

(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2006-516117

(P2006-516117A)

(43) 公表日 平成18年6月22日(2006.6.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 3/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00	
<b>A 6 1 P 9/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 3/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-555592 (P2004-555592)	(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
(86) (22) 出願日	平成15年11月21日 (2003.11.21)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月25日 (2005.7.25)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/037367	(72) 発明者	スリウコフスキー, マーク, エクス. アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, オーク クリ ーク レーン 42
(87) 国際公開番号	W02004/048525		
(87) 国際公開日	平成16年6月10日 (2004.6.10)		
(31) 優先権主張番号	60/428,027		
(32) 優先日	平成14年11月21日 (2002.11.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 E r b B 2 抗体を用いた非悪性疾患または疾患の治療

## (57) 【要約】

本出願は、抗-E r b B 2 抗体（例えば、r h u M A b 2 C 4）を用いた、非悪性兆候、例えば乾癬、子宮内膜症、強皮症、血管系疾患または疾患、呼吸器系疾患、大腸ポリープ、または線維腺腫の治療方法について説明する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

E r b B 2 に結合する治療的有効量の抗体をヒトに投与することを含む、E r b B レセプターまたはE r b B リガンドの異常活性または異常産生に関する哺乳動物の非悪性疾病または疾患の治療方法。

## 【請求項 2】

抗体がE r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

抗体がモノクローナル抗体 2 C 4 のE r b B 2 への結合を阻害する、請求項 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

疾病または疾患がE G F R の異常活性化に関する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

異常活性化がE r b B リガンドの過剰発現に起因する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

E r b B リガンドがトランスフォーミング成長因子 ( T G F - ) である、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

抗体が分裂促進因子活性化プロテインキナーゼ ( M A P K ) の T G F - 活性化を阻害する、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 8】

抗体がモノクローナル抗体 2 C 4 の生物学的特性を有する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

抗体が、モノクローナル抗体 2 C 4 またはヒト化 2 C 4 を含む、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

抗体が、抗体断片である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

抗体断片が、F a b 断片である、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 12】

抗体が、細胞障害性薬剤とコンジュゲートしていない、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 13】

抗体断片が、細胞障害性薬剤とコンジュゲートしていない、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

抗体が、細胞障害性薬剤とコンジュゲートしている、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 15】

他のE r b B アンタゴニスト、免疫抑制薬、化学療法薬、細胞障害性薬剤、成長阻害薬、E G F R 標的薬剤、チロシンキナーゼ抑制物質、抗血管形成薬剤、抗ホルモン化合物、心臓保護物質、およびサイトカインからなる群から選択された治療的有効量の第 2 の治療剤をヒトに投与することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 16】

約 0 . 5 m g / k g から約 3 0 m g / k g の量で少なくとも 1 用量の抗体をヒトに投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 17】

哺乳動物がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 18】

疾病または疾患が良性過剰増殖性疾患である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 19】

疾病または疾患が乾癬である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 20】

50

疾病または疾患が子宮内膜症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

疾病または疾患が強皮症である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 2】

疾病または疾患が血管系疾患である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

血管系疾患が、動脈硬化症、血管再閉塞、アテローム性動脈硬化、術後血管狭窄、再狭窄、血管閉塞または頸動脈閉塞性疾患、冠動脈疾患、狭心症、小血管性疾患、高コレステロール血症、高血圧、および血管上皮細胞の異常増殖または異常機能に関する症状からなる群から選択されたものである、請求項 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

疾病または疾患が大腸ポリープである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

疾病または疾患が線維腺腫である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

疾病および疾患が呼吸器系疾患である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

呼吸器系疾患が、慢性気管支炎、喘息、嚢胞性線維症、気管支拡張症、鼻炎、副鼻腔炎、1 抗トリプシン欠乏症、咳、肺気腫、肺線維症、高過敏性気道、慢性閉塞性肺性疾患、慢性閉塞性肺疾患、および高血圧からなる群から選択されたものである、請求項 2 7 に記載の方法。

20

【請求項 2 8】

容器とその容器に含まれる組成物を含んでなる製造品であって、E r b B 2 に結合する抗体、さらには、E r b B レセプターまたは E r b B リガンドの異常な活性化または異常な産生が関与する非悪性疾患または疾患を治療するのに使用することができる組成物であることを示すパッケージ挿入物を含んでなる製造品。

【請求項 2 9】

E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、乾癬の治療方法。

【請求項 3 0】

抗体が E r b B レセプターの活性化を阻害する、請求項 2 9 に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

抗体がモノクローナル抗体 2 C 4 またはヒト化 2 C 4 である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

