

(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2008-503476

(P2008-503476A)

(43) 公表日 平成20年2月7日(2008.2.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 8 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 74 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-516733 (P2007-516733)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月15日 (2005.6.15)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年2月16日 (2007.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/021286
 (87) 国際公開番号 W02006/007398
 (87) 国際公開日 平成18年1月19日 (2006.1.19)
 (31) 優先権主張番号 60/580,333
 (32) 優先日 平成16年6月16日 (2004.6.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596168317
 ジェネンテック・インコーポレーテッド
 GENENTECH, INC.
 アメリカ合衆国カリフォルニア・9408
 0-4990・サウス・サン・フランシス
 コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
 (74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇
 (74) 代理人 100113653
 弁理士 東田 幸四郎
 (74) 代理人 100116919
 弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラチナ耐性ガンの治療法

(57) 【要約】

本発明は、HERの二量体化を効果的に阻害するHER2抗体とゲムシタピンとの組み合わせを用いて、プラチナ耐性の卵巣ガン、原発性腹膜ガン、または卵管ガンを処置するための方法に関するものである。

1 KSAALQWQ LALALPQA ASYQWQWQ KMLLEAFSS TELMLASHY QQQWQWQ KUTLPPAS LALQWQWQ QWVLAHQW PQWVQWQW
 191 IYVQWQWQW NYALWQWQW PLANTWVYV GAFQWQWQW QSSWQWQW QWVLAHQWQ LQWQWQWQW LQWQWQWQW LQWQWQWQW LQWQWQWQW
 201 GSWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW
 301 WYVLAHQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW
 401 WYVLAHQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW
 501 WYVLAHQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW
 601 WYVLAHQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW QWQWQWQW
 (SEQ ID NO: 15)

702 aa 22-53 (51 RESIDUES)
 773 aa 22-53 (51 RESIDUES)
 204 aa 22-584 (562 RESIDUES)
 703 aa 22-584 (562 RESIDUES)
 309 aa 510-625 (115 RESIDUES)
 405 aa 529-645 (96 RESIDUES)
 2111 aa 529-645 (116 RESIDUES)
 314 aa 541-609 (68 RESIDUES)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

卵巣ガン、原発性腹膜ガン、および卵管ガンからなる群より選択されるプラチナ耐性ガンを処置するための方法であって、患者に、トラスツズマブよりも効果的に H E R の二量体化を阻害する H E R 2 抗体と、代謝拮抗化学療法剤とを、それぞれ該ガンを処置するのに有効量投与することを含む方法。

【請求項 2】

H E R 2 抗体が H E R 2 のドメイン I I に結合する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

H E R 2 抗体がパーツズマブである、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

代謝拮抗化学療法剤がゲムシタピンである、前記請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5】

患者由来の腫瘍試料が H E R 活性化を示す、前記請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

患者由来の腫瘍試料が H E R 2 活性化を示す、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

代謝拮抗化学療法剤のみで処置された患者に比較して生存の改善が結果として生じる、前記請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 8】

代謝拮抗化学療法剤のみで処置された患者に比較して進行のない生存の改善が結果として生じる、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】

代謝拮抗化学療法剤のみで処置された患者に比較して全生存の改善が結果として生じる、請求項 7 記載の方法。

【請求項 10】

客観的反応が結果として生じる、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

完全反応が結果として生じる、請求項 10 記載の方法。

30

【請求項 12】

部分反応が結果として生じる、請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

H E R 2 抗体が、約 8 4 0 mg のローディング用量に続いて、約 3 週間毎に約 4 2 0 mg として投与される、前記請求項 1 ~ 12 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

H E R 2 抗体が、約 3 週間毎に投与される約 1 0 5 0 mg の間の用量として投与される、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項または複数項記載の方法。

【請求項 15】

ゲムシタピンが 3 週間サイクルの 1 日目および 8 日目に約 6 0 0 mg/m² から 1 2 5 0 mg/m² の間の用量で投与される、請求項 4 記載の方法。

40

【請求項 16】

代謝拮抗化学療法剤が H E R 2 抗体の投与の前または後に投与される、前記請求項 1 ~ 15 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

代謝拮抗化学療法剤の少なくとも 1 回の投与および H E R 2 抗体の少なくとも 1 回の投与の間のタイミングが約 1 か月以下である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

代謝拮抗化学療法剤の少なくとも 1 回の投与および H E R 2 抗体の少なくとも 1 回の投

50

与の間のタイミングが約2週間以下である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

代謝拮抗化学療法剤およびHER2抗体が単一製剤または別々の製剤として患者に同時投与される、請求項1～15のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

ガンがHER2を過剰発現しない、請求項1記載の方法。

【請求項21】

患者に第2の化学療法剤を投与することをさらに含む、前記請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

第2の化学療法剤が、タキサン、カペシタビン、プラチナ系化学療法剤、アントラサイクリン、リボソームドキソルビシン、トポテカン、ペメトレキセド、ビンカルカロイド、およびTLK286からなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項23】

代謝拮抗化学療法剤とHER2抗体との組み合わせを用いた処置の結果として、患者に相乗的な、または相加的よりも大きい治療上の利益が生じる、前記請求項1～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

ゲムシタビンとHER2抗体との組み合わせを用いた処置の結果として、患者に相乗的な、または相加的よりも大きい利益が生じる、請求項4記載の方法。

【請求項25】

HER2抗体がネイキッドな抗体である、前記請求項1～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

HER2抗体がインタクトな抗体である、前記請求項1～25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

HER2抗体が、抗原結合領域を含む抗体フラグメントである、請求項1～25のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

ガンが卵巣ガンである、前記請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

ガンが原発性腹膜ガンである、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

ガンが卵管ガンである、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

卵巣ガン、原発性腹膜ガン、および卵管ガンからなる群より選択されるプラチナ耐性ガンを処置するための方法であって、患者に、HER2のヘテロ二量体結合部位に結合するHER2抗体とゲムシタビンとを、それぞれ該ガンの処置に有効量投与することを含む方法。

【請求項32】

抗体が、HER2とEGFRまたはHER3とのヘテロ二量体化を遮断する、請求項31記載の方法。

【請求項33】

卵巣ガン、原発性腹膜ガン、および卵管ガンからなる群より選択されるプラチナ耐性ガンを処置するための方法であって、患者に、HER2のドメインIIに結合するHER2抗体とゲムシタビンとを、それぞれ該ガンの処置に有効量投与することを含む方法。

【請求項34】

HER2のドメインI、II、およびIIIの間の結合部に結合する、請求項33記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第119条(e)項に基づき2004年6月16日に出願された仮出願60/580,333の利益を主張している、米国特許法施行規則1.53条(b)項に基づき出願された非仮出願であり、本非仮出願の内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、HERの二量体化を効果的に阻害するHER2抗体とゲムシタビンとの組み合わせを用いて、プラチナ耐性の卵巣ガン、原発性腹膜ガン、または卵管ガンを処置するための方法に関するものである。

【背景技術】

【0003】

発明の背景HER抗体

HERファミリーのレセプターチロシンキナーゼは、細胞の成長、分化、および生存の重要な仲介物質である。このレセプターファミリーには、上皮成長因子レセプター(EGFR、ErbB1、またはHER1)、HER2(ErbB2またはp185^{neu})、HER3(ErbB3)、およびHER4(ErbB4またはtyr2)を含めた四つの異なるメンバーがある。

【0004】

erbB1遺伝子によってコードされるEGFRは、ヒトの悪性腫瘍の原因となると関係づけられている。特に、EGFRの発現増加が乳ガン、膀胱ガン、肺ガン、頭部ガン、頸部ガン、および胃ガン、ならびに神経膠芽腫で観察されている。レセプターEGFRの発現増加は、同じ腫瘍細胞によるEGFRリガンドであるトランスフォーミング成長因子アルファ(TGF- α)の産生増加としばしば関連し、その結果として自己分泌刺激経路によるレセプター活性化が生じる。Baselga and Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154 (1994)。EGFRまたはそのリガンドであるTGF- α およびEGFに対するモノクローナル抗体は、そのような悪性腫瘍の処置における治療薬として評価されてきた。例えば、Baselga and Mendelsohn、上記; Masui et al., *Cancer Research* 44:1002-1007 (1984); およびWu et al., *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905 (1995)を参照されたい。

【0005】

HERファミリーの第2のメンバーであるp185^{neu}は、化学処置されたラットの神経芽細胞腫由来のトランスフォーミング遺伝子産物としても同定された。neuプロトオンコジンの活性化型は、コードされたタンパク質の膜貫通領域における(バリンからグルタミン酸への)点突然変異に起因する。neuのヒトホモログの増幅は、乳ガンおよび卵巣ガンで観察され、予後不良と関連する(Slamon et al., *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon et al., *Science*, 244:707-712 (1989); および米国特許第4,968,603号)。これまで、neuプロトオンコジンにおける点突然変異に類似した点突然変異は、ヒト腫瘍については報告されていない。HER2の過剰発現(遺伝子増幅が原因で頻繁であるが一様ではない)は、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓、および膀胱のガン腫を含めたその他のガン腫でも観察されている。数ある中で、King et al., *Science*, 229:974 (1985); Yokota et al., *Lancet* 1:765-767 (1986); Fukushima et al., *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Guerin et al., *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen et al., *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura et al., *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, 38:364(1990); Weiner et al., *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern et al., *Cancer Res.*, 50:5184 (1990); Park et al., *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, 3:254-257 (19

10

20

30

40

50

90); Aasland et al., Br. J. Cancer 57:358-363 (1988); Williams et al. Pathobiology 59:46-52 (1991);およびMcCann et al., Cancer, 65:88-92 (1990)を参照されたい。HER2は前立腺ガンで過剰発現していることがある(Gu et al., Cancer Lett. 99:185-9 (1996); Ross et al., Hum. Pathol. 28:827-33 (1997); Ross et al., Cancer 79:2162-70 (1997);およびSadasivan et al., J. Urol. 150:126-31 (1993))。

【0006】

ラットp185^{neu}およびヒトHER2タンパク質産物に対する抗体が記載されている。Drebinおよび共同研究者らは、ラットneu遺伝子産物であるp185^{neu}に対する抗体を産生させた。例えば、Drebin et al., Cell 41:695-706 (1985); Myers et al., Meth. Enzym. 198:277-290 (1991);およびWO 94 / 22478を参照されたい。Drebin et al., Oncogene 2:273-277 (1988)は、p185^{neu}の二つの異なる領域と反応する抗体の混合物が、ヌードマウスに移植した、neuでトランスフォーメーションしたNIH-3T3細胞に相乗的な抗腫瘍効果を招くと報告している。1998年10月20日に発行された米国特許第5,824,311号も参照されたい。

【0007】

Hudziak et al., Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989)は、ヒト乳房腫瘍細胞系SK-BR-3を用いて特徴付けられたHER2抗体の一団の発生を記載している。抗体を曝露した後に、72時間後に単層をクリスタルバイオレットで染色することによって、SK-BR-3細胞の相対的な細胞増殖を決定した。このアッセイを用いて、細胞増殖を56%阻害した4D5と呼ばれる抗体で最大阻害が得られた。この一団のその他の抗体は、このアッセイではより少ない程度に細胞増殖が低減した。この抗体4D5は、HER2を過剰発現している乳房腫瘍細胞系を、TNF- α の細胞毒性作用に対して感作することがさらに見出された。1997年10月14日に発行された米国特許第5,677,171号も参照されたい。Hudziakらに論じられたHER2抗体は、Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990); Kotts et al., In Vitro 26(3):59A (1990); Sarup et al., Growth Regulation 1:72-82 (1991); Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11(3):117-127 (1991); Kumar et al., Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986 (1991); Lewis et al. Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263 (1993); Pietras et al., Oncogene 9:1829-1838 (1994); Vitetta et al., Cancer Research 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20): 14661-14665 (1994); Scott et al., J. Biol. Chem. 266:14300-5 (1991); D'souza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206 (1994); Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996);およびSchaefer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997)にさらに特徴付けられている。

【0008】

組換えヒト化バージョンのマウスHER2抗体4D5(huMAb4D5-8、rhuMAb HER2、トラスツズマブ、またはHERCEPTIN(登録商標);米国特許第5,821,337号)は、以前に大規模な抗ガン治療を受けた、HER2過剰発現転移性乳ガンを有する患者に臨床的に活性である(Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744 (1996))。トラスツズマブは、腫瘍がHER2タンパク質を過剰発現する転移性乳ガン患者の処置に、1998年9月25日に食品医薬品局から販売許可を受けた。

【0009】

種々の特性を有するその他のHER2抗体は、Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al., Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al., Cancer Res.51:5361-5369 (1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al., Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408 (1993);WO 94 / 00136; Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-2776 (1992);Hancock et al., Cancer Res.51:4575-4580 (1991); Shawver et al., Cancer Res.54:1367-1373 (1994); Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992);米国特許第5,783,186号;およびKlapper et al., O

ncogene 14:2099-2109 (1997)に記載されている。

【 0 0 1 0 】

ホモロジースクリーニングの結果として、レセプター H E R ファミリーの 2 つの他のメンバー、すなわち H E R 3 (米国特許第 5 , 1 8 3 , 8 8 4 号および第 5 , 4 8 0 , 9 6 8 号、ならびに Kraus et al., PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)) および H E R 4 (E P 特許出願第 5 9 9 , 2 7 4 号 ; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993); および Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993)) を同定した。これらのレセプターの両方は、少なくとも一部の乳ガン細胞系上で増加した発現を示す。

【 0 0 1 1 】

これらのレセプター H E R は、一般に、細胞に様々な組み合わせで見い出され、ヘテロ二量体化は、多様な H E R リガンドに対する細胞応答の多様性を増加させると考えられる (Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment 35: 115-132 (1995))。E G F R は、六つの異なるリガンド、すなわち上皮成長因子 (E G F)、トランスフォーミング成長因子アルファ (T G F -)、アンフィレグリン、ヘパリン結合性上皮成長因子 (H B - E G F)、ベータセルリン、およびエピレグリンによって結合される (Groenen et al., Growth Factors 11:235-257 (1994))。単一の遺伝子の選択的スプライシングに起因するヘレグリンタンパク質ファミリーは、H E R 3 および H E R 4 に対するリガンドである。このヘレグリンファミリーには、アルファヘレグリン、ベータヘレグリン、およびガンマヘレグリン (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); 米国特許第 5 , 6 4 1 , 8 6 9 号; および Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997)) ; n e u 分化因子 (N D F)、グリア成長因子 (G G F) ; アセチルコリンレセプター誘導活性 (A R I A) ; および感覚および運動神経細胞由来因子 (S M D F) がある。総説については、Groenen et al., Growth Factors 11:235-257 (1994); Lemke, G. Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262 (1996)、および Lee et al., Pharm. Rev. 47:51-85 (1995) を参照されたい。最近、三つの追加の H E R リガンドが同定された。それらは、H E R 3 または H E R 4 のいずれかと結合することが報告されているニューレグリン - 2 (N R G - 2) (Chang et al., Nature 387 509-512 (1997); および Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)) ; H E R 4 と結合するニューレグリン - 3 (Zhang et al., PNAS (USA) 94(18):9562-7 (1997)) ; および H E R 4 と結合するニューレグリン - 4 (Harari et al., Oncogene 18:2681-89 (1999)) である。H B - E G F、ベータセルリン、およびエピレグリンもまた H E R 4 に結合する。

【 0 0 1 2 】

E G F および T G F は H E R 2 と結合しないが、E G F は、E G F R および H E R 2 を刺激してヘテロ二量体を形成させ、このヘテロ二量体は E G F R を活性化して、その結果としてこのヘテロ二量体中の H E R 2 のリン酸基転移が生じる。二量体化および / またはリン酸基転移は、H E R 2 チロシンキナーゼを活性化するようである。Earpら、上記を参照されたい。同様に、H E R 3 が H E R 2 と同時発現すると、活性なシグナル伝達複合体が形成し、H E R 2 に対する抗体はこの複合体を破壊できる (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994))。追加的に、H E R 2 と同時発現すると、ヘレグリン (H R G) に対する H E R 3 の親和性はより高い親和性状態に増大する。H E R 2 - H E R 3 タンパク質複合体に関しては、Levi et al., Journal of Neuroscience 15: 1329-1340 (1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1431-1435 (1995); および Lewis et al., Cancer Res., 56:1457-1465 (1996) もまた参照されたい。H E R 4 は、H E R 3 と同様に、H E R 2 と共に活性なシグナル伝達複合体を形成する (Carraway and Cantley, Cell 78:5-8 (1994))。

【 0 0 1 3 】

卵巣ガン

卵巣ガンは、女性生殖器の悪性腫瘍による死亡の最大の原因である。米国で 1 年に推定 2 4 0 0 0 人が新しく診断され、この疾患により約 1 3 0 0 0 人が死亡する。進行した卵巣ガンを有する患者は、プラチナ系化学療法をしばしばタキサンと組み合わせて処置され

10

20

30

40

50

ることが多い。これらの薬剤が作用しなくなった後には、治療の選択肢はほとんどない。プラチナ感受性疾患を有する患者はプラチナで再処置されることが多いが、かなりの率の患者が再処置後に短い反応持続期間しか有さない。プラチナ耐性疾患を有する患者については転帰はあまり良好ではない。トポテカン、初回またはその後の化学療法が作用しなくなった患者のために、食品医薬品局（FDA）により許可されており、リボソームドキシソルビシンは、プラチナ系およびパクリタキセル系化学療法方式の両方に抗療性である卵巣ガンを有する患者にのみ許可されている。トポテカンおよびリボソームドキシソルビシンは、プラチナ耐性疾患を有する患者のそれぞれ6%および12%の部分反応を示し、14～18週間の進行のない生存の中央値を有した。最近になって、プラチナ耐性卵巣ガンに部分反応16%を伴う有望な結果がゲムシタピンで報告され、第2選択療法としてこの薬剤の使用が増加するに至った。しかし、現存する治療法が作用しなくなった、進行卵巣ガンを有する患者のための新しく改善された治療選択肢の必要性が明らかに存在する。

10

【0014】

Erbbまたはヒト上皮成長因子レセプター（HER）ファミリーのレセプターチロシンキナーゼは、卵巣ガンの病因に関係づけられている。HERシグナル伝達経路をターゲティングするために、パーツズマブ（rhuma2c4）が、他のレセプターHERとのHER2の二量体化を阻害することにより、リガンド駆動リン酸化および活性化、ならびにRASおよびAKT経路の下流の活性化を阻害するヒト化抗体として開発された。

【0015】

ゲムシタピンは、多様な腫瘍に使用されており、膵臓ガンおよび肺ガンへの使用の適応がある。ゲムシタピン単剤の使用に伴う最も一般的な毒性には、貧血および好中球減少症の発生率それぞれ68%および63%を有する血球減少症がある。別の一般的な毒性は悪心および嘔吐であり、同時発生率は69%であり、グレードIIIの発生率は13%、グレードIVの発生率は1%である。下痢は、それよりも低頻度の19%に起こる。発疹は、さらに通例は30%に起こり、グレードIIIの発生率はわずか1%である。ゲムシタピンは、重大な増加も予期されない毒性も全く有さずに、タキサン、アントラサイクリン、およびプラチナ類などの多くのその他の化学療法剤と組み合わせられてきた。

20

【0016】

トラスツズマブは、フェーズII試験で種々の化学療法のいくつかの組み合わせでゲムシタピンと組み合わせられ、心臓毒性も予期せぬ毒性も観察されずに十分に耐容もされた。Safran et al., Proc Am. Soc. Clin. Oncol. 20:130a (2001), Miller et al., Oncology 15(2): 38-40 (2001)。トラスツズマブおよびゲムシタピンの組み合わせに関しては、Zinner et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:328a (2001), Nagourney et al., Breast Cancer Res. Treat. 57:116, Abstract 475 (1999), Bun et al., Proc. Am. Assoc. Canc. Res. 41:719, Abstract #4571 (2000), Konecny et al., Breast Cancer Res Treat 57: 114, Abstract 467 (1999), O'Shaughnessy et al., Sem. Oncol 2(suppl3):22-26 (2004), Sledge et al., Sem. Oncol. 2(suppl3): 19-21 (2003), Zinner et al., Lung Cancer 44(1):99-110 (2004), Gatzemeier et al., Ann of Oncol. 15:19-27 (2004)も参照されたい。

30

【0017】

固形腫瘍を処置するための単剤としてのOmnitargのフェーズI試験において、進行卵巣ガンを有する被験者3人をパーツズマブで処置した。1人は持続的な部分反応を有し、追加の被験者1人は15週間安定病態を有した。Agus et al., Proc Am Soc Clin Oncol 22: 192, Abstract 771 (2003)。

40

【0018】

発明の概要

本発明は、第一の局面において、卵巣ガン、原発性腹膜ガン、および卵管ガンからなる群より選択されるプラチナ耐性ガンを処置するための方法に関するものであり、その方法は、トラスツズマブよりも効果的にHERの二量体化を阻害するHER2抗体と、代謝拮抗化学療法剤とを、それぞれそのガンを処置するのに有効な量で患者に投与することを含

50

む。

【 0 0 1 9 】

別の局面では、本発明は、卵巢ガン、原発性腹膜ガン、および卵管ガンからなる群より選択されるプラチナ耐性ガンを処置するための方法を提供し、その方法は、HER2上のヘテロ二量体結合部位に結合するHER2抗体とゲムシタピンとを、それぞれそのガンを処置するのに有効な量で患者に投与することを含む。

【 0 0 2 0 】

なおさらなる局面では、本発明は、卵巢ガン、原発性腹膜ガン、および卵管ガンからなる群より選択されるプラチナ耐性ガンを処置するための方法に関するものであり、その方法は、HER2のドメインIIに結合するHER2抗体とゲムシタピンとを、それぞれそのガンを処置するのに有効な量で患者に投与することを含む。

10

【 0 0 2 1 】

好ましい態様の詳細な説明

I. 定義

「レセプターHER」は、レセプターHERファミリーに属するレセプタータンパク質チロシンキナーゼであり、レセプターEGFR、HER2、HER3、およびHER4、ならびに将来同定されるべき本ファミリーのその他のメンバーを含む。レセプターHERは、HERリガンドと結合できる細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびリン酸化されうるいくつかのチロシン残基を保有するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを一般に含むものである。レセプターHERは、「天然配列」レセプターHERまたはその「アミノ酸配列変異体」でありうる。好ましくは、レセプターHERは天然配列のヒトレセプターHERである。

20

【 0 0 2 2 】

HER2の細胞外ドメインは、四つのドメイン、すなわちドメインI（約1～195のアミノ酸残基）、ドメインII（約196～320のアミノ酸残基）、ドメインIII（約321～488のアミノ酸残基）、およびドメインIV（約489～632のアミノ酸残基）（シグナルペプチドを除いた残基に番号付け）を含む。Garrett et al., Mol. Cell. 11:495-505 (2003), Cho et al., Nature 421:756-760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)、またはPlowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750 (1993)、および本明細書の図16を参照されたい。

30

【 0 0 2 3 】

用語「erbB1」、「HER1」、「上皮成長因子レセプター」、および「EGFR」は、本明細書において相互交換可能に使用され、例えばCarpenter et al., Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987)に開示されたようなEGFRを、その天然突然変異体（例えば、Humphrey et al., PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)におけるような欠失突然変異体EGFR）を含めて指す。erbB1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子を指す。

【 0 0 2 4 】

表現「erbB2」および「HER2」は、本明細書において相互交換可能に使用され、例えばSemba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985)およびYamamoto et al., Nature 319:230-234 (1986)に記載されたヒトHER2タンパク質（GenebankアクセッションナンバーX03363）を指す。用語「erbB2」は、ヒトerbB2をコードする遺伝子を指し、「neu」は、ラットp185^{neu}をコードする遺伝子を指す。好ましいHER2は天然配列のヒトHER2である。

40

【 0 0 2 5 】

「erbB3」および「HER3」は、例えば、米国特許第5,183,884号および第5,480,968号、ならびにKraus et al., PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989)に開示されたようなレセプターポリペプチドを指す。

【 0 0 2 6 】

本明細書における用語「erbB4」および「HER4」は、例えば、EP特許出願第

50

599, 274号; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993); および Plowman et al., Nature, 366:473-475 (1993) に開示されたようなレセプターポリペプチドを、例えば、1999年4月22日に公表されたWO 99/19488 に開示されたようなそのアイソフォームを含めて指す。

【0027】

「HERリガンド」により、レセプターHERに結合し、かつ/またはそれを活性化するポリペプチドを意味する。本明細書において特に関心対象であるHERリガンドは、上皮成長因子(EGF)(Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)); トランスフォーミング成長因子アルファ(TGF-) (Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)); 神経鞘腫またはケラチン細胞の自己分泌成長因子としても公知であるアンフィレグリン(Shoyab et al., Science 243:1074-1076 (1989); Kimura et al., Nature 348:257-260 (1990); および Cook et al., Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)); ベータセルリン(Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993); および Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)); ヘパリン結合性上皮成長因子(HB-EGF)(Higashiyama et al., Science 251:936-939 (1991)); エピレグリン(Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995); および Komurasaki et al., Oncogene 15:2841-2848 (1997)); ヘレグリン(下記参照); ニューレグリン-2(NRG-2)(Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)); ニューレグリン-3(NRG-3)(Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)); ニューレグリン-4(NRG-4)(Harari et al., Oncogene 18:2681-89 (1999)) または クリプト(cripto)(CR-1)(Kannan et al., J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)) などの天然配列のヒトHERリガンドである。EGFRと結合するHERリガンドには、EGF、TGF- 、アンフィレグリン、ベータセルリン、HB-EGF、およびエピレグリンがある。HER3と結合するHERリガンドには、ヘレグリンがある。HER4と結合できるHERリガンドには、ベータセルリン、エピレグリン、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4、およびヘレグリンがある。

【0028】

本明細書に使用する場合、「ヘレグリン」(HRG)は、米国特許第5,641,869号または Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993) に開示されたようなヘレグリン遺伝子産物にコードされるポリペプチドを指す。ヘレグリンの例には、ヘレグリン- 、ヘレグリン- 1、ヘレグリン- 2、およびヘレグリン- 3 (Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); および 米国特許第5,641,869号); neu分化因子(NDF)(Peles et al., Cell 69:205-216 (1992)); アセチルコリンレセプター誘導活性(ARIA)(Falls et al., Cell 72:801-815 (1993)); グリア細胞成長因子(GGF)(Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)); 感覚および運動神経細胞由来因子(SMDF)(Ho et al., J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)); -ヘレグリン(Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997)) がある。本用語は、天然配列のHRGポリペプチドのEGF様ドメインフラグメント(HRG 1₁₇₇-244)などの、そのHRGポリペプチドの生物学的に活性なフラグメントおよび/またはアミノ酸配列変異体を含む。

【0029】

本明細書における「HER二量体」は、少なくとも二つの異なるレセプターHERを含む非共有的に会合した二量体である。二つ以上のレセプターHERを発現している細胞がHERリガンドに曝露された場合にそのような複合体が形成することがあり、免疫沈降によりその複合体を単離して、例えば Sliwowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665 (1994) に記載されているような SDS-PAGE によって分析することができる。当該HER二量体の例には、EGFR-HER2、HER2-HER3、およびHER3-HER4ヘテロ二量体がある。さらに、HER二量体は、二つ以上のレセプターHER2を、HER3、HER4、またはEGFRのような異なるレセプターHERと組み合わせる。サイトカインレセプターサブユニット(例えば gp130)などのその

他のタンパク質がその二量体と会合していることがある。

【0030】

HER2上の「ヘテロ二量体結合部位」は、EGFR、HER3、またはHER4と二量体を形成するときにそれらの細胞外ドメイン中の領域と接触または連結するHER2の細胞外ドメイン中の領域を指す。その領域はHER2のドメインIIに見い出される。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004)。

【0031】

「HER活性化」または「HER2活性化」は、任意の一つもしくは複数のレセプターHER、またはレセプターHER2の活性化またはリン酸化を指す。一般に、HER活性化は（例えば、レセプターHERにおけるチロシン残基をリン酸化しているレセプターHERの細胞内キナーゼドメインまたは基質ポリペプチドによって起こる）シグナル伝達を招く。HER活性化は、関心対象のレセプターHERを含むHER二量体に結合するHERリガンドによって仲介されうる。HER二量体に結合するHERリガンドは、二量体における一つまたは複数のレセプターHER中のキナーゼドメインを活性化することにより、一つもしくは複数のレセプターHER中のチロシン残基のリン酸化および/またはAktもしくはMAPK細胞内キナーゼなどの追加の基質ポリペプチド（類）中のチロシン残基のリン酸化を生じうる。

