTGTKVTVL

Ab # 14 V<sub>H</sub> CDR1 (配列番号19)

AYGMG

Ab # 14 V<sub>H</sub> CDR2 (配列番号20)

YISPSGGHTKYADSVKG

Ab # 14 V<sub>H</sub> CDR3 (配列番号21)  
VLETGLLVDAFDI

Ab # 14 V<sub>L</sub> CDR1 (配列番号22)  
SGDQLGSKFVS

Ab # 14 V<sub>L</sub> CDR2 (配列番号23)  
YKDKRRPS

Ab # 14 V<sub>L</sub> CDR3 (配列番号24)  
QAWDSSTYV

Ab # 17 V<sub>H</sub> アミノ酸配列 (配列番号25)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGIT  
VYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDVWGQGTTVT  
VSS

Ab # 17 V<sub>L</sub> アミノ酸配列 (配列番号26)  
QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIDGDSLNWYQQKPGKAPRLLIYDASNLETGVP  
PRFSGSGSGTDFTRSLQPEDIATYFCQQSANAPFTFGPGTKVDIK

Ab # 17 V<sub>H</sub> CDR1 (配列番号27)  
WYGMG

Ab # 17 V<sub>H</sub> CDR2 (配列番号28)  
YISPSGGITVYADSVKG

Ab # 17 V<sub>H</sub> CDR3 (配列番号29)  
LNYYYGLDV

Ab # 17 V<sub>L</sub> CDR1 (配列番号30)  
QASQDIGDSLN

Ab # 17 V<sub>L</sub> CDR2 (配列番号31)  
DASNLET

Ab # 17 V<sub>L</sub> CDR3 (配列番号32)  
QQSANAPFT

Ab # 19 V<sub>H</sub> アミノ酸配列 (配列番号33)  
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWWVRQAPGKGLEWVSYIGSSGGPT  
YYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDSWGQGTLV  
TVSS

Ab # 19 V<sub>L</sub> アミノ酸配列 (配列番号34)  
QYELETQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDGRWNIVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGV  
SNRF

10

20

30

40

SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTWVFGGGTKLTVL

Ab # 19 V<sub>H</sub> CDR1 (配列番号35)  
RYGMW

Ab # 19 V<sub>H</sub> CDR2 (配列番号36)  
YIGSSGGPTYYYVDSVKG

Ab # 19 V<sub>H</sub> CDR3 (配列番号37)  
GRGTPYYFDS

Ab # 19 V<sub>L</sub> CDR1 (配列番号38)  
TGTSSDIGRWNIVS

10

Ab # 19 V<sub>L</sub> CDR2 (配列番号39)  
DVSNRPS

Ab # 19 V<sub>L</sub> CDR3 (配列番号40)  
SSYTSSSTWV

ErbB3 (配列番号41)

SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLKYERCEVVMGNLEIVLTGHNADLSFL  
QWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAIFVMLNYNTNSSHALRQLR  
LTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPHEVCKGRC  
WGPGESEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNPNQCCCHDECAGGCSGPQDTDCFACRHFNDS  
GACVPRCPQPLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPhNFVVDQTSCVRACPPDKM  
EVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNG  
DPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPhMHNFNSVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLL  
IMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHSLNWTKVLRGPTERLDIKHNRPRRD  
CVAEGKVCDPLCSSGGCWGPQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHEAECFS  
CHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVGLGAKGPIYKYPDVQNEC  
RPCHENCTQGCKGPTELQDCLGQTLVLIGKTHLTMALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGR  
RIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLKVLGSGVFGTVHKGVWI  
PEGESIKIPVCIKVIEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRLLGLCPGSSLQLVTQYLP  
LGSLLDHVRQHRGALGPQLLNWGVQIAKGMYYLEEHGMVHRNLAARNVLLKSPSQV  
QVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESIHFQKYTHQSDVWSYGVTVWELMT  
FGAEPYAGLRLAEVPDLLEKGERLAQPQICTIDVYVMVMKCWMIDENIRPTFKELANEFT  
RMARDPPRYLVIKRESGPPIAPGPEPHGLTNKLEEVELEPELDLDDLEAEEDNLATTIL  
GSALSLPVGTLNRPGRGSQSSLSPSSGYMPMNQGNLGESCQESAVGSSSERCPRVSLHPMP  
RGCLASESSEGHVTGSEAEIQLEKVSMCRSRSRSPRPGDSAYHSQRHSSLTPVTPLSPPG  
LEEDVNGYVMPDTHLKGTTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEEEDEDEEYEYEMNRRRRHSPPHP  
PRPSSLEELGYEYMDVGSDLSASLGSTQSCPLHPVPIMPTAGTTPDEDYEYEMNRQRDGGGP  
GGDYAAMGACPASEQGYEEMRAFQGPGHQAPHVHYARLKTLSLEATDSAFTDNPDYWH  
SRLFPKANAQRT

20

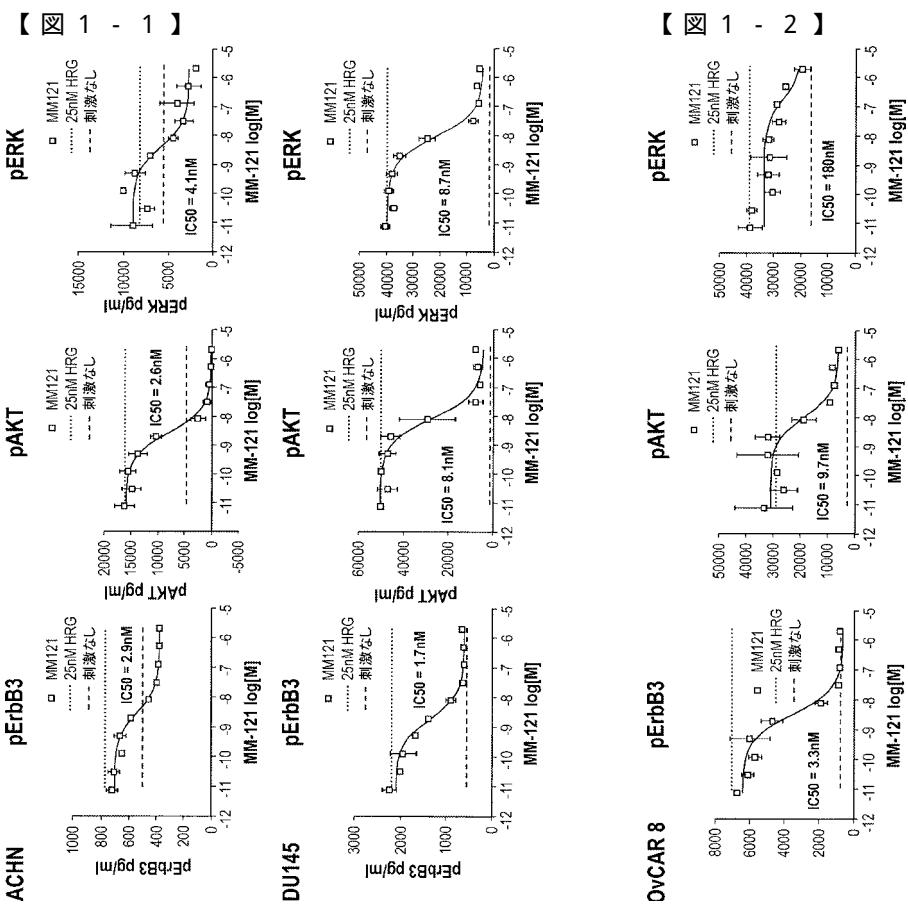
30

40

MM-111 アミノ酸配列 (配列番号44)

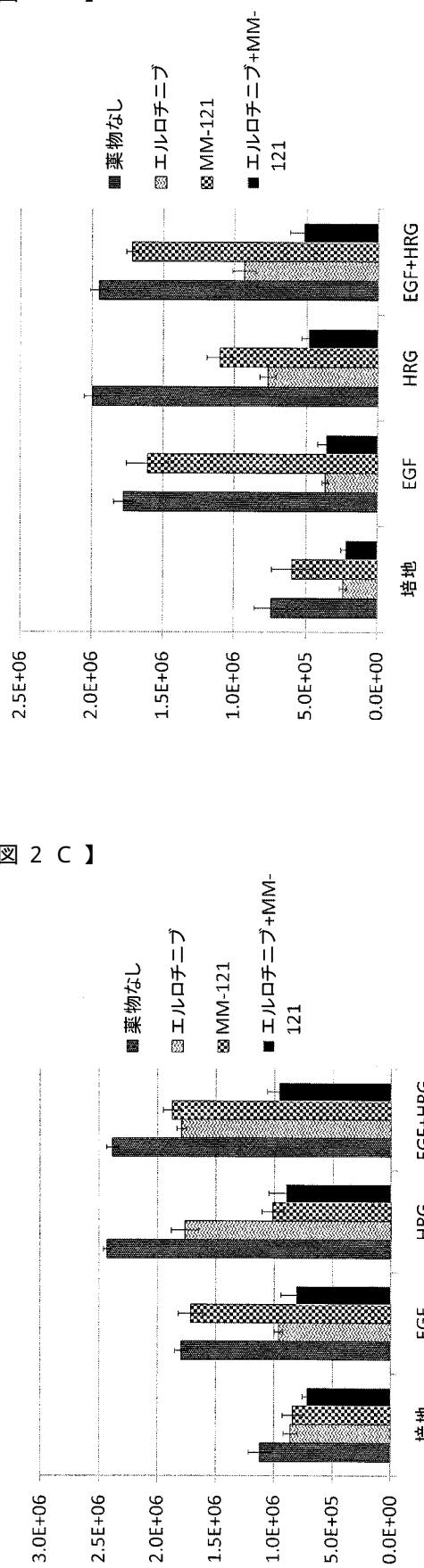
QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIRDGSA  
SYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWGRGTLV  
TVSSASTGGGGSGGGGSGGGSQSALTQPVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSW  
YQQHPGKAPKLMYDVSDRPSGVSDRSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGS

THVIFGGGTKVTVLGAASDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVIAFAQYLQQSPFEDHV  
 KLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPPER  
 NECFLQHKDDNPNLPLRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFF  
 AKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAW  
 AVARLSQRFPKAFAEVS KLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISS  
 KLKECCPKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCCKNYAEAKDVFGLMFL  
 YEYARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCAAADPHECYAKV FDFKPLVEEPQNLIKQ  
 NCELF EQLGEYKFQNALLVRYTKV P QVSTPLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMP  
 AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFQAETF  
 TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKE  
 TCF AEEGKKLVAASQAALGLAAALQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWI  
 AWVRQMPGKGLEYMGLIYPGDSDTKYSPSFQGQVTISVDKSVSTAYLQWSSLKPSDSA  
 VYFCARHDVGYCTDRTCAKWP EWLGVWGQGT LVTVSSGGGSSGGGGSSQSVL  
 TQPPSVSAAPGQKV TISC GSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDHTNRPAGVPDRFS  
 GSKSGTSASLAISGFRSEDEADYYCASWDYTL SGWVFGGGTKLTVLG



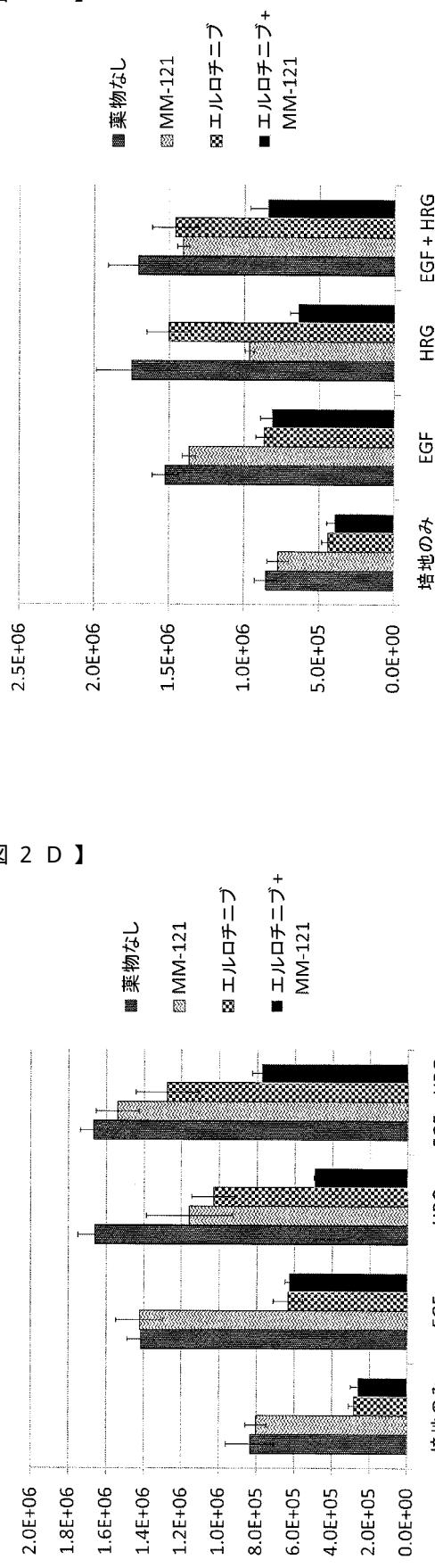
【図 2 A】

## H322M NSCLC 細胞株



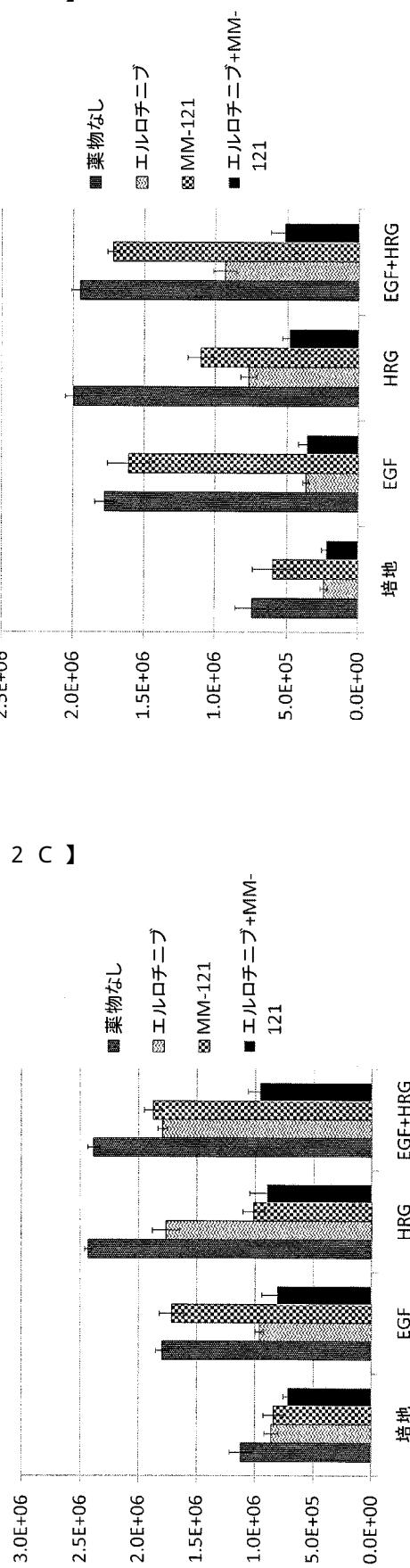
【図 2 B】

## EKVX NSCLC 細胞株



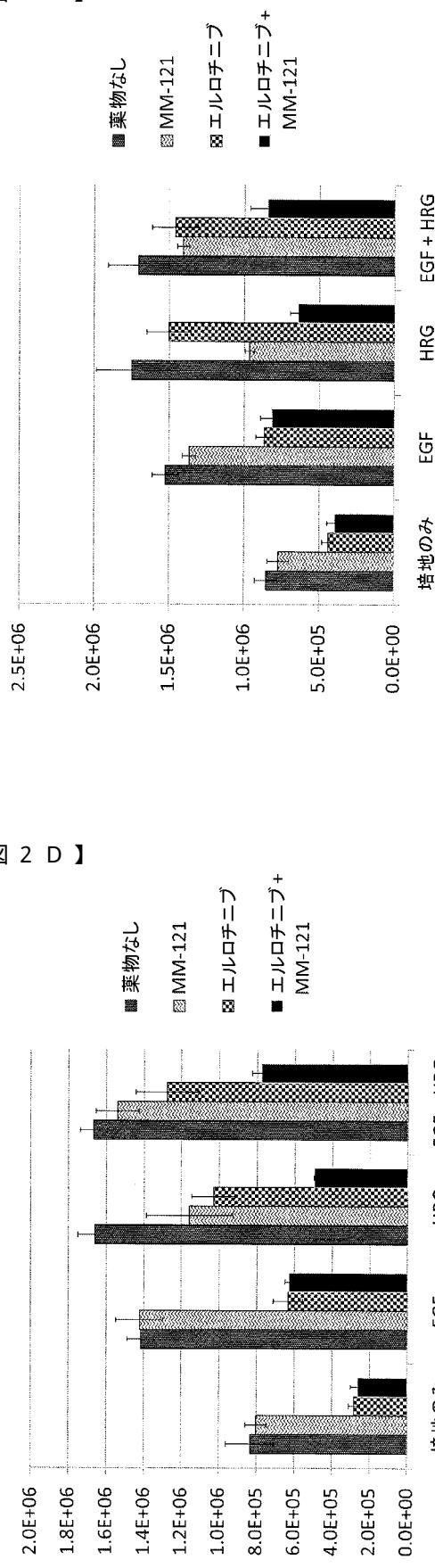
【図 2 C】

## A549 NSCLC 細胞株



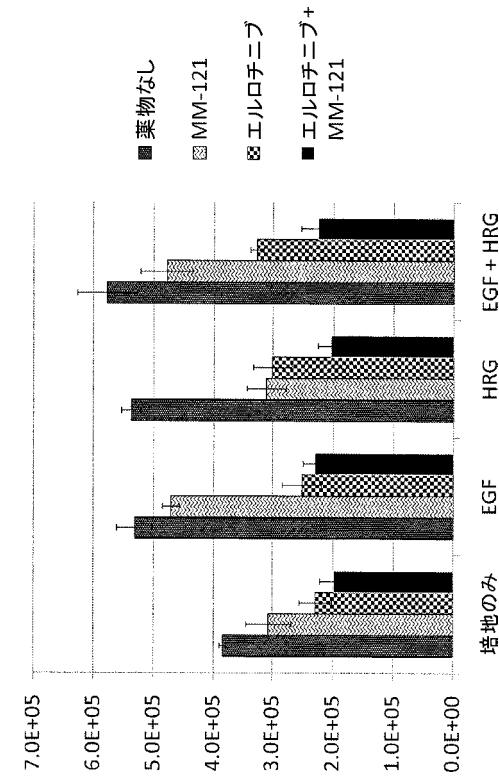
【図 2 D】

## H358 NSCLC 細胞株



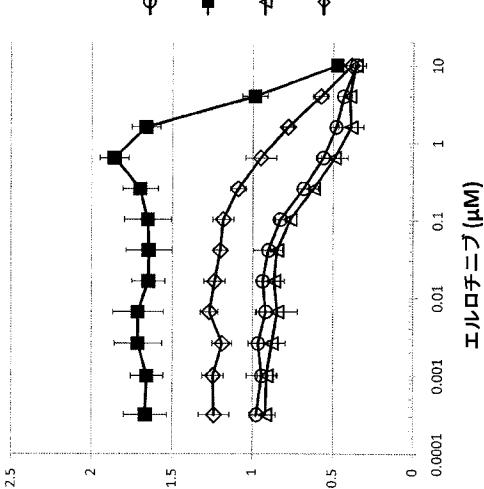
【図2E】

## SW-900 NSCLC 細胞株



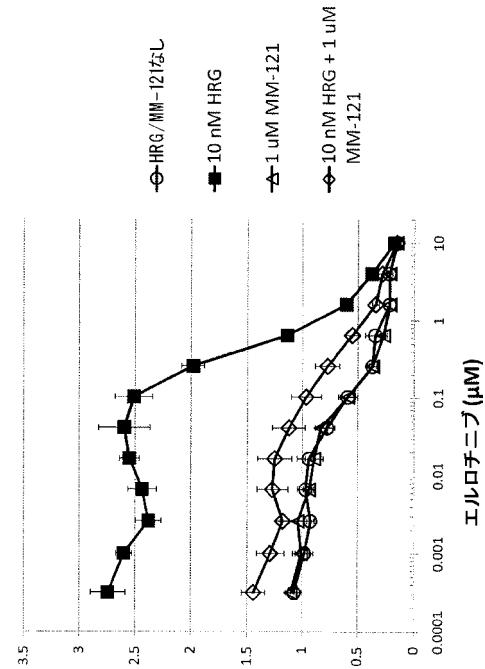
【図3B】

## EKVX NSCLC 細胞株



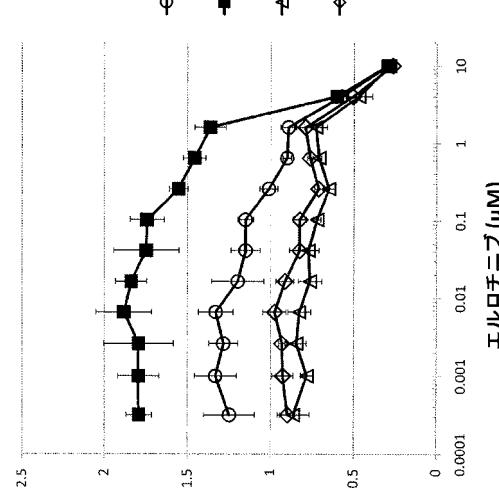