免疫抑制薬、シクロスポリン、タクロリムス ( F K 5 0 6 )、D A B 3 8 9 I L 2、化学療法薬、メトトレキサート、ソラレン、ステロイド、グルココルチコステロイド、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、O K T - 3 モノクローナル抗体、アザチオプリン、プロモクリプチン、異種性抗リンパ球グロブリン、抗 L F A - 1 抗体、エファリズマブ、B 細胞表面抗原に結合する抗体、抗 C D 2 0 抗体、リツキシマブ、T N F アンタゴニスト、エタネルセプト、インフリキシマブ、D 2 E 7、C D P - 8 7 0、I L - 1 アンタゴニスト、キネレット、I L - 1 0 アゴニスト、C O X - 2 阻害薬、他の E r b B アンタゴニスト、E G F R 標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害薬、メトキシサレン、ヒドロコルチゾン、カルシポトリエン、アンスラリン、コールタール、ベタメサゾン、ベタメサゾンアセテート/ベタメサゾンリン酸ナトリウム、コルチゾンアセテート、デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸ナトリウム、メチルプレドニゾンアセテート、ヒドロコルチゾンリン酸ナトリウム、プレドニゾン、およびプレドニゾンリン酸ナトリウムからなる群から選択された治療的有効量の第 2 の治療剤を投与し、および/または光線療法に患者を受けさせることをさらに含んでなる、請求項 2 9 に記載の方法。

40

【請求項 3 3】

50

E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、子宮内膜症の治療方法。

【請求項 3 4】

抗体が、E r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

抗体がモノクローナル抗体 2 C 4 またはヒト化 2 C 4 である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

他の E r b B アンタゴニスト、E G F R 標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害薬、免疫抑制薬、ホルモン、経口避妊薬、プロゲステロン、ダナゾール、ゴナドトロフィン放出ホルモン ( G n R H ) アゴニスト、フィトエストロゲン、イソフラボン、抗エストロゲン、ベンゾチオフェン、ドロキシフェン、ベンゾフラン、アロマターゼ阻害薬、ノルエチンドロンアセテート、ロイプロリドアセテート、ナファレリンアセテート、クラブラン酸カリウム / チカルシリンジソディウム、およびゴセレリンアセテートからなる群から選択された治療的有効量の第 2 の治療剤を患者に投与することをさらに含んでなる、請求項 3 3 に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、血管系疾病または疾患の治療方法。

【請求項 3 8】

血管系疾患が、動脈硬化症、血管再開塞、アテローム性動脈硬化、術後血管狭窄、再狭窄、血管閉塞または頸動脈閉塞性疾患、冠動脈疾患、狭心症、小血管性疾患、高コレステロール血症、高血圧、および血管上皮細胞の異常増殖または異常機能に関する症状からなる群から選択されたものである、請求項 3 7 に記載の方法。

20

【請求項 3 9】

抗体が、E r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

抗体がモノクローナル抗体 2 C 4 またはヒト化 2 C 4 である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

塩酸プロプラノロール、他の E r b B アンタゴニスト、E G F R 標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害薬、および血圧調節薬剤、コレステロール低下薬剤、抗酸化薬、I C A M 1 , 2 および 3 , V C A M - 1 または P E C A M - 1 等の接着分子調節薬剤、脂質低下薬、抗血小板薬、カルシウムチャネル阻害薬、アンジオテンシン交換酵素 ( A C E ) 阻害薬、遮断薬、チクロピジン、クロピドグレル、抗組織因子抗体またはアンタゴニスト、経口第 V I I a 因子阻害薬、ビパリンジン、N a p C 2、ロベロックス、フラグラニン、A R B A C E レセプターアンタゴニスト、ヒルディン、ヒルレグ、メラガトロン、エプチフィバチド、アブシキシマブ、およびアスピリンからなる群から選択された治療的有効量の第 2 の治療剤を投与することをさらに含んでなる、請求項 3 7 に記載の方法。

30

【請求項 4 2】

E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、呼吸器系疾患の治療方法。

40

【請求項 4 3】

呼吸器系疾患が、慢性気管支炎、喘息、嚢胞性線維症、気管支拡張症、鼻炎、副鼻腔炎、1 抗トリプシン欠乏症、咳、肺気腫、肺線維症、高過敏性気道、慢性閉塞性肺性疾患、慢性閉塞性肺疾患、および高血圧からなる群から選択されたものである、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

抗体が、E r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

50

抗体がモノクローナル抗体 2 C 4 またはヒト化 2 C 4 である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