10

【0032】

「天然配列」のポリペプチドは、天然由来のポリペプチド（例えばレセプターHERまたはHERリガンド）と同じアミノ酸配列を有するポリペプチドである。当該天然配列のポリペプチドを自然界から単離でき、また、組換えもしくは合成手段により産生させることができる。このように、天然配列のポリペプチドは、天然ヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、または任意のその他の哺乳動物種由来であるポリペプチドのアミノ酸配列を有しうる。

20

【0033】

用語「アミノ酸配列変異体」は、天然配列のポリペプチドとある程度異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。通常は、アミノ酸配列変異体は天然HERリガンドの少なくとも一つのレセプター結合ドメインまたは天然レセプターHERの少なくとも一つのリガンド結合ドメインと少なくとも約70%の相同性を有するものであり、好ましくは、アミノ酸配列は、当該レセプターまたはリガンド結合ドメインと少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%相同なものである。そのアミノ酸配列変異体は、天然アミノ酸配列のアミノ酸配列内のある位置に置換、欠失、および/または挿入を有する。

30

【0034】

「相同性」は、配列をアライメントして、必要ならばギャップを導入して最大率の相同性を実現させた後で、アミノ酸配列変異体中の同一な残基の率として定義される。アライメントのための方法およびコンピュータプログラムは当技術分野で周知である。一つの当該コンピュータプログラムは、米国著作権局、Washington, DC 20559に1991年12月10日にユーザ文書と共に納付された、Genentech, Inc.によって著作された「Align2」である。

40

【0035】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、具体的には、所望の生物学的活性を示す限りはインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも二つのインタクトな抗体から形成された多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、および抗体フラグメントにわたる。

【0036】

本明細書に使用されるような用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、モノクローナル抗体の産生時に生じる可能性のある変異体を除いて、その集団を構成する個別の抗体は同一であり、かつ/または同一のエピトープと結合する。当該変異体は一般に少量存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクロー

50

ナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンが混入していない点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から得られるとしてのその抗体の性質を表し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈してはならない。例えば、本発明により使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法により作製することができるし、また、組換えDNA法によって作製することもできる（例えば米国特許第4,816,567号を参照されたい）。「モノクローナル抗体」は、例えばClackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載された技法を用いたファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

【0037】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、所望の生物学的活性を示す限り、重鎖および/または軽鎖の部分が、特定の種由来の抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同であるが、その鎖（類）の残りが、別の種由来または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である「キメラ」抗体、ならびに当該抗体のフラグメントが具体的には含まれる（米国特許第4,816,567号；およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書において関心対象のキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば旧世界ザル、類人猿など）由来の可変ドメイン抗原結合配列およびヒト定常部配列を含む「霊長類化（primatized）」抗体がある。

20

【0038】

「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の部分を含み、その部分は好ましくはその抗原結合部または可変部を含む。抗体フラグメントの例には、F a b、F a b'、F (a b')₂、およびF vフラグメント；二特異性抗体（diabody）；線状抗体（linear antibody）；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメント（類）から形成された多重特異性抗体がある。

【0039】

「インタクトな抗体」は、抗原結合性可変部ならびに軽鎖定常ドメイン（C_L）と重鎖定常ドメインであるC_H1、C_H2、およびC_H3とを含む抗体である。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えばヒト天然配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列変異体でありうる。好ましくは、インタクトな抗体は一つまたは複数のエフェクター機能を有する。

30

【0040】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のF c部（天然配列F c部またはアミノ酸配列変異体F c部）に起因しうる生物学的活性を指す。抗体のエフェクター機能の例には、C1qとの結合；補体依存性細胞毒性作用；F cレセプターとの結合；抗体依存性細胞性細胞毒性作用（ADCC）；食作用；細胞表面レセプターのダウンレギュレーション（例えばB細胞レセプター；BCR）などがある。

【0041】

重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、インタクトな抗体を異なる「クラス」に割り当てることができる。インタクトな抗体には五つの主要クラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのいくつかを「サブクラス」（アイソタイプ）、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、およびIgA2にさらに分けることができる。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。

40

【0042】

「抗体依存性細胞性細胞毒性作用」および「ADCC」は、F cレセプター（F c R）を発現する非特異的細胞毒性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）がターゲット細胞上に結合した抗体を認識して、その後にターゲット

50

細胞の溶解を起こす細胞介在性反応を指す。A D C Cを仲介するためのプライマリー細胞であるNK細胞はF c R I I Iのみを発現するが、単球はF c R I、F c R I I、およびF c R I I Iを発現する。造血細胞上のF c Rの発現を要約したものは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3である。関心対象の分子のA D C C活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されているような*in vitro* A D C Cアッセイを行うことができる。当該アッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(P B M C)およびナチュラルキラー(N K)細胞がある。または、もしくは追加的に、関心対象の分子のA D C C活性を、例えばClynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されたような動物モデルで*in vivo*評価できる。

10

【0043】

「ヒトエフェクター細胞」は、一つまたは複数のF c Rを発現してエフェクター機能を果たす白血球である。好ましくは、これらの細胞は少なくともF c R I I Iを発現してA D C Cエフェクター機能を果たす。A D C Cを仲介するヒト白血球の例には、末梢血単核細胞(P B M C)、ナチュラルキラー(N K)細胞、単球、細胞毒性T細胞、および好中球があり、P B M CおよびNK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、その天然起源から、例えば本明細書に記載されたように血液またはP B M Cから単離することができる。

【0044】

用語「F c レセプター」または「F c R」は、抗体のF c部に結合するレセプターを記述するために使用される。好ましいF c Rは天然配列のヒトF c Rである。さらに、好ましいF c Rは、I g G抗体と結合するもの(ガンマレセプター)であり、好ましいF c Rには、F c R I、F c R I I、およびF c R I I Iサブクラスのレセプターが、これらのレセプターのアレル変異体および選択的スプライシングされた形態を含めて挙げられる。F c R I I Iレセプターには、F c R I I I A(「活性化レセプター」)およびF c R I I I B(「阻害レセプター」)があり、それらは、細胞質ドメインが主に異なる類似したアミノ酸配列を有する。活性化レセプターF c R I I I Aは、細胞質ドメインにI T A M(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)を含む。阻害レセプターF c R I I I Bは、細胞質ドメインにI T I M(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)を含む(Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)の総説Mを参照されたい)。F c Rは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994);およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に総説されている。将来同定されるものを含めたその他のF c Rは、本明細書において用語「F c R」で包含される。この用語は、胎児への母体IgGの輸送を担う新生児レセプターF c R nも含む(Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))。

20

30

【0045】

「補体依存性細胞毒性作用」または「C D C」は、分子が補体の存在下でターゲットを溶解する能力を指す。補体活性化経路は、コグネイト抗原と複合体を形成した分子(例えば抗体)への補体系の第1成分(C 1 q)の結合により開始する。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)に記載されているようなC D Cアッセイを行うことができる。

40

【0046】

「天然抗体」は、通常は2本の同一の軽(L)鎖および2本の同一の重(H)鎖から構成される約150000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合する一方で、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で多様である。各重鎖および軽鎖は、規則的に間隔のあいた鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_H)を有し、続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン(V_L)と、もう一方の末端に定常ドメインとを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖可変ドメインは、重鎖可変ドメインと整列している。特定

50

のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の界面を形成すると考えられる。

【 0 0 4 7 】

用語「可変」は、可変ドメインのある部分が、抗体間で広範囲に配列が異なり、各特定の抗体の特定の抗原に対する結合および特異性に使用されるという事実を指す。しかし、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたり均等に分布しているわけではない。可変性は、軽鎖および重鎖の可変ドメイン両方における超可変部と呼ばれる三つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク部（F R）と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインそれぞれは、4つのF Rを含み、それらのF Rは大部分がシート立体配置を採り、三つの超可変部により連結され、これらの超可変部は、シート構造と連結するループを形成して、場合によりこのシート構造の一部を形成する。各鎖中の超可変部は、F Rによって相互に近接して保持されて、もう一方の鎖由来の超可変部と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照されたい）。定常ドメインは、抗原に対する抗体の結合に直接には関与しないが、抗体依存性細胞性細胞毒性作用（A D C C）での抗体の関与などの様々なエフェクター機能を示す。

10

【 0 0 4 8 】

本明細書に使用する場合、用語「超可変部」は、抗原との結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変部は、一般に「相補性決定部」または「C D R」由来のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24～34（L1）、残基50～56（L2）、および残基89～97（L3）、ならびに重鎖可変ドメイン中の残基31～35（H1）、残基50～65（H2）および残基95～102（H3）；Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）ならびに/または「超可変ループ」由来のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26～32（L1）、50～52（L2）、および残基91～96（L3）、ならびに重鎖可変ドメイン中の残基26～32（H1）、残基53～55（H2）および残基96～101（H3）；Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）を含む。「フレームワーク部」または「F R」残基は、本明細書において定義するような超可変部残基以外の、可変ドメインの残基である。

20

30

【 0 0 4 9 】

抗体のパパイン消化は、「F a b」フラグメントと呼ばれる、それぞれ単一の抗原結合部位を有する二つの同一の抗原結合フラグメントと、名前が、容易に結晶化できる能力を反映する残りの「F c」フラグメントとを産生する。ペプシン処理は、二つの抗原結合部位を有するF（a b'）₂フラグメントを生じ、このフラグメントは、依然として抗原を架橋できる。

【 0 0 5 0 】

「F v」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む、最小限の抗体フラグメントである。この領域は、密接に非共有的に会合した、一つの重鎖可変ドメインと一つの軽鎖可変ドメインとの二量体からなる。V_H - V_L二量体の表面上に抗原結合部位を規定するために、各可変ドメインの三つの超可変部が相互作用するのは、この立体配置である。まとめると、六つの超可変部は、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン（すなわち抗原に対して特異的な三つの超可変部のみを含む、F vの半分）でさえも、結合部位全体よりも低い親和性ではあるが、抗原を認識して結合する能力を有する。

40

【 0 0 5 1 】

F a bフラグメントもまた、軽鎖の定常ドメインと、重鎖の第一定常ドメイン（C H 1）とを含む。F a b'フラグメントは、抗体のヒンジ部由来の一つまたは複数のシステインを含めて、重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端に数残基が付加していることが、F a bフラグメントと異なる。F a b' - S Hは、本明細書においてF a b'についての呼称であり、F a b' - S Hでは、定常ドメインのシステイン残基（類）が少なくとも一つの

50

遊離チオール基を有する。F (a b ')₂ 抗体フラグメントは、間にヒンジシステインを有する F a b ' フラグメント対として本来産生された。抗体フラグメントのその他の化学的カップリングも公知である。

【 0 0 5 2 】

任意の脊椎動物種由来である抗体の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ () およびラムダ () と呼ばれる二つの明らかに別個の型のうちの一つに割り当てることができる。

【 0 0 5 3 】

「一本鎖 F v 」抗体フラグメントまたは「 s c F v 」抗体フラグメントは、抗体の V_H ドメインおよび V_L ドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。好ましくは、この F v ポリペプチドは、この s c F v が抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする、V_H ドメインと V_L ドメインとの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。s c F v の総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994) を参照されたい。HER 2 抗体の s c F v フラグメントは、WO 93 / 1 6 1 8 5 ; 米国特許第 5 , 5 7 1 , 8 9 4 号 ; および米国特許第 5 , 5 8 7 , 4 5 8 号に記載されている。

【 0 0 5 4 】

用語「二特異性抗体」は、二つの抗原結合部位を有する小さな抗体フラグメントを指し、このフラグメントは、同じポリペプチド鎖 (V_H - V_L) 中で可変軽鎖ドメイン (V_L) に連結した可変重鎖ドメイン (V_H) を含む。同じ鎖上のこれら二つのドメイン間で対形成するには短すぎるリンカーを用いることによって、これらのドメインを別の鎖の相補性ドメインと対形成することを強いて、二つの抗原結合部位を生み出す。二特異性抗体は、例えば、EP 4 0 4 , 0 9 7 ; WO 93 / 1 1 1 6 1 ; および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) に、さらに完全に記載されている。

【 0 0 5 5 】

「ヒト化」形態の非ヒト (例えば、げっ歯類) 抗体は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は、通例レシピエントの超可変部由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種 (ドナー抗体) の超可変部由来の残基に置換されている、ヒト免疫グロブリン (レシピエント抗体) である。時には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク部 (F R) の残基は、対応する非ヒト残基に置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にもドナー抗体中にも見い出されない残基を含み得る。これらの改変は、抗体の性能をさらに洗練するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含むものであり、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応する超可変ループのうちの全てまたは実質的に全てと、F R の全てまたは実質的に全てとは、ヒト免疫グロブリン配列のものであろう。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常部 (F c) の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常部も場合により含むものである。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 3 21:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); および Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) を参照されたい。

【 0 0 5 6 】

ヒト化 HER 2 抗体には、h u M A b 4 D 5 - 1、h u M A b 4 D 5 - 2、h u M A b 4 D 5 - 3、h u M A b 4 D 5 - 4、h u M A b 4 D 5 - 5、h u M A b 4 D 5 - 6、h u M A b 4 D 5 - 7、および参照により本明細書に特に組み入れられる米国特許第 5 , 8 2 1 , 3 3 7 号の表 3 に記載される h u M A b 4 D 5 - 8 またはトラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標)) ; ヒト化 5 2 0 C 9 (WO 93 / 2 1 3 1 9) および本明細書に記載されているようなヒト化 2 C 4 抗体がある。

【 0 0 5 7 】

本明細書の目的で、「トラスツズマブ」、「HERCEPTIN (登録商標)」、およ

10

20

30

40

50

び「h u M A b 4 D 5 - 8」は、それぞれ配列番号 1 4 および 1 5 の軽鎖および重鎖アミノ酸配列を含む抗体を指す。

【 0 0 5 8 】

本明細書において、「パーツズマブ」および「O M N I T A R G (商 標)」は、それぞれ配列番号 1 6 および 1 7 の軽鎖および重鎖アミノ酸配列を含む抗体を指す。

【 0 0 5 9 】

「ネイキッドな抗体」は、(本明細書に定義されるとおり) 細胞毒性部分または放射性ラベルなどの異種分子とコンジュゲーションしていない抗体である。

【 0 0 6 0 】

「単離された」抗体は、その天然環境の構成要素から同定されて、分離および/または回収された抗体である。その天然環境の混入構成要素は、その抗体についての診断的用途または治療的用途を妨害するであろう物質であり、それらには、酵素、ホルモン、およびその他のタンパク質様または非タンパク質様の溶質が含まれうる。好ましい態様では、抗体は、(1) ローリー法によって決定したときに、抗体の 9 5 重量%を超えるまで、最も好ましくは 9 9 重量%を超えるまで精製されるか、(2) スピニングカップ (spinning cup) シークエネーターの使用により、少なくとも 1 5 残基の N 末端アミノ酸配列もしくは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度に精製されるか、または (3) クーマシーブルー染色もしくは好ましくは銀染色を用いた、還元条件もしくは非還元条件での S D S - P A G E によって均一になるまで精製されるであろう。抗体の天然環境の少なくとも一つの構成要素は存在しないものであることから、単離された抗体には、組換え細胞内の i n s i t u 抗体が含まれる。しかし、通常、単離された抗体は、少なくとも 1 回の精製段階によって調製されるものである。

10

20

【 0 0 6 1 】

「トラスツズマブよりも効果的に H E R の二量体化を阻害する」H E R 2 抗体は、トラスツズマブよりも効果的に (例えば少なくとも約 2 倍効果的に) H E R 二量体を低減または除去する抗体である。好ましくは、当該抗体は、マウスモノクローナル抗体 2 C 4、マウスモノクローナル抗体 2 C 4 の F a b フラグメント、パーツズマブ、およびパーツズマブの F a b フラグメントからなる群より選択される抗体と少なくとも同じくらい効果的に H E R 2 の二量体化を阻害する。H E R 二量体を直接研究することにより、または H E R の二量体化を招く H E R の活性化もしくは下流のシグナル伝達を評価することにより、および/または抗体の H E R 2 結合部位を評価することなどにより、H E R 二量体化の阻害を評価できる。トラスツズマブよりも効果的に H E R 2 二量体化を阻害する能力を有する抗体をスクリーニングするためのアッセイは、Agus et al., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) ならびに本明細書の実施例 1 ~ 2 および 4 に記載されている。ほんの一例として、例えば H E R 二量体の形成阻害 (例えば、Agus et al., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) の図 1 A ~ B ; および本明細書の実施例 2 を参照されたい) ; H E R リガンドによる H E R 二量体を発現する細胞の活性化の低減 (本明細書の実施例 1 および例えば Agus et al., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) の図 2 A ~ B) ; H E R 二量体を発現する細胞に対する H E R リガンドの結合の遮断 (本明細書の実施例 1 および例えば Agus et al., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) の図 2 E) ; H E R リガンドの存在下 (または不在下) で H E R 二量体を発現するガン細胞 (例えば M C F 7、M D A - M D - 1 3 4、Z R - 7 5 - 1、M D - M B - 1 7 5、T - 4 7 D 細胞) の細胞成長阻害 (本明細書の実施例 1 および例えば Agus et al., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) の図 3 A ~ D) ; 下流のシグナル伝達の阻害 (例えば、H R G 依存性 A K T リン酸化の阻害または H R G もしくは T G F 依存性 M A P K リン酸化の阻害) (本明細書の実施例 4 および例えば Agus et al., Cancer Cell 2: 127-137 (2002) の図 2 C ~ D を参照されたい) を評定することによって H E R 二量体化の阻害をアッセイすることができる。抗体 - H E R 2 結合部位を研究することによって、例えば H E R 2 に結合した抗体の結晶構造などの構造またはモデルを評価することによっても、その抗体が H E R 二量体化を阻害するかどうか評定することができる (例えば、Franklin et al., Cancer Cell 5: 317-328 (2004) を参照されたい) 。

30

40

50

【 0 0 6 2 】

HER2 抗体は、トラスツズマブよりも効果的に（例えば少なくとも2倍効果的に）「HRG 依存性 AKT リン酸化を阻害」し、かつ/または「HRG もしくは TGF 依存性の MAPK リン酸化」を阻害しうる（例として Agus et al., Cancer Cell 2:127-137 (2002) および本明細書の実施例 4 を参照されたい）。

【 0 0 6 3 】

HER2 抗体は、「HER2 エクトドメインの開裂を阻害しない」抗体でありうる（Molina et al., Cancer Res. 61:4744-4749(2001)）。

【 0 0 6 4 】

HER2 の「ヘテロ二量体結合部位に結合する」HER2 抗体は、ドメイン II 中の残基に結合して（場合によりドメイン I および III などの HER2 細胞外ドメインのドメインのうち他のものにおける残基にも結合して）、HER2 - EGFR、HER2 - HER3、または HER2 - HER4 ヘテロ二量体の形成を少なくともある程度立体的に妨害することができる。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004) は、RCSB Protein Data Bank (ID コード IS78) に寄託された HER2 - パーツマブの結晶構造を特徴づけ、その構造は HER2 のヘテロ二量体結合部位に結合する抗体の例を例示している。

10

【 0 0 6 5 】

HER2 の「ドメイン II に結合する」抗体は、ドメイン II 中の残基と、場合によりドメイン I およびドメイン III などの、HER2 のその他のドメイン（類）中の残基と結合する。好ましくは、ドメイン II に結合する抗体は、HER2 のドメイン I、II、および III の間の結合部に結合する。

20

【 0 0 6 6 】

「卵巣」は、女性において子宮の両側に位置する二つの小さなアーモンド型の器官の一つである。

【 0 0 6 7 】

「卵管」または「輸卵管」は、雌性哺乳動物の卵巣から子宮に至る2本の細い管の1本である。

【 0 0 6 8 】

「腹膜」は、腹部などの体腔の上皮裏装である。

30

【 0 0 6 9 】

「卵巣ガン」は、一方または両方の卵巣に発現する、潜在的に生命を危うくする悪性腫瘍である。卵巣ガンの症状が出現するときまでに、卵巣腫瘍は腹部全体にガン細胞を播種するのに十分なほど大きく成長していることがある。卵巣の外側に拡大した卵巣ガン細胞は、転移性卵巣ガンと呼ばれる。卵巣腫瘍は、横隔膜、腸、および/または網（腹部にある器官を覆い、間隙を埋める脂肪層）に拡大する傾向にある。ガン細胞はリンパのチャネルおよび血流を介して他の器官に拡大することもある。本明細書において処置される卵巣ガンには、3つの原発性クラスの悪性卵巣腫瘍、すなわち上皮性腫瘍、胚細胞性腫瘍、および間質性腫瘍がある。

【 0 0 7 0 】

「原発性腹膜ガン」は、腹膜に発生するガンを指す。原発性腹膜ガンは、顕微鏡像、症状、拡大パターン、および予後からみて上皮性卵巣ガンに非常に類似していることがある。卵巣を除去された女性は、依然として原発性腹膜ガンに冒されるおそれがある。

40

【 0 0 7 1 】

「卵管ガン」は、卵管および/または広間膜のガンを指す。

【 0 0 7 2 】

「上皮性腫瘍」は、卵巣の外側を取り囲む胚上皮として公知である立方体形の細胞層に発現する。上皮性腫瘍は全ての卵巣ガンの90%までを占める。

【 0 0 7 3 】

「胚細胞性腫瘍」は、卵巣の卵成熟細胞に見出される。全ての卵巣ガンの約3%を占め

50

る胚細胞性腫瘍は、ティーンエイジャーおよび若い女性に発生することが最も多い。

【0074】

「間質性腫瘍」は、卵巣がばらばらにならないようにまとめて、女性ホルモンであるエストロゲンおよびプロゲステロンを産生する結合組織細胞から発生する。間質性腫瘍は全ての卵巣ガンの6%を占める。

【0075】

本明細書における「腫瘍試料」は、患者の腫瘍由来であるか、またはその腫瘍由来の腫瘍細胞を含む試料である。本明細書における腫瘍試料の例には、腫瘍生検、循環腫瘍細胞、循環血漿タンパク質、腹水、腫瘍由来の、または腫瘍様性質を示す初代細胞培養物または細胞系、およびホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍試料などの保存処理された腫瘍試料があるが、それに限定されるわけではない。

10

【0076】

本明細書に使用する場合の「成長阻害剤」は、細胞、特にHER発現性ガン細胞の成長を *in vitro* または *in vivo* のいずれかで阻害する化合物または組成物を指す。このように、成長阻害剤は、S期のHER発現細胞の率を有意に低減する薬剤でありうる。成長阻害剤の例には、G1停止およびM期停止を誘導する薬剤などの、細胞周期の進行を（S期以外の位置で）遮断する薬剤がある。古典的M期遮断薬には、ビンカ（ビンクリスチンおよびビンブラスチン）、タキサン、ならびにドキシソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、およびブレオマイシンなどのトポII阻害剤がある。G1で停止させる薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、およびara-CなどのDNAアルキル化剤は、S期停止にも波及する。さらなる情報は、"Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)という標題のThe Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., 第1章、特に13頁に見い出すことができる。

20

【0077】

「成長阻害」抗体の例は、HER2に結合し、そしてHER2を過剰発現しているガン細胞の成長を阻害する抗体である。好ましい成長阻害HER2抗体は、約0.5から30 µg/mlの抗体濃度で、細胞培養でのSK-BR-3乳房腫瘍細胞の成長を、20%よりも高く、好ましくは50%よりも高く（例えば、約50%から約100%）阻害する。ここで、抗体にSK-BR-3細胞を曝露した6日間後に、この成長阻害を決定する（1997年10月14日に発行された米国特許第5,677,171号を参照されたい）。このSK-BR-3細胞成長阻害アッセイは、その特許および本明細書の下記にさらに詳細に記載されている。好ましい成長阻害抗体は、マウスモノクローナル抗体4D5のヒト化変異体、例えばトラスツマブである。

30

【0078】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAのフラグメント化、細胞収縮、小胞体の拡大、細胞のフラグメント化、および/または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成によって決定されるようなプログラム細胞死を誘導する抗体である。この細胞は、通常、レセプターHER2を過剰発現する細胞である。好ましくは、この細胞は腫瘍細胞、例えば、乳房細胞、卵巣細胞、胃細胞、子宮内膜細胞、唾液腺細胞、肺細胞、腎臓細胞、結腸細胞、甲状腺細胞、膵臓細胞、または膀胱細胞である。*in vitro* では、この細胞は、SK-BR-3細胞、BT474細胞、Calu3細胞、MDA-MB-453細胞、MDA-MB-361細胞、またはSKOV3細胞でありうる。アポトーシスに関連する細胞事象を評価するために、様々な方法が利用できる。例えば、アネキシンの結合によって、ホスファチジルセリン（PS）の移行を測定でき；DNAラダー生成によってDNAのフラグメント化を評価でき；低二倍体細胞の任意の増加によってDNAのフラグメント化にともなう核/クロマチンの凝縮を評価できる。好ましくは、アポトーシスを誘導する抗体は、BT474細胞を用いたアネキシン結合アッセイにおいて、未処理細胞と比較して約2から50倍、好ましくは約5から50倍、最も好ましく

40

50

は約10から50倍のアネキシン結合の誘導を招く抗体である(以下参照)。アボトーシスを誘導するHER2抗体の例は、7C2および7F3である。

【0079】

「エピトープ2C4」は、抗体2C4が結合する、HER2の細胞外ドメイン中の領域である。2C4エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような日常的な交差遮断アッセイを行うことができる。または、エピトープマッピングを行って、その抗体がHER2の2C4エピトープ(例えば、HER2の約22番残基から約584番残基まで、両端の残基を含めた領域における任意の一つまたは複数の残基; 図1A~B参照)に結合するかどうかを評定することができる。エピトープ2C4は、HER2の細胞外ドメイン中のドメインII由来である残基を含む。2C4およびパースズマブは、ドメインI、II、およびIIIの結合部でHER2の細胞外ドメインに結合する。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004)。

10

【0080】

「エピトープ4D5」は、HER2の細胞外ドメイン中の、抗体4D5(ATCC CRL 10463)およびトラストズマブが結合する領域である。このエピトープはHER2の膜貫通ドメインに近接しており、HER2のドメインIV内に存在する。4D5エピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)に記載されているような日常的な交差遮断アッセイを行うことができる。または、エピトープマッピングを行って、その抗体がHER2の4D5エピトープ(例えば、約529番残基から約625番残基まで、両端の残基を含めた領域における任意の一つまたは複数の残基; 図1A~B参照)に結合するかどうかを評定することができる。

20

【0081】

「エピトープ7C2/7F3」は、7C2抗体および/または7F3抗体(それぞれATCCに寄託、以下参照)が結合する、HER2の細胞外ドメインのドメインI内のN末端の領域である。7C2/7F3エピトープに結合する抗体についてスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)に記載されているような日常的な交差遮断アッセイを行うことができる。または、その抗体がHER2の7C2/7F3エピトープ(例えば、HER2の約22番残基から約53番残基までの領域中の任意の一つまたは複数の残基; 図1A~B参照)に結合するかどうかを確認するために、エピトープマッピングを行うことができる。

30

【0082】

「処置」は、治療的処置および予防手段または阻止手段の両方を指す。処置を必要とする者には、すでにガンを有する者およびガンを予防されるべき者が含まれる。従って、本明細書において処置されるべき患者は、ガンを有すると診断された場合もあるし、また、ガンの素因があるか、もしくはガンに感受性な場合もある。

【0083】

用語「有効量」は、患者におけるガンを処置するために有効な薬物の量を指す。その薬物の有効量は、ガン細胞数を減少させ; 腫瘍の大きさを低減し; 末梢器官へのガン細胞の浸潤を阻害し(すなわちある程度減速させて、好ましくは停止させ); 腫瘍の転移を阻害し(すなわちある程度減速させて、好ましくは停止させ); 腫瘍の成長をある程度阻害し; かつ/またはガンに関連した一つもしくは複数の症状をある程度軽減することができる。薬物が成長を阻止して、かつ/または現存しているガン細胞を殺滅できる程度に、有効量は細胞増殖抑制性および/または細胞毒性でありうる。有効量は、(例えば固形腫瘍効果判定基準(RECIST)またはCA-125の変化によって測定されるような)進行のない生存期間を延長し、(部分反応(PR)または完全反応(CR)を含めた)反応を招き、全生存期間を増大させ、かつ/または(FOSIによって評定されるような)ガンの一つもしくは複数の症状を改善することができる。