【図3A】

## H322M NSCLC 細胞株

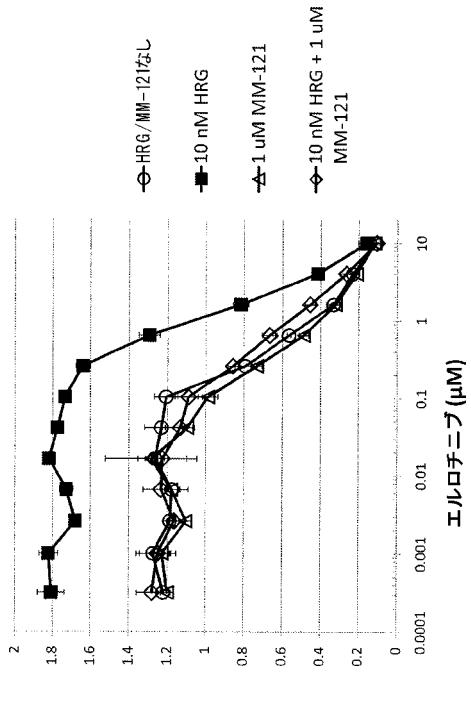


【図3C】

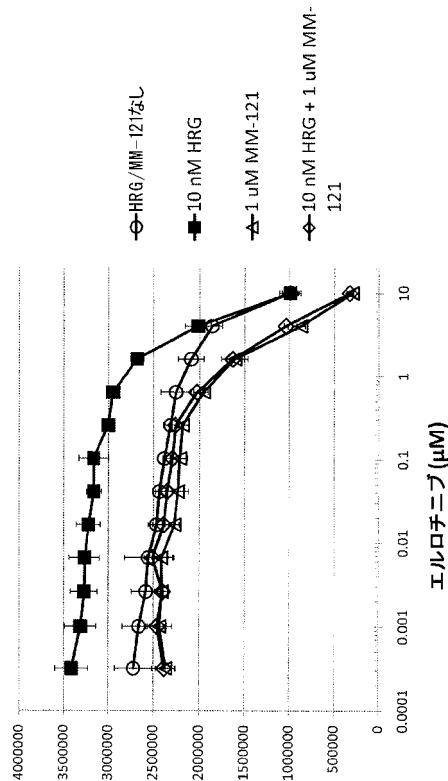
## A549 NSCLC 細胞株



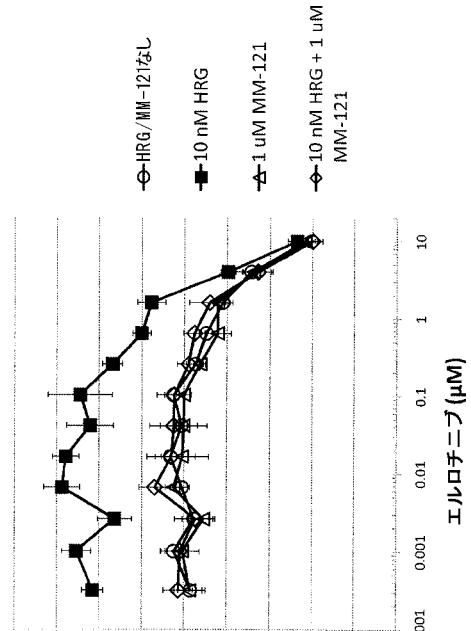
【図3D】



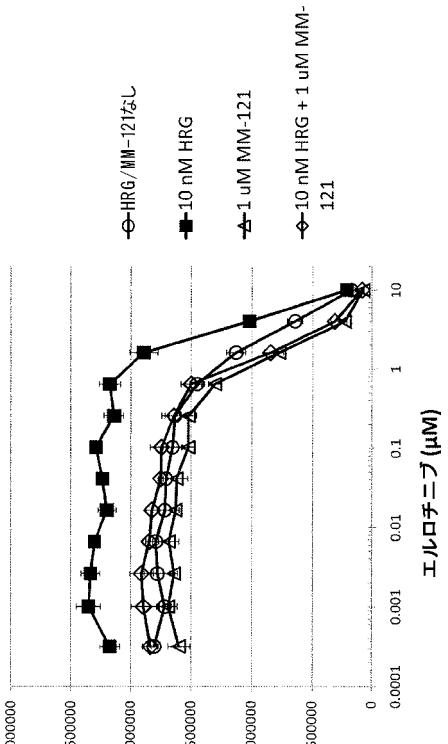
【図3E】



【図3F】

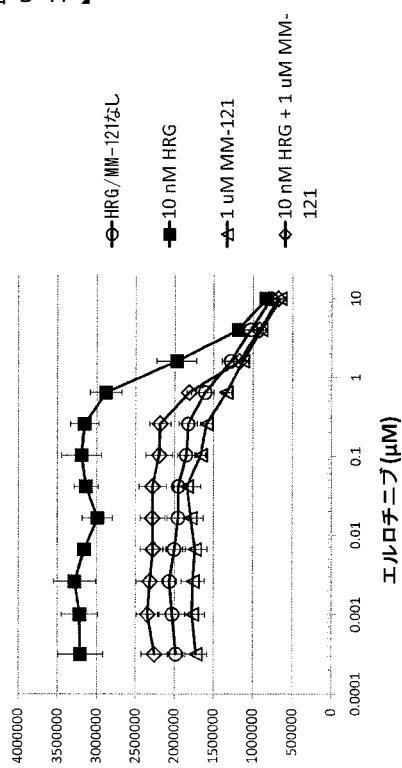


【図3G】



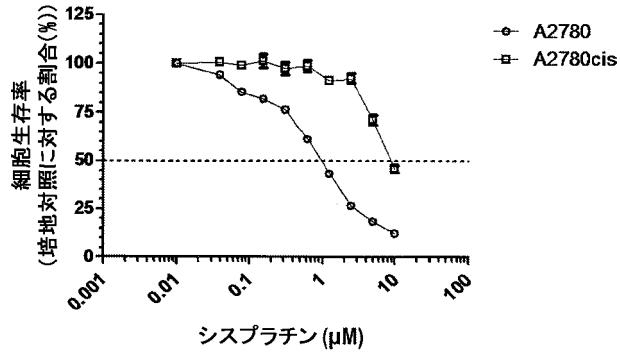
【図3 H】

## NCI-H661 NSCLC 細胞株



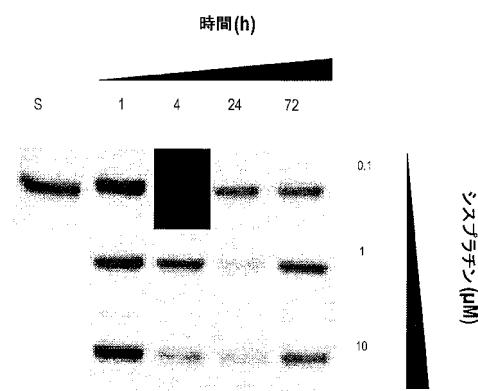
【図4】

シスプラチン処理 - 72時間



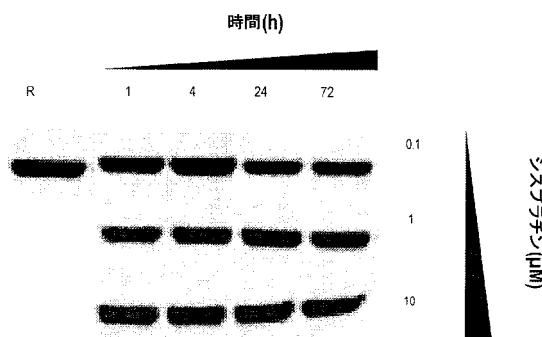
【図5 A】

A2780 (感受性)



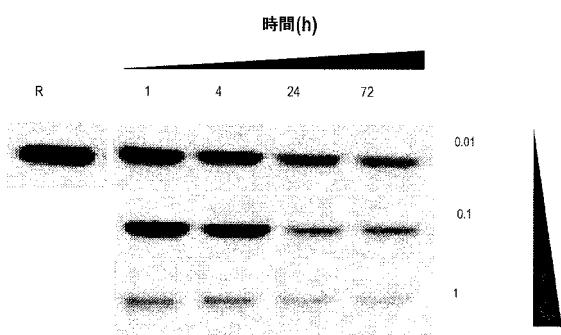
【図5 B】

A2780cis (耐性)

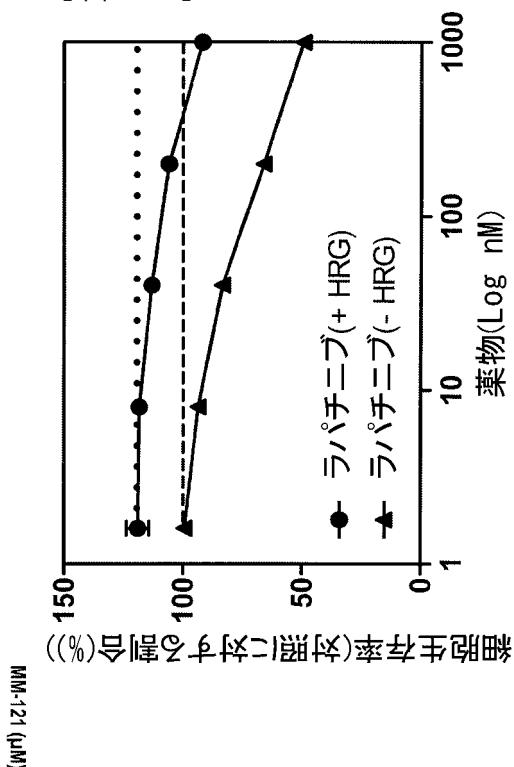


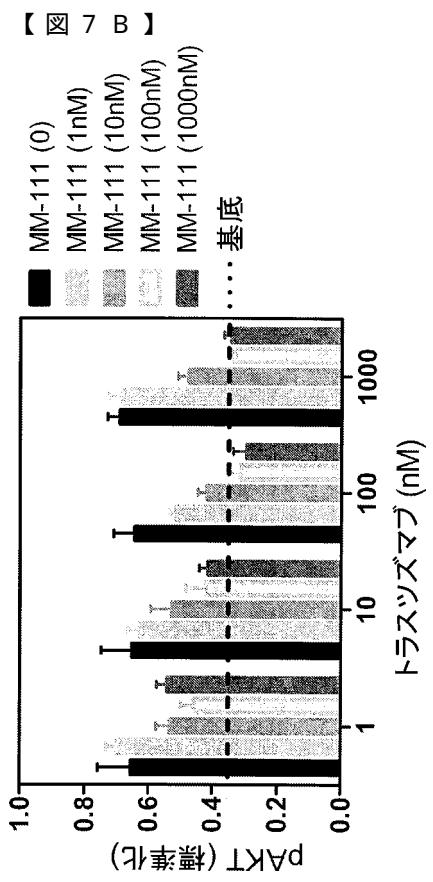
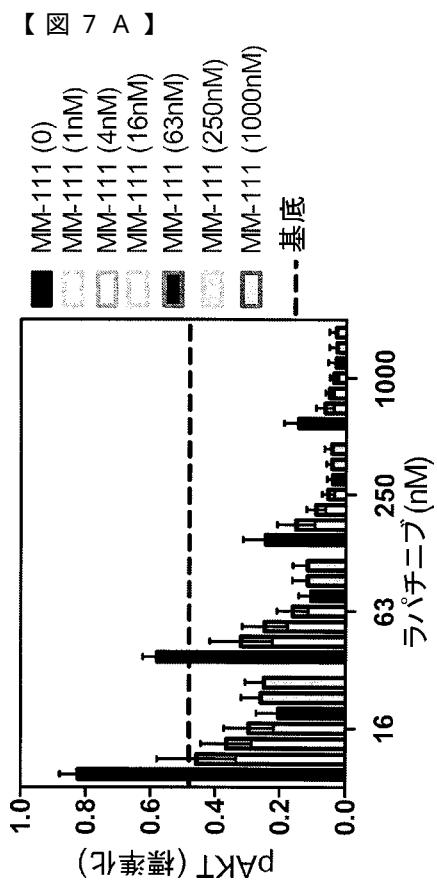
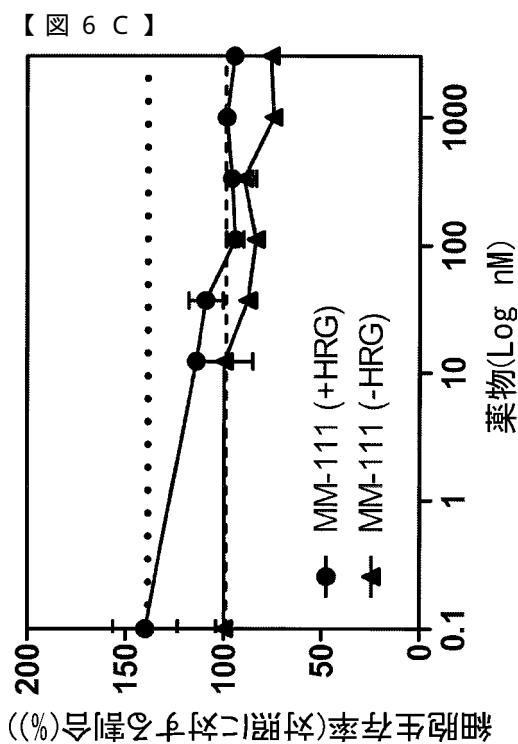
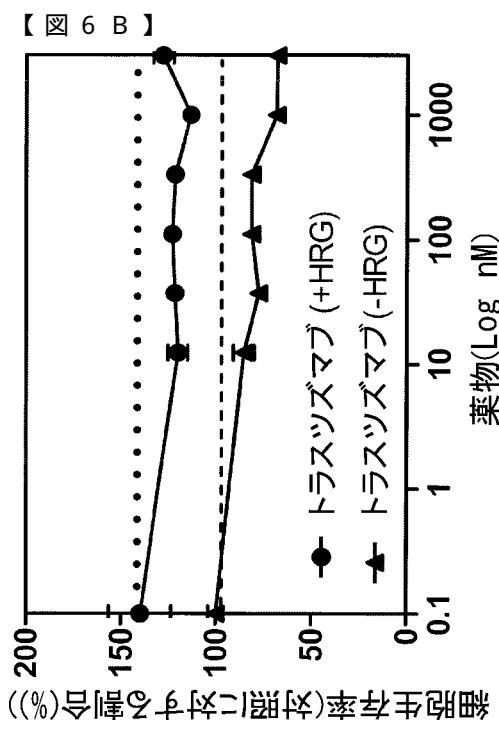
【図5 C】