免疫抑制薬、プレドニゾン、速効型 アゴニスト、アトロピン作動性気管支拡張薬、持続型気管支拡張薬、吸入ステロイド、I g E アンタゴニスト、抗 I g E 抗体、ヒト化抗 I g E 抗体、オマリズマブ、他の E r b B アンタゴニスト、E G F R 標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害薬、ザフィルルカスト、硫酸アルブテロール、プロピオン酸フルチカゾン/キシナホ酸サルメテロール、フルニソリド、テオフィリン、硫酸メタプロテロール、臭化イプラトロピウム、トリアムシノロン・アセトニド、硫酸テルブタリン、酢酸ベタメタゾン/リン酸ナトリウムベタメタゾン、ベタメタゾン、硫酸アルブテロール/臭化イプラトロピウム、酢酸コルチゾン、デキサメタゾン、リン酸ナトリウムデキサメタゾン、酢酸メチルプレドニゾン、硫酸アルブテロール/臭化イプラトロピウム、プロピオン酸フルチカゾン、フマル酸ホルモテロール、ヒドロコルチゾン、リン酸ナトリウムヒドロコルチゾン、ダイフィリン、ダイフィリン/グアイフェネシン、酢酸ピルブテロール、リン酸ナトリウムプレドニゾン、ヨウ化カリウム、プレドニゾン、エピネフリン、塩酸エフェドリン/グアイフェネシン、硫酸アルブテロール、アルブテロール、ブデソニド、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、キシナホ酸サルメテロール、モンテルカストナトリウム、コハク酸ナトリウムメチルプレドニゾン、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、アルブテロール、塩酸レバルブテロール、ジロートン、臭化イプラトロピウム、硫酸テルブタリン、ヨウ化カリウム、キシナホ酸サルメテロール、塩酸モキシフロキサシン、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、クラリスロマイシン、セファクロル、セフチブテン二水和物、セフロキシムアキセチル、セフェプロジル、シプロフロキサシン、塩酸シプロフロキサシン、オフロキサシン、レボフロキサシン、ロラカルベフ、セフジニル、シラスタチンナトリウム/イミペネム、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、セフジトレンピボキシル、セフィキシム、ガチフロキサシン、およびセフポドキシムプロキセチルからなる群から選択された治療的有効量の第 2 の治療剤を患者に投与することをさらに含んでなる、請求項 4 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、抗-E r b B 2 抗体、特に E r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する抗-E r b B 2 抗体を用いた非悪性兆候の治療に関する。

【0002】

(発明の背景)

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

erbB1 遺伝子にコードされる E G F R は、ヒト悪性腫瘍の原因と示唆されている。特に E G F R の発現の増加は、乳房、膀胱、肺、頭部、首部及び胃癌、並びに膠芽細胞腫で観察されている。増大した E G F R 発現は、自己分泌刺激経路によるレセプターの活性化となる、同じ腫瘍細胞による E G F R リガンド、トランスフォーミング成長因子 - アルファ (T G F - ) の生成の増加にしばしば関連していると報告されている。Baselga 及び Mendelson Pharmac Ther., 64:127-154 (1994)。E G F R、又はそのリガンド T G F - 及び E G F に対するモノクローナル抗体は、そのような悪性腫瘍の治療における治療剤として評価されている。例えば、Baselga 及び Mendelson 上掲; Masui ら, Cancer Research, 44:1002-1007(1984); 及び Wu ら, J. Clin. Invest., 95:1897-1905 (1995) 参照。

E r b B ファミリーの第 2 のメンバーである p 1 8 5<sup>neu</sup> は、元々は、化学的に処理されたラットの神経芽細胞種由来のトランスフォーミング遺伝子の産物として同定された。

neuプロト癌遺伝子の活性化型は、コードされたタンパク質の膜貫通領域の点突然変異（バリンからグルタミン酸へ）から生じる。neuのヒト相同体の増幅は、乳房及び卵巣癌で観察され、乏しい予後と相関している(Slamonら, Science, 235:177-182 (1987); Slamonら, Science, 244:707-712 (1989); 及び米国特許第4,968,603号)。今日まで、neuプロト癌遺伝子におけるものに類似した点突然変異はヒトの腫瘍に対しては報告されていない。Erbb2の過剰発現(増幅のためしばしば見られるが均一にはではない)が、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓及び膀胱の癌腫を含む他の癌腫においても観察されている。特に、Kingら, Science, 229:974 (1985); Yokotaら, Lancet, 1:765-767 (1986); Fukushimaら, Mol Cell Biol., 6:955-958 (1986); Geurinら, Oncogene Res., 3:21-31 (1988); Cohenら, Oncogene., 4:81-88 (1989); Yonemuraら, Cancer Res., 51:1034 (1991); Borstら, Gynecol.Oncol., 38:364 (1990); Weinerら, Cancer Res., 50:421-425 (1990); Kernら, Cancer Res., 50:5184 (1990); Parkら, Cancer Res., 49:6605 (1989); Zhouら, Mol. Carcinog., 3:354-357 (1990); Aaslandら, Br. J. Cancer 57:358-363 (1988); Williamsら, Pathobiology, 59:46-52 (1991); 及びMcCannら, Cancer, 65:88-92 (1990)参照。Erbb2は前立腺癌で過剰発現されうる(Guら Cancer Lett. 99:185-9(1996); Rossら Hum. Pathol. 28:827-33(1997); Rossら Cancer 79:2162-70(1997); 及びSadasivanら J. Urol. 150:126-31(1993))。