40

50

【 0 0 8 4 】

「全生存」は、診断または処置の時点から 1 年間、5 年間などの所定の期間生存を維持した患者を指す。

【 0 0 8 5 】

「進行のない生存」は、ガンが悪化せずに生存を維持した患者を指す。

【 0 0 8 6 】

「客観的反応」は、完全反応 (C R) または部分反応 (P R) を含めた測定可能な応答を指す。

【 0 0 8 7 】

「完全反応」または「完全寛解」によって、処置に応答してガンの全ての徴候が消失したことを意味する。これは、ガンが治癒したことを必ずしも意味しない。

【 0 0 8 8 】

「部分反応」は、処置に応答した、一つもしくは複数の腫瘍もしくは病変の大きさの減少、または体内のガンの程度の減少を指す。

【 0 0 8 9 】

「 H E R 発現ガン」は、細胞表面に H E R タンパク質が存在する細胞を含むガンである。

【 0 0 9 0 】

「 H E R 2 発現ガン」は、そのガンの細胞表面に十分なレベルの H E R 2 を産生することにより、 H E R 2 抗体がそれに結合して、そのガンに関して治療効果を有することができるガンである。

【 0 0 9 1 】

レセプター H E R を「過剰発現する」ガンは、同じ組織型の非ガン細胞に比較して、そのガンの細胞表面に H E R 2 などのレセプター H E R をかなり高レベル有するガンである。当該過剰発現は、遺伝子増幅によって、または転写もしくは翻訳の増加によって起こることがある。レセプター H E R の過剰発現を、細胞表面に存在する増加したレベルの H E R タンパク質を評価することによって、診断または予後アッセイで (例えば免疫組織化学アッセイ (I H C) により) 決定することができる。または、もしくは追加的に、例えば、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (F I S H ; 1998 年 10 月に公表された W O 98 / 45479 参照)、サザンブロット、またはリアルタイム定量 P C R (R T - P C R) などのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 技法によって、細胞中の H E R をコードしている核酸のレベルを測定することができる。血清などの生体液に分散した抗原 (例えば H E R 細胞外ドメイン) を測定することによって、レセプター H E R の過剰発現を研究することもできる (例えば、1990 年 6 月 12 日に発行された米国特許第 4,933,294 号; 1991 年 4 月 18 日に公表された W O 91 / 05264; 1995 年 3 月 28 日に発行された米国特許第 5,401,638 号; および Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990) を参照されたい)。当業者は、上記アッセイの他に様々な *in vivo* アッセイを利用できる。例えば検出可能なラベル、例えば放射性同位体で場合によりラベルした抗体に、患者の体内の細胞を曝露して、例えば放射能を外部スキャンすることにより、または抗体に予め曝露された患者から採取した生検を分析することにより、その患者における細胞に対する抗体の結合を評価することができる。

【 0 0 9 2 】

逆に、「レセプター H E R 2 を過剰発現しない」ガンは、同じ組織型の非ガン細胞に比較して正常レベルよりも高いレセプター H E R 2 を発現しないガンである。

【 0 0 9 3 】

H E R リガンドを「過剰発現する」ガンは、同じ組織型の非ガン細胞に比較して有意に高いレベルのそのリガンドを産生するガンである。当該過剰発現は、遺伝子増幅によって、または転写もしくは翻訳の増加によって起こることがある。 H E R リガンドの過剰発現は、患者における、例えば腫瘍生検におけるリガンド (もしくはそれをコードする核酸) のレベルを評価することによって、または上記の I H C、F I S H、サザンブロット、P

10

20

30

40

50

C R、もしくは *in vivo* アッセイなどの様々な診断アッセイによって、診断的に決定することができる。

【0094】

本明細書中において使用されるとき用語「細胞毒性薬」は、細胞の機能を阻害もしくは阻止し、かつ/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} および Lu の放射性同位体）、化学療法剤、および細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性な毒素などの毒素を、そのフラグメントおよび/または変異体を含めてを含むことを意味する。

【0095】

「化学療法剤」は、ガンの処置に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（登録商標））などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミン（trimethylolomelamine）を含めたエチレンイミンおよびメチルメラミン（methylamelamine）；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン（bullatacinone））；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ベータ-ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトセシン（合成アナログであるトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトセシン、スコボレクチン（scopolectin）、および9-アミノカンプトセシンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸（podophyllinic acid）；テニボシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；ズオカルマイシン（合成アナログKW-2189およびCB1-TM1を含む）；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンビキン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン（ranimustine）のようなニトロソ尿素；エンジン抗生物質などの抗生物質（例えば、カリチェアミシン、特に、カリチェアミシガンマ1IおよびカリチェアミシンオメガI1（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994) 参照））；ジネマイシンAを含めたジネマイシン；クロドロネートなどのビスホスフォネート；エスペラマイシン；ならびに、ネオカルチノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabycin）、カルミノマイシン、カルチノフィリン、クロモマイシン（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、（モルホリノ-ドキシソルビシン、シアノモルホリノ-ドキシソルビシン、2-ピロリノ-ドキシソルビシン、およびデオキシドキシソルビシンを含めた）ドキシソルビシン（ADRIAMYCIN（登録商標））、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）などの代謝拮抗物質；デノブテリン、メトトレキサート、プテロブテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸

10

20

30

40

50

アナログ；フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジンなどのピリミジンアナログ；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤（anti-adrenal）；フロリニン酸（frolinic acid）などの葉酸補給剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート（edat raxate）；デホファミン（defofamine）；デメコルシン；ジアジクオン；エルホルニチン（elfornithine）；酢酸エリブチニウム；エボチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシンおよびアンサミトシンなどのメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール（mopidanmol）；ニトラエリン（nitraerine）；ペントスタチン；フェナメット（phenamet）；ピラルピシン；ロソキサントロン；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K（登録商標）多糖複合体（JHS Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に T - 2 毒素、ベラクリン（verracurin）A、ロリジン A およびアングイジン（anguidine））；ウレタン；ピンデシン（ELDISINE（登録商標））、FILDESIN（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「A r a - C」）；シクロホスファミド；チオテパ；パクリタキセル（TAXOL（登録商標））（Bristol-Myer s Squibb Oncology, Princeton, NJ.）、パクリタキセルの無 C r e m o p h o r アルブミン加工ナノ粒子製剤である A B R A X A N E（商標）（American Pharmaceutical Partne rs, Schaumburg, Illinois）、およびドセタキセル（TAXOTERE（登録商標））（Rhone-Po ulenc Rorer, Antony, France）などのタキサン；クロランブシル；ゲムシタビン（GEMZA R（登録商標））；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどのプラチナアナログ；ピンブラスチン（VELBAN（登録商標））；プラチナ；エトポシド（V P - 1 6）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボビン（leucovovin）；ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；トボイソメラーゼ阻害剤 R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン（D M F O）；レチノイン酸などのレチノイド；カベシタビン；前記いずれかの薬学的に許容されうる塩、酸、または誘導体；ならびに C H O P（シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、およびブレドニゾロンの併用療法についての略語）および F O L F O X（5 - F U およびロイコボビンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXATIN（商標））を用いた処置方式についての略語）などの、前記のうち二つ以上の組み合わせがある。

【0096】

腫瘍に及ぼすホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も本定義に含まれる。それらには、例えば、タモキシフェン（タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））を含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストン、およびトレミフェン（FARESTON（登録商標））を含めた抗エストロゲンおよび選択的エストロゲンレセプターモジュレーター（S E R M）；例えば 4（5） - イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、エキセメスタン（AROMASIN（登録商標））、ホルメスタン、ファドロゾール、ボロゾール（RIVISOR（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））、およびアナストロゾール（ARIMIDEX（登録商標））などの、副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤；フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン；ならびにトロキサシタビン（troxacitabine）（1, 3 - ジオキソラ

ンヌクレオシドシトシンアナログ) ; アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えば P K C - アルファ、R a f、H - R a s、および上皮成長因子レセプター (E G F - R) などの、接着性細胞増殖に関係づけられているシグナル伝達経路における遺伝子発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド ; 遺伝子治療ワクチン、例えば A L L O V E C T I N (登録商標) ワクチン、L E U V E C T I N (登録商標) ワクチン、および V A X I D (登録商標) ワクチンなどのワクチン ; P R O L E U K I N (登録商標) r I L - 2 ; L U R T O T E C A N (登録商標) トポイソメラーゼ 1 阻害剤 ; A B A R E L I X (登録商標) r m R H ; ならびに前記いずれかの薬学的に許容されうる塩、酸、または誘導体がある。

【 0 0 9 7 】

「代謝拮抗化学療法剤」は、代謝物に構造的に類似しているが、生産的方法で身体によって使用されることができない薬剤である。多くの代謝拮抗化学療法剤は、核酸、すなわち R N A および D N A の産生を妨害する。代謝拮抗化学療法剤の例には、ゲムシタビン (G E M Z A R (登録商標))、5-フルオロウラシル (5 - F U)、カペシタビン (X E L O D A (登録商標))、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、6-チオグアニン、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、アラビノシルシトシン (A R A - C、シタラビン) (C Y T O S A R - U (登録商標))、ダカルバジン (D T I C - D O M E (登録商標))、アゾシトシン (azocytosine)、デオキシシトシン、ピリドミデン (pyridmidene)、フルダラビン (F L U D A R A (登録商標))、クラドラビン、2-デオキシ-D-グルコースなどがある。好ましい代謝拮抗化学療法剤は、ゲムシタビンである。

【 0 0 9 8 】

「ゲムシタビン」または「2'-デオキシ-2', 2'-ジフルオロシチジン-塩酸塩 (b - 異性体)」は、抗腫瘍活性を示すヌクレオシドアナログである。ゲムシタビン H C l の実験式は C 9 H 1 1 F 2 N 3 O 4 · H C l である。ゲムシタビン H C l は、G E M Z A R (登録商標) の商標で Eli Lilly により販売されている。

【 0 0 9 9 】

「プラチナ系化学療法剤」は、分子の構成部分としてプラチナを含有する有機化合物を含む。プラチナ系化学療法剤の例には、カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチン (oxaliplatinum) がある。

【 0 1 0 0 】

「プラチナ系化学療法」により、一つまたは複数のプラチナ系化学療法剤を、場合により一つまたは複数のその他の化学療法剤と併用した治療を意味する。

【 0 1 0 1 】

「プラチナ耐性」ガンにより、プラチナ系化学療法を受けている間に、そのガン患者で進行した (すなわち、その患者は「プラチナ難治性」である) か、またはその患者でプラチナ系化学療法方式を完了した 1 2 か月以内 (例えば、6 か月以内) に進行したことを意味する。

【 0 1 0 2 】

本明細書において使用されるとき用語「E G F R ターゲット薬」は、E G F R に結合して、場合により E G F R の活性化を阻害する治療剤を指す。当該薬剤の例には、E G F R に結合する抗体および小分子がある。E G F R に結合する抗体の例には、M A b 5 7 9 (A T C C C R L H B 8 5 0 6)、M A b 4 5 5 (A T C C C R L H B 8 5 0 7)、M A b 2 2 5 (A T C C C R L 8 5 0 8)、M A b 5 2 8 (A T C C C R L 8 5 0 9) (米国特許第 4, 9 4 3, 5 3 3 号、Mendelsohn et al. 参照)、ならびにキメラ化 2 2 5 (C 2 2 5 またはセツキシマブ ; E R B U T I X (登録商標)) および再形状化ヒト 2 2 5 (H 2 2 5) (W O 9 6 / 4 0 2 1 0、Imclone Systems Inc. 参照) などのその異性体 ; I I 型突然変異 E G F R と結合する抗体 (米国特許第 5, 2 1 2, 2 9 0 号) ; 米国特許第 5, 8 9 1, 9 9 6 号に記載されているような、E G F R と結合するヒト化抗体およびキメラ抗体 ; ならびに A B X - E G F などの、E G F R と結合するヒト抗体 (W O 9 8 / 5 0 4 3 3、Abgenix 参照) がある。抗 E G F R 抗体を細胞毒性薬とコンジュゲーション

10

20

30

40

50

ンすることにより、免疫コンジュゲートを発生させることができる（例えば、E P 6 5 9 , 4 3 9 A 2、Merck Patent GmbH参照）。E G F Rに結合する小分子の例には、Z D 1 8 3 9 またはゲフィチニブ（IRESSA（商標）;Astra Zeneca）、C P - 3 5 8 7 7 4、またはエルロチニブ H C L（TARCEVA（商標）;Genentech/OSI）、および A G 1 4 7 8、A G 1 5 7 1（S U 5 2 7 1;Sugen）がある。

【 0 1 0 3 】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、レセプター H E R などの、チロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子である。当該阻害剤の例には、前項で言及された E G F R ターゲット薬、そしてTakedaから入手可能な T A K 1 6 5 などの小分子 H E R 2 チロシンキナーゼ阻害剤、優先的に E G F R と結合するが、H E R 2 および E G F R の両方を過剰発現している細胞を阻害する E K B - 5 6 9（Wyethから入手できる）などの二重 H E R 阻害剤、経口 H E R 2 および E G F R チロシンキナーゼ阻害剤である G W 5 7 2 0 1 6（Glaxoから入手できる）、ならびに P K I - 1 6 6（Novartisから入手できる）；カネルチニブ（C I - 1 0 3 3；Pharmacia）などの汎 H E R 阻害剤；R a f - 1 シグナル伝達を阻害する、ISIS Pharmaceuticalsから入手できるアンチセンス剤 I S I S - 5 1 3 2 などの R a f - 1 阻害剤；Glaxoから入手できるメシル酸イマチニブ（Gleevac（商標））などの非 H E R ターゲット T K 阻害剤；M A P K 細胞外調節キナーゼ I 阻害剤 C I - 1 0 4 0（Pharmaciaから入手できる）；P D 1 5 3 0 3 5、4 -（3 - クロロアニリノ）キナゾリンなどのキナゾリン；ピリドピリミジン；ピリミドピリミジン、C G P 5 9 3 2 6、C G P 6 0 2 6 1、および C G P 6 2 7 0 6 などのピロロピリミジン；ピラゾロピリミジン、4 -（フェニルアミノ）- 7 H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン；クルクミン（ジフェルロイルメタン、4, 5 - ビス（4 - フルオロアニリノ）フタルイミド）；ニトロチオフエン部分含有チルホスチン；P D - 0 1 8 3 8 0 5（Warner-Lambers）；アンチセンス分子（例えば、H E R をコードする核酸に結合するもの）；キノキサリン（米国特許第 5, 8 0 4, 3 9 6 号）；トリホスチン（米国特許第 5, 8 0 4, 3 9 6 号）；Z D 6 4 7 4（Astra Zeneca）；P T K - 7 8 7（Novartis/Schering AG）；C I - 1 0 3 3（Pfizer）などの汎 H E R 阻害剤；アフィニタック（I S I S 3 5 2 1；Isis/Lilly）；メシル酸イマチニブ（Gleevac；Novartis）；P K I 1 6 6（Novartis）；G W 2 0 1 6（Glaxo SmithKline）；C I - 1 0 3 3（Pfizer）；E K B - 5 6 9（Wyeth）；セマキシニブ（Sugen）；Z D 6 4 7 4（AstraZeneca）；P T K - 7 8 7（Novartis/Schering AG）；I N C - 1 C 1 1（Imclone）；または以下の特許公報のいずれかに記載されるもの：米国特許第 5, 8 0 4, 3 9 6 号；W O 9 9 / 0 9 0 1 6（American Cyanamid）；W O 9 8 / 4 3 9 6 0（American Cyanamid）；W O 9 7 / 3 8 9 8 3（Warner Lambert）；W O 9 9 / 0 6 3 7 8（Warner Lambert）；W O 9 9 / 0 6 3 9 6（Warner Lambert）；W O 9 6 / 3 0 3 4 7（Pfizer, Inc）；W O 9 6 / 3 3 9 7 8（Zeneca）；W O 9 6 / 3 3 9 7（Zeneca）；および W O 9 6 / 3 3 9 8 0（Zeneca）がある。

【 0 1 0 4 】

「抗血管形成剤」は、血管の発生をある程度遮断または妨害する化合物を指す。抗血管形成因子は、例えば、血管形成の促進に関与する成長因子または成長因子レセプターに結合する、小分子または抗体でありうる。本明細書における好ましい抗血管形成因子は、ペバシズマブ（AVASTIN（登録商標））などの、血管内皮成長因子（V E G F）に結合する抗体である。

【 0 1 0 5 】

用語「サイトカイン」は、細胞間仲介物質として別の細胞に作用する、ある細胞集団によって放出されるタンパク質についての総称である。当該サイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンである。これらのサイトカインの中に含まれるのは、ヒト成長ホルモン、N - メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラキシン；プロレラキシン；卵胞刺激ホルモン（F S H）、甲状腺刺激ホルモン（T S H）、および黄体形成ホルモン（L H）などの糖タンパク質ホルモン；肝成長因子

10

20

30

40

50

；線維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子 および腫瘍壊死因子；ミュー管抑制物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF - などの神経成長因子；血小板成長因子；TGF - およびTGF - などのトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子 - I およびインスリン様増殖因子 - I I；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン - 、インターフェロン - 、およびインターフェロン - などのインターフェロン；コロニー刺激因子（CSF）（マクロファージCSF（M-CSF）、顆粒球マクロファージCSF（GM-CSF）、および顆粒球CSF（G-CSF）など）；IL - 1、IL - 1、IL - 2、IL - 3、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 9、IL - 10、IL - 11、IL - 12などのインターロイキン（IL）；TNF - またはTNF - などの腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよびkitリガンド（KL）を含めたその他のポリペプチド因子である。本明細書に使用されるとき用語「サイトカイン」には、天然起源由来またはリコンビナント細胞培養物由来のタンパク質、および天然配列サイトカインの生物学的活性等価物が含まれる。

10

【0106】

II. HER2抗体の産生

本発明により使用される抗体の産生についての例示的な技法に関して、以下に説明する。抗体の産生に使用されるHER2抗原は、例えば、所望のエピトープを含む、HER2の可溶性細胞外ドメインまたはその一部分でありうる。または、細胞表面にHER2を発現している細胞（例えば、HER2を過剰発現するようにトランスフォーメーションされたNIH-3T3細胞；またはSK-BR-3細胞などのガン細胞系、Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)参照）を使用して抗体を発生させることができる。抗体の発生に有用な他の形態のHER2は、当業者に明らかであろう。

20

【0107】

(i) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連抗原およびアジュバントの複数回の皮下（s.c）注射または腹腔内（i.p）注射によって動物に産生される。二官能剤または誘導化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介したコンジュゲーション）、N - ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介する）、グルタルアルデヒド、コハク酸無水物、SOCl₂、またはR¹N=C=N R（式中、RおよびR¹は異なるアルキル基である）を使用して、キーホールリンペットヘモシニアン、血清アルブミン、ウシチログロブリン、またはダイズトリブシン阻害剤などの、免疫処置される種に免疫原性であるタンパク質と関連抗原をコンジュゲーションすることが有用なことがある。

30

【0108】

例えば、（それぞれウサギまたはマウスに対して）100 μgまたは5 μgのタンパク質もしくはコンジュゲートを3倍量のフロイント完全アジュバントと組み合わせて、複数の部位にその溶液を皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体に対して、動物を免疫処置する。1か月後、フロイント完全アジュバントに入れた初回量の1/5から1/10のペプチドまたはコンジュゲートを複数の部位で皮下注射することにより、その動物に追加免疫する。7日から14日後、その動物から採血し、そしてその血清の抗体力価をアッセイする。力価がプラトーになるまで動物に追加免疫する。好ましくは、同抗原のコンジュゲートであるが、異なるタンパク質とコンジュゲーションし、かつ/または異なる架橋試薬によりコンジュゲーションしたものをを用いて、その動物を追加免疫する。タンパク質融合体として組換え細胞培養でコンジュゲートを作製することもできる。また、ミョウバンのような凝集剤を適切に使用して、免疫応答を増強させる。

40

【0109】

(ii) モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、実質的に均一な抗体の集団から得られる。すなわち、その集団

50

を含む個々の抗体は、少量存在するおそれのある可能性のある天然突然変異を除いて同一である。このように、修飾語「モノクローナル」は、別個の抗体の混合物ではないとしてのその抗体の性質を示す。

【0110】

例えば、モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、また、組換えDNA法（米国特許第4,816,567号）によって作製できる。

【0111】

ハイブリドーマ法では、マウス、またはハムスターなどのその他の適切な宿主動物を、本明細書上記のように免疫処置して、免疫処置のために使用されたタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生するか、または産生できるリンパ球を誘発させる。または、リンパ球を *in vitro* で免疫処置できる。次に、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いて、リンパ球を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成させる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。

10

【0112】

このようにして調製したハイブリドーマ細胞を、未融合の親骨髓腫細胞の成長または生存を阻害する一つまたは複数の物質を好ましくは含有する適切な培地に接種し、成長させる。例えば、親骨髓腫細胞が酵素であるヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRTまたはHPR T) を欠如しているならば、ハイブリドーマ用の培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含むものであり (HAT培地)、これらの物質はHGPRT欠損細胞の成長を阻止する。

20

【0113】

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞により抗体の安定な高レベルの産生を支持し、かつHAT培地などの培地に感受性の細胞である。とりわけ好ましい骨髓腫細胞系は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手できるMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍由来の細胞系、ならびにAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手できるSP-2細胞またはX63-Ag8-653細胞などのマウス骨髓腫系である。ヒト骨髓腫細胞株およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生のために記載されている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); およびBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

30

【0114】

抗原に対するモノクローナル抗体の産生について、ハイブリドーマ細胞が成長している培地をアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降または *in vitro* 結合アッセイ (ラジオイムノアッセイ (RIA) もしくは酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) など) によって決定される。

40

【0115】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980) のスキッチャード解析によって決定できる。

【0116】

所望の特異性、親和性、および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後で、限界希釈手順によりそのクローンをサブクローニングして、標準的な方法により成長させることができる (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。この目的に適切な培地には、例えば、DMEMまたはRPMI-1640培地がある。さらに、このハイブリドーマ細胞を、動物における腹水腫瘍として *in vivo* で成長させることができる。

50

【0117】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、例えば、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の抗体精製手順によって培地、腹水、または血清から適切に分離する。

【0118】

モノクローナル抗体をコードする DNA は、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、当該 DNA の好ましい供給源として役立つ。一旦単離すると、その DNA を発現ベクターの中に配置することができ、次にその発現ベクターを、*E. coli* 細胞、サル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または別の状況では抗体タンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクションして、組換え宿主細胞にモノクローナル抗体の合成を得る。抗体をコードする DNA を細菌に組換え発現させることに関する総説論文には、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol, 5:256-262 (1993) および Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992) がある。

10

【0119】

さらなる態様では、モノクローナル抗体または抗体フラグメントを、McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990) に記載されている技法を使用して発生した抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) は、ファージライブラリーを使用した、それぞれマウス抗体およびヒト抗体の単離を記載している。それに続く刊行物は、鎖シャッフリング (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)) ならびに非常に大規模なファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染および *in vivo* 組換えによる高親和性 (nM 範囲) のヒト抗体の産生を記載している (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993))。このように、これらの技法は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技法に対する実行可能な代替法である。

20

【0120】

DNA は、例えば、相同マウス配列の代わりに、ヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインについてのコード配列に置換することによって（米国特許第 4, 816, 567 号；および Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)）、または免疫グロブリンのコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列の全てまたは一部を共有結合的に繋ぐことによって改変することもできる。

30

【0121】

典型的には、当該非免疫グロブリンポリペプチドを、抗体の定常ドメインの代わりに置換するか、または、抗体の一抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換して、抗原に対する特異性を有する一つの抗原結合部位と、異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を生み出す。

【0122】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当技術分野に記載されている。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである起源からその抗体に導入された一つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「輸入 (import)」残基と称される。この残基は、典型的には「輸入」可変ドメインから取り入れられる。ヒト化は、ヒト抗体の対応配列の代わりに超可変部配列に置換することによって、Winter および共同研究者らの方法 (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988)) に従って本質的に行うことができる。従って、当該「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に小さな配列が非ヒト種由来の対応する配列に置換されているキメラ抗体（米国特許第 4, 816, 567 号）である。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、一

40

50

部の超可変部残基と、可能性のあることには一部の F R 残基とが、げっ歯動物抗体の類似部位に由来する残基に置換されているヒト抗体である。

【 0 1 2 3 】

ヒト化抗体を作製する際に使用される、軽鎖および重鎖両方のヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減するために非常に重要である。いわゆる「ベストフィット」法により、げっ歯動物抗体の可変ドメインの配列を、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。次に、げっ歯動物の配列に最も類似しているヒト配列を、ヒト化抗体についてのヒトフレームワーク部 (F R) として受け入れる (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。別の方法は、特定亜群の軽鎖または重鎖の全ヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク部を使用する。同フレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体に使用することができる (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993))。

10

【 0 1 2 4 】

抗体が抗原に対する高い親和性および他の好都合な生物学的性質を保持してヒト化されることは、さらに重要である。この目標を実現するために、好ましい方法により、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した、親配列および様々な概念上のヒト化産物の分析プロセスによりヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の有望な三次元コンフォメーション構造を図解して表示するコンピュータプログラムを利用できる。これらの表示の検査は、候補免疫グロブリン配列の機能に、これらの残基が果たしそうな役割を分析すること、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原と結合する能力に影響する残基を分析することが可能になる。このように、F R 残基を、レシピエント配列および輸入配列から選択して、組み合わせることができ、その結果、ターゲット抗原 (類) に対する増大した親和性などの所望の抗体特性が実現される。一般に、超可変部残基は、抗原結合に影響することに、直接的かつ最も実質的に関与している。

20

【 0 1 2 5 】

下記実施例 3 は、H E R 2 と結合してレセプター H E R のリガンド活性化を遮断する例示的なヒト化 H E R 2 抗体の産生を記載している。本明細書において特に関心対象のヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体 2 C 4 (もしくはその F a b フラグメント) と本質的に同程度効果的に E G F、T G F - 、および / もしくは H R G が仲介する M A P K 活性化を遮断し、かつ / またはマウスモノクローナル抗体 2 C 4 (もしくはその F a b フラグメント) と本質的に同程度効果的に H E R 2 と結合する。本明細書におけるヒト化抗体は、例えば、ヒト可変重鎖ドメインに組み込まれた非ヒト超可変部残基を含むことができ、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に記述されている可変ドメイン番号付けシステムを利用して 6 9 H、7 1 H、および 7 3 H からなる群より選択される位置でフレームワーク部 (F R) 置換をさらに含むことができる。一態様では、ヒト化抗体は、位置 6 9 H、7 1 H、および 7 3 H の二つまたは全てに F R 置換を含む。

30

40

【 0 1 2 6 】

本明細書において関心対象の例示的なヒト化抗体は、重鎖可変ドメイン相補性決定部残基 G F T F T D Y T M X (X は好ましくは D または S) (配列番号 : 7) ; D V N P N S G G S I Y N Q R F K G (配列番号 : 8) ; および / または N L G P S F Y F D Y (配列番号 : 9) を含み、場合により、それらの C D R 残基にアミノ酸改変を含む (例えばその改変がその抗体の親和性を本質的に維持または改善する場合)。例えば、関心対象の抗体変異体は、約 1 個から約 7 個または約 5 個のアミノ酸置換を上記重鎖可変 C D R 配列に有することができる。例えば下記のような親和性成熟によって、当該抗体変異体を調製することができる。最も好ましいヒト化抗体は、配列番号 : 4 の重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

50

【0127】

ヒト化抗体は、例えば前節の重鎖可変ドメインCDR残基に追加して、軽鎖可変ドメイン相補性決定残基 K A S Q D V S I G V A (配列番号: 10); S A S Y X¹ X² X³ (X¹は好ましくはRもしくはL、X²は好ましくはYもしくはE、そしてX³は好ましくはTもしくはS) (配列番号: 11); および/またはQ Q Y Y I Y P Y T (配列番号: 12)を含むことができる。当該ヒト化抗体は、場合により、上記CDR残基のアミノ酸改変を含む(例えばその改変がその抗体の親和性を本質的に維持または改善する場合)。例えば、関心対象の抗体変異体は、約1個から約7個または約5個のアミノ酸置換を上記軽鎖可変CDR配列に有することができる。例えば下記のような親和性成熟によって、当該抗体変異体を調製することができる。最も好ましいヒト化抗体は、配列番号: 3の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

10

【0128】

本出願は、HER2と結合して、リガンドによるレセプターHERの活性化を遮断する、親和性成熟した抗体も考えている。親抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体、例えばそれぞれ配列番号3および4の軽鎖可変配列および/または重鎖可変配列をそれぞれ含むヒト化抗体(すなわち変異体574)でありうる。親和性成熟した抗体は、マウス2C4または変異体574よりも優れた親和性で(例えば、HER2の細胞外ドメイン(ECD)ELISAを用いて評定するとき、例えば約2または約4倍から約100倍または約1000倍向上した親和性で)レセプターHER2に好ましくは結合する。置換のための例示的な重鎖可変部CDR残基には、H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99、または二つ以上の組み合わせ(例えば、これらの残基の2、3、4、5、6、または7個)がある。変更のための軽鎖可変部CDR残基の例には、L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97、または二つ以上の組み合わせ(例えば、これらの残基の2から3、4、5、または約10個まで)がある。