A2780cis (耐性)

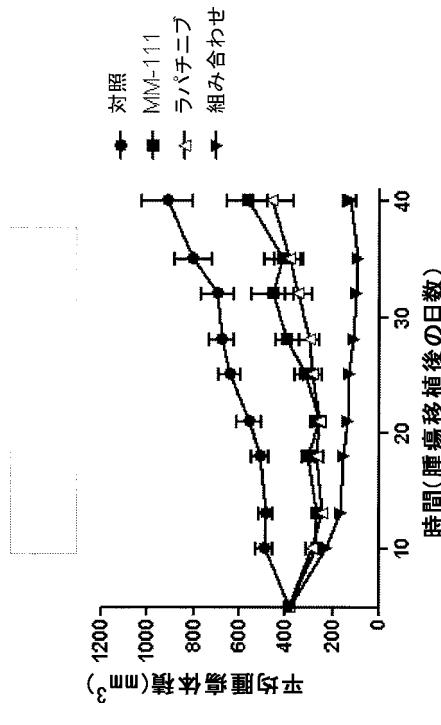


【図6 A】

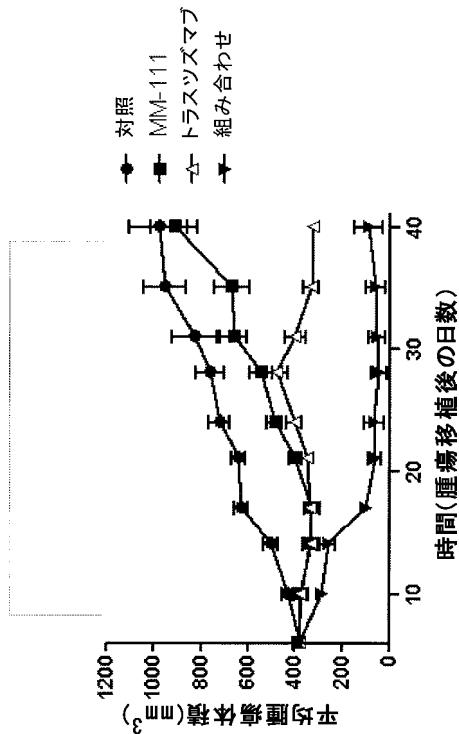




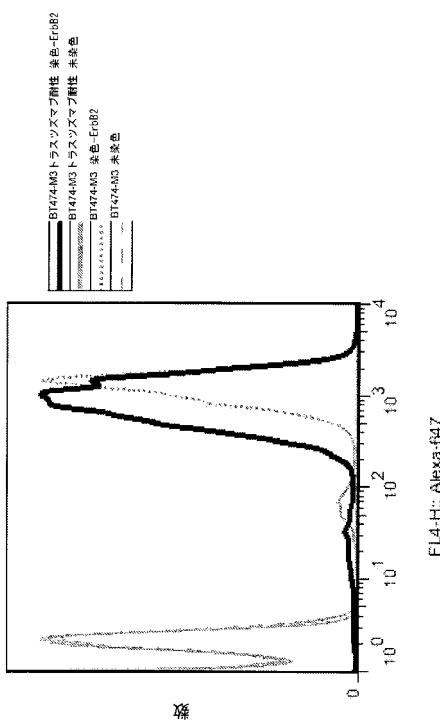
【図 8 A】



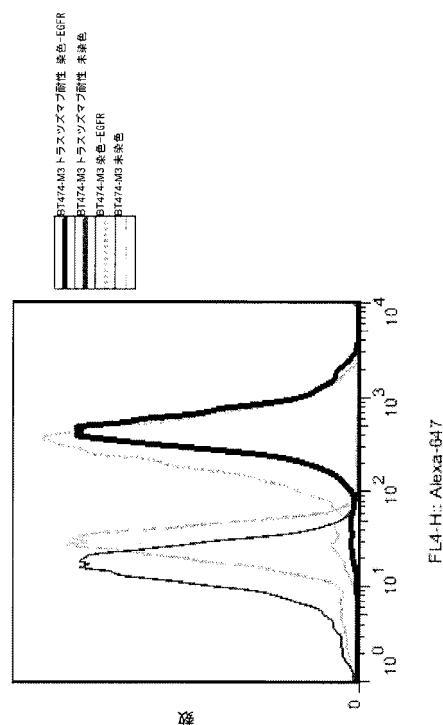
【図 8 B】



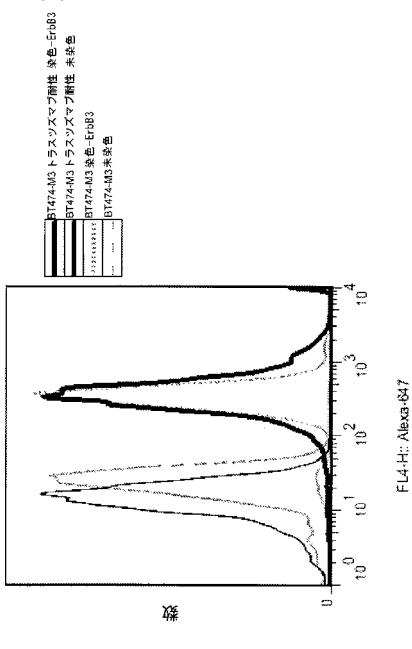
【図 9 A】



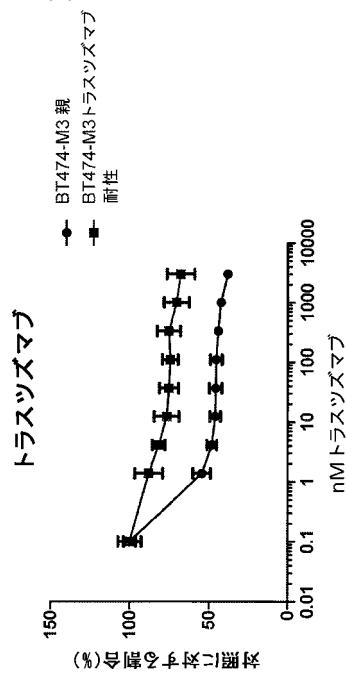
【図 9 B】



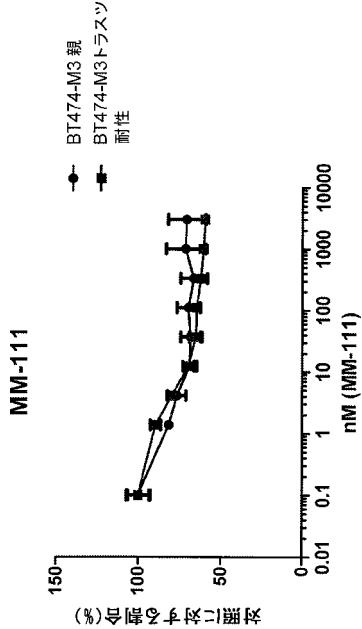
【図 9 C】



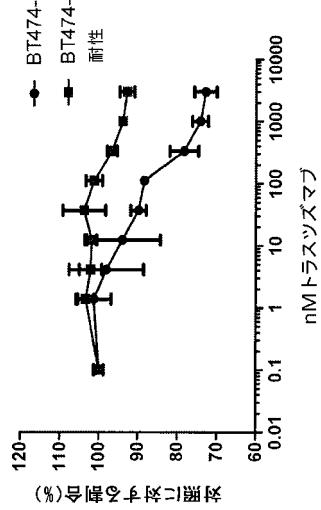
【図 1 0 A】



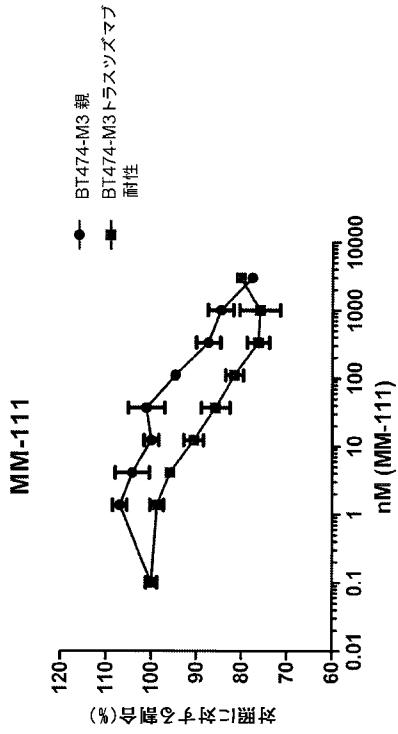
【図 1 0 B】



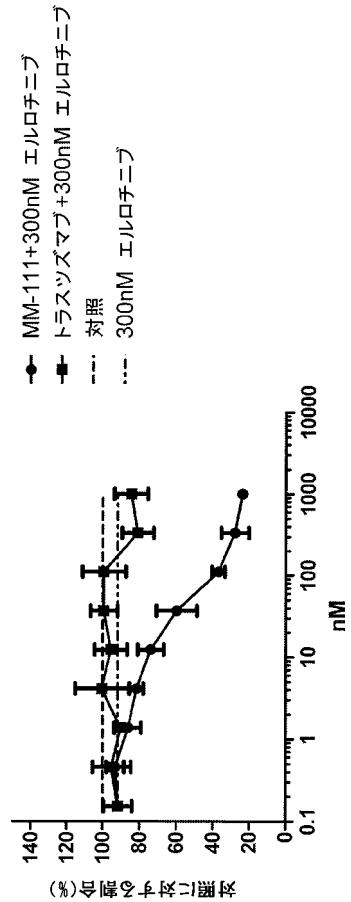
【図 1 1 A】



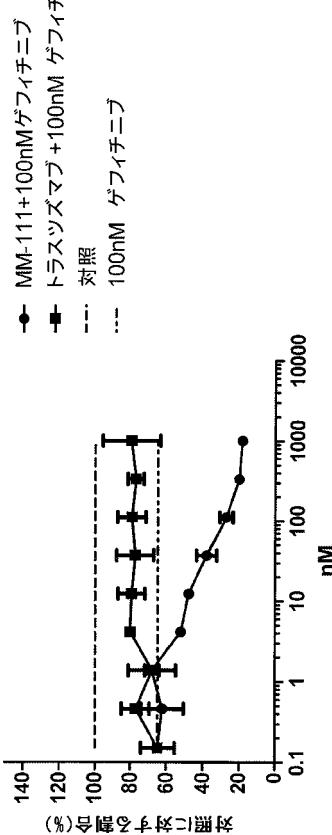
【図 1 1 B】