#### 【0003】

ラットp185<sup>neu</sup>及びヒトErbb2タンパク質産物に対する抗体が記述されている。Drebinとその仲間、ラットneu遺伝子産物であるp185<sup>neu</sup>に対する抗体を言及している。例えば、Drebinら, Cell 41:695-706(1985); Meyersら, Meth. Enzym. 198:277-290(1991); 及びW094/22478参照。Derbinら, Oncogene 2:273-277(1988)は、p185<sup>neu</sup>の2つの異なる領域と反応性のある抗体混合物が、ヌードマウス中に移植されたneu形質転換NIH-3T3細胞に相乗的な抗腫瘍効果を生じることを報告している。また1998年10月20日公開の米国特許第5,824,311号参照。

Hudziakら, Mol. Cell. Biol. 9(3):1165-1172(1989)には、ヒトの乳房腫瘍株化細胞SK-BR-3を使用して特徴付けられた抗-Erbb2抗体パネルの作成が記載されている。抗体への暴露に続いてSK-BR-3細胞の相対的細胞増殖が、72時間後の単層のクリスタルバイオレット染色により測定された。このアッセイを使用して、4D5と呼ばれる抗体により最大の阻害度が得られ、これは細胞増殖を56%阻害した。パネルの他の抗体は、このアッセイにおいてより少ない度合いで細胞増殖を低減した。さらに、抗体4D5は、TNF- $\alpha$ の細胞障害効果に対し、Erbb2過剰発現乳房腫瘍株化細胞を感作させることが見出されている。また、1997年10月14日に公開された米国特許第5,677,171号参照。Hudziakらにより検討された抗-Erbb2抗体は、Fendlyら Cancer Research 50:1550-1558(1990); Kottsら In Vitro 26(3):59A(1990); Sraupら Growth Regulation 1:72-82(1991); Shepardら J. Clin. Immunol. 11(3):117-127(1991); Kumarら Mol. Cell. Biol. 11(2):979-986(1991); Lewisら Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263(1993); Pietrasら Oncogene 9:1829-1838(1994); Vitettaら Cancer Research 54:5301-5309(1994); Sliwkowskiら J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994); Scottら J. Biol. Chem. 266:14300-5(1991); D'souzaら Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206(1994); Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996); 及びSchaeferら Oncogene 15:1385-1394(1997)においてもさらに特徴付けられている。

#### 【0004】

マウス抗-Erbb2抗体4D5の組換えヒト化体(huMAb4D5-8、rhMAbHER2又はハーセプチン(商品名); 米国特許第5,821,337号)は、広範な抗癌治療の前に受けたErbb2過剰発現転移性乳癌を持つ患者において臨床的に活性であった(Baselgaら, J. Clin. Oncol. 14:737-744(1996))。ハーセプチン(商品名)は、腫瘍がErbb2タンパク質を発現する転移性乳癌を有する患者の治療のために、1998年9月25日、食品医薬品局から販売許可を受けた。

様々な特性を有する他の抗-Erbb2抗体は、Tagliabueら Int. J. Cancer 47:933-9 50

37(1991); McKenzieら *Oncogene* 4:543-548(1989); Maierら *Cancer Res.* 51:5361-5369(1991); Bacusら *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362(1990); Stancovskiら *PNAS(USA)* 88:8691-8695(1991); Bacusら *Cancer Research* 52:2580-2589(1992); Xuら *Int. J. Cancer* 53:401-408(1993); W094/00136; Kasprzykら *Cancer Research* 52:2771-2776(1992); Hancockら *Cancer Res.* 51:4575-4580(1991); Shawverら *Cancer Res.* 54:1367-1373(1994); Arteagaら *Cancer Res.* 54:3758-3765(1994); Harwerthら *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167(1992); 米国特許第5,783,186号; 及び Klapperら *Oncogene* 14:2099-2109(1997)に記載されている。

#### 【0005】

相同性スクリーニングは、結果的に他の2つの ErbBレセプターファミリーメンバーを同定した; ErbB3(米国特許第5,183,884号及び第5,480,968号、並びに Krausら *PNAS(USA)* 86:9193-9197(1989))、及び ErbB4(欧州特許出願第599,274号、Plowmanら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750(1993)、及び Plowmanら, *Nature* 366:473-475(1993))。これらのレセプターはどちらも、少なくともいくつかの乳癌株での増加した発現を示す。