20

【0129】

様々な形態のヒト化抗体または親和性成熟した抗体が考えられている。例えば、ヒト化抗体または親和性成熟した抗体は、Fabなどの抗体フラグメントでありうるが、このフラグメントは、免疫コンジュゲートを発生させるために、1つまたは複数の細胞毒性薬と場合によりコンジュゲーションしている。または、ヒト化抗体もしくは親和性成熟した抗体は、インタクトなIgG1抗体などのインタクトな抗体でありうる。

30

【0130】

(iv) ヒト抗体

ヒト化の代替として、ヒト抗体を発生させることができる。例えば、免疫処置した際に、内因性免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体の全レパートリーを産生できるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作製することが今や可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞系突然変異マウスにおける抗体重鎖結合部(J_H)遺伝子の同型接合型欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害を招くことが記載されている。当該生殖細胞系突然変異マウスにヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイを導入する結果として、抗原による攻撃の際にヒト抗体の産生が生じるものである。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993);ならびに米国特許第5,591,669号、第5,589,369号および第5,545,807号を参照されたい。

40

【0131】

または、ファージディスプレイ技法(McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990))を使用して、免疫処置されていないドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーからヒト抗体および抗体フラグメントを*in vitro*で産生することができる。この技法によると、抗体Vドメイン遺伝子を、M13またはfdなどの、糸状バクテリオファージの主または副コートタンパク質遺伝子のいずれかにフレーム内にクローニングして、ファージ粒子の表面上に機能的な抗体フラグメントとして提示させる。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むことから、その抗体の機能的性質

50

に基づく選択は、それらの性質を示す抗体をコードする遺伝子の選択も招く。従って、そのファージは、B細胞の性質の一部を模倣する。ファージディスプレイを、様々な形式で行うことができる；それらの総説については、例えばJohnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)を参照されたい。いくつかの起源のV遺伝子セグメントをファージディスプレイのために使用することができる。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)は、免疫処置したマウスの脾臓に由来するV遺伝子の小規模ランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。免疫処置していないヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築することができ、(自己抗原を含む)多様なアレイの抗原に対する抗体を、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)、またはGriffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)によって記載されている技法に本質的に従って単離することができる。米国特許第5,565,332号および第5,573,905号も参照されたい。

10

【0132】

上記のように、ヒト抗体を、*in vitro*で活性化したB細胞により発生させることもできる(米国特許第5,567,610号および第5,229,275号参照)。

【0133】

ヒトHER2抗体は、1998年6月30日に発行された米国特許第5,772,997号および1997年1月3日に公表されたWO97/00271に記載されている。

【0134】

(v) 抗体フラグメント

種々の技法が抗体フラグメントの産生のために開発されてきた。伝統的には、これらのフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して誘導された(例えば、Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992);およびBrennan et al., *Science*, 229:81 (1985)を参照されたい)。しかし、これらのフラグメントを、今や組換え宿主細胞によって直接産生することができる。例えば、その抗体フラグメントを、上記の抗体ファージライブラリーから単離することができる。または、Fab'-SHフラグメントを、*E. coli*から直接回収して、化学的に結合させてF(ab')₂フラグメントを形成させることができる(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。別のアプローチにより、F(ab')₂フラグメントを、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体フラグメントの産生のためのその他の技法は、当業者に明白であろう。他の態様では、選択した抗体は一本鎖Fvフラグメント(scFv)である。WO93/16185；米国特許第5,571,894号；および第5,587,458号を参照されたい。この抗体フラグメントは、例えば、米国特許第5,641,870号に例えば記載される通り「線状抗体」(linear antibody)でもありうる。当該線状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性でありうる。

20

30

【0135】

(vi) 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、HER2タンパク質の2つの異なるエピトープに結合することができる。その他の当該抗体は、HER2結合部位と、EGFR、HER3および/またはHER4に対する結合部位とを組み合わせることができる。または、細胞防御メカニズムをHER2発現細胞に集中させるために、T細胞レセプター分子(例えば、CD2もしくはCD3)のような、またはFcRI(CD64)、FcRII(CD32)、およびFcRIII(CD16)などの、IgGに対するFcレセプター(FcR)のような、白血球上のトリガー分子に結合するアームとHER2アームを組み合わせることができる。HER2を発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるために、二重特異性抗体を使用することもできる。これらの抗体は、HER2結合アームと、細胞毒性薬(例えば、サポリン、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシン(ricin)A鎖、メトトレキサート、または放射性同位体ハプテン)と結合するアームとを有する。二重特異性抗体を、全長抗体または抗体フラグメント(例えば、F(ab')₂二重

40

50

特異性抗体)として調製することができる。

【0136】

WO96/16673は、二重特異性HER2/FcRIII抗体を記載し、米国特許第5,837,234号は、二重特異性HER2/FcRI抗体IDM1(Ositem)を開示している。二重特異性HER2/Fc抗体は、WO98/02463に示されている。米国特許第5,821,337号は、二重特異性HER2/CD3抗体を教示している。MDX-210は、二重特異性HER2-FcRIIIAbである。

【0137】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野において公知である。全長二重特異性抗体の従来の産生は、二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づく。ここで、その2本の鎖は異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな取り合わせが原因で、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生し、そのうち、一つだけが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、普通はアフィニティークロマトグラフィー段階によってなされるが、その精製はかなり煩雑であり、その産物の収率は低い。類似の手順がWO93/08829およびTraunecker et al., EMBOL J., 10:3655-3659 (1991)に開示されている。

【0138】

異なるアプローチにより、所望の結合特異性(抗体-抗原の結合部位)を有する抗体可変ドメインを、免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。この融合体は、好ましくは、ヒンジ部の少なくとも部分、CH2部およびCH3部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有する。これら融合体の少なくとも一つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含む第一重鎖定常部(CH1)を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合体をコードするDNAと、所望により免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAとを、別々の発現ベクターに挿入して、そして適切な宿主生物に同時トランスフェクションする。これは、等しくない比率の三つのポリペプチド鎖の構築に使用されるそれらのポリペプチド鎖が最適な収率を提供する態様において、三つのポリペプチドフラグメントの相互比率の調整に大きな柔軟性を提供する。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖が等しい比で発現することが高収率を招く場合、またはその比が特に重要ではない場合に、二つまたは三つ全てのポリペプチド鎖についてのコード配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0139】

このアプローチの好ましい態様では、その二重特異性抗体は、一方のアームに第1結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖と、他方のアームにハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2結合特異性を提供する)とから構成される。この非対称構造は、望まれていない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。それは、二重特異性分子の半分のみに免疫グロブリン軽鎖が存在することが、分離の容易な方法を提供するからである。このアプローチは、WO94/04690に開示されている。二重特異性抗体を発生させるさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0140】

米国特許第5,731,168号に記載されている別のアプローチによると、抗体分子対の間の界面を操作して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の率を最大にすることができる。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部分を含む。この方法では、第1抗体分子の界面由来の一つまたは複数の小型アミノ酸側鎖を、より大型の側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)に置換する。その大型側鎖(類)に同一または類似の大きさの代償的な「空洞」は、大型アミノ酸側鎖をより小型のアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはトレオニン)に置換することによって、第2抗体分子の界面に生み出される。これは、ホモ二量体などのその他の望まれない最終産物に比べてヘテロ二量体の収率を増加するためのメカニズムを提供する。

【0141】

二重特異性抗体は、架橋抗体または「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体のうちの一方をアビジンと、他方をビオチンと結合させることができる。当該抗体は、例えば、望まれていない細胞に免疫系細胞をターゲティングするために（米国特許第4,676,980号）、およびHIV感染の処置のために（WO 91/00360、WO 92/200373、およびEP03089）提案された。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の好都合の架橋方法を用いて作製することができる。適切な架橋剤は当技術分野において周知であり、米国特許第4,676,980号に、いくつかの架橋技法と共に開示されている。

【0142】

抗体フラグメントから二重特異性抗体を発生させるための技法は、文献にも記載されている。例えば、化学的結合を用いて二重特異性抗体を調製することができる。Brennan et al., Science, 229:81 (1985)は、インタクトな抗体がタンパク質分解的に開裂されてF(a b')₂フラグメントを発生する手順を記載している。これらのフラグメントを、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元して、隣接するジチオールを安定化して、分子間ジスルフィド形成を阻止する。次に、発生したF a b'フラグメントをチオニトロ安息香酸(TNB)誘導体に変換する。次に、メルカプトエチルアミンを用いた還元により、F a b' - TNB誘導体の一つをF a b' - チオールへと再変換し、等モル量のその他のF a b' - TNB誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成させる。産生した二重特異性抗体を、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用することができる。

【0143】

最近の進歩により、E. coli由来のF a b' - S Hフラグメントを直接回収することが容易になった。このF a b' - S Hフラグメントを、化学的に結合して、二重特異性抗体を形成させることができる。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子の産生を記載している。各々のF a b'フラグメントが、E. coliから別個に分泌され、i n v i t r o定方向化学的結合に供されて、二重特異性抗体を形成した。このように形成した二重特異性抗体は、レセプターH E R 2を過剰発現している細胞および正常なヒトT細胞に結合することができ、かつヒト乳房腫瘍ターゲットに対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性をトリガーできた。

【0144】

組換え細胞培養物から二重特異性抗体フラグメントを直接作製して単離するための様々な技法も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生された。Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)。F o sタンパク質およびJ u nタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合によって二つの異なる抗体のF a b'部分に連結された。その抗体ホモ二量体は、ヒンジ部で還元されて単量体を形成し、次に、再び酸化されて抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法は、抗体ホモ二量体産生のためにも利用することができる。Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)によって記載された「二特異性抗体」技法は、二重特異性抗体フラグメントを作製するための代替メカニズムを提供した。このフラグメントは、同一鎖上の二つのドメイン間で対形成するには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。従って、一フラグメントのV_HドメインおよびV_Lドメインは、別のフラグメントの相補性V_LドメインおよびV_Hドメインと対形成することを強いられ、それによって、二つの抗原結合部位を形成する。二重特異性抗体フラグメントを単鎖F v(s F v)二量体の使用によって作製するための別の戦略も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994)を参照されたい。

【0145】

二つを超える結合価を有する抗体が考えられている。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991)。

【0146】

(vii) その他のアミノ酸配列の改変

本明細書に記載されたHER2抗体のアミノ酸配列の改変が考えられている。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的性質を改善することが望ましいことがある。適切なヌクレオチド変化をHER2抗体の核酸に導入することにより、またはペプチド合成により、HER2抗体のアミノ酸配列変異体を調製する。当該改変には、例えば、HER2抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失および/または挿入および/または置換がある。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせは、最終構築物に達するように作製されるが、ただし、その最終構築物は所望の性質を有する。そのアミノ酸変化は、グリコシル化部位の数または位置を変化させるように、HER2抗体の翻訳後プロセスを変更することもできる。

10

【0147】

突然変異誘発についての好ましい位置である、HER2抗体のある残基または領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)に記載されているような「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。本明細書において、ターゲット残基の残基または基（例えば、arg、asp、his、lys、およびgluなどの荷電した残基）が同定され、中性または陰性に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）に置換されて、アミノ酸とHER2抗原との相互作用に影響する。次に、置換に対する機能的感受性を実証しているアミノ酸位置を、置換部位に、または置換部位の代わりに、さらなる変異体またはその他の変異体を導入することによって精密化する。このように、アミノ酸配列変異を導入するための部位が予め決定されているものの、その突然変異自体の性質は、予め決定されている必要はない。例えば、所定の部位での突然変異の性能を分析するために、alaスキャニングまたはランダム突然変異誘発が、ターゲットコドンまたはターゲット領域に施され、そして発現したHER2抗体変異体が、所望の活性についてスクリーニングされる。

20

【0148】

アミノ酸配列挿入には、一つの残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および/またはカルボキシル末端の融合体、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入がある。末端の挿入の例には、N末端メチオニル残基を有するHER2抗体、または細胞毒性ポリペプチドに融合したHER2抗体がある。HER2抗体分子のその他の挿入変異体には、HER2抗体のN末端もしくはC末端と、酵素（例えば、ADEPT用）との、または抗体の血清半減期を増大させるポリペプチドとの融合体がある。

30

【0149】

別の型の変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、HER2抗体分子中の少なくとも一つのアミノ酸残基が異なる残基に置換されている。置換突然変異誘発について最も関心対象の部位には、超可変部があるが、FR変更も考えられている。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しの下に表1に示す。当該置換が生物学的活性の変化を招くならば、表1に「例示的置換」と称するか、またはアミノ酸クラスを参照して以下にさらに記載される、より実質的な変化を導入して、その産物をスクリーニングすることができる。

40

【0150】

【表 1】

表1

本来の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

【 0 1 5 1 】

抗体の生物学的性質における実質的な改変は、(a)例えば、シートまたはヘリックスコンフォメーションのような、置換領域におけるポリペプチド主鎖の構造、(b)ターゲット部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ高さを維持することに及ぼすそれらの効果が有意に異なる置換を選択することによって実現される。アミノ酸を、側鎖の性質の類似性により以下のような群に分けることができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp.73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

40

(1) 非極性: Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

(2) 非荷電極性: Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性: Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性: Lys (K)、Arg (R)、His (H)。

【 0 1 5 2 】

または、天然に存在する残基を、共通の側鎖の性質に基づいて以下の群に分けることができる:

(1) 疎水性: ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

(2) 中性親水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

(3) 酸性: Asp、Glu;

50

- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g；
- (5) 鎖配向に影響する残基：G l y、P r o；
- (6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0153】

非保存的置換は、これらのクラスのうち、一つのメンバーを別のクラスのものに交換することを必要とするものである。

【0154】

H E R 2 抗体の適切なコンフォメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基を、一般にセリンに置換して、その分子の酸化に対する安定性を改善して、異常な架橋を阻止することもできる。逆に、システイン結合をその抗体に付加して、（特に、その抗体が F v フラグメントなどの抗体フラグメントである場合）その安定性を改善することができる。

【0155】

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の一つまたは複数の超可変部残基を置換することを伴う。一般に、さらなる開発のために選択された、結果として生じた変異体は、それらの発生が由来する親抗体と比較して、改善した生物学的性質を有するものである。当該置換変異体を発生させるための簡便法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟を伴う。簡潔には、いくつかの超可変部部位（例えば、6 から 7 個の部位）を突然変異させてすべての可能なアミノ置換を各部位に発生させる。このように発生した抗体変異体は、系状ファージ粒子から一価の様式で、各粒子内にパッケージングされた M 1 3 の遺伝子 I I I 産物との融合体として提示される。次に、ファージディスプレイされた変異体を、本明細書に開示されたように、それらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。改変のための候補となる超可変部部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、抗原結合に重大に寄与する超可変部残基を同定することができる。または、もしくは追加的に、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体とヒト H E R 2 との間の接触点を同定することも有益でありうる。そのような接触残基および隣接する残基は、本明細書に詳細に述べられた技法による置換のための候補である。当該変異体がいったん発生すると、一団の変異体を本明細書に記載されたスクリーニングに供し、一つまたは複数の関連するアッセイで優れた性質を有する抗体を、さらなる開発のために選択することができる。

【0156】

この抗体の別の型のアミノ酸変異体は、この抗体の本来のグリコシル化パターンを変更したものである。変更によって、抗体に見出される一つもしくは複数の糖質部分を欠失させること、および / またはその抗体には存在しない一つもしくは複数のグリコシル化部位を付加することを意味する。

【0157】

抗体のグリコシル化は、典型的には N - 結合または O - 結合のいずれかである。N - 結合は、アスパラギン残基の側鎖に糖質部分が付着していることを指す。トリペプチド配列であるアスパラギン - X - セリンおよびアスパラギン - X - トレオニン（ここで、X は、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖に糖質部分を酵素的に付着させるための認識配列である。このように、これらのトリペプチド配列のいずれかがポリペプチドに存在することで、潜在的なグリコシル化部位が生み出される。O - 結合型グリコシル化は、糖である N - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの一つがヒドロキシアミノ酸に付着していることを指し、そのヒドロキシアミノ酸は、5 - ヒドロキシプロリンまたは 5 - ヒドロキシリジンも使用されうるが、最も一般にはセリンまたはトレオニンである。

【0158】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、好都合には、アミノ酸配列を変更することにより、そのアミノ酸配列が（N - 結合型グリコシル化部位のための）上記の一つまたは複数のトリペプチド配列を含ませることによって実現される。本来の抗体の配列に（O - 結合型

グリコシル化部位のための)一つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基を付加するか、またはこれらに置換することによっても、変更を行うことができる。

【0159】

HER2抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で公知の様々な方法によって調製される。これらの方法には、(天然アミノ酸配列変異体の場合)天然起源からの単離、またはHER2抗体の以前に調製された変異体もしくは非変異体版のオリゴヌクレオチド介在性(もしくは部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、およびカセット突然変異誘発による調製があるが、それに限定されるわけではない。

【0160】

例えば、抗体の抗原依存性細胞性細胞毒性(ADCC)および/または補体依存性細胞毒性(CDC)を増強するためのエフェクター機能に関して、本発明の抗体を改変することが望ましいことがある。これは、抗体のFc部に一つまたは複数のアミノ酸置換を導入することによって実現することができる。または、もしくは追加的に、システイン残基(類)をFc部に導入することによって、この領域中の鎖間ジスルフィド結合形成を可能にすることができる。このように発生したホモ二量体抗体は、改善したインターナリゼーション能ならびに/または増大した補体介在性細胞殺滅および抗体依存性細胞性細胞毒性(ADCC)を有することがある。Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)およびShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照されたい。増強した抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体を、Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されているようなヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製することもできる。または、二つのFc部を有する抗体を操作することができ、それによって、その抗体は増強した補体溶解およびADCC能を有しうる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照されたい。

【0161】

抗体の血清半減期を増大させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されているように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体(特に抗体フラグメント)に組み込むことができる。本明細書中で使用されるとき用語「サルベージレセプター結合エピトープ」は、IgG分子のin vivo血清半減期の増大を担う、IgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄)のFc部のエピトープを指す。

【0162】

(viii) 所望の性質を有する抗体についてのスクリーニング

抗体を発生させるための技法は、上に記載されている。所望に応じ、特定の生物学的特性を有する抗体をさらに選択することができる。

【0163】

レセプターHERのリガンド活性化を遮断する抗体を同定するために、その抗体が、(例えば、別のレセプターHERとコンジュゲーションして、それと共に関心対象のレセプターHERがHERヘテロオリゴマーを形成する)レセプターHERを発現している細胞に対するHERリガンドの結合を遮断する能力を決定することができる。例えば、HERヘテロオリゴマーのレセプターHERを自然発現しているか、またはそれを発現するようにトランスフェクションされた細胞を、その抗体と共にインキュベーションして、次にラベルしたHERリガンドに曝露することができる。HER2抗体が、HERヘテロオリゴマー中のレセプターHERに対するリガンドの結合を遮断する能力を、次に評価することができる。

【0164】

例えば、HER2抗体によるMCF7乳房腫瘍細胞系へのHRG結合の阻害を、本質的に以下の実施例1に記載したように24ウェルプレート形式での氷冷単層MCF7培養物を用いて行うことができる。HER2モノクローナル抗体を各ウェルに加え、30分間インキュベーションすることができる。¹²⁵IラベルrHRG₁₁₇₇₋₂₂₄(25pM)を次に加え、インキュベーションを4から16時間続けることができる。用量反応曲線

10

20

30

40

50

を準備することができ、関心対象の抗体について IC_{50} 値を算出することができる。一態様では、レセプターHERのリガンド活性化を遮断する抗体は、このアッセイで約50 nM以下の、より好ましくは約10 nM以下の、MCF7細胞に対するHRG結合阻害についての IC_{50} を有するであろう。抗体が、Fabフラグメントなどの抗体フラグメントである場合、このアッセイにおけるMCF7細胞に対するHRGの結合阻害についての IC_{50} は、例えば約100 nM以下、より好ましくは50 nM以下でありうる。

【0165】

または、もしくは追加的に、HER2抗体が、HERヘテロオリゴマーに存在するレセプターHERのHERリガンド刺激性チロシンリン酸化を遮断する能力を評定することができる。例えば、レセプターHERを内因性発現しているか、またはそれらを発現するようにトランスフェクションされた細胞を、抗体と共にインキュベーションして、次に、HERリガンド依存性チロシンリン酸化活性について抗ホスホチロシンモノクローナル(場合により検出可能なラベルとコンジュゲーションされたもの)を用いてアッセイすることができる。米国特許第5,766,863号に記載されているキナーゼレセプター活性化アッセイも、レセプターHERの活性化と抗体によるその活性の遮断とを測定するために利用できる。

【0166】

一態様では、本質的に以下の実施例1に記載されたように、HRGによるMCF7細胞でのp180チロシンリン酸化の刺激を阻害する抗体についてスクリーニングすることができる。例えば、MCF7細胞を24ウェルプレートに蒔き、HER2に対するモノクローナル抗体を各ウェルに加え、室温で30分間インキュベーションし、次に最終濃度0.2 nMまでrHRG 1177-244を各ウェルに加えることができ、インキュベーションを8分間続けることができる。培地を各ウェルから吸引し、SDS試料バッファー(5% SDS、25mM DTT、および25mM トリス-HCl、pH 6.8)100 μ lを加えることによって反応を停止させることができる。各試料(25 μ l)を、4~12%の勾配ゲル(Novex)で電気泳動して、次にポリビニリデンジフルオリド膜に電気泳動的に移行させることができる。抗ホスホチロシン(1 μ g/ml)免疫プロットを展色させて、 $M_r \sim 180000$ での顕著な反応性バンドの強度を反射率デンストメトリーにより定量することができる。選択された抗体は、好ましくはこのアッセイの対照の約0~35%まで、HRGによるp180チロシンリン酸化刺激を有意に阻害するであろう。反射率デンストメトリーによって決定された、HRGによるp180チロシンリン酸化刺激の阻害についての用量反応曲線を準備することができ、関心対象の抗体についての IC_{50} を算出することができる。一態様では、レセプターHERのリガンド活性化を遮断する抗体は、このアッセイにおいて約50 nM以下の、より好ましくは約10 nM以下の、HRGによるp180チロシンリン酸化刺激の阻害についての IC_{50} を有するであろう。抗体が、Fabフラグメントなどの抗体フラグメントである場合、このアッセイにおける、HRGによるp180チロシンリン酸化刺激の阻害についての IC_{50} は、例えば約100 nM以下、より好ましくは50 nM以下でありうる。

【0167】

例えば、本質的にSchaefer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997)に記載されているように、MDA-MB-175細胞に及ぼす抗体の成長阻害効果を評定することもできる。このアッセイによると、MDA-MB-175細胞を、HER2モノクローナル抗体(10 μ g/mL)で4日間処理して、クリスタルバイオレットで染色することができる。HER2抗体とのインキュベーションにより、モノクローナル抗体2C4によって示される効果に類似した、本細胞系に及ぼす成長阻害効果が示されうる。さらなる態様では、外因性HRGはこの阻害を有意に逆転しないであろう。好ましくは、この抗体は、外因性HRGの存在下および不在下の両方で、モノクローナル抗体4D5よりも高い程度(および場合によりモノクローナル抗体7F3よりも高い程度)、MDA-MB-175細胞の細胞増殖を阻害することができるであろう。

【0168】

10

20

30

40

50

一態様では、関心対象のHER2抗体は、モノクローナル抗体4D5よりも実質的に効果的に、好ましくはモノクローナル抗体7F3よりも実質的に効果的に、実施例2に記載されたような共免疫沈降実験で決定されたように、MCF7細胞およびSK-BR-3細胞の両方においてHER2とHER3とのヘレグリン依存性会合を遮断することができる。

【0169】

増殖阻害HER2抗体を同定するために、HER2を過剰発現するガン細胞の成長を阻害する抗体についてスクリーニングすることができる。一態様では、えり抜きの成長阻害抗体は、細胞培養において約0.5から30 µg/mlの抗体濃度で約20~100%だけ、好ましくは約50~100%だけSK-BR-3細胞の成長を阻害することができる。当該抗体を同定するために、米国特許第5,677,171号に記載されているSK-BR-3アッセイを行うことができる。このアッセイによると、SK-BR-3細胞を、10%ウシ胎仔血清、グルタミン、およびペニシリン、ストレプトマイシンを補充したF12とDMEM培地との1:1混合物中で成長させる。SK-BR-3細胞を、35mmの細胞培養皿に細胞20000個で(2ml/35mmの皿)で蒔く。皿1枚あたり0.5から30 µg/mlのHER2抗体を添加する。6日後に、未処理の細胞と比較した細胞数を、電子COUNTER(商標)細胞計数機を用いて計数する。SK-BR-3細胞の成長を約20~100%または約50~100%だけ阻害する抗体を、成長阻害抗体として選択することができる。4D5および3E8などの成長阻害抗体についてスクリーニングするアッセイに関しては、米国特許第5,677,171号を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0170】

アポトーシスを誘導する抗体を選択するために、BT474細胞を用いたアネキシン結合アッセイを利用できる。BT474細胞を培養して、前項に論じたように皿に接種する。次に、培地を取り除き、新鮮培地培地単独または10 µg/mlのモノクローナル抗体を含む培地に交換する。3日間のインキュベーション期間の後に、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により剥離する。次に、細胞を遠心分離して、Ca²⁺結合バッファーに再懸濁して、細胞死アッセイについて上に論じたように試験管に分取する。次に、試験管にラベル化アネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1 µg/ml)を入れる。FACS CAN(商標)フローサイトメータおよびFACS CONVERT(商標)CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して試料を分析できる。対照に比べて統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体を、アポトーシス誘導抗体として選択する。アネキシン結合アッセイに追加して、BT474細胞を用いたDNA染色アッセイを利用できる。このアッセイを行うために、前の二項に記載したように関心対象の抗体で処理したBT474細胞を、37℃で2時間、9 µg/mlのHOECHST33342(商標)と共にインキュベーションし、次に、MODFITLT(商標)ソフトウェア(Verity Software House)を用いたEPICS ELITE(商標)フローサイトメータ(Coulter Corporation)で分析する。本アッセイを使用して、未処理細胞(100%までのアポトーシス細胞)よりも2倍以上(好ましくは3倍以上)というアポトーシス細胞率の変化を誘導する抗体を、アポトーシス促進性抗体として選択することができる。7C2および7F3などの、アポトーシスを誘導する抗体についてスクリーニングするためのアッセイに関してはWO98/17797を参照されたい。

【0171】

関心対象の抗体によって結合されるHER2上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されているような日常的な交差遮断アッセイを実施して、その抗体が2C4またはパーツズマブなどの抗体がHER2に結合するのを交差遮断するかどうかを評定することができる。または、もしくは追加的に、当技術分野で公知の方法によって、エピトープマッピングを行うことができ(例えば、本明細書の図1Aおよび1B参照)、かつ/または抗体-HER2構造を研究して(Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004))HER2のどのドメイン(類)がその抗体によって結合されるかを知ることができる。

【 0 1 7 2 】

(i x) 免疫コンジュゲート

本発明は、化学療法剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素であって、そのフラグメントおよび／または変異体を含む）、または放射性同位体（すなわち、放射性コンジュゲート）などの細胞毒性薬にコンジュゲーションした抗体を含む免疫コンジュゲートにも関するものである。

【 0 1 7 3 】

当該免疫コンジュゲートの発生に有用な化学療法剤は上に記載されている。抗体と、カリチエアミシン、メイタンシン（米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号）、およびトリコテン（trichothene）、および C C 1 0 6 5 などの一つまたは複数の小分子毒素とのコンジュゲートも本明細書に考えられている。

10

【 0 1 7 4 】

本発明の好ましい一態様では、抗体は、一つまたは複数のメイタンシン分子（例えば、抗体 1 分子あたり約 1 から約 1 0 個のメイタンシン分子）とコンジュゲーションしている。メイタンシンを、例えば M a y - S S - M e に変換でき、それを M a y - S H 3 に還元して改変抗体と反応させ（Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)）、メイタンシノイド - 抗体免疫コンジュゲートを発生させることができる。

【 0 1 7 5 】

関心対象の別の免疫コンジュゲートは、一つまたは複数のカリチエアミシン分子とコンジュゲーションしている H E R 2 抗体を含む。カリチエアミシンファミリーの抗生物質は、サブピコモル濃度で、2 本鎖 D N A 切断を産生することができる。使用されうるカリチエアミシンの構造アナログには、 1^I 、 2^I 、 3^I 、N - アセチル - 1^I 、P S A G、および 1^I （Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342(1993)および Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928(1998)）があるが、それに限定されるわけではない。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第 5 , 7 1 4 , 5 8 6 号；第 5 , 7 1 2 , 3 7 4 号；第 5 , 2 6 4 , 5 8 6 号；および第 5 , 7 7 3 , 0 0 1 号も参照されたい。