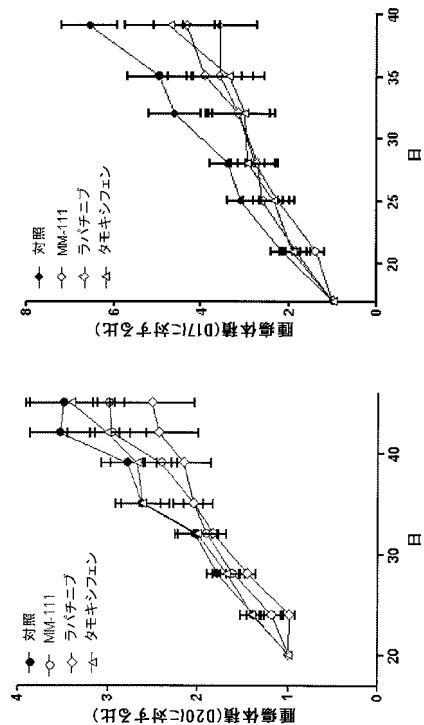
【図 1 2 A】



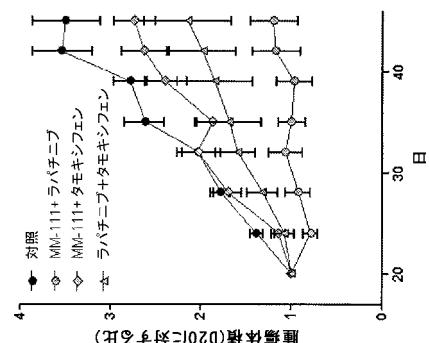
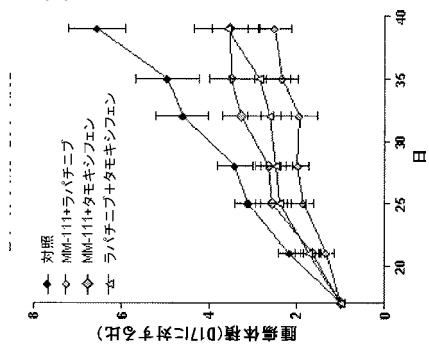
【図 1 2 B】



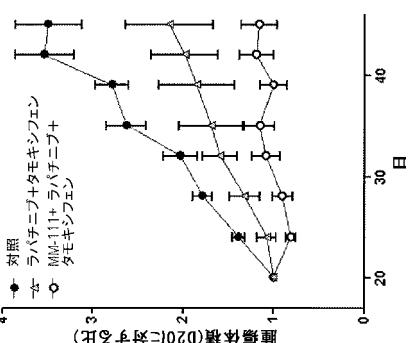
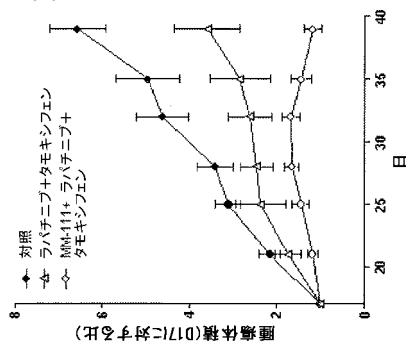
【図 1 3 A】



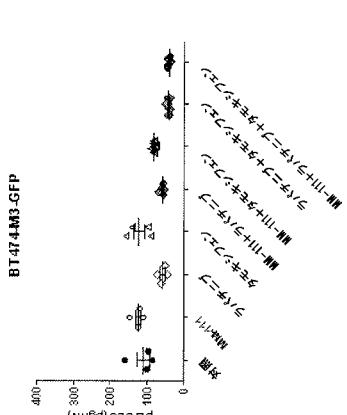
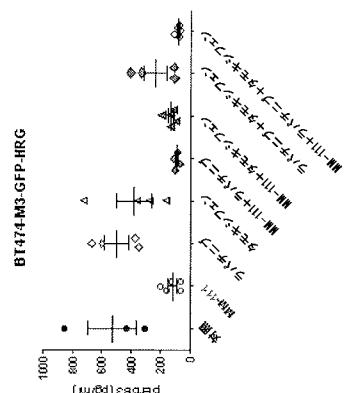
【図 1 3 B】



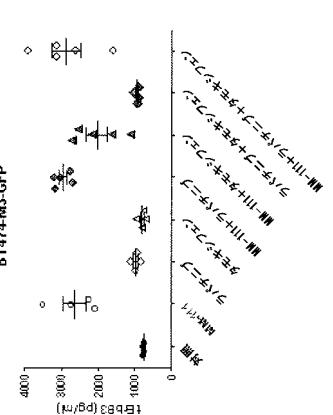
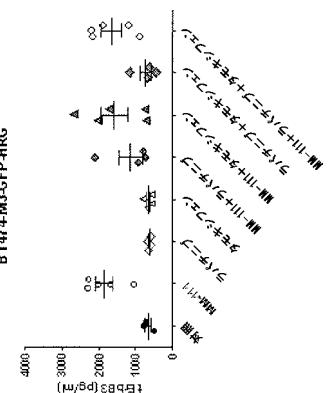
【図 1 3 C】



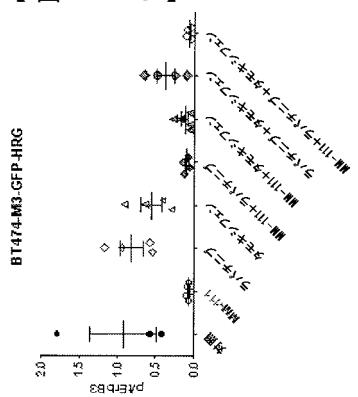
【図 1 4 A】



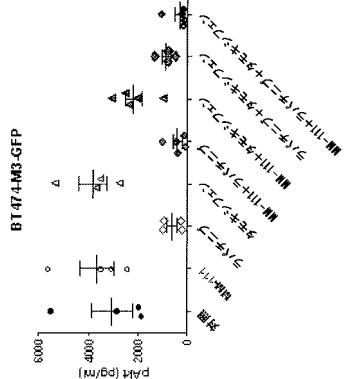
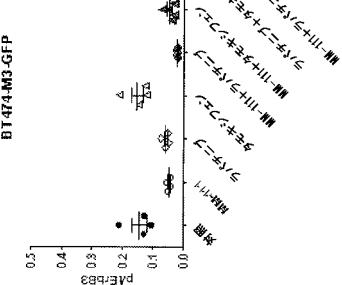
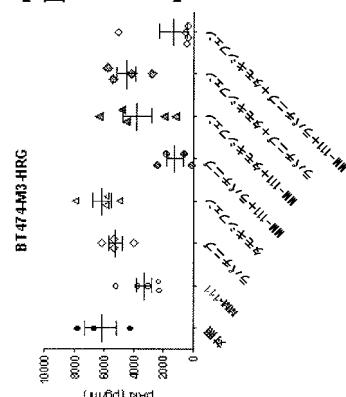
【図 1 4 B】