ErbBレセプターが一般に、細胞内の様々な組み合わせで発見され、ヘテロ二量体は様々な ErbBリガンドに対する細胞応答の相違を増加すると考えられる(Earpら *Breast Cancer Research and Treatment* 35:115-132(1995))。EGFRは6つの異なるリガンド; 上皮成長因子(EGF); トランスフォーミング成長因子アルファ(TGF- $\alpha$ )、アンフィレグリン、ヘパリン結合上皮細胞成長因子(HB-EGF)、ベータセルリン及びエピレグリンにより結合される(Groenenら *Growth Factors* 11:235-257(1994))。単一の遺伝子の選択的スプライシングから生じるヘレグリンタンパク質のファミリーは ErbB3及び ErbB4のリガンドである。ヘレグリンファミリーは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、及びヘレグリン(Holmesら, *Science*, 256:1205-1210(1992); 米国特許第5,641,869号; 及び Schaeferら *Oncogene* 15:1385-1394(1997)); neu分化因子(NDF)、グリア成長因子(CGF); アセチルコリンレセプター促進活性(ARIA); 及び感覚、運動神経由来因子(SMDF)を含む。概説については、Groenenら *Growth Factors* 11:235-257(1994); Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7:247-262(1996)及び Leeら *Pharm. Rev.* 47:51-85(1995)参照。最近になって更に3つの ErbBリガンドが同定された; ErbB3又は ErbB4のどちらかに結合すると報告されたニューレグリン-2(NRG-2)(Changら *Nature* 387:509-512(1997); 及び Carrawayら *Nature* 387:512-516(1997)); ErbB4に結合するニューレグリン-3(Zhangら *PNAS(USA)* 94(18):9562-7(1997)); 及び ErbB4に結合するニューレグリン-4(Harariら *Oncogene* 18:2681-89(1999)) HB-EGF、ベータセルリン及びエピレグリンもまた ErbB4に結合する。

EGF及び TGF $\alpha$  は ErbB2に結合しないが、EGFはヘテロ二量体を形成するように EGFR及び ErbB2を促進し、EGFRを活性化し、その結果ヘテロ二量体で ErbB2のトランスリン酸化を生じる。ヘテロ二量体及び/又はトランスリン酸化は ErbB2チロシンキナーゼを活性化するように見える。上掲の Earpら, 参照。同様に、ErbB3が ErbB2と共に発現しているとき、活性シグナル伝達複合体が形成され、ErbB2に対する抗体はこの複合体を分裂させる能力がある(Sliwkowskiら, *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665(1994))。更に、ヘレグリン(HRG)に対する ErbB3の親和性は ErbB2と共に発現するときの高い親和性にまで増加される。また、ErbB2-ErbB3タンパク質複合体に関しては、Leviら, *Journal of Neuroscience* 15:1329-1340(1995); Morrisseyら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1431-1435(1995); 及び Lewisら, *Cancer Res.*, 56:1457-1564(1996)参照。ErbB3と同様に ErbB4は ErbB2と活性シグナル伝達複合体を形成する(Carraway and Cantley, *Cell* 78:5-8(1994))。

#### 【0006】

##### (発明の概要)

本発明は、ErbB2に結合する治療的有効量の抗体を哺乳動物に投与することを含んでなる、ErbBレセプターまたは ErbBリガンドの異常活性または産生に關与する非

悪性疾患または疾患を哺乳動物において治療する方法を提供する。

更に、本発明は、容器とその容器に含まれる組成物を含んでなる製造品であって、E r b B 2 に結合する抗体、さらには非悪性疾患または疾患を治療するのに使用することができる組成物であることを示すパッケージ挿入物を含んでなるものであり、ここで疾患または疾患はE r b B レセプターまたはE r b B リガンドの異常な活性化または異常な産生が関与するものである製造品に関する。

更なる側面では、本発明は、E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、乾癬の治療方法を提供する。

さらに、E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、子宮内膜症の治療方法をここに提供する。

また、本発明は、E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、血管系疾患または疾患の治療方法に関する。

加えて、本発明は、E r b B 2 に結合する抗体の治療的有効量を患者に投与することを含んでなる、呼吸器系疾患の治療方法に関する。

#### 【0007】

好ましい実施態様の詳細な説明

##### I. 定義

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

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

表記「E r b B 2」、「H E R 2」は、ここで互換的に使用され、例えばSembaら、PNAS(USA)82:6497-6501(1985)及びYamamotoら、Nature 319:230-234(1986)(Genebank受託番号 X03363)に記載されているヒトH E R 2タンパク質に相当する。「erbB2」という用語は、ヒトE r b B 2をコードする遺伝子に相当し、「neu」はラットp185<sup>neu</sup>をコードする遺伝子に相当する。好ましくは、E r b B 2は天然配列ヒトE r b B 2である。