20

【 0 1 7 6 】

使用できる酵素活性毒素およびそのフラグメントには、ジフテリア A 鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性フラグメント、外毒素 A 鎖（Pseudomonas aeruginosa 由来）、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデシン（modeccin）A 鎖、アルファ - サルシン（sarcin）、Aleuri tes fordii タンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、Phytolaca americana タンパク質（P A P I、P A P I I、および P A P - S）、momordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalis 阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）、およびトリコテセンがある。例えば、1 9 9 3 年 1 0 月 2 8 日に公表された W O 9 3 / 2 1 2 3 2 を参照されたい。

30

【 0 1 7 7 】

本発明は、抗体と核分解活性を有する化合物（例えば、デオキシリボヌクレアーゼ（D N a s e）などのリボヌクレアーゼまたは D N A エンドヌクレアーゼ）との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考えている。

40

【 0 1 7 8 】

放射性コンジュゲーションした H E R 2 抗体の産生に種々の放射性同位体を利用できる。例には、A t 211 、I 131 、I 125 、Y 90 、R e 186 、R e 188 、S m 153 、B i 212 、P 32 、および L u の放射性同位体がある。

【 0 1 7 9 】

抗体と細胞毒性薬とのコンジュゲートを、N - スクシンイミジル - 3 - （2 - ピリジルジチオール）プロピオネート（S P D P）、スクシンイミジル - 4 - （N - マレイミドメチル）シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、イミノチオラン（I T）、イミドエステル類の二官能性誘導体（ジメチルアジボイミデート H C L など）、活性エステル類（スベ

50

リン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド類(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トリエン(tolyene)-2,6-ジイソシアネートなど)、および二活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)のような多様な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製することができる。例えば、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されているように、リシン免疫毒素を調製することができる。炭素14ラベル1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲーションするための例示的なキレート剤である。WO 94 / 11026を参照されたい。リンカーは、細胞内で細胞毒性薬物の放出を容易にする「開裂可能なリンカー」でありうる。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992))を使用することができる。

10

【0180】

または、HER2抗体および細胞毒性薬を含む融合タンパク質を、例えば組換え技法またはペプチド合成によって作成することができる。

【0181】

なお別の態様では、腫瘍の予備ターゲティングに利用するために、「レセプター」(ストレプトアビジンなど)に抗体をコンジュゲーションすることができ、ここで、抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて除去(clearing)剤を使用して循環から未結合のコンジュゲートを除去し、次に、細胞毒性薬(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲーションしている「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

20

【0182】

(x) 抗体依存性酵素介在性プロドラッグ療法(ADEPT)

プロドラッグ(例えばペプチジル化学療法剤、WO 81 / 01145参照)を活性な抗ガン薬に変換するプロドラッグ活性化酵素に抗体をコンジュゲーションすることによって、ADEPTにも本発明の抗体を使用することができる。例えば、WO 88 / 07378および米国特許第4,975,278号を参照されたい。

【0183】

ADEPTに有用な免疫コンジュゲートの酵素構成要素には、より活性な細胞毒性形態に変換するようにプロドラッグに作用できる任意の酵素が含まれる。

30

【0184】

本発明の方法に有用な酵素には、ホスフェート含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ; スルフェート含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ; 無毒性5-フルオロシトシンを抗ガン薬5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ; ペプチド含有プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用な serratia プロテアーゼ、テルモリジン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン(カテプシンBおよびLなど)のようなプロテアーゼ; D-アミノ酸置換基を含有するプロドラッグの変換に有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ; グリコシル化プロドラッグを遊離の薬物に変換するのに有用な -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなどの糖質開裂酵素; -ラクタムで誘導体化された薬物を遊離の薬物に変換するのに有用な -ラクタマーゼ; ならびにアミン性窒素でフェノキシアセチルまたはフェニルアセチル基を用いて誘導体化された薬物を、それぞれ遊離の薬物に変換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼがあるが、それに限定されるわけではない。または、「アブザイム」としても当技術分野において公知である酵素活性を有する抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離の活性薬物に変換することができる(例えば、Massey, Nature 328:457-458(1987)参照)。腫瘍細胞集団にアブザイムを送達するために、抗体-アブザイムコンジュゲートを本明細書に記載したように調製することができる。

40

50

【 0 1 8 5 】

本発明の酵素は、上に論じたヘテロ二官能性架橋試薬の使用などの当技術分野において周知の技法によって、H E R 2 抗体に共有結合することができる。または、本発明の抗体の少なくとも抗原結合領域が本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結したものを含む融合タンパク質を、当技術分野において周知の組換え D N A 技法を使用して構築することができる（例えばNeuberger et al., Nature 312:604-608 (1984) 参照。

【 0 1 8 6 】

(x i) その他の抗体改変

抗体のその他の改変が本明細書において考えられている。例えば、多様な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマーのうちの一つに抗体を連結することができる。例えばコアセルベーション技法もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリメタクリル酸メチルマイクロカプセル）に、コロイド状薬物送達系（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）に、またはマクロエマルジョンに、抗体を捕捉することもできる。このような技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980) に開示されている。

【 0 1 8 7 】

本明細書において開示された H E R 2 抗体を、免疫リボソームとして処方することもできる。抗体を含有するリボソームを、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 米国特許第 4, 4 8 5, 0 4 5 号および第 4, 5 4 4, 5 4 5 号; ならびに 1 9 9 7 年 1 0 月 2 3 日に公表された W O 9 7 / 3 8 7 3 1 に記載されているように、当技術分野において公知の方法により調製する。循環時間が高まったリボソームは、米国特許第 5, 0 1 3, 5 5 6 号に開示されている。

【 0 1 8 8 】

特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、および P E G - 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (P E G - P E) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって発生させることができる。所定の孔径のフィルターを通過させてリボソームを押し出して、所望の直径を有するリボソームを得る。本発明の抗体の F a b ' フラグメントを、ジスルフィド交換反応を介して、Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) に記載されているようにしてリボソームにコンジュゲーションすることができる。場合により、化学療法剤がリボソーム内に包含される。Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989) を参照されたい。

【 0 1 8 9 】

I I I . 薬学的製剤

本発明により使用される抗体の治療用製剤は、所望の純度を有する抗体を、任意選択の薬学的に許容されうる担体、賦形剤、または安定化剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)) と、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で混合することによって、保存用に調製される。許容されうる担体、賦形剤、または安定化剤は、採用される投薬量および濃度でレシピエントに対して無毒性であり、これらには、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などのバッファー; アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤; 保存料 (オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; ヘキサメトニウムクロリド; 塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチルアルコール、またはベンジルアルコール; メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3 - ペンタノール; および m - クレゾールなど); 低分子量 (約 1 0 残基未満の) ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質; ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー; グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギ

ニン、またはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含めた単糖類、二糖類、およびその他の糖質；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；および/またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン界面活性剤がある。好ましい凍結乾燥HER2抗体製剤は、WO97/04801に記載され、参照により本明細書に特に組み入れられる。

【0190】

本明細書における製剤は、処置される特定の適応症に必要な一つを超える活性化化合物、好ましくは相互に有害な影響を及ぼさない相補性活性を有するものも含有することがある。例えば、一製剤中に、EGFR、HER2、HER3、HER4、または血管内皮因子（VEGF）に結合する抗体（例えばHER2上の異なるエピトープに結合する抗体）をさらに提供することが望ましいことがある。または、もしくは追加的に、組成物は、化学療法剤、細胞毒性薬、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、EGFRターゲット薬、抗血管形成剤、および/または心臓保護剤をさらに含む。このような分子は、好適には、意図された目的に有効な量で組み合わせて存在する。

10

【0191】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセルまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリメタクリル酸メチルマイクロカプセルに、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）に、またはマクロエマルジョンに捕捉することもできる。当該技法はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示されている。

20

【0192】

持続性放出製剤を調製することができる。持続性放出製剤の適切な例には、抗体を含有する固体疎水性重合体の半透過性マトリックスがあり、このマトリックスは、造形品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続性放出マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（メタクリル酸2-ヒドロキシエチル）、またはポリビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とD-エチル-L-グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア）などの分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸がある。

30

【0193】

in vivo投与のために使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌濾過膜を通して濾過することにより容易に実現される。

【0194】

IV. 治療のための患者のスクリーニング

本明細書における発明の好ましい態様によると、治療のために選択された患者は、HER（好ましくはHER2）の活性化を示している腫瘍を有する。一態様では、ガン細胞におけるHER（またはHER2）活性化の程度は、同組織型の非ガン性細胞におけるレセプターの活性化レベルを有意に上回る。そのような過度の活性化は、レセプターHERの過剰発現、および/またはガン細胞におけるこのレセプターHERの活性化に利用できるHERリガンドのレベルが正常よりも高いことに起因する。そのような過度の活性化は、ガン細胞の悪性状態を引き起こし、かつ/またはそれに引き起こされうる。いくつかの態様では、そのガンは、診断または予後アッセイに供されて、レセプターHERのそのような過度の活性化を招くレセプターHERの増幅および/または過剰発現が生じているかどうか決定されるであろう。または、もしくは追加的に、そのガンは、診断または予後アッセイに供されて、このレセプターの過度の活性化を原因とされるHERリガンドの増幅

40

50

および/または過剰発現がそのガンにおいて生じているかどうか決定されうる。当該ガンのサブセットでは、レセプターの過度の活性化は、自己分泌刺激経路に起因しうる。HER活性化を決定するための様々なアッセイを下にさらに詳細に説明する。

【0195】

(i) HER二量体

HERまたはHER2活性化を示しているとして、HER二量体の存在について腫瘍試料を評定することができる。当技術分野において公知の任意の方法を使用して、腫瘍におけるEGFR-HER2、HER2-HER3などのHER2二量体を検出することができる。いくつかの好ましい方法を下に説明する。これらの方法は、非共有タンパク質-タンパク質相互作用を検出するか、または、さもなければ関心対象のタンパク質の間で近接していることを指示する。

10

【0196】

免疫沈降またはELISAなどの免疫親和性に基づく方法を使用してHER二量体を検出することができる。一態様では、HER2抗体を使用して、HER2を含む複合体を腫瘍細胞から免疫沈降させ、次に、免疫プロットによりEGFRまたはHER3の存在について、結果として生じた免疫沈殿剤を探索する。別の態様では、免疫沈降段階のためにEGFR抗体またはHER3抗体を使用することができ、次に、HER2抗体を用いて免疫沈殿剤を探索する。さらなる態様では、EGFR、HER3、EGFR/HER2複合体またはHER2/HER3複合体に特異的なHERリガンドを使用して、複合体を沈殿させることができ、次に、HER2の存在についてその複合体を探索する。例えば、リガンドをアビジンとコンジュゲーションして、複合体をビオチンカラムで精製することができる。

20

【0197】

ELISAアッセイまたは抗体「サンドイッチ」型アッセイなどの他の態様では、HER2に対する抗体を固体支持体上に固定化して、腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物と接触させ、洗浄し、次にEGFRまたはHER3に対する抗体に曝露する。後者の抗体の結合は、直接または検出可能なラベルにコンジュゲーションした二次抗体によって検出できるが、ヘテロ二量体の存在を示す。ある態様では、EGFR抗体またはHER3抗体を固定化して、HER2抗体を検出段階に使用する。他の態様では、HERリガンドをHER抗体の代わりに、またはHER抗体と組み合わせて使用することができる。

30

【0198】

化学架橋またはUV架橋を使用して、生きた細胞の表面に二量体を共有結合的に繋ぐこともできる。Hunter et al., Biochem. J., 320:847-53. 化学架橋剤の例には、ジチオビス(スクシンイミジル)プロピオナート(DSP)および3,3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジル)プロピオナート(DTSSP)がある。一態様では、化学架橋した腫瘍細胞由来の細胞抽出物をSDS-PAGEによって分析して、EGFRおよび/またはHER3に対する抗体を用いて免疫プロットする。適切な分子量のスーパーシフトしたバンドは、EGFR-HER2またはHER2-HER3二量体を最も表していると思われる。それは、HER2がEGFRおよびHER3に好ましい二量体化パートナーだからである。この結果を、HER2抗体を用いたその後の免疫プロットにより確認することができる。

40

【0199】

蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使用して、EGFR-HER2またはHER2-HER3二量体を検出することもできる。FRETは、ドナーフルオロホアからアクセプターフルオロホアへのエネルギー移動に基づいてタンパク質のコンフォメーション変化およびタンパク質-タンパク質相互作用をin vivoおよびin vitroで検出する。Selvin, Nat. Struct. Biol., 7:730-34(2000). ドナーフルオロホアがアクセプターフルオロホアに十分近接している場合に限り、エネルギー移動が起こる。典型的なFRET実験では、二つのタンパク質または単一タンパク質の二つの部位を異なる蛍光プローブでラベルする。一方のプローブであるドナープローブは、特異的な波長の入射光によ

50

て高いエネルギー状態に励起する。次に、ドナープローブはそのエネルギーを第2のプローブであるアクセプタープローブに伝播し、その結果、ドナー蛍光強度の減少とアクセプター蛍光発光の増加とを生じる。エネルギー移動の程度を測定するために、ドナープローブおよびアクセプタープローブでラベルした試料でのドナーの強度を、ドナープローブのみでラベルした試料でのドナーの強度と比較する。場合により、アクセプターの強度をドナー/アクセプターおよびアクセプターのための試料で比較する。適切なプローブは当技術分野で公知であり、それには、例えば、フルオレセインおよびロダミンなどの膜透過性色素、シアニン色素などの有機色素、ならびにランタニド原子がある。Selvin、上記。エネルギー移動を検出および測定するための方法および計装もまた、当技術分野で公知である。Selvin、上記。

10

【0200】

個別の細胞におけるタンパク質-タンパク質相互作用を検出および測定するために適した、FRETに基づく技法も当技術分野で公知である。例えば、ドナー光退色蛍光共鳴エネルギー移動(pbFRET)顕微鏡観察および蛍光寿命イメージング顕微鏡観察(FLIM)を使用して、細胞表面レセプターの二量体化を検出することができる。Selvin、上記; Gadella & Jovin, J. Cell Biol., 129:1543-58 (1995)。一態様では、Nagy et al., Cytometry, 32:120-131 (1998)に記載されているように「懸濁液中」または「in situ」のいずれかで細胞に対してpbFRETを使用して、EGFR-HER2またはHER2-HER3二量体の形成を検出および測定する。これらの技法は、エネルギー移動が原因のドナーの蛍光寿命の減少を測定する。特定の態様では、Nagyら、上記およびBrockhoff et al., Cytometry, 44:338-48 (2001)に記載されているように、フローサイトメトリーFörster型FRET技法(FRET)を使用してEGFR-HER2およびHER2-HER3の二量体化を研究することができる。

20

【0201】

FRETは、好ましくは標準的な免疫組織化学ラベル技法と共に使用される。Kenworthy, Methods, 24:289-96 (2001)。例えば、適切な蛍光色素とコンジュゲーションした抗体を、二つの異なるタンパク質をラベルするためのプローブとして使用することができる。タンパク質が相互に近接しているならば、それらの蛍光色素はFRETのためのドナーおよびアクセプターとして作用する。標準的な手段によってエネルギー移動を検出する。フローサイトメトリー手段によって、または電荷結合素子(CCD)カメラと接続した共焦点顕微鏡観察もしくは広視野蛍光顕微鏡観察などのデジタル顕微鏡観察システムによってエネルギー移動を検出することができる。

30

【0202】

本発明の一態様では、例えば、Nagyら、上記に記載されているように、HER2抗体と、EGFR抗体またはHER3抗体のいずれかとを二つの異なるフルオロホアで直接ラベルする。腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物を、EGFR-HER2またはHER2-HER3二量体の存在下でFRETのためのドナーおよびアクセプターとして作用する、ディファレンシャルにラベルした抗体と接触させる。または、HER2に対する未ラベル抗体と、EGFRまたはHER3のいずれかに対する未ラベル抗体とを、ドナーおよびアクセプターとして働くディファレンシャルにラベルした二次抗体と一緒に使用する。例えば、Brockhoffら、上記を参照されたい。エネルギー移動を検出して、それらラベルが近接していることが見出されたならば、二量体の存在が決定される。

40

【0203】

他の態様では、HER2に特異的なレセプターHERのリガンドと、HER1またはHER3のいずれかに特異的なレセプターHERのリガンドとを蛍光ラベルして、FRET研究に使用する。

【0204】

本発明のなその他の態様では、腫瘍細胞表面上に二量体が存在することを、標準的な直接または間接免疫蛍光技法および共焦点レーザー走査顕微鏡観察を用いて、EGFRまたはHER3のいずれかとのHER2の共局在によって実証する。または、Zuck et al., Pro

50

c. Natl. Acad. Sci. USA, 96:11122-27(1999)に記載されているように、レーザ走査イメージング (LSI) を使用して、マイクロウェルプレートなどの高スループット形式で、抗体結合および EGF R または HER 3 のいずれかとの HER 2 の共局在を検出する。

【0205】

さらなる態様では、二量体構成要素の近接に依存した酵素活性を確認することによって、EGF R - HER 2 および / または HER 2 - HER 3 二量体の存在を決定する。HER 2 抗体を、ある酵素とコンジュゲーションさせ、EGF R 抗体または HER 3 抗体を第 2 酵素とコンジュゲーションさせる。第 1 酵素に対する第 1 基質を加えると、その反応は、第 2 酵素に対する第 2 基質を産生する。これにより、別の分子と反応して色素などの検出可能な化合物の産生がもたらされる。別の化学物質が存在すると、第 2 基質が分解し、その結果、第 1 および第 2 酵素が、よって二つの抗体が近接していない限り、第 2 酵素との反応は阻止される。特定の態様では、グルコースオキシダーゼとコンジュゲーションした HER 2 抗体、およびホースラディッシュペルオキシダーゼとコンジュゲーションした HER 3 抗体または HER 1 抗体と、腫瘍細胞または細胞溶解物を接触させる。DAB およびカタラーゼなどの色素前駆体と共にグルコースを反応物に加える。DAB について染色したときの展色によって、二量体の存在を決定する。

【0206】

例えば、2001 年 12 月 6 日に公表された、両方共にその全体が参照により特に組み入れられる米国特許出願 2001 / 0049105 に記載されているような eTag (商標) アッセイシステム (Aclara Bio Sciences, MountainView, CA) に基づく方法を用いても、二量体を検出することができる。eTag (商標) または「電気泳動タグ」は、蛍光基などの検出可能なレポーター部分を含む。それは、独特の電気泳動移動度を有する部分から本質的になる「移動度改変物質」も含みうる。これらの部分は、キャピラリー電気泳動 (CE) などの所定の電気泳動条件で複合体混合物から eTag (商標) の分離および検出を可能にする。レポーター部分と、場合により移動度改変物質とを含有する eTag (商標) の一部を、開裂可能な連結基によって第 1 ターゲット結合部分に連結させて、第 1 結合化合物を産生する。この第 1 ターゲット結合部分は、核酸またはタンパク質などの特定の第 1 ターゲットを特異的に認識する。第 1 ターゲット結合部分は、いかなる方法にも限定されず、例えばポリヌクレオチドまたはポリペプチドでありうる。好ましくは、第 1 ターゲット結合部分は、抗体または抗体フラグメントである。または、第 1 ターゲット結合部分は、レセプター HER のリガンドまたはその結合構成要素フラグメントでありうる。

【0207】

連結基は、酵素基質などの開裂可能な部分、または所定の条件で開裂できる任意の化学結合を好ましくは含む。第 1 ターゲット結合部分がそのターゲットに結合した場合、開裂剤が導入および / または活性化され、連結基が開裂し、それによってレポーター部分および移動度改変物質を含有する eTag (商標) の一部が放出される。このように、「遊離の」 eTag (商標) の存在は、ターゲットに対するターゲット結合部分の結合を示す。

【0208】

好ましくは、第 2 結合化合物は、開裂剤と、第 2 ターゲットを特異的に認識する第 2 ターゲット結合部分とを含む。第 2 ターゲット結合部分も、どのようにも限定されるわけではなく、例えば抗体もしくは抗体フラグメントまたはレセプター HER のリガンドまたは結合構成要素のリガンドフラグメントでありうる。第 1 結合化合物および第 2 結合化合物が近接しているならば、開裂剤は、第 1 結合化合物の連結基のみを開裂させるであろう開裂剤である。

【0209】

本発明の態様では、第 1 結合化合物は、HER 2 に対する抗体が第 1 ターゲット結合部分として働く eTag (商標) を含む。第 2 結合化合物は、eTag (商標) の連結基を開裂できる開裂剤と繋がった、EGF R または HER 3 に対する抗体を含む。好ましくは、開裂剤は、連結基を開裂できるには活性化していなければならない。HER 2 に結合す

る e T a g (商標)、および細胞表面の E G F R または H E R 3 に結合する改変 E G F R 抗体または H E R 3 抗体と、腫瘍細胞または腫瘍細胞溶解物を接触させる。未結合の結合化合物を好ましくは取り除き、開裂剤を必要に応じて活性化させる。E G F R - H E R 2 または H E R 2 - H E R 3 二量体が存在するならば、開裂剤は連結基を開裂して、開裂剤が連結基と近接していることが原因で e T a g (商標)を放出するであろう。次に、キャピラリー電気泳動などの、当技術分野で公知の任意の方法によって、遊離の e T a g (商標)を検出できる。

【0210】

一態様では、開裂剤は、連結基に作用する活性化可能な化学種である。例えば、開裂剤は、試料を露光することにより活性化することができる。

10

【0211】

別の態様では、第1ターゲット結合部分として E G F R または H E R 3 に対する抗体を用いて e T a g (商標)を構築して、第2結合化合物を H E R 2 に対する抗体から構築する。

【0212】

なお別の態様では、二量体におけるいずれかのレセプター H E R に対する結合に比較して、その二量体に特異的または優先的に結合する抗体または他の試薬を使用して、H E R 二量体を検出する。

【0213】

(i i) H E R 2 リン酸化

20

前項で論じたように、E G F R 抗体、H E R 2 抗体、または H E R 3 抗体との免疫沈降の後に、場合により免疫プロットの代替または補足として、二量体の機能的アッセイを行う。一態様では、H E R 3 抗体を用いた免疫沈降に続いて、免疫沈殿剤でのレセプターチロシンキナーゼ活性についてのアッセイを行う。H E R 3 は内因性チロシンキナーゼ活性を有さないことから、免疫沈殿剤中のチロシンキナーゼ活性の存在は、H E R 3 が H E R 2 と最も会合していそうなことを示す。Graus-Porta et al., EMBO J., 16:1647-55 (1997); Klapper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4995-5000 (1999)。H E R 2 抗体を用いた免疫プロットにより本結果を確認できる。別の態様では、H E R 2 抗体を用いた免疫沈降に続いて、E G F R のレセプターチロシンキナーゼ活性についてのアッセイを行う。本アッセイでは、免疫沈殿剤を放射性 A T P、および E G F R による H E R 2 のリン酸基転移の *i n v i v o* 部位を模倣するペプチド基質と接触させる。ペプチドのリン酸化は、共免疫沈降と、よって E G F R と H E R 2 との二量体化を示す。レセプターチロシンキナーゼ活性アッセイは、当技術分野で周知であり、それには、例えばホスホチロシン抗体によるターゲット基質のリン酸化と、M A P K 経路などのコグネイトシグナル伝達経路の活性化とを検出するアッセイが含まれる。

30

【0214】

レセプター H E R のリン酸化を、レセプター H E R 2 (H E R 2)などの一つまたは複数のレセプター H E R の免疫沈降およびウエスタンブロット分析によって評価できる。例えば、免疫沈降したレセプター H E R 中のリン酸化したチロシン残基を検出するために抗ホスホチロシン抗体を用いて、ゲル上のホスホ - H E R 2 バンドの存在によって陽性を決定する。抗ホスホチロシン抗体は、Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA)の子会社であるPan Vera (Madison, WI)、またはUpstate Biotechnology (Lake Placid, NY)から市販されている。バンドの不在により陰性を決定する。

40

【0215】

別の態様では、レセプター H E R 2 (H E R 2)のリン酸化を、ホスホ特異的 H E R 2 抗体(クローン P N 2 A; Thor et al., J. Clin. Oncol., 18(18):3230-3239 (2000))を用いた免疫組織化学検査により評定する。

【0216】

レセプター H E R のリン酸化を検出するための他の方法には、K I R A E L I S A (米国特許第 5,766,863号;第5,891,650号;第5,914,237号

50

；第6，025，145号；および第6，287，784号）、質量分析（リン酸化HER2と非リン酸化HER2とのサイズを比較）、およびHER（例えばHER2）抗体とホスホ特異的またはホスホチロシン特異的抗体との両方を用いたe-tag近接アッセイ（例えばAclara BioSciences（Mountain View, CA）から入手できるeTag（商標）アッセイキットを使用）がある。eTagアッセイの詳細を本明細書に上記する。

【0217】

細胞アレイにホスホ特異的抗体を使用して、細胞試料中のシグナル伝達タンパク質のリン酸化状態を検出することもできる（US2003/0190689）。

【0218】

(iii) HER2リガンド

腫瘍中または腫瘍に関連したTGF-などのHERリガンドのレベルを、公知の手順により決定することができる。そのようなアッセイは、検査する試料中のタンパク質および/またはそれをコードする核酸を検出することができる。一態様では、免疫組織化学（IHC）を用いて、腫瘍中のHERリガンドのレベルを決定できる；例えば、Scher et al., Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995)を参照されたい。または、もしくは追加的に、検査する試料中の、HERリガンドをコードする核酸のレベルを、例えばFISH、サザンブロット、またはPCR技法により評価することができる。

【0219】

(iv) HER2を過剰発現していないガン

レセプターHER2の過剰発現によってガンの特徴づけることができるが、本出願は、HER2過剰発現性ではないとみなされるガンを処置するための方法をさらに提供する。

【0220】

ガンにおけるHER2発現を決定するために、様々な診断/予後アッセイを利用できる。一態様では、HER2の過剰発現を、例えばHERCEPT（登録商標）（Dako）を使用した、IHCにより分析できる。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイに供して、以下の通りHER2タンパク質染色強度基準に適合させることができる：

スコア0 染色が観察されないか、または腫瘍細胞の10%未満に膜染色が観察される。

スコア1+ 腫瘍細胞の10%超にかすか/わずかに認知できる膜染色が検出される。これらの細胞の膜の一部だけが染色される。

スコア2+ 腫瘍細胞の10%超に膜全体の弱から中度の染色が観察される。

スコア3+ 腫瘍細胞の10%超に膜全体の中から強度の染色が観察される。

【0221】

HER2の過剰発現評価についてスコア0または1+を有する腫瘍を、HER2を過剰発現していないと特徴づけることができ、一方、スコア2+または3+を有する腫瘍を、HER2を過剰発現していると特徴づけることができる。

【0222】

HER2を過剰発現している腫瘍を、細胞1個あたりに発現したHER2分子のコピー数に対応する免疫組織化学スコアによって採点することができ、生化学的に決定することができる：

0 = 0 ~ 10000コピー/細胞、

1+ = 少なくとも約200000コピー/細胞、

2+ = 少なくとも約500000コピー/細胞、

3+ = 少なくとも約2000000コピー/細胞。

【0223】

チロシンキナーゼのリガンド非依存性活性化をもたらす3+レベルでのHER2の過剰発現（Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163 (1987)）は、乳ガンの約30%で起こり、これらの患者では、無再発生存率および全生存率が減少している

10

20

30

40

50

(Slamon et al., Science, 244:707-712 (1989); Slamon et al., Science, 235:177-182 (1987))。

【0224】

または、もしくは追加的に、INFORM (商標) (Ventana, Arizonaが販売) または PATHVISION (商標) (Vysis, Illinois) などのFISHアッセイを、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織に対して行って、(もしあれば) 腫瘍におけるHER2の過剰発現の程度を決定することができる。

【0225】

一態様では、ガンはEGFRを発現する(かつ過剰発現しうる)ガンであろうし、当該発現を、上に言及したようなHER2の発現を評価するための方法に関して評価することができる。

10

【0226】

in vivo診断アッセイを用いて、例えば検出すべき分子と結合し、検出可能なラベル(例えば放射性同位体)でタグを付けた(抗体などの)分子を投与して、そのラベルの局在について患者を外部からスキャンすることによって、レセプターHERまたはHERリガンドの過剰発現または増幅を評価することもできる。

【0227】

V. HER2抗体を用いた処置

本発明によると、HER2抗体を使用してプラチナ耐性ガンなどの化学療法耐性ガンまたはプラチナ耐性ガンを処置できることが考えられている。そのガンは、本明細書におけるHER2抗体がガン細胞に結合できるように、HER2発現細胞を一般に含む。