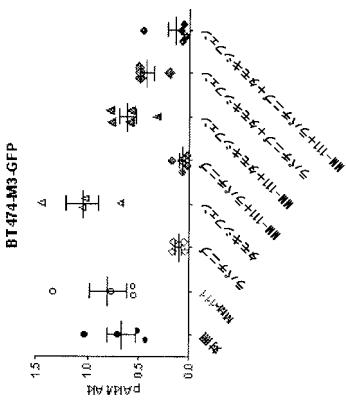
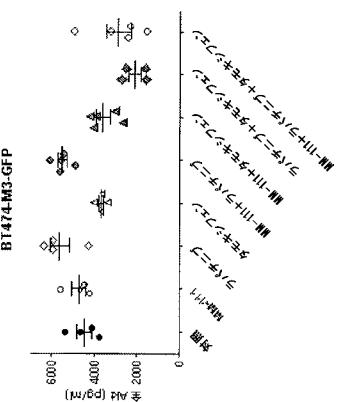
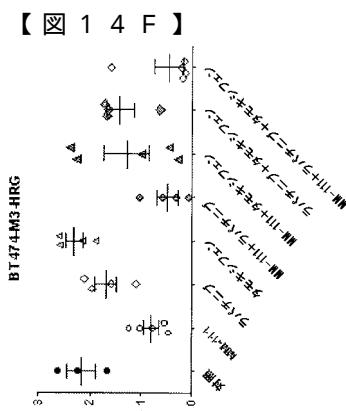
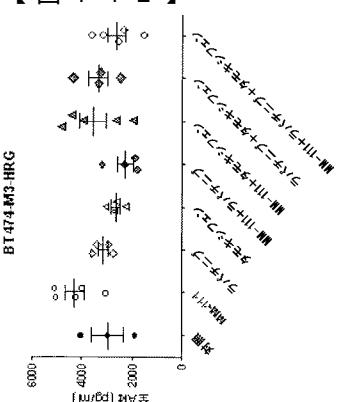
【図 14 C】



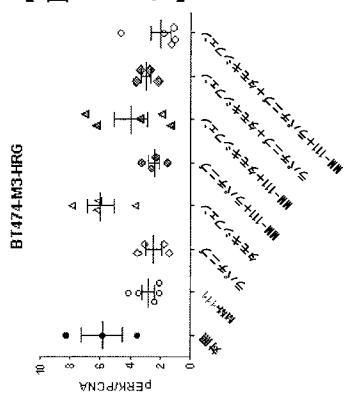
【図 14 D】



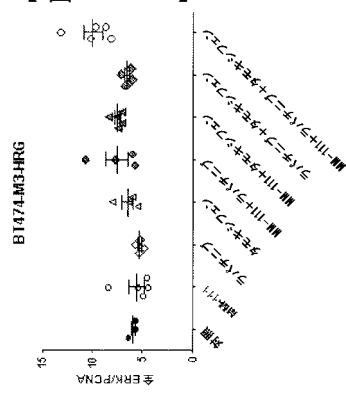
【図 14 E】



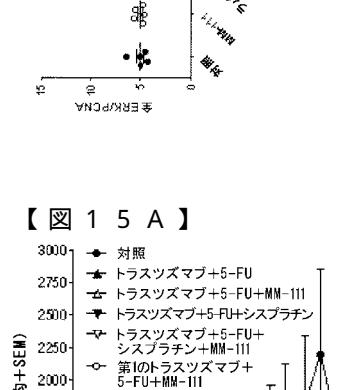
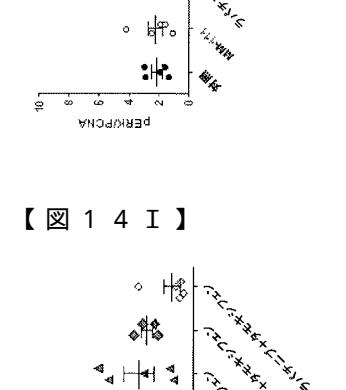
【図 14 G】