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

ここでの用語「E r b B 4」及び「H E R 4」は、例えば、欧州特許出願599,274；Plo wmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750(1993)；及びPlo wmanら、Nature 366: 473-475(1993)に開示されたレセプターポリペプチドに相当し、例えば1999年4月22日公開のW099/19488に開示されているような、そのアイソフォームを含む。

「E r b B リガンド」とは、E r b B レセプターに結合する及び/又は活性化するポリペプチドを意味する。この用語はE r b B リガンドの膜結合性前駆体型だけでなくE r b B リガンドのタンパク分解過程の可溶性型も含む。ここで特に対象とするE r b B リガンドは、例えば上皮細胞成長因子(E G F)(Savageら、J. Biol. Chem. 247: 7612-76721(1972))；トランスフォーミング成長因子-(T G F-)(Marquardtら、Science 223: 1079-1082(1984))；シュワン細胞腫由来成長因子又はケラチノサイト自己分泌成長因

10

20

30

40

50

子としても知られているアンフィレグリン (Shoyabら, Science 243:1074-1076(1989); Kimuraら, Nature 348:257-260(1990); 及びCookら, Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557(1991)); ベータセルリン (Shingら, Science 259:1604-1607(1993); 及びSasadaら, Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173(1993)); ヘパリン結合上皮細胞成長因子 (HB-EGF) (Higashiyamaら, Science 251:936-939(1991)); エピレグリン (Toyodaら, J. Biol. Chem. 270: 7495-7500(1995); 及びKomurasakiら, Oncogene 15:2841-2848(1997)); ヘレグリン (以下参照); ニューレグリン-2 (NRG-2) (Carrawayら, Nature 387: 512-516(1997)); ニューレグリン-3 (NRG-3) (Zhangら, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 9562-9567(1997)); 及びニューレグリン-4 (NRG-4) (Harariら Oncogene 18:2681-89(1999))又はクリプト (CR-1) (Kannanら J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335(1997))のような天然配列ヒト ErbBリガンドである。EGFRに結合するErbBリガンドは、EGF、TGF- $\beta$ 、アンフィレグリン、ベータセルリン、HB-EGF及びエピレグリンを含む。ErbB3に結合するErbBリガンドは、ヘレグリンを含む。ErbB4に結合する能力のあるErbBリガンドはベータセルリン、エピレグリン、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4及びヘレグリンを含む。

10

#### 【0008】

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

20

ここでの「ErbBヘテロ-オリゴマー」は、少なくとも2つの異なるErbBレセプターを含んでなる非共有的に関連したオリゴマーである。このような複合体は、2以上のErbBレセプターを発現する細胞がErbBリガンドに暴露すると形成される (Sliwkowskiら, J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665(1994))。このようなErbBヘテロ-オリゴマーの例はEGFR-ErbB2、ErbB2-ErbB3及びErbB3-ErbB4複合体を含む。更にErbBヘテロ-オリゴマーは、異なるErbBレセプター、例えばErbB3、ErbB4又はEGFRと組み合わせられた2以上のErbB2レセプターを含んでいてもよい。他のタンパク質、例えばサイトカインレセプターサブユニット(例えばgp130)はヘテロ-オリゴマーに含まれる。ここで言う患者はErbBヘテロダイマー、特にEGFR-ErbB2および/またはErbB2-ErbB3ヘテロダイマーが患者細胞、例えば患者の患部組織内に存在するかどうかを決定するために分析する対象となりうる。

30

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

40

「天然配列」ポリペプチドは、天然由来の対応するポリペプチド(例えば、ErbBレセプター又はErbBリガンド)と同一のアミノ酸配列を有するものである。このような

50

天然配列ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え又は合成手段により生産することもできる。従って、天然配列ポリペプチドは、自然発生ヒトポリペプチド、マウスポリペプチド、又は特定の他の哺乳動物種のアミノ酸配列を有しうる。

#### 【0009】

「アミノ酸配列変異体」という用語は、天然配列ポリペプチド由来と或る程度異なっているアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。通常、アミノ酸配列変異体は天然のE b r Bリガンドの少なくとも1つのレセプター結合ドメインと又は天然のE b r Bレセプターの少なくとも1つのリガンド結合ドメインと少なくとも約70%の相同性を有しており、好ましくは該レセプター又はリガンド結合ドメインと少なくとも約80%、さらに好ましくは少なくとも約90%の相同性を有している。アミノ酸配列変異体は、天然アミノ酸配列のアミノ酸配列内の或る位置での置換、欠失及び/又は挿入を有している。