20

【0228】

患者は、HER2抗体、好ましくはパースズマブと、代謝拮抗化学療法剤、好ましくはゲムシタピンとの組み合わせで処置される。組み合わせ投与には、別々の製剤または単一の薬学的製剤を使用した同時投与または併行投与、およびいずれかの順序の連続投与があり、ここで、好ましくは両方の(または全ての)活性薬剤が生物学的活性を同時に発揮する期間が存在する。このように、代謝拮抗化学療法剤を、HER2抗体の投与前または投与後に投与することができる。本態様では、代謝拮抗化学療法剤の少なくとも1回の投与と、HER2抗体の少なくとも1回の投与との間のタイミングは、好ましくは約1か月以下であり、最も好ましくは約2週間以下である。または、代謝拮抗化学療法剤およびHER2抗体を単一の製剤または別々の製剤として患者に同時投与する。

30

【0229】

組み合わせを用いた処置は、ガンの徴候または症状の改善を招くであろう。例えば、当該治療は、代謝拮抗化学療法剤のみで処置された患者に比較して、生存率の改善(全生存率および/もしくは進行のない生存率)を招くことができ、かつ/または臨床的(部分もしくは完全)反応を招くことができる。さらに、代謝拮抗化学療法剤(例えばゲムシタピン)とHER2抗体(例えばパースズマブ)との組み合わせを用いた処置により、患者に対して相乗的な治療上の利益、または相加的よりも大きい治療上の利益が生じうる。

【0230】

好ましくは、投与されるHER2抗体はネイキッドな抗体である。しかし、投与されるHER2抗体を、細胞毒性薬とコンジュゲーションすることができる。好ましくは、その細胞毒性薬が結合している免疫コンジュゲートおよび/またはHER2タンパク質は、細胞によってインターナリゼーションされ、それが結合するガン細胞の殺滅において免疫コンジュゲートの増加した治療有効性を招く。好ましい態様では、細胞毒性薬はガン細胞中の核酸をターゲティングまたは妨害する。当該細胞毒性薬の例には、メイタンシノイド、カリチェアミシン、リボヌクレアーゼ、およびDNAエンドヌクレアーゼがある。

40

【0231】

HER2抗体(またはHER2抗体の免疫コンジュゲート)および代謝拮抗化学療法剤を、例えばボラスとしての、もしくはある時間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、動脈内、滑膜内、鞘内、経口、局所、または吸入経路な

50

どの公知の方法により、ヒト患者に投与する。HER2抗体および代謝拮抗化学療法剤を同じ投与経路によって投与してもよいが、そうしなくてもよい。抗体および代謝拮抗化学療法剤の両方の静脈内投与が好ましい。

【0232】

疾患の予防または処置のための、HER2抗体の適切な投薬量は、上に定義したような処置される疾患の種類、疾患の重症度および経過、予防または治療目的のためにHER2抗体が投与されるかどうか、以前の治療、患者の臨床歴およびHER2抗体に対する反応、ならびに担当の医師の判断力に依存するであろう。HER2抗体は一度にまたは一連の処置にわたり患者に適切に投与される。疾患の種類および重症度に応じて、約1 µg/kgから50 mg/kg（例えば0.1～20 mg/kg）のHER2抗体は、患者に対する投与の候補となる初期投薬量であり、それは例えば一つもしくは複数の個別の投与、または連続注入のいずれかによる。一態様では、HER2抗体についての初回注入時間は、その後の注入時間よりも長いことがあり、例えば初回注入について約90分間であり、（初回注入が耐容性良好であるならば）その後の注入について約30分間である。HER2抗体の好ましい投薬量は、約0.05 mg/kgから約10 mg/kgの範囲内であろう。このように、約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg、または10 mg/kgの一つまたは複数の用量（またはその任意の組み合わせ）を患者に投与することができる。（患者がHER2抗体の約2から約20回、例えば約6回の投与を受けるように）間欠的、例えば毎週または3週間毎に当該用量を投与することができる。初回の高いローディング用量の後で、1回または複数回の低用量を投与することができる。一態様では、HER2抗体を約840 mgのローディング用量として投与し、その後約420 mgを約3週間毎に投与する。別の態様では、約3週間毎に投与される約1050 mgの用量として、HER2抗体を投与する。

【0233】

代謝拮抗化学療法剤は、それについて公知の投薬量で通常投与されるか、または代謝拮抗化学療法剤の投与に原因があるとされる薬物の組み合わせ作用または負の副作用が原因で場合により減量される。当該化学療法剤のための製剤および/または投薬スケジュールを製造業者の説明書により、または当業者により経験的に決定されたように使用することができる。当該化学療法剤についての製剤および投薬スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記載されている。代謝拮抗化学療法剤がゲムシタピンである場合、好ましくは、ゲムシタピンは約600 mg/m²から1250 mg/m²の間（例えば約1000 mg/m²）の用量で、例えば3週間サイクルの1日目および8日目に投与される。

【0234】

HER2抗体および代謝拮抗化学療法剤の他に、他の治療方式をそれに組み合わせることができる。例えば、第2（第3、第4など）の化学療法剤（類）を投与することができ、ここで、第2化学療法剤は別の異なる代謝拮抗化学療法剤、または代謝拮抗物質ではない化学療法剤のいずれかである。例えば、第2化学療法剤は、（パクリタキセルまたはドセタキセルなどの）タキサン、カペシタビン、またはプラチナ系化学療法剤（カルボプラチン、シスプラチン、またはオキサリプラチンなど）、アントラサイクリン（リボソームドキシソルピシンを含めたドキシソルピシンなど）、トポテカン、ペメトレキセド、ビンカルカロイド（ビノレルビンなど）、およびTLK286でありうる。異なる化学療法剤の「カクテル」を投与することができる。

【0235】

HER2抗体と組み合わせることができる他の治療剤および代謝拮抗化学療法剤には：第2の異なるHER2抗体（例えば、トラスツズマブなどの成長阻害性HER2抗体、またはHER2過剰発現細胞のアポトーシスを誘導する、7C2、7F3、もしくはそのヒト化改変体などのHER2抗体）；EGFR、HER3、HER4などの別の腫瘍関連抗原に対する第2抗体；抗ホルモン化合物、例えばタモキシフェンなどの抗エストロゲン化合物、またはアロマターゼ阻害剤；（治療に関連する任意の心筋機能不全を阻止または低減するための）心臓保護剤；サイトカイン；EGFRターゲット薬（TARCEVA（登録商標

）、IRESSA（登録商標）、またはセツキシマブなど）；抗血管形成剤（特にAVASTIN（商標）の商標でGenentechによって販売されているベバシズマブ）；チロシンキナーゼ阻害剤；C O X 阻害剤（例えばC O X - 1 阻害剤またはC O X - 2 阻害剤）；非ステロイド系抗炎症薬であるセレコキシブ（CELEBREX（登録商標））；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、Johnson and Johnsonから入手できるチピファルニブ（Tipifarnib）/ ZAR NESTRA（登録商標）R 1 1 5 7 7 7、またはSchering-Ploughから入手できるロナファルニブ（Lonafarnib）S C H 6 6 3 3 6 ）；オレゴボマブ（Oregovomab）（M o A b B 4 3 . 1 3 ）などの、ガン胎児タンパク質C A 1 2 5 と結合する抗体；H E R 2 ワクチン（PharmexiaからのH E R 2 AutoVacワクチン、またはDendreonからのA P C 8 0 2 4 タンパク質ワクチン、またはGSK/CorixaからのH E R 2 ペプチドワクチン）；別のH E R ターゲティング療法（例えば、トラスツズマブ、セツキシマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、C I 1 0 3 3、G W 2 0 1 6 など）；R a f および / または r a s 阻害剤（例えばW O 2 0 0 3 / 8 6 4 6 7 参照）；ドキシル；トペテカン（Topotecan）；タキサン；G W 5 7 2 0 1 6；T L K 2 8 6；E M D - 7 2 0 0；セロトニン拮抗薬、ステロイド、またはベンゾジアゼピンなどの、悪心を処置する薬；皮疹を予防もしくは処置する薬、または局所もしくは経口抗生物質を含めた標準的な瘡治療法、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミン、またはメペリジンなどの解熱薬；造血成長因子などのうち任意の一つまたは複数が含まれる。

10

【 0 2 3 6 】

上記で同時投与された任意薬剤についての適切な投薬量は、現在使用されている投薬量であり、その薬剤およびH E R 2 抗体の組み合わせ作用（相乗作用）により減らすことができる。

20

【 0 2 3 7 】

上記治療方式以外に、ガン細胞の外科的除去および / または放射線療法に患者を供することができる。

【 0 2 3 8 】

患者への抗体タンパク質の投与は別として、本出願は遺伝子療法による抗体の投与を考えている。抗体をコードする核酸の当該投与は、「抗体を投与する」という表現に包含される。例えば、1996年3月14日に公表された、細胞内抗体を発生させるための遺伝子療法の使用に関するW O 9 6 / 0 7 3 2 1 を参照されたい。

30

【 0 2 3 9 】

（場合によりベクターに含まれる）核酸を患者の細胞内に *in vivo* および *ex vivo* で至らせるために、二つの主なアプローチがある。*in vivo* 送達のために、患者に直接、通常はその抗体が必要とされる部位に核酸を注射する。*ex vivo* 処置のために、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離された細胞に導入して、改変された細胞を患者に直接投与するか、または例えば多孔性膜内に封入して、その多孔性膜を細胞を患者に植込む（例えば米国特許第4,892,538号および第5,283,187号参照）。生存可能な細胞に核酸を導入するために利用できる多様な技法がある。これらの技法は、核酸が培養細胞に *in vitro* で、または意図された宿主の細胞に *in vivo* で導入されるかどうかに応じて変動する。哺乳動物細胞に *in vitro* で核酸を導入するのに適した技法には、リボソームの使用、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、D E A E - デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などがある。遺伝子の *ex vivo* 送達用に通例使用されているベクターはレトロウイルスである。

40

【 0 2 4 0 】

現在好ましい *in vivo* 核酸導入技法には、（アデノウイルス、Herpes simplex I ウイルス、またはアデノ随伴ウイルスなどの）ウイルスベクターおよび脂質に基づく系のトランスフェクションがある（遺伝子の脂質介在性導入に有用な脂質は、例えばD O T M A、D O P E、およびD C - C h o l である）。ある状況では、核酸源に、細胞表面膜タンパク質またはターゲット細胞に特異的な抗体、ターゲット細胞上のレセプターに対する

50

リガンドなどのような、ターゲット細胞をターゲティングする薬剤を提供することが理想的である。リポソームが採用された場合、エンドサイトーシスに関連する細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞種類に親和性のキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、サイクリングにおいてインターナリゼーションを受けるタンパク質に対する抗体、および細胞内局在をターゲティングして細胞内半減期を増大するタンパク質を、ターゲティングに、および/または取込みを促進するために使用することができる。レセプター介在性エンドサイトーシスの技法は、例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); および Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990) に記載されている。現在公知の遺伝子マーカー作成および遺伝子治療プロトコールの総説については、Anderson et al., Science 256:808-813 (1992) を参照されたい。WO 93 / 2 5 6 7 3 および本明細書に引用した参考文献も参照されたい。

【 0 2 4 1 】

V I . 材料の寄託

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

抗体の名称	A T C C 番号	寄託日
7 C 2	A T C C H B - 1 2 2 1 5	1 9 9 6 年 1 0 月 1 7 日
7 F 3	A T C C H B - 1 2 2 1 6	1 9 9 6 年 1 0 月 1 7 日
4 D 5	A T C C C R L 1 0 4 6 3	1 9 9 0 年 5 月 2 4 日
2 C 4	A T C C H B - 1 2 6 9 7	1 9 9 9 年 4 月 8 日

【 0 2 4 2 】

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定的な実施例によって例示される。明細書における全ての引用の開示は、参照により特に本明細書に組み入れられる。

【 0 2 4 3 】

実施例 1

モノクローナル抗体 2 C 4 の産生および特徴づけ

HER2 の細胞外ドメインと特異的に結合するマウスモノクローナル抗体 2 C 4、7 F 3、および 4 D 5 を、Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990) に記載されているように産生させた。簡潔には、Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7159-7163 (1987) に記載されているように産生させた NIH 3 T 3 / HER 2 - 3₄₀ 細胞 (約 1 × 10⁵ 個の HER 2 分子 / 細胞を発現している) を、2.5 mM EDTA を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で収集して、BALB / c マウスを免疫処置するために使用した。0、2、5、および 7 週目に PBS 0.5 ml に入れた細胞 10⁷ 個の i.p. 注射をマウスに行った。³²P ラベル HER 2 を免疫沈降する抗血清を有するマウスに、コムギ胚芽アグルチニン - セファロース (WGA) で精製した HER 2 膜抽出物の i.p. 注射を 9 週目および 13 週目に行った。この後に、HER 2 調製物 0.1 ml の i.v. 注射を行って、脾臓細胞をマウス骨髄腫系 X 63 - Ag 8.653 と融合させた。

【 0 2 4 4 】

ELISA および放射性免疫沈降によって、HER 2 の結合についてハイブリドーマ上清をスクリーニングした。

【 0 2 4 5 】

モノクローナル抗体 4 D 5、7 F 3、および 2 C 4 によって結合される HER 2 エピトープを、競合結合分析により決定した (Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990))。蛍光を定量するために PANDEx (商標) スクリーン機を使用したインタクトな細胞に関する直接蛍光によって、抗体に関する交差遮断研究を行った。確立した手順を用いて、各モノクローナル抗体にフルオレセインイソチオシアネート (FITC) をコンジュゲーションさせた (Wofsy et al., Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980))。NIH 3 T 3 / HER 2 - 3₄₀ 細胞の集密な単層をトリプシン処理して、1 回洗浄して、0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) および 0.1% NaN₃ を含有する冷 PBS に 1.7

5×10^6 細胞/mlとなるように再懸濁した。最終濃度 1%のラテックス粒子 (IDC, Portland, OR) を添加して、P A N D E X (商標) プレート膜の詰まりを低減させた。懸濁状態の細胞 $20 \mu\text{l}$ および精製モノクローナル抗体 ($100 \mu\text{g/ml}$ から $0.1 \mu\text{g/ml}$) $20 \mu\text{l}$ を P A N D E X (商標) プレートのウェルに加えて、30 分間氷冷しながらインキュベーションした。 $20 \mu\text{l}$ に予定した希釈を行った F I T C ラベルモノクローナル抗体を各ウェルに加え、30 分間インキュベーションして、洗浄し、蛍光を P A N D E X (商標) によって定量した。モノクローナル抗体は、無関係のモノクローナル抗体対照に比較して、それぞれのモノクローナル抗体がもう一方の結合を 50% 以上遮断したならば、エピトープを共有するとみなされた。この実験では、モノクローナル抗体 4 D 5、7 F 3、および 2 C 4 は、それぞれ、エピトープ I、G / F、および F を割り当てられた。

10

【0246】

モノクローナル抗体 2 C 4、7 F 3、および 4 D 5 の成長阻害特性を、乳房腫瘍細胞系 S K - B R - 3 を用いて評価した (Hudziak et al., Molec. Cell. Biol. 9(3):1165-1172 (1989) 参照)。簡潔には、0.25% (v o l / v o l) トリプシンを使用することによって S K - B R - 3 細胞を剥離させ、 4×10^5 細胞/ml の密度で完全培地に懸濁した。一定分量 $100 \mu\text{l}$ (4×10^4 細胞) を 96 ウェル微量希釈プレートにプレーティングして、細胞を接着させ、次に、培地単独またはモノクローナル抗体を含有する培地 (最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$) $100 \mu\text{l}$ を加えた。72 時間後にプレートを P B S (p H 7.5) で 2 回洗浄し、クリスタルバイオレット (0.5% メタノール溶液) で染色して、Sugarman et al., Science 230:943-945 (1985) に記載されているように相対細胞増殖について分析した。

20

【0247】

M C F 7 細胞の全細胞溶解物からの M_r 180000 範囲のタンパク質の H R G 刺激性チロシンリン酸化を阻害する能力について、モノクローナル抗体 2 C 4、4 D 5、および 7 F 3 を評価した (Lewis et al. Cancer Research 56:1457-1465 (1996))。M C F 7 細胞は全ての公知のレセプター H E R を発現するが、それは比較的低レベルであると報告されている。H E R 2、H E R 3、および H E R 4 はほぼ同一の分子サイズを有することから、全細胞溶解物をウエスタンブロット分析によって評価する場合、どのタンパク質がチロシンリン酸化されつつあるかを識別するのは不可能である。

30

【0248】

しかし、外因性に添加した H R G の不在下では、これらの細胞は、使用したアッセイ条件で、 M_r 180000 範囲で低レベルから検出不能レベルのチロシンリン酸化タンパク質を示すことから、これらの細胞は H R G チロシンリン酸化アッセイに理想的である。

【0249】

M C F 7 細胞を 24 ウェルプレートにプレーティングして、H E R 2 に対するモノクローナル抗体を各ウェルに加え、室温で 30 分間インキュベーションした。次に、各ウェルに最終濃度 0.2 nM まで r H R G $1_{177-244}$ を添加して、インキュベーションを 8 分間続けた。各ウェルから培地を慎重に吸引し、S D S 試料バッファー (5% S D S、25 mM D T T、および 25 mM トリス H C l、p H 6.8) $100 \mu\text{l}$ の添加によって反応を停止させた。各試料 ($25 \mu\text{l}$) を、4 ~ 12% 勾配のゲル (Novex) で電気泳動させ、次にポリビニリデンジフルオリド膜に電気泳動的に移行させた。抗ホスホチロシン ($4 G 10$ 、U B I 由来、 $1 \mu\text{g/ml}$ で使用) 免疫ブロットを展色させ、 $M_r \sim 180000$ の顕著な反応性バンドの強度を、以前に記載されたように反射率デンシトメトリーにより定量した (Holmes et al., Science 256:1205-1210 (1992); Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269:14661-14665 (1994))。

40

【0250】

モノクローナル抗体 2 C 4、7 F 3、および 4 D 5 は、 M_r 180,000 で H R G に誘導されるチロシンリン酸化シグナルの発生を有意に阻害した。H R G 不在下では、これ

50

らの抗体のどれも M_r 180000 範囲でタンパク質のチロシンリン酸化を刺激できなかった。また、これらの抗体は EGF R (Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990)) とともに、HER3 とともに、HER4 とともに交差反応しない。抗体 2C4 および 7F3 は、HRG による p180 のチロシンリン酸化刺激を対照の < 25% まで有意に阻害した。モノクローナル抗体 4D5 は、HRG によるチロシンリン酸化刺激を ~ 50% 遮断できた。図 2A は、反射率デンストメトリーにより決定されたような、HRG による p180 のチロシンリン酸化刺激を 2C4 または 7F3 が阻害することについての用量反応曲線を示す。4 変数適応を用いたこれらの阻害曲線の評価により、2C4 および 7F3 についてそれぞれ 2.8 ± 0.7 nM および 29.0 ± 4.1 nM の IC_{50} が生じた。

【0251】

HER2 抗体による、MCF7 乳房腫瘍細胞系に対する HERG の結合阻害を、24 ウェルプレート形式で氷冷した単層培養を用いて行った (Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996))。HER2 モノクローナル抗体を各ウェルに加えて、30 分間インキュベーションした。 125 I ラベル rHRG 1.177×10^{-4} (25 pM) を加え、インキュベーションを 4 から 16 時間続けた。図 2B は、MCF7 細胞に対する HRG 結合を 2C4 または 7F3 が阻害することについての用量反応曲線を提供する。様々な濃度の 2C4 または 7F3 を、 125 I ラベル rHRG 1 の存在下で MCF7 細胞と共にインキュベーションし、阻害曲線を図 2B に示す。これらのデータの分析により、2C4 および 7F3 についてそれぞれ 2.4 ± 0.3 nM および 19.0 ± 7.3 nM の IC_{50} が生じた。2C4 および 7F3 について ~ 74% の最大阻害は、チロシンリン酸化のデータと一

【0252】

MCF7 細胞に及ぼす HER2 抗体の観察された効果が、一般的な現象であるかどうかを決定するために、ヒト腫瘍細胞系を 2C4 または 7F3 と共にインキュベーションして、 125 I ラベル rHRG 1 の特異的結合の程度を決定した (Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996))。本研究の結果を図 3 に示す。 125 I ラベル rHRG 1 の結合は、HER2 をほとんどまたは全く発現しないと報告された乳ガン細胞系 MDA-MB-468 を除いた全ての細胞系で、2C4 または 7F3 のいずれかによって有意に阻害されることができた。残りの細胞系は、HER2 を発現すると報告され、HER2 の発現レベルは、これらの細胞系の間で大きく変動する。実際に、試験された細胞系における HER2 の発現範囲は、2 オーダーを超えて変動する。例えば、BT-20、MCF7、および Caov3 はレセプター HER2 ~ 10^4 個 / 細胞を発現するが、BT-474 および SK-BR-3 はレセプター HER2 ~ 10^6 個 / 細胞を発現する。これらの細胞および上記データにおける HER2 の広範囲の発現を考えると、HER2 と HER3 または HER4 との間の相互作用は、それ自体、原形質膜表面で行われる高親和性相互作用であったと結論された。

【0253】

外因性 rHRG 1 の存在下または不在下での MDA-MB-175 および SK-BR-3 細胞に及ぼすモノクローナル抗体 2C4 および 4D5 の成長阻害効果を評定した (Schafer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997))。MDA-MB-175 細胞における HER2 レベルは、正常な乳房上皮細胞にみられるレベルよりも 4 ~ 6 倍高く、レセプター HER2 - HER4 は MDA-MB-175 細胞において構成的にチロシンリン酸化されている。MDA-MB-175 細胞を HER2 モノクローナル抗体 2C4 および 4D5 ($10 \mu\text{g/mL}$) で 4 日間処理した。クリスタルバイオレット染色アッセイでは、2C4 とのインキュベーションにより、本細胞系に及ぼす強力な成長阻害効果を示された (図 4A)。外因性 HRG はこの阻害を有意には逆転しなかった。他方で、2C4 は、HER2 を過剰発現している細胞系 SK-BR-3 に対して阻害効果を示さなかった (図 4B)。モノクローナル抗体 2C4 は、外因性 HRG の存在下および不在下の両方でモノクローナル抗体 4D5 よりも大きな程度に MDA-MB-175 細胞の細胞増殖を阻害できた。4D5 による細胞増殖の阻害は、HER2 の発現レベルに依存する (Lewis et al., Cancer 1

10

20

30

40

50

mmunol. Immunother. 37:255-263 (1993))。S K - B R - 3 細胞における最大 66% の阻害を検出することができた (図 4 B)。しかし、この効果を外因性 H R G により克服することができた。

【 0 2 5 4 】

実施例 2

H R G に依存する H E R 3 との H E R 2 の会合はモノクローナル抗体 2 C 4 により遮断される

H E R 3 が H E R 2 と会合する能力を共免疫沈降実験で試験した。M C F 7 細胞または S K - B R - 3 細胞 1.0×10^6 個を 6 ウェル組織培養プレート中の、10%ウシ胎仔血清 (F B S) および 10mM H E P E S (pH 7.2) (成長培地) を含有する D M E M / H a m の F 1 2 培地 (50:50) に蒔き、一晚接着させた。実験開始前に血清を有さない成長培地中で細胞を 2 時間飢餓状態にした。

【 0 2 5 5 】

リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で細胞を短時間洗浄し、次に、10mM H E P E S (pH 7.2) (結合バッファー) を有し 0.2%w/v ウシ血清アルブミン (B S A) を含む R P M I 培地に希釈し、100nM のいずれかの表示した抗体と共に、または結合バッファー単独 (対照) と共にインキュベーションした。室温で 1 時間後に、H R G を最終濃度 5 nM となるように半数のウェルに加えた (+)。同様の容積の結合バッファーを残りのウェルに加えた (-)。インキュベーションを約 10 分間続けた。

【 0 2 5 6 】

上清を吸引によって除き、0.2mM P M S F、10 μ g/ml ロイペプチン、および 10 TU/ml アプロチニンを含むし、10mM H E P E S (pH 7.2)、1.0%v/v T R I T O N X - 100 (商標)、1.0%w/v C H A P S を有する R P M I (溶解バッファー) 中で、細胞を溶解させた。溶解物を遠心分離によって溶けない物質から除いた。

【 0 2 5 7 】

アフィニティーゲル (Affi-Prep 10, Bio-Rad) に共有結合したモノクローナル抗体を用いて H E R 2 を免疫沈降させた。この抗体 (A b - 3、Oncogene Sciences) は、細胞質ドメインのエピトープを認識する。固定化抗体約 8.5 μ g を含有するゲルスラリー 10 μ l を各溶解物に添加することによって免疫沈降を行い、試料を室温で 2 時間混合させた。次に、遠心分離によってゲルを収集した。溶解バッファーで 3 回バッチ的にゲルを洗浄して未結合の材料を除いた。次に S D S 試料バッファーを添加して、試料を沸騰水浴中で短時間加熱した。

【 0 2 5 8 】

4 ~ 12% ポリアクリルアミドゲルで上清を泳動させ、ニトロセルロース膜に電気ブロッティングした。H E R 3 の細胞質ドメインエピトープに対するポリクローナル抗体 (c - 17、Santa Cruz Biotech) でプロットを探索することによって、H E R 3 の存在を評定した。化学ルミネセンス基質 (E C L、Amersham) を用いて、プロットを可視化した。

【 0 2 5 9 】

M C F 7 および S K - B R - 3 細胞について、それぞれ図 5 A および 5 B の対照レーンに示すように、細胞を H R G で刺激した場合にのみ、H E R 2 免疫沈降物中に H E R 3 が存在した。モノクローナル抗体 2 C 4 で細胞を最初にインキュベーションした場合は、M C F 7 細胞では H E R 3 シグナルは打ち消され (図 5 A、レーン 2 C 4 +)、また S K - B R - 3 細胞では実質的に低減した (図 5 B、レーン 2 C 4 +)。図 5 A ~ B に示すように、モノクローナル抗体 2 C 4 は、トラスツズマブよりも実質的に効果的に M C F 7 細胞および S K - B R - 3 細胞の両方で、H E R 3 と H E R 2 とのヘレグリン依存性会合を遮断する。トラスツズマブとの予備インキュベーションは、M C F 7 溶解物中の H E R 3 シグナルを減少させたが、S K - B R - 3 溶解物から共沈した H E R 3 の量にほとんどまたは全く効果を有さなかった。E G F レセプターに対する抗体 (A b - 1、Oncogene Sciences) を用いた予備インキュベーションは、どちらの細胞系でも H E R 3 が H E R 2 と免疫共沈する能力に効果を有さなかった。

【 0 2 6 0 】

実施例 3

ヒト化 2 C 4 抗体

マウスモノクローナル抗体 2 C 4 の可変ドメインを、マウス/ヒトキメラ F a b フラグメントの産生を可能にするベクターに最初にクローニングした。Stratagene の R N A 抽出キットを用いて製造業者のプロトコールに従って、ハイブリドーマ細胞から総 R N A を単離した。可変ドメインを R T - P C R で増幅して、ゲル精製し、以前に記載されたようなヒトカッパ定常ドメインおよびヒト C_H 1 ドメインを含有する p U C 1 1 9 系プラスミド誘導体に挿入した (Carter et al., PNAS(USA) 89:4285 (1992); および米国特許第 5, 8 2 1, 3 3 7 号)。結果として得られたプラスミドを、F a b フラグメントの発現のために E. coli 1 6 C 9 株にトランスフォーメーションした。培養物の成長、タンパク質発現の誘導、および F a b フラグメントの精製は以前に記載されたとおりであった (Wertheimer et al., J. Immunol. 157:4986-4995 (1996); Presta et al., Cancer Research 57:4593-4599 (1997))。

10

【 0 2 6 1 】

キメラ 2 C 4 の精製 F a b フラグメントが M C F 7 細胞に対する ^{1 2 5} I - H R G の結合を阻害して、M C F 7 細胞における p 1 8 0 チロシンリン酸化の r H R G による活性化を阻害する能力に関して、マウス親抗体 2 C 4 と比較した。図 6 A に示すように、キメラ 2 C 4 の F a b フラグメントは、ヒト乳ガン細胞系 M C F 7 上の高親和性 H E R 2 - H E R 3 結合部位の形成を破壊するのに非常に有効である。インタクトなマウス 2 C 4 について計算した相対 I C₅₀ 値は 4 . 0 ± 0 . 4 nM であり、一方で Fab フラグメントについての値は 7 . 7 ± 1 . 1 nM である。図 6 B に例示されるように、キメラ 2 C 4 の一価 F a b フラグメントは H R G 依存性の H E R 2 - H E R 3 活性化を破壊するのに非常に有効である。インタクトなマウスモノクローナル抗体 2 C 4 について計算された I C₅₀ 値は 6 . 0 ± 2 nM であり、一方でその F a b フラグメントについての値は 1 5 . 0 ± 2 nM である。