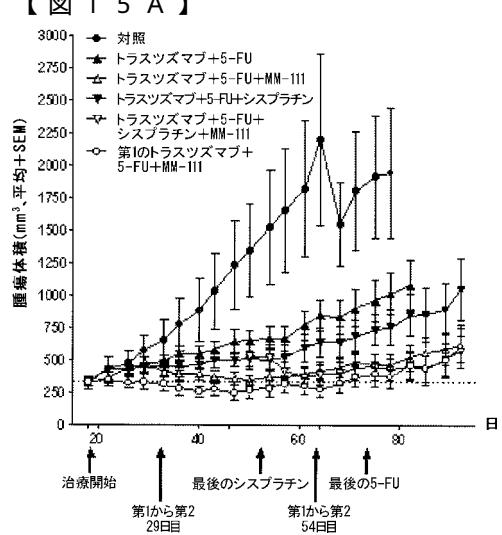
【図 14 H】



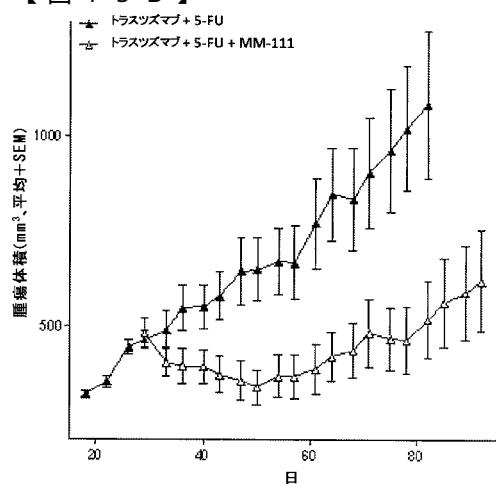
【図 14 I】



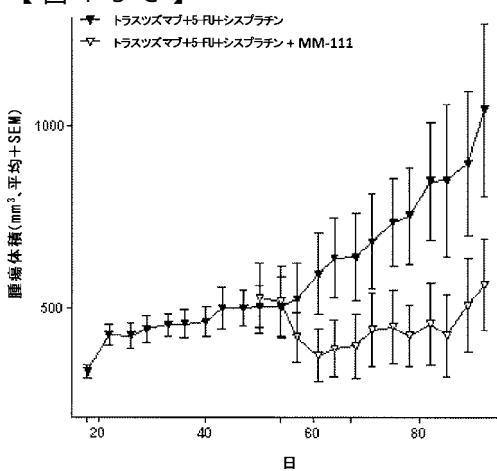
【図 15 A】



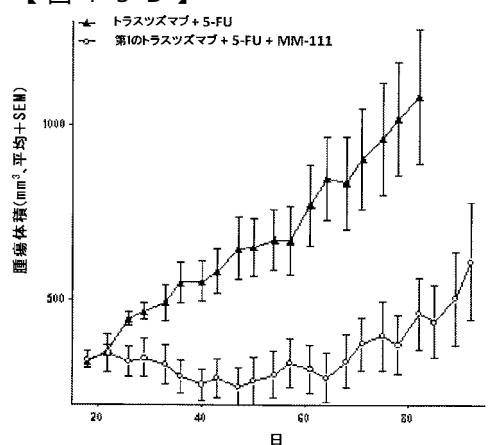
【図 15 B】



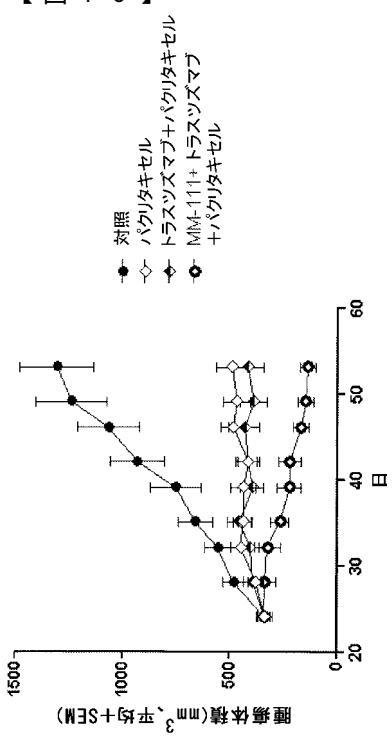
【図 15 C】



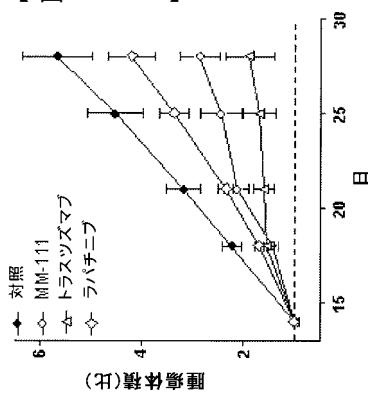
【図 15 D】



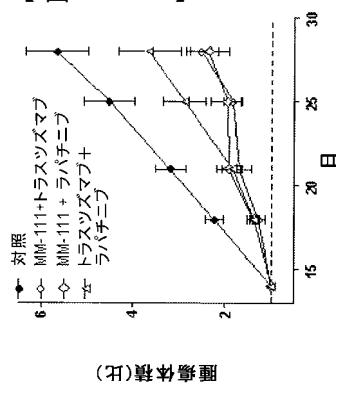
【図 16】



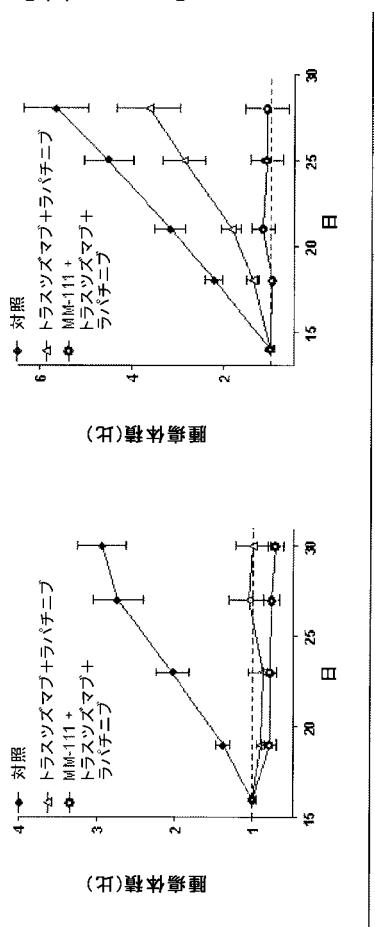
【図 17 A】



【図 17 B】



【図 17 C】



【配列表】

2014509593000001.xml

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/029292
---

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 A61K31/00 A61K33/00 ADD. C07K16/32
--

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC
---

B. FIELDS SEARCHED
--------------------

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K
--

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
---

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
--

EPO-Internal, BIOSIS
----------------------

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHOEBERL BIRGIT ET AL: "An ErbB3 antibody, MM-121, is active in cancers with ligand-dependent activation", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 70, no. 6, 15 March 2010 (2010-03-15), pages 2485-2494, XP002581703, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3145 [retrieved on 2010-03-09]	1-4, 7, 8, 10, 11, 19-26, 31-38, 42, 44-49, 51-58, 65-71, 73-83, 88-92, 95-98
Y	figures 3-5 page 2492 ----- -/-	12, 39, 43, 85, 87

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--	--

* Special categories of cited documents :
---

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
---

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
--

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
--

"&" document member of the same patent family
---

Date of the actual completion of the international search
---

Date of mailing of the international search report
--

27 July 2012
--------------

05/11/2012
------------

Name and mailing address of the ISA/
--------------------------------------

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Authorized officer
--------------------

Bumb, Peter
-------------

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/029292

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/056761 A1 (SCHOEBERL BIRGIT [US] ET AL) 4 March 2010 (2010-03-04)	1-3,5-7, 10,11, 19-22, 24,25, 27-35, 37,38, 42,44, 47, 50-55, 57,58, 65,66, 69,70, 72-77, 79-83, 88,91, 95-98
Y	example 17 ----- IORIO MARILENA V ET AL: "microRNA-205 regulates HER3 in human breast cancer.", CANCER RESEARCH 15 MAR 2009 LNKD- PUBMED:19276373, vol. 69, no. 6, 15 March 2009 (2009-03-15) , pages 2195-2200, XP002680947, ISSN: 1538-7445 page 2197 - page 2199 ----- WO 2010/108127 A1 (GENENTECH INC [US]; FUH GERMAINE [US]; SCHAEFER GABRIELE [US]; HABER L) 23 September 2010 (2010-09-23) example 9 figures 11-13,18 page 76 ----- HUHALOV ALEXANDRA ET AL: "MM-111, an ErbB2/ErbB3 bispecific antibody with potent activity in ErbB2-overexpressing cells, positively combines with trastuzumab to inhibit growth of breast cancer cells driven by the ErbB2/ErbB3 oncogenic unit", PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 51, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 845-846, XP009145436, ISSN: 0197-016X the whole document -----	12,39, 43,85,87 1-3,8, 20,21, 25,27, 36,79-91 12,39, 43,85,87 12,39, 43,85,87
Y		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/029292

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>MORGILLO FLORIANA ET AL:          "Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib",          CANCER RESEARCH, vol. 66, no. 20, October 2006 (2006-10),          pages 10100-10111, XP002680948,          ISSN: 0008-5472          the whole document</p> <p>-----</p>	34,35, 54,55, 76,77
E	<p>WO 2012/059857 A2 (SYMPHOGEN AS [DK];          PEDERSEN MIKKEL WANDAHL [DK]; CHRISTENSEN IDA K [DK] 10 May 2012 (2012-05-10)</p> <p>figures 1-26          claims 41, 45</p> <p>-----</p>	1-3,10, 11, 19-25, 31,36, 79-83, 88-91,95

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2012/029292

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
  
  
  
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
  
  
  
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

3-8, 21-27, 37-39, 42-58, 65-78, 89-92(completely); 1, 2, 10-12, 19, 20  
31-36, 79-83, 85, 87, 88, 95-98(partially)

## Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2012/029292

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2010056761	A1	04-03-2010	US	2010056761 A1		04-03-2010
			US	2011123523 A1		26-05-2011
-----						
WO 2010108127	A1	23-09-2010	AR	075896 A1		04-05-2011
			AU	2010226453 A1		08-09-2011
			CA	2755640 A1		23-09-2010
			CN	102356092 A		15-02-2012
			CO	6430487 A2		30-04-2012
			EP	2408817 A1		25-01-2012
			JP	2012521196 A		13-09-2012
			KR	20110117256 A		26-10-2011
			MA	33198 B1		02-04-2012
			PE	05392012 A1		12-05-2012
			SG	174378 A1		28-10-2011
			TW	201036637 A		16-10-2010
			US	2010255010 A1		07-10-2010
			US	2012121596 A1		17-05-2012
			WO	2010108127 A1		23-09-2010
-----						
WO 2012059857	A2	10-05-2012	WO	2012059857 A2		10-05-2012
			WO	2012059858 A1		10-05-2012
-----						

International Application No. PCT/ US2012/ 029292

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 3-8, 21-27, 37-39, 42-58, 65-78, 89-92(completely); 1, 2, 10-12, 19, 20, 31-36, 79-83, 85, 87, 88, 95-98(partially)

A method of overcoming resistance of a tumour to an ErbB pathway inhibitor, comprising administering to a subject (i) an ErbB3 inhibitor and (ii) the ErbB pathway inhibitor, wherein the resistance is to an EGFR inhibitor.

---

2. claims: 9, 28-30, 93, 94(completely); 1, 2, 10-12, 19, 20, 31-36, 79-83, 85, 87, 88, 95-98(partially)

A method of overcoming resistance of a tumour to an ErbB pathway inhibitor, comprising administering to a subject (i) an ErbB3 inhibitor and (ii) the ErbB pathway inhibitor, wherein the resistance is to a HER2 inhibitor.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/4706 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/4706	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1 C 1 2 N 15/00 Z N A A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,A0,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100142929	弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699	弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048	弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506	弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845	弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人 100114340	弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889	弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072	弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ガルシア ガブリエラ	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ロスリンデール ノル ストリート 14
(72)発明者 クバセク ウィリアム	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント フェアビュー アベニュー 165
(72)発明者 ラハデンランタ マリア ヨハンナ	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウェンデル ストリート 29 ナンバー2
(72)発明者 マクビース ガビン	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ダンバーズ カークブライド ドライブ 4222
(72)発明者 マクドナー シャーロット	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウィンチエスター サージェント ロード 11
(72)発明者 モイオ ピクター	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 コンコード メイン ストリート 1694 アパートメント ナンバー5
(72)発明者 オンスム マシュー デビッド	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ジャマイカ プレイン ビナー ストリート 90
(72)発明者 セベスカ マーク	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ パール ストリート 333

(72)発明者 ウェインスゼルバウム マリサ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン エマーソン プレイス 1 アパートメント  
12エイチ

(72)発明者 チャン ボー  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 リンフィールド ビレッジ ロー 14

(72)発明者 ショーバール ビルギット  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ウィンザー ストリート 324

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA54 CA02  
4C084 AA20 NA14 ZB261 ZB262 ZC201 ZC202  
4C085 AA13 AA14 BB01 DD62 DD63 EE01 GG01  
4C086 AA01 AA02 BC28 BC46 BC73 GA01 GA02 GA07 MA02 MA04  
NA05 NA14 ZB26 ZC20