10

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

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

20

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

30

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同であり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体あるいは他の抗体クラスあるいはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物活性を有する限りそれら抗体の断片を特に含む(米国特許第4,816,567号; Morrisonほか, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。ここで対象とするキメラ抗体は、非ヒト(例えばオナガザル、サルなど)及びヒト定常領域配列から誘導される可変ドメイン抗原結合配列を含んでなる「霊長類化」抗体を含む。

40

#### 【0010】

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

「完全な」抗体は、抗原結合可変領域、並びに軽鎖定常ドメイン(C<sub>L</sub>)及び重鎖定常ドメイン、C<sub>H</sub> 1、C<sub>H</sub> 2及びC<sub>H</sub> 3を含んでなるものである。定常ドメインは天然配列定常ドメイン(例えば、ヒト天然配列定常ドメイン)又はそのアミノ酸配列変異体でありうる

50

。好ましくは、完全な抗体は一又は複数のエフェクター機能を有する。

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

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、完全な抗体は異なる「クラス」に分類できる。完全な抗体の五つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更に「サブクラス」(アイソタイプ)、例えばIgG1(ヒトA及び非Aアロタイプ)、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び3次元構造がよく知られている。

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

#### 【0011】

「ヒトエフェクター細胞」は、一つ以上のFcRを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。好ましくは、細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球を含む；PBMC類及びNK細胞が好まれる。エフェクター細胞は、その天然ソースより単離されてもよい；例えばここにおいて記載の血液又はPBMC類である。

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(レセプター)に結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcRIIレセプターは、FcRIIA(「活性化レセプター」)及びFcRIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化FcRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234(1997)に概説されている)。FcRはRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)；Capelら, Immunomethods 4:25-34(1994)；及びde Hasら, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。この用語は胎児への母性IgGsの移動の原因である新生児レセプター、FcRnもまた含む(Guyerら, J. Immunol. 117:587(1976)及びKimら, J. Immunol. 24:249(1994))。

「補体依存性細胞障害活性」又は「CDC」は、補体の存在下で目的物を溶解させる分子の能力に関する。補体活性化経路は、同系の抗原と複合体形成する分子(例えば、抗体)への補体系の第1の成分(C1q)の結合により開始される。補体活性化を評価するために

10

20

30

40

50

、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されているようなC D Cアッセイが実施されうる。

「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽(L)鎖及び2つの同一の重(H)鎖からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合しており、ジスルフィド結合の数は、異なった免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の中で変化する。また各重鎖と軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド結合を有している。各重鎖は、多くの定常ドメインが続く可変ドメイン( $V_H$ )を一端に有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン( $V_L$ )を、他端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは重鎖の第一定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列している。特定のアミノ酸残基が、軽鎖及び重鎖可変ドメイン間の界面を形成すると考えられている。

10

#### 【0012】

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

20

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

30

抗体のパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理は $F(a b')_2$ 断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

40

#### 【0013】

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

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカル

50

ボキシ末端に数個の残基が付加している点で F a b 断片とは異なる。F a b'-S H は、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持している F a b' に対するここでの命名である。F (a b')<sub>2</sub> 抗体断片は、間にヒンジシステインを有する F a b' 断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

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

「一本鎖 F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体の V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、F v ポリペプチドは V<sub>H</sub> 及び V<sub>L</sub> ドメイン間にポリペプチドリンカーを更に含み、それは s c F v が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F v の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) の Pluckthun を参照のこと。抗-E r b B 2 抗体 s c F v 断片は W093/16185; 米国特許第 5,571,894 号; 及び米国特許第 5,587,458 号に記載されている。

「ダイアボディ」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖 (V<sub>H</sub> - V<sub>L</sub>) 内で軽鎖可変ドメイン (V<sub>L</sub>) に重鎖可変ドメイン (V<sub>H</sub>) が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で二つのドメインの対形成を可能にするリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、二つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディーは、例えば、EP404,097; W O 93/11161; 及び Hollinger ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) に更に詳細に記載されている。

#### 【0014】

非ヒト(例えば齧歯動物)抗体の「ヒト化」形とは、非非と免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分においてヒト化抗体はレシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)の高頻度可変の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク領域残基 (F R) は、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体に、又はドナー抗体に見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全ての高頻度可変領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全ての F R 領域がヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた、場合によっては免疫グロブリン定常領域 (F c) の少なくとも一部、典型的にはヒトの免疫グロブリンのものを含んでなる。さらなる詳細は、Jones ら, Nature 321, 522-525 (1986); Reichman ら, Nature 332, 323-329 (1988) 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992) を参照。

ヒト化抗-E r b B 2 抗体は、出展明示によりここに取り込まれる米国特許第 5,821,337 号の表 3 に記載されているような h u M A b 4 D 5 - 1、h u M A b 4 D 5 - 2、h u M A b 4 D 5 - 3、h u M A b 4 D 5 - 4、h u M A b 4 D 5 - 5、h u M A b 4 D 5 - 6、h u M A b 4 D 5 - 7 及び h u M A b 4 D 5 - 8 (ハーセプチン(商品名)); ヒト化 5 2 0 C 9 (W093/21319) 及び以下に記載されるようなヒト化 2 C 4 抗体抗体を含む。