20

【 0 2 6 2 】

キメラクローンの D N A 配列決定により、C D R 残基の同定が可能になった (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)) (図 7 A および B)。オリゴヌクレオチド部位特異的突然変異誘発を使用して、以前に記載されたようなプラスミド V X 4 に含まれる完全ヒトフレームワーク (V_L カッパ亜群 I および V_H 亜群 I I I) にこれらの C D R 部の 6 個全てを導入した (Presta et al., Cancer Research 57:4593-4599 (1997))。結果として生じた「C D R - スワップ」由来タンパク質を上記のように発現させて精製した。二つのバージョンを比較するために結合研究を行った。簡潔には、N U N C M A X I S O R P (商標) プレートに、5 0 mM 炭酸バッファー (p H 9 . 6) 中の 1 マイクログラム/ml の H E R 2 細胞外ドメイン (E C D ; W O 9 0 / 1 4 3 5 7 に記載されているように産生) を 4 で一晚被覆し、次に、室温で 1 時間 E L I S A 希釈液 (0 . 5 % B S A、0 . 0 5 % ポリソルベート 2 0 を含有する P B S) でブロッキングした。E L I S A 希釈液に試料を連続希釈したものをプレート上で 2 時間インキュベーションした。洗浄後、結合した F a b フラグメントをビオチン化マウス抗ヒトカッパ抗体 (I C N 6 3 4 7 7 1) の後でストレプトアビジンとコンジュゲーションしたホースラディッシュペルオキシダーゼ (Sigma) を用いて、基質として 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を使用して検出した。吸光度を 4 5 0 nm で読み取った。図 8 A に示すように、C D R - スワップヒト F a b フラグメントが構築すると、全ての結合が失われた。

30

40

【 0 2 6 3 】

ヒト化 F a b の結合を回復させるために、テンプレートとして C D R - スワップ由来 D N A を使用して突然変異体を構築した。コンピュータ処理モデルを用いて (図 9)、変更が C D R コンフォメーションまたは抗体 - 抗原界面に影響しうる位置で、ヒトフレームワーク部残基をマウス対応物に変更するように、これらの突然変異体を設計した。突然変

50

異体を表 2 に示す。

【 0 2 6 4 】

【 表 2 】

表 2

ヒト化 2 C 4 の F R 突然変異の呼称

突然変異体の番号	フレームワーク部 (F R) の置換
560	ArgH71Val
561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

10

20

【 0 2 6 5 】

様々な突然変異体についての結合曲線を図 8 A ~ C に示す。A r g H 7 1 V a l、A s p H 7 3 A r g、および I l e H 6 9 L e u の変更を有するヒト化 F a b バージョン 5 7 4 は、本来のキメラ 2 C 4 の F a b フラグメントの結合まで回復した結合を有すると思われる。ヒト化抗体の結合をさらに洗練または増強するために、L 2、L 5 4、L 5 5、L 5 6、H 3 5、および / または H 4 8 などの追加の F R および / または C D R 残基を改変することができる (例えば、I l e L 2 T h r ; A r g L 5 4 L e u ; T y r L 5 5 G l u ; T h r L 5 6 S e r ; A s p H 3 5 S e r ; および V a l H 4 8 I l e のように置換)。または、もしくは追加的に、ヒト化抗体の親和性および / またはその他の生物学的活性をさらに改善または洗練するために、そのヒト化抗体を親和性成熟 (上記参照) させることができる。

30

【 0 2 6 6 】

ファージ - ディスプレイ法を用いてヒト化 2 C 4 バージョン 5 7 4 を親和性成熟させた。簡潔には、g e n e I I I 融合体としてファージディスプレイベクターにヒト化 2 C 4 . 5 7 4 F a b をクローニングした。M 1 3 K O 7 ヘルパーファージを感染させることによってファージ粒子を誘導する場合、この融合は、F a b がファージ尾部繊維タンパク質である g e n e I I I の N 末端に提示されることを可能にする (Baca et al., J Biol Chem. 272:10678 (1997))。

【 0 2 6 7 】

上に同定した 6 個の C D R のそれぞれについて個別のライブラリーを構築した。これらのライブラリーでは、H E R 2 に対する結合に潜在的に重大であるとコンピュータ処理モデルを使用して同定された、C D R 中のアミノ酸 (図 9) を、それらのコドンとして「N N S」を含むオリゴを使用して無作為化した。次に、全てのブロッキング溶液の代わりに使用した、0 . 2 % T W E E N 2 0 (登録商標) (M P B S T) を有する、3 % 粉乳の P B S 溶液を用いて、N U N C M A X I S O R P (商標) プレート上に被覆した H E R 2 の E C D に対してこれらのライブラリーをパンニングした。3、4、および 5 回目のパンニングで 2 C 4 . 5 7 4 の親和性よりも高い親和性を有するファージを選択するために、競合物として洗浄段階中に可溶性 H E R 2 E C D または可溶性 F a b 2 C 4 . 5 7 4 を添加した。洗浄時間を室温で 1 時間に延長した。

40

【 0 2 6 8 】

50

5回のパンニングを行った後に、ファージ - E L I S Aによって個別のクローンを再び分析した。C o s t a r 96ウェル丸底組織培養プレートに個別のクローンを成長させ、ヘルパーファージの添加によってファージを誘導した。一晚成長させた後で、E. coli細胞をペレットにして、ファージを含有する上清を96ウェルプレートに移し、そこでM P B S Tを用いて室温で1時間ファージをブロッキングした。H E R 2のE C Dを被覆したN U N C M A X I S O R P (商標)プレートも上記のようにM P B S Tでブロッキングした。ブロッキングされたファージをプレート上で2時間インキュベーションした。洗浄後、M P B S Tで1 : 5 0 0 0に希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼとコンジュゲーションした抗M 1 3モノクローナル抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01) に続いて基質として3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンを使用して、結合したファージを検出した。吸光度を450nmで読み取った。

10

【0269】

最高のシグナルを与えた各ライブラリーからのクローン48個をDNA配列決定した。配列が最も高頻度に生じたクローンを、可溶性F a bの発現を可能にする上記のベクターにサブクローニングした。これらのF a bを誘導して、タンパク質を精製して、精製されたF a bを上記のようなE L I S Aにより結合について分析し、その結合を、初発のヒト化2C4・574バージョンの結合と比較した。

【0270】

個別のC D Rにおける関心対象の突然変異を同定した後で、これらの様々な組み合わせである追加の突然変異体を構築して上記のように試験した。574に比べて改善した結合を与えた突然変異体を表3に記載する。

20

【0271】

【表3】

表3

2C4・574の親和性成熟から得られた突然変異体の呼称

突然変異体名	574からの変異	突然変異体/574*
H3.A1	serH99trp, metH34leu	0.380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu	0.087
H1.3.B3	thrH28gln, thrH30ser, metH34leu	0.572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu	0.569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu	0.561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, metH34leu	0.552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, metH34leu	0.215
654	serL50trp, metH34leu	0.176
655	metH34ser	0.542
659	serL50trp, metH34ser	0.076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, serH99trp	0.175
L3G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu, serH99trp	0.218
H1.3.B3.H3.A1	thrH28gln, thrH30ser, metH34leu, serH99trp	0.306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu, serH99trp	0.248
654.H3.A1	serL50trp, metH34leu, serH99trp	0.133
654.L3.G6	serL50trp, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0.213
654.L3.29	serL50trp, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0.236
654.L3.36	serL50trp, metH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0.141

30

40

*E r b 2 - E C D E L I S Aにおいて標準曲線の間CDを与えるのに必要な574の量に対する標準曲線の間ODを与えるのに必要な突然変異体の量の比。1. 0未満の数は、574が結合するよりも良好にその突然変異体がE r b 2と結合することを示す。

50

【 0 2 7 2 】

以下の突然変異体も構築され、現在評価段階である：

【 0 2 7 3 】

【 表 4 】

659.L3.G6	serL50trp, metH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
659.L3.G11	serL50trp, metH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
659.L3.29	serL50trp, metH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
659.L3.36	serL50trp, metH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36	serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6.655	serL50trp, tyrL53gly, metH35ser, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11.655	serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29.655	serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36.655	serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

10

【 0 2 7 4 】

ホモロジースキャンによって示唆される以下の突然変異体は、現在構築中である：

【 0 2 7 5 】

【 表 5 】

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

20

30

【 0 2 7 6 】

H 3 4 で好ましいアミノ酸はメチオニンであろう。この位置で酸化されていることが見出されるならば、ロイシンへの変更を行うことができよう。

【 0 2 7 7 】

A s n H 5 2 および a s n H 5 3 は、結合のために強く好まれることが見出された。これらの残基をアラニンまたはアスパラギン酸に変更することで、結合が劇的に減少する。ヒト I g G 1 重鎖定常部を有するヒト化バージョン 5 7 4 の可変軽鎖ドメインおよび可変重鎖ドメインを含むインタクトな抗体が調製された（米国特許第 5 , 8 2 1 , 3 3 7 号参照）。インタクトな抗体はチャニーズハムスター卵巣（C H O）細胞によって産生される。その分子を本明細書においてパーツズマブと称する。

40

【 0 2 7 8 】

実施例 4

モノクローナル抗体 2 C 4 は M A P K および A k t キナーゼの E G F 、 T G F - 、または H R G 介在性活性化を遮断する

多くの成長因子レセプターはマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（M A P K）経路を介してシグナルを伝達する。これらの二重特異性キナーゼは、シグナル伝達経路におけ

50

る主要な終点の一つであり、ガン細胞が分裂するのを最後にトリガーする。モノクローナル抗体 2 C 4 またはトラスツズマブが E G F、T G F - 、または H R G による M A P K 活性化を阻害する能力を以下のように評定した。

【 0 2 7 9 】

M C F 7 細胞 (1 0 ⁵ 細胞 / ウェル) を 1 2 ウェル細胞培養プレート中の血清含有培地に蒔いた。翌日、細胞培地を除き、0 . 1 % 血清を含有する新鮮培地を各ウェルに加えた。次に、その翌日にこの手順を繰り返し、アッセイの前に培地を無血清結合バッファーと交換した (Jones et al., J. Biol. Chem. 273:11667-74 (1998); および Schaefer et al., J. Biol. Chem. 274:859-66 (1999))。細胞を室温に平衡化させ、次に、0 . 5 mL の 2 0 0 nM トラスツズマブまたはモノクローナル抗体 2 C 4 と共に 3 0 分間インキュベーションした。次に細胞を 1 nM E G F、1 nM T G F - 、または 0 . 2 nM H R G で 1 5 分間処理した。細胞培地を吸引して、次に 1 % D T T を含有する S D S - P A G E 試料バッファー 0 . 2 mL を添加することによって反応を停止させた。以前に記載されたように、抗活性 M A P K 抗体 (Promega) を用いたウエスタンブロットにより M A P K の活性化を評定した (Jones et al. J. Biol. Chem. 273:11667-74 (1998))。

10

【 0 2 8 0 】

図 1 0 に示すように、モノクローナル抗体 2 C 4 は、E G F、T G F - 、および H R G が介在する M A P K 活性化をトラスツズマブよりも大きな程度に有意に遮断する。これらのデータは、E G F R または H E R 3 のいずれかとの会合に使用される H E R 2 表面にモノクローナル抗体 2 C 4 が結合することによって、シグナル伝達レセプター複合体の形成が阻止されることを示唆している。

20

【 0 2 8 1 】

モノクローナル抗体 2 C 4 は、ヘレグリン (H R G) 依存性 A k t 活性化を阻害することも示された。P I 3 キナーゼシグナル伝達経路の活性化は、細胞の生存に重要である (Carraway et al., J. Biol. Chem. 270:7111-6 (1995))。腫瘍細胞において、P I 3 キナーゼ活性化は浸潤性表現型に役割を果たすことができる (Tan et al., Cancer Research . 59:1620-1625 (1999))。生存経路は、セリン / トレオニンキナーゼである A K T によって主に仲介される (Bos et al., Trends Biochem Sci. 20:441-442 (1995))。H E R 2 と、H E R 3 または E G F R のいずれかとの間に形成した複合体は、それぞれヘレグリンまたは E G F に応答してこれらの経路を開始することができる (Olayioye et al., Mol. & Cell. Biol. 18:5042-51 (1998); Karunagaran et al., EMBO Journal. 15:254-264 (1996); および Krymskaya et al., Am. J. Physiol. 276:L246-55 (1999))。2 C 4 との M C F 7 乳ガン細胞のインキュベーションは、ヘレグリン介在性 A k t 活性化を阻害する。Agus et al., Cancer Cell 2:127-137 (2002)。さらに、ヘレグリンの添加の不在下で存在する基礎レベルの A k t 活性化は、2 C 4 の添加によりさらに減少する。

30

【 0 2 8 2 】

実施例 5

プラチナ耐性ガンの治療

本実施例は、プラチナ耐性の卵巣ガン、原発性腹膜ガン、または卵管ガンを有する患者における、ゲムシタピンと組み合わせたパーツズマブの安全性、耐容性、および有効性を実証している。腫瘍が H E R 2 の活性化を示すマーカーを含む全ての患者において、および患者のサブセットにおいて、進行のない生存に及ぼすパーツズマブおよびゲムシタピンの効果を評価する。

40

【 0 2 8 3 】

プラチナ系化学療法方式を受けている間に、または受けてから 6 か月以内に、進行した患者が本研究に適格であろう。患者を無作為化して、パーツズマブと組み合わせたゲムシタピン、またはプラセボと組み合わせたゲムシタピンのいずれかの投与を行う。本明細書において処置される患者には、研究に参加する前にプラチナ耐性疾患のための救助方式処置を以前に受けていない患者、およびプラチナ耐性疾患のための一治療方式を以前に受けた患者が含まれる。

50

【 0 2 8 4 】

各 2 1 日のサイクルの 1 日目および 8 日目にゲムシタピンを 1 0 0 0 mg/m²で投与する。ゲムシタピンを最初に 3 0 分間かけて注入する。毒性に関して用量低減を許容する。2 1 日サイクルの 1 日目にプラセボまたはパーツズマブを投与する。パーツズマブの投与を受けるように無作為化された被験者に初回ローディング用量 8 4 0 mg (サイクル 1) に続いてサイクル 2 以降に 4 2 0 mg を投与する。プラセボの投与を受けるように無作為化された被験者に、サイクル 1 およびサイクル 2 以降についてパーツズマブ群で投与したのと同容積のプラセボを投与する。進行した疾患を有さない被験者に 1 7 サイクル、又は 1 年間まで処置を受けさせることができる。

【 0 2 8 5 】

患者は、標準的なゲムシタピン用量低減を行われ、血球減少症の結果として投薬を保留 (held) されるであろう。任意に保留された 1 日目のゲムシタピン投薬に対して、パーツズマブもまた保留されるであろう。その後の用量は、低減した用量であり、増加しないであろう。用量低減もしくは投薬保留が 4 回を超えて必要ならば、または投薬が 3 週間を超えて保留されているならば、ゲムシタピンが中止されるであろうし、担当の医師および医療モニターの承認を得て疾患が進行するまで盲検化した薬物を継続することができる。8 日目のゲムシタピンの投薬が保留されたならば、8 日目の投薬は省略され、その後の処置は次のサイクルと共に開始するであろう (以前のサイクルの 2 2 日目) 。

ゲムシタピンを保留して、以下の表に推奨されるように用量を減らす：

【 0 2 8 6 】

【 表 6 】

顆粒球の絶対数 (x10 ⁶ /L)		血小板数 (x10 ⁶ /L)	完全な用量に 対する%
>1000	および	>100,000	100
500-999	または	50,000-99,000	75
<500	または	<50,000	保留

【 0 2 8 7 】

用量低減を必要とする任意の患者についてのその後の投薬は、低減した用量で行われるであろう。投薬が血球減少症の結果として 3 週間を超えて保留されているならば、患者は許容されない毒性を有すると推測され、ゲムシタピンが中止されるであろう。その他の追加のグレード I I I または I V の毒性がないならば、盲検化した薬物の継続は医師および医療モニターの判断次第であろう。ゲムシタピンの血液毒性は、投薬速度と関係していた。合計用量にかかわらずゲムシタピンは 3 0 分間かけて与えられるであろう。N C I - C T C グレード 2 血球減少症に対するコロニー刺激剤の使用は、担当の医師の判断次第で使うことができる。

【 0 2 8 8 】

単剤パーツズマブとのクロスオーバーの選択肢も提供されるであろう。次のサイクル期日にローディング用量 8 4 0 mg を投与して、2 1 日毎に次のサイクルで 4 2 0 mg を継続する。ガンを含む代表的な腫瘍のパラフィン包埋腫瘍標本または未染色のパラフィンスライドを得て、H E R 2 のリン酸化状態について評定する。卵巣ガン患者の約 2 0 ~ 4 0 % が検出可能な H E R 2 リン酸化を有しうる。

【 0 2 8 9 】

サイクル 2、4、6、8、12、および 17 の最後に反応を評定する。固形腫瘍効果判定基準 (R E C I S T) を使用して、臨床評価および C T スキャンまたは同等物により測定可能な疾患を評定する。C A - 1 2 5 に対する変化および疾患の臨床的および放射線学的根拠により評価可能な疾患を有する被験者についての反応を評定する。最初に反応を記録した 4 ~ 8 週間後に反応を確認すべきである。評価可能な被験者は、少なくとも一つの反応評定を受けたことがあり、腫瘍標本における H E R 2 リン酸化状態を決定された被験者からなるであろう。

【0290】

以下の転帰尺度を評定する。

【0291】

主要有効性評価項目

R E C I S TまたはC A - 1 2 5の変化を用いて、研究者の評定によって決定された、各群の全被験者の割り付けられた研究処置の開始後の進行のない生存。

R E C I S TまたはC A - 1 2 5変化を用いて研究者の評定によって決定された、以下の亜群での各群に割り付けられた研究処置の開始後の進行のない生存：

検出可能なH E R 2活性化マーカーを有する被験者。

検出可能なH E R 2活性化マーカーを有さない被験者。

10

【0292】

第二次有効性評価項目

客観的反応（P RまたはC R）

反応期間

生存期間

4か月目での進行の停止

各群および以下の亜群の全被験者においてこれらの評価項目を評定する：

検出可能なH E R 2活性化マーカーを有する被験者。

検出可能なH E R 2活性化マーカーを有さない被験者。

【0293】

20

可能性のある悪心および嘔吐を予防または処置するために、セロトニン拮抗薬、ステロイド、および/またはベンゾジアゼピンを患者に予備投薬することができる。可能性のある発疹を予防または処置するために、局所および/または経口抗生物質を含めた標準的な治療法を使用できる。その他の可能性のある同時投薬は、1日目の7日前に開始して追跡期間の最終日にかけて継続した間隔で患者によって使用される、任意の処方薬の投薬または一般用医薬製剤である。注入に関連する > 38.5 の発熱またはその他の注入関連症状を経験する被験者を、アセトアミノフェン、ジフェンヒドラミン、またはメペリジンで症状的に処置することができる。非実験的造血成長因子をN C I - C T Cグレード2の血球減少症のために投与することができる。

【0294】

30

上記のように処置された患者は、任意の一つまたは複数の主要有効性評価項目または第二次有効性評価項目によって評価された卵巣ガン、原発性腹膜ガン、または卵管ガンの徴候または症状に改善を示すであろう。さらに、パーツズマブおよびゲムシタピンの組み合わせで上記のように処置されたプラチナ耐性患者は、ゲムシタピン単独で処置されたプラチナ耐性患者に比較して、ガンの任意の徴候または症状に大きな改善を示すであろう。

【図面の簡単な説明】

【0295】

【図1A】短縮突然変異体分析および部位特異的突然変異誘発によって決定された、H E R 2の細胞外ドメイン（E C D）内の残基22～645（シグナル配列を含めたアミノ酸配列を図1A；配列番号：13に示す）のエピトープマッピングを示す図である（Nakamura et al., J. of Virology 67(10):6179-6191 (1993);およびRenz et al., J. Cell Biol. 125(6):1395-1406 (1994)）。ポリメラーゼ連鎖反応技法を用いて、c D N AからH E R 2 - E C Dの様々な短縮または点突然変異を調製した。哺乳動物発現プラスミドでのg D融合タンパク質としてH E R 2突然変異体を発現させた。この発現プラスミドは、挿入されたc D N Aの下流に局在するS V 40終止シグナルおよびポリアデニル化シグナルを有するサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーを使用している。プラスミドD N Aを293細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの1日後に、1%透析ウシ胎仔血清およびそれぞれ $25 \mu\text{Ci}$ の ^{35}S メチオニンおよび ^{35}S システインを含有する無メチオニン無システイン低グルコースD M E M中で細胞を一晩代謝的にラベルした。上清を採集して、H E R 2モノクローナル抗体または対照抗体のいずれかを上清に加

40

50

えて、4 で2～4時間インキュベーションした。複合体を沈殿させて、10～20%トリシンSDSグラジエントゲルに適用して、100Vで電気泳動した。そのゲルを膜に電気ブロッティングして、オートラジオグラフィーで分析した。図1Bに示すように、HER2抗体である7C2、7F3、2C4、7D3、3E8、4D5、2H11、および3H4は、HER2の様々なECDエピトープと結合する。

【図1B】短縮突然変異体分析および部位特異的突然変異誘発によって決定された、HER2の細胞外ドメイン(ECD)内の残基22～645(シグナル配列を含めたアミノ酸配列を図1A;配列番号:13に示す)のエピトープマッピングを示す図である(Nakamura et al., J. of Virology 67(10):6179-6191 (1993);およびRenz et al., J. Cell Biol. 125(6):1395-1406 (1994))。ポリメラーゼ連鎖反応技法を用いて、cDNAからHER2-ECDの様々な短縮または点突然変異を調製した。哺乳動物発現プラスミドでのgD融合タンパク質としてHER2突然変異体を発現させた。この発現プラスミドは、挿入されたcDNAの下流に局在するSV40終止シグナルおよびポリアデニル化シグナルを有するサイトメガロウイルスプロモーター/エンハンサーを使用している。プラスミドDNAを293細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの1日後に、1%透析ウシ胎仔血清およびそれぞれ25 μ Ciの 35 Sメチオニンおよび 35 Sシステインを含有する無メチオニン無システイン低グルコースDMEM中で細胞を一晩代謝的にラベルした。上清を採集して、HER2モノクローナル抗体または対照抗体のいずれかを上清に加えて、4 で2～4時間インキュベーションした。複合体を沈殿させて、10～20%トリシンSDSグラジエントゲルに適用して、100Vで電気泳動した。そのゲルを膜に電気ブロッティングして、オートラジオグラフィーで分析した。図1Bに示すように、HER2抗体である7C2、7F3、2C4、7D3、3E8、4D5、2H11、および3H4は、HER2の様々なECDエピトープと結合する。

【図2A】rHRG 1のMCF7細胞活性化に及ぼす、HER2モノクローナル抗体2C4および7F3の効果を示す図である。図2Aは、2C4または7F3によるHRGのチロシンリン酸化刺激の阻害についての用量反応曲線を示す。図2Bは、2C4または7F3による、MCF7細胞に対する 125 IラベルrHRG 1₁₇₇₋₂₄₄の結合阻害についての用量反応曲線を示す。

【図2B】rHRG 1のMCF7細胞活性化に及ぼす、HER2モノクローナル抗体2C4および7F3の効果を示す図である。図2Aは、2C4または7F3によるHRGのチロシンリン酸化刺激の阻害についての用量反応曲線を示す。図2Bは、2C4または7F3による、MCF7細胞に対する 125 IラベルrHRG 1₁₇₇₋₂₄₄の結合阻害についての用量反応曲線を示す。

【図3】HER2モノクローナル抗体2C4または7F3による、一連のヒト腫瘍細胞系に対する 125 IラベルrHRG 1₁₇₇₋₂₄₄の特異的結合阻害を示す図である。モノクローナル抗体対照は、rHRGの結合を遮断しない、アイソタイプが一致するマウスモノクローナル抗体である。100nM rHRG 1の存在下で行った併行インキュベーションから、 125 IラベルrHRG 1₁₇₇₋₂₄₄の非特異的結合を決定した。 125 IラベルrHRG 1₁₇₇₋₂₄₄の非特異的結合についての値は、試験した全ての細胞系についての合計の1%未満であった。

【図4A】MDA-MB-175細胞(図4A)およびSK-BR-3細胞(図4B)の増殖に及ぼすモノクローナル抗体2C4および4D5の効果を示す図である。MDA-MB-175細胞およびSK-BR-3細胞を96ウェルプレートに蒔き、2時間接着させた。1%血清を含有する培地中で実験を行った。HER2抗体または培地単独を加え、細胞を37 で2時間インキュベーションした。続いて、rHRG 1(1nM)または培地単独を加え、細胞を4日間インキュベーションした。単層を洗浄して、0.5%クリスタルバイオレットで染色/固定した。細胞の増殖を決定するために、吸光度を540nmで測定した。

【図4B】MDA-MB-175細胞(図4A)およびSK-BR-3細胞(図4B)の増殖に及ぼすモノクローナル抗体2C4および4D5の効果を示す図である。MDA-M

10

20

30

40

50

B - 175 細胞および SK - BR - 3 細胞を 96 ウェルプレートに蒔き、2 時間接着させた。1%血清を含有する培地中で実験を行った。HER2 抗体または培地単独を加え、細胞を 37℃ で 2 時間インキュベーションした。続いて、rHRG 1 (1 nM) または培地単独を加え、細胞を 4 日間インキュベーションした。単層を洗浄して、0.5%クリスタルバイオレットで染色/固定した。細胞の増殖を決定するために、吸光度を 540 nm で測定した。

【図 5 A】低/正常レベルの HER2 を発現している MCF7 細胞 (図 5 A) および高レベルの HER2 を発現している SK - BR - 3 細胞 (図 5 B) における、ヘレグリン (HRG) に依存した HER2 と HER3 との会合に及ぼすモノクローナル抗体 2C4、トラスツズマブ抗体、または抗 EGFR 抗体の効果を示す図である。下記実施例 2 を参照されたい。

【図 5 B】低/正常レベルの HER2 を発現している MCF7 細胞 (図 5 A) および高レベルの HER2 を発現している SK - BR - 3 細胞 (図 5 B) における、ヘレグリン (HRG) に依存した HER2 と HER3 との会合に及ぼすモノクローナル抗体 2C4、トラスツズマブ抗体、または抗 EGFR 抗体の効果を示す図である。下記実施例 2 を参照されたい。

【図 6 A】インタクトなマウスモノクローナル抗体 2C4 (mu2C4) およびキメラ 2C4 Fab フラグメントの活性を比較する図である。図 6 A は、キメラ 2C4 Fab またはインタクトなマウスモノクローナル抗体 2C4 による、MCF7 細胞に対する 125 I - HRG の結合阻害を示す。MCF7 細胞を 24 ウェルプレートに蒔き (1×10^5 個/ウェル)、約 85% の集密度になるまで 2 日間成長させた。Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996) に記載されているように結合実験を行った。図 6 B は、Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996) に記載されているように行った、MCF7 細胞における rHRG 1 による p180 チロシンリン酸化活性化の阻害を示す。

【図 6 B】インタクトなマウスモノクローナル抗体 2C4 (mu2C4) およびキメラ 2C4 Fab フラグメントの活性を比較する図である。図 6 A は、キメラ 2C4 Fab またはインタクトなマウスモノクローナル抗体 2C4 による、MCF7 細胞に対する 125 I - HRG の結合阻害を示す。MCF7 細胞を 24 ウェルプレートに蒔き (1×10^5 個/ウェル)、約 85% の集密度になるまで 2 日間成長させた。Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996) に記載されているように結合実験を行った。図 6 B は、Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996) に記載されているように行った、MCF7 細胞における rHRG 1 による p180 チロシンリン酸化活性化の阻害を示す。

【図 7 A】マウスモノクローナル抗体 2C4 の可変軽鎖ドメイン (V_L) (図 7 A) および可変重鎖ドメイン (V_H) (図 7 B) (それぞれ配列番号 1 および 2) ; ヒト化 2C4 バージョン 574 の V_L ドメインおよび V_H ドメイン (それぞれ配列番号 3 および 4) ; ならびにヒト V_L および V_H コンセンサスフレームワーク (hum 1 (軽鎖カッパ亜群 I) ; hum I I I (重鎖亜群 I I I)) (それぞれ配列番号 5 および 6) のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。星印により、ヒト化 2C4 バージョン 574 とマウスモノクローナル抗体 2C4 との間、またはヒト化 2C4 バージョン 574 とヒトフレームワークとの間に差があることを明らかにする。相補性決定部 (CDR) に括弧を付す。

【図 7 B】マウスモノクローナル抗体 2C4 の可変軽鎖ドメイン (V_L) (図 7 A) および可変重鎖ドメイン (V_H) (図 7 B) (それぞれ配列番号 1 および 2) ; ヒト化 2C4 バージョン 574 の V_L ドメインおよび V_H ドメイン (それぞれ配列番号 3 および 4) ; ならびにヒト V_L および V_H コンセンサスフレームワーク (hum 1 (軽鎖カッパ亜群 I) ; hum I I I (重鎖亜群 I I I)) (それぞれ配列番号 5 および 6) のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。星印により、ヒト化 2C4 バージョン 574 とマウスモノクローナル抗体 2C4 との間、またはヒト化 2C4 バージョン 574 とヒトフレームワークとの間に差があることを明らかにする。相補性決定部 (CDR) に括弧を付す。

。

10

20

30

40

50

【図 8 A】実施例 3 において E L I S A により決定された、H E R 2 の細胞外ドメイン (E C D) へのキメラ F a b 2 C 4 (F a b . v 1) およびいくつかのヒト化 2 C 4 変異体の結合を示す図である。

【図 8 B】実施例 3 において E L I S A により決定された、H E R 2 の細胞外ドメイン (E C D) へのキメラ F a b 2 C 4 (F a b . v 1) およびいくつかのヒト化 2 C 4 変異体の結合を示す図である。

【図 8 C】実施例 3 において E L I S A により決定された、H E R 2 の細胞外ドメイン (E C D) へのキメラ F a b 2 C 4 (F a b . v 1) およびいくつかのヒト化 2 C 4 変異体の結合を示す図である。

【図 9】白色の C D R 主鎖がラベルされた (L 1 、 L 2 、 L 3 、 H 1 、 H 2 、 H 3) 、モノクローナル抗体 2 C 4 の V_L および V_H ドメインのリボンダイアグラムを示す図である。ヒト化の間の突然変異誘発によって (実施例 3 、 表 2 参照) 評価された V_H 側鎖も示す。

10

【図 1 0】E G F 、 T G F - β 、または H R G が仲介するマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (M A P K) 活性化に及ぼすモノクローナル抗体 2 C 4 またはトラスツズマブの効果を示す図である。

【図 1 1 A】トラスツズマブ軽鎖 (配列番号 : 1 4) およびトラスツズマブ重鎖 (配列番号 : 1 5) のアミノ酸配列をそれぞれ示す図である。

【図 1 1 B】トラスツズマブ軽鎖 (配列番号 : 1 4) およびトラスツズマブ重鎖 (配列番号 : 1 5) のアミノ酸配列をそれぞれ示す図である。

20

【図 1 2 A】パーツズマブ軽鎖 (配列番号 : 1 6) およびパーツズマブ重鎖 (配列番号 : 1 7) のアミノ酸配列をそれぞれ示す図である。

【図 1 2 B】パーツズマブ軽鎖 (配列番号 : 1 6) およびパーツズマブ重鎖 (配列番号 : 1 7) のアミノ酸配列をそれぞれ示す図である。

【図 1 3】H E R 2 のヘテロ二量体結合部位に 2 C 4 が結合することによって活性化 E G F R または H E R 3 とのヘテロ二量体化が阻止されることを概略的に示す図である。

【図 1 4】M A P K および A k t 経路との H E R 2 / H E R 3 の共役を示す図である。

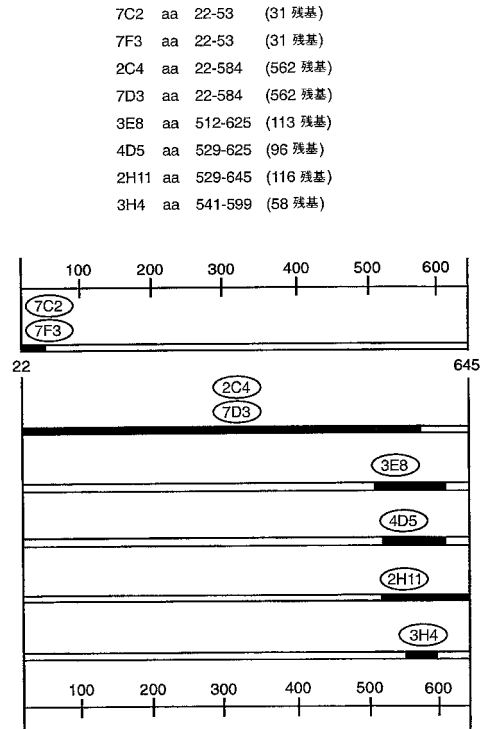
【図 1 5】トラスツズマブおよびパーツズマブの活性を比較する図である。

【図 1 6】H E R 2 の様々なドメインを概略的に示す図である。

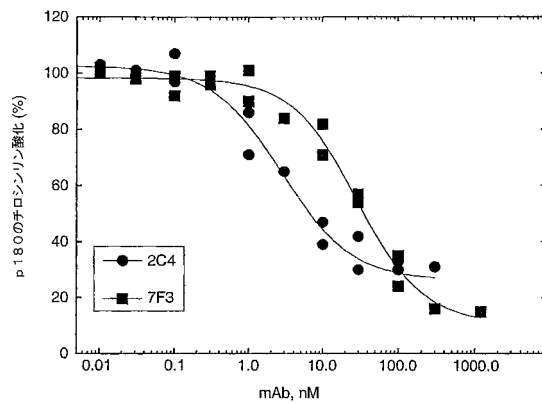
【図 1 A】

1 MELAALCEMG LLLALLPFGA ASTQVCIGTD KKLRLPASPE THLMRHLV QCCQVQCNL ELATLPNNA LSTFLODIQV QGVYLIHQ VQVPLQRLR
 101 IVRGTFLEFD NYALAVINDG DFLANTTFTV GASFGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCVQPTILMK DIFHNMQLA LLLIDNRSR ACPCESECK
 201 GSCRCESSE DQSLRTVC AGGCARCKP LPDCCHEQC AAGCTPHHS DCLACLPHNH SGICHLCEA LVTYNTTPE SHPPPEGYT FGASCTACP
 301 YNVLSTDVGS CTLVCPLEHQ EWTAEQGTQZ CEKSKPCAR VCYGLMEHL REVTAVTSAN IQEPASCKKI FGSLAFLES FDEGASNTA PLOPEQLQVF
 401 ETLEETGYL YISAWPDSL DLSVQNLQV IGRILHNGA YSHLQGLGI SMLGLSLRE LGSGLALHH NTHLCFVHV FWDQLFNPH QALLHTANRP
 501 EDECVGEGLA CHQLCARGH WGFQVQCN CSQFLGQBC VEECRVLOGL PREYVNAHC LPCHPECQIQ NGSVTCTGPE ADQCVACHV KDPFCVARC
 601 FSGVKPDLST MTWKFPDEE GACQCFPNC THSCVDLDXK GCPAE (配列番号 13)

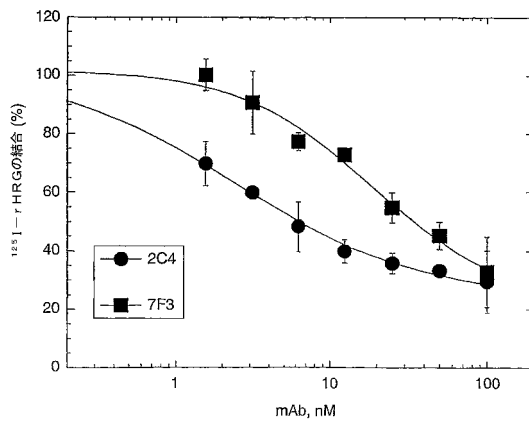
【図 1 B】



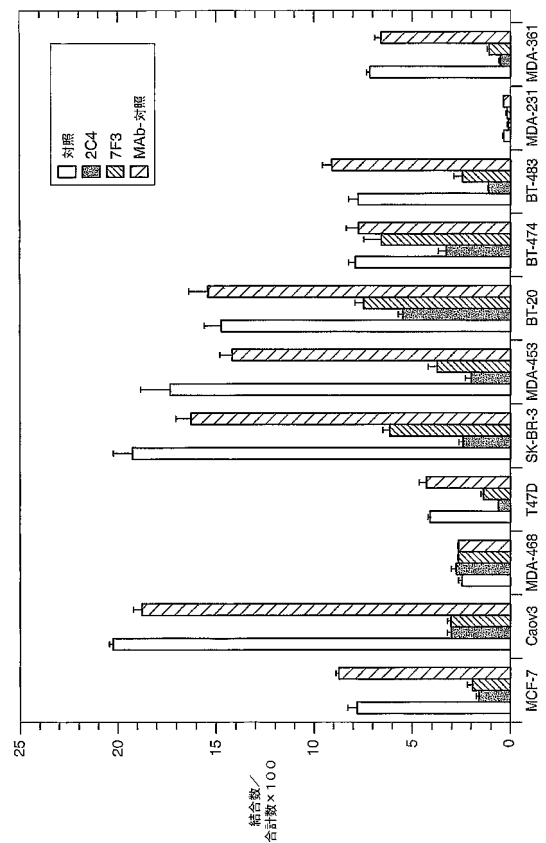
【図 2 A】



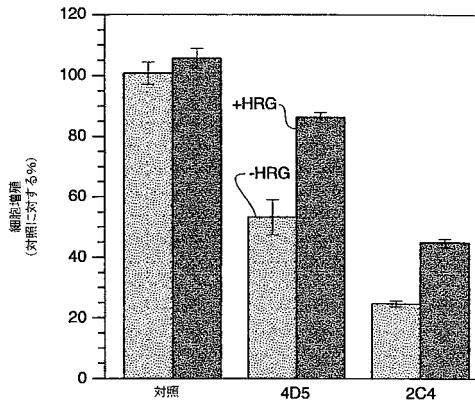
【図 2 B】



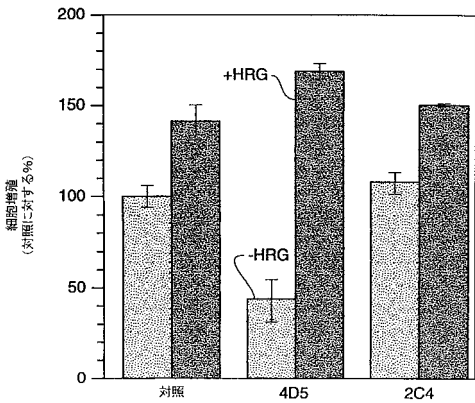
【図 3】



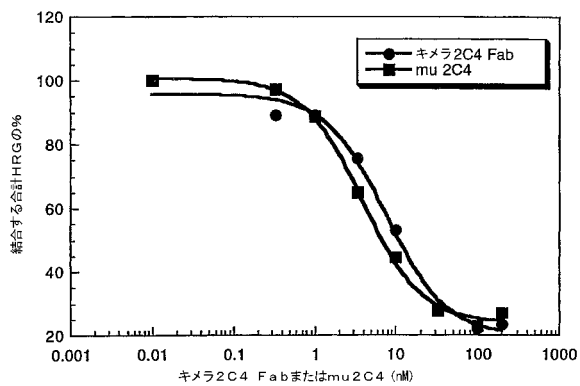
【図 4 A】



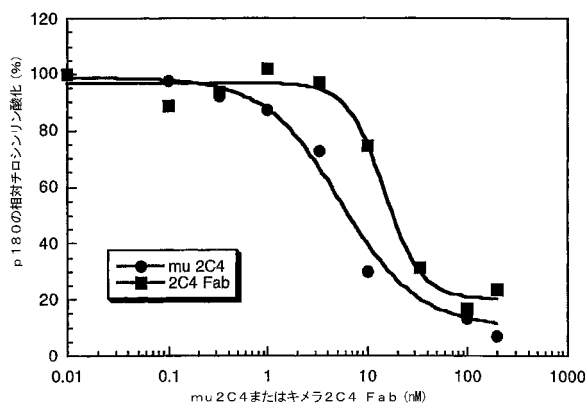
【図 4 B】



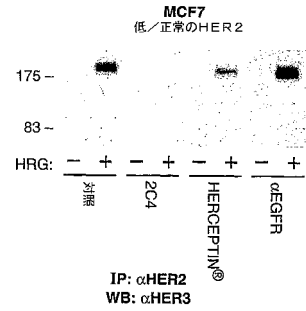
【図 6 A】



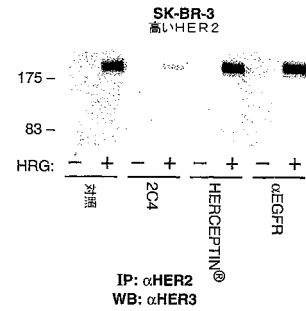
【図 6 B】



【図 5 A】



【図 5 B】



【図 7 A】

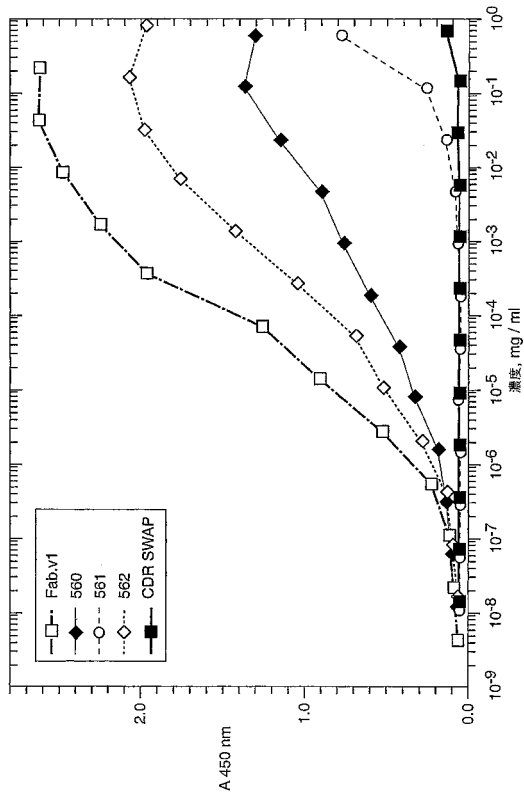
可変部軽鎖				
	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVITC	[KASQDVSIGVA]	WYQORP	
	**	**** *	*	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQOKP	
		*	***	
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	[RASQISNYLA]	WYQOKP	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDTFTISSVQA		
	**	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFGSGSGTDTFTISSLQP		
	*	*****		
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDTFTISSLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QYIYIYPT]	FGGQTKLEIK (配列番号1)		
	*	*	*	
574	EDFATYYC [QYIYIYPT]	FGGQTKVEIK (配列番号3)		
	***	*		
hum κI	EDFATYYC [QYNSLPWT]	FGGQTKVEIK (配列番号5)		

【図 7 B】

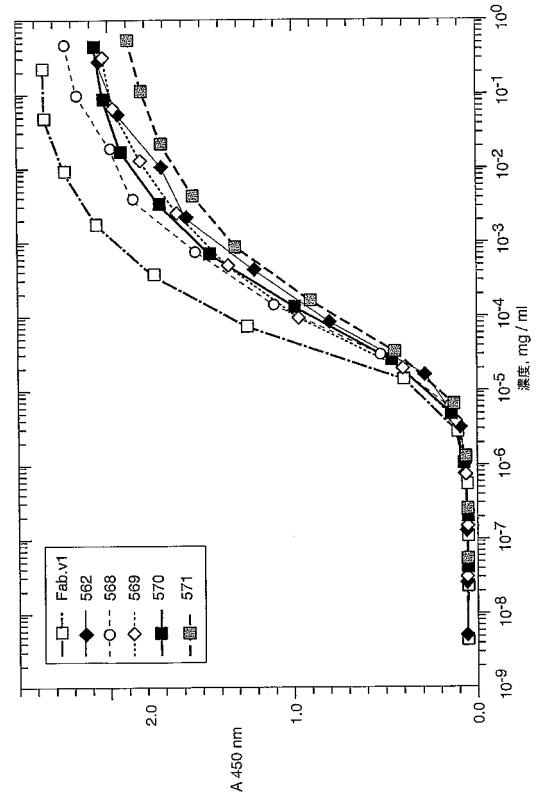
可変部重鎖				
	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	**	*	*	*
574	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		*	*	*
hum III	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVPNPGSGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	*	*	*	*
574	PGKLEWVA [DVPNPGSGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	*****	*	*	*
hum III	PGKLEWVA [VISGDDGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSITFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY]	WGQGTILTVSS (配列番号2)		
	***	*	*	*
574	QMNSLRADTAVYYCAR [NLGPSFYFDY]	WGQGTILTVSS (配列番号4)		

hum III	QMNSLRADTAVYYCAR [GRVGYSLYDY]	WGQGTILTVSS (配列番号6)		

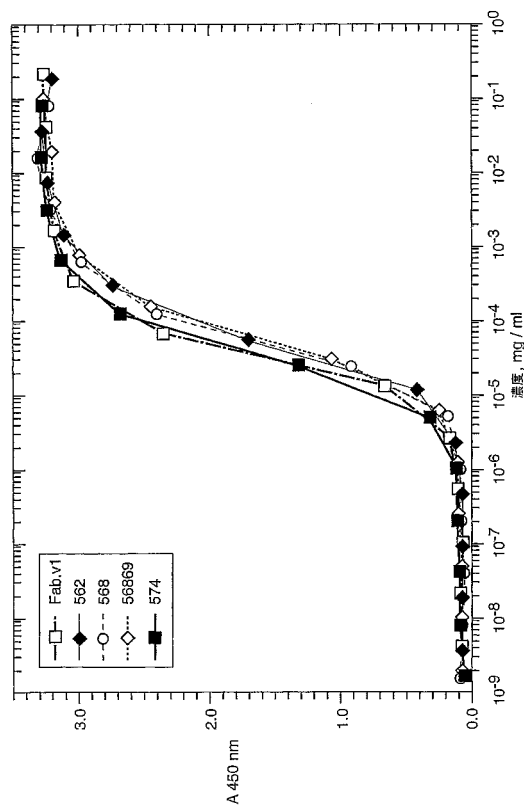
【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



【 図 8 C 】



【 図 9 】

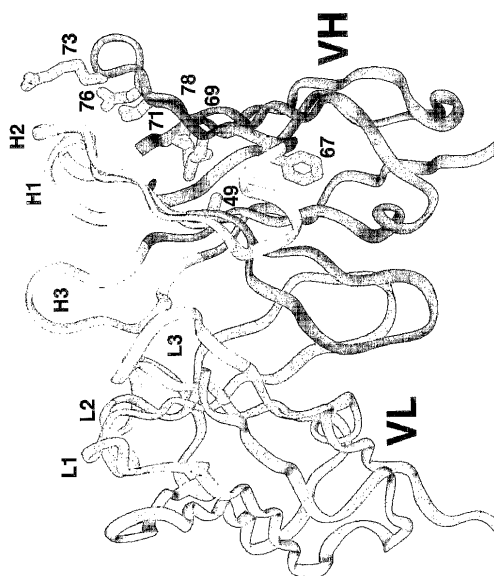
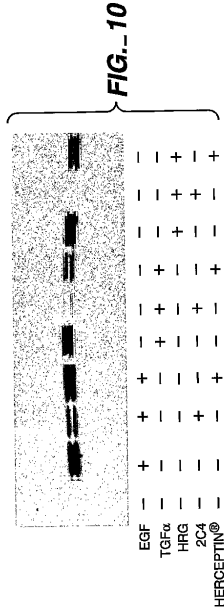


FIG._9

【 図 1 0 】



【 図 1 1 A 】

解題

1	15	30	45
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q K P G K A P K			
46	60	75	90
L L I Y S A S P L Y S G V P S R P F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D P A T Y Y C Q Q			
91	105	120	135
H Y T T P P T P G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L			
136	150	165	180
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T			
181	195	210	214
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C			

【 図 1 1 B 】

[illegible]

【 図 1 2 A 】

[illegible]

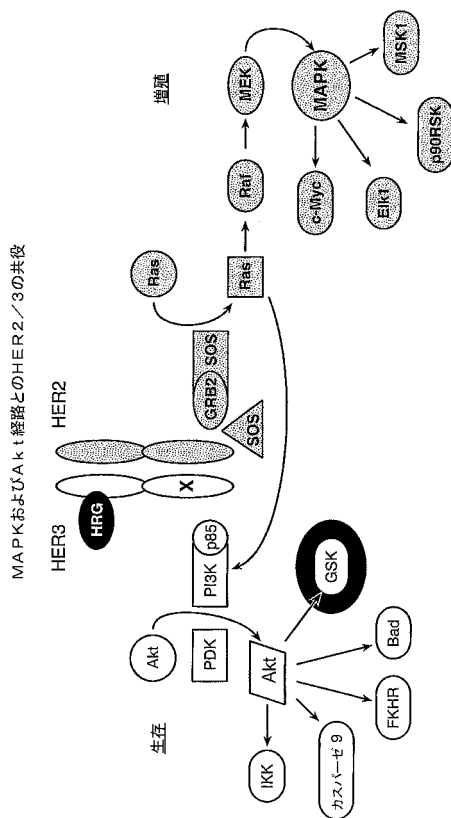
(配列番号 16)

【図 1 2 B】

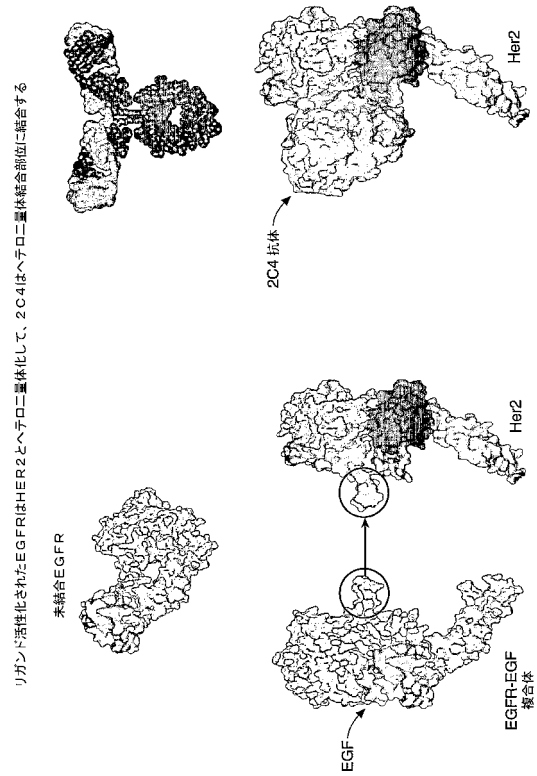
重鎖

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDDWVRQAPGKGL 45
 46 EWAVDVPNPSGGSIYNQRFPKGRFTLSVDRSSKNTLYLQMNSLRAED 90
 91 TAVYYCARNLGPFSPFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGGPSVFPFLAPSSK 135
 136 STSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALLTSGVHTFPAVLQSSG 180
 181 LYSLSSTVTVPSSTSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT 225
 226 HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH 270
 271 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPKREEQYNSTYRVVSVLTVQLHQQDW 315
 316 LNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRPEQVYTLPPSRREEM 360
 361 TKNQVSLTCLVKGPYPFDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGGS 405
 406 PFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHHEALHNHYTQKSLSLSPGK 449
 (配列番号17)

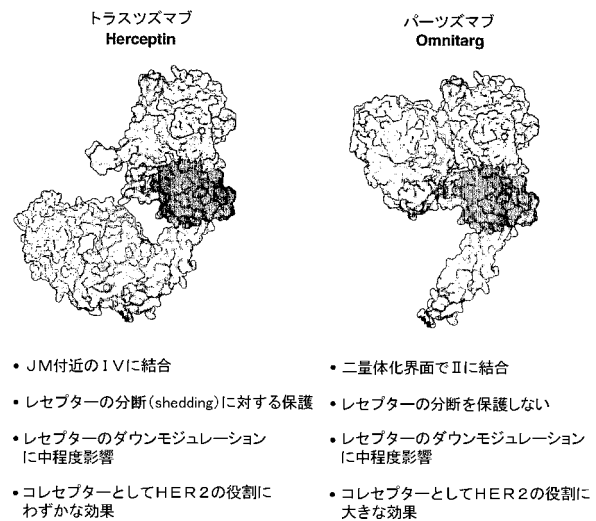
【図 1 4】



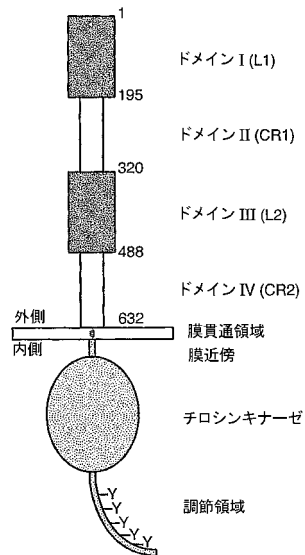
【図 1 3】



【図 1 5】



【図 16】



【手続補正書】

【提出日】平成19年2月20日(2007.2.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2008503476000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2005/021286

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K39/395 A61K31/00 A61P35/00		
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		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/00245 A (GENENTECH, INC) 4 January 2001 (2001-01-04) page 5, line 9 - line 14 page 12, line 32 - line 35 page 15, line 20 - page 16, line 1 page 16, line 22 - line 31 page 18, line 7 - page 19, line 1	1-34
A	WO 2004/005305 A (UNIVERSITY OF LEEDS; MCGOWAN, PATRICK, COLUMBA; KNOX, RICHARD, J) 15 January 2004 (2004-01-15) the whole document page 1, line 23 - line 32 ----- -/--	1-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 20 December 2005		Date of mailing of the international search report 28/12/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl; Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Irion, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2005/021286

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>AGUS D B ET AL: "Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth" SIGNALING NETWORKS AND CELL CYCLE CONTROL: THE MOLECULAR BASIS OF CANCER AND OTHER DISEASES, XX, XX, vol. 2, August 2002 (2002-08), pages 127-137, XP002988666 the whole document</p>	1-34
A	<p>PEGRAM MARK D ET AL: "Rational combinations of trastuzumab with chemotherapeutic drugs used in the treatment of breast cancer" JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE (CARY), vol. 96, no. 10, 19 May 2004 (2004-05-19), pages 739-749, XP009058594 ISSN: 0027-8874 the whole document</p>	1-34
P,A	<p>PONZONE RICCARDO ET AL: "Selected highlights from the 27th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, TX, USA, 8-11 December 2004." EXPERT OPINION ON PHARMACOTHERAPY. JUL 2005, vol. 6, no. 7, July 2005 (2005-07), pages 1257-1267, XP009058602 ISSN: 1744-7666 the whole document</p>	1-34
P,A	<p>VALLE J W ET AL: "287 A phase Ib study of pertuzumab (P), a recombinant humanized antibody to HER2, and capecitabine (C) in patients with advanced solid tumors" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 2, no. 8, September 2004 (2004-09), page 88, XP004639731 ISSN: 1359-6349 abstract</p>	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/021286**Box 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:
Although claims 1-34 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/021286

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100245	A	04-01-2001	AU 5763200 A	31-01-2001
			BR 0012198 A	02-04-2002
			CA 2376596 A1	04-01-2001
			CH 694589 A5	15-04-2005
			CN 1370082 A	18-09-2002
			CZ 20014596 A3	12-02-2003
			DE 10084743 T0	14-08-2002
			EP 1189641 A2	27-03-2002
			GB 2368796 A	15-05-2002
			HU 0201695 A2	28-09-2002
			JP 2003503366 T	28-01-2003
			MX PA01013458 A	30-07-2002
			NO 20016329 A	25-02-2002
			NZ 516830 A	30-07-2004
			NZ 531426 A	28-10-2005
			PL 352321 A1	11-08-2003
			TR 200103756 T2	21-06-2002
			ZA 200109786 A	28-11-2002
			ZA 200110263 A	13-12-2002
WO 2004005305	A	15-01-2004	AU 2003251162 A1	23-01-2004
			CA 2491649 A1	15-01-2004
			CN 1665827 A	07-09-2005
			EP 1534723 A1	01-06-2005
			ZA 200500455 A	28-07-2005

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 0 7 K 16/32 (2006.01) A 6 1 K 31/7068
 C 0 7 K 16/32 Z N A

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

(72)発明者 ケルシー , スティーブン・エム
 アメリカ合衆国、カリフォルニア 9 4 0 3 7、モンタラ、 1 4 ティーエイチ・ストリート 3 6
 0

F ターム(参考) 4C084 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC751
 4C085 AA13 AA14 EE03
 4C086 AA01 AA02 EA17 MA02 MA04 NA05 NA14 ZB26 ZC75
 4H045 AA11 BA10 CA41 DA86 EA28 EA51 FA74