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

の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0015】

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

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

命名された抗体の、例えば2C4と命名されたモノクローナル抗体の「生物学的特性」を有する抗体は、同じ抗体(例えばErbB2)に結合する他の抗体から識別する、抗体の一又は複数の生物学的特性を有するものである。例えば、2C4の生物学的特性を有する抗体は、ErbB2とErbB3又はErbB4を含むErbBヘテロ-オリゴマーのHRG活性化を阻害しても; EGFR及びErbB2を含むErbBレセプターのEGF、TGF-、HB-EGF、エプレグリン及び/又はアンフィレグリン活性化を阻害しても; MAPKのEGF、TGF-及び/又はHRG媒介活性化を阻害しても; 及び/又は2C4により結合するようなErbB2の細胞外ドメインの同じエピトープに結合(例えば、モノクローナル抗体2C4のErbB2への結合を阻害する)してもよい。

【0016】

別に示されなければ、表記「モノクローナル抗体2C4」は以下の実施例のマウス2C4抗体の、又は該抗体由来の抗原結合残基を有する抗体に相当する。例えば、モノクローナル抗体2C4は、マウスモノクローナル抗体2C4又はその変異体、例えばマウスモノクローナル抗体2C4の抗原結合アミノ酸残基を有するヒト化抗体2C4でありうる。ヒト化2C4抗体の例は、以下の実施例3で提供される。他に示されなければ、ここで使用される場合の発現「rhuma2C4」はそれぞれ配列番号、3及び4の可変軽鎖(V<sub>L</sub>)及び可変重鎖(V<sub>H</sub>)配列を含み、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞により通常発現されるヒト軽鎖及び重鎖IgG1(非-Aアロタイプ)定常領域配列に融合する抗体を意味する。

別に示されなければ、「モノクローナル抗体4D5」という用語は、マウス4D5抗体

10

20

30

40

50

(ATCC CRL10463)の、又は該抗体由来の抗原結合残基を有する抗体の相当する。例えば、モノクローナル抗体4D5はマウスモノクローナル抗体4D5又はその変異体、たとえばマウスモノクローナル抗体4D5の抗原結合残基を有するヒト化4D5であってもよい。ヒト化4D5抗体は、米国特許第5,821,337号に記載されているようなh u M A b 4 D 5 - 1、h u M A b 4 D 5 - 2、h u M A b 4 D 5 - 3、h u M A b 4 D 5 - 4、h u M A b 4 D 5 - 5、h u M A b 4 D 5 - 6、h u M A b 4 D 5 - 7及びh u M A b 4 D 5 - 8(ハーセプチン(商品名))を含み、ここで、h u M A b 4 D 5 - 8(ハーセプチン(商品名))はヒト化4D5抗体であることが好ましい。

ここで使用される場合の「成長阻害剤」とは、インビトロ又はインビボのいずれかにおいて、細胞、特にE r b B 発現癌細胞の成長を阻害する化合物又は組成物を指すものである。よって、成長阻害剤とは、S期におけるE r b B 発現細胞のパーセンテージを有意に低減させるものである。成長阻害剤の例には、細胞周期の進行を阻害する薬剤(S期以外のところで)、例えばG1停止及びM期停止を誘発する薬剤が含まれる。伝統的なM期ブロッカーには、ピンカ(ピンクリスチン及びピンプラスチン)、タキサン、及びトポIIインヒビター、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシンが含まれる。またG1を停止させるこれらの薬剤、例えばDNAアルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカーバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びa r a - CがS期停止に溢流する。更なる情報は、Murakamiらにより「細胞分裂周期の調節、癌遺伝子、及び抗新生物薬(Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs)」と題された、癌の分子の基礎(The Molecular Basis of Cancer)、Mendelsohn及びIsrael編、第1章(WB Saunders; Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。

#### 【0017】

「成長阻害」抗体の例は、E r b B 2に結合して、E r b B 2を過剰発現する癌細胞の成長を抑制するものである。好ましい成長阻害抗-E r b B 2抗体は、成長阻害がSK-BR-3細胞の抗体への暴露から6日後に決定される場合に、抗体濃度約0.5から30µg/mlで20%よりも大きく、好ましくは50%よりも大きく(例えば約50%から100%)細胞培養物のSK-BR-3乳癌細胞の成長を阻害する(1997年10月14日公開の米国特許第5,677,171号参照)。SK-BR-3細胞成長阻害アッセイは、該特許及び以下に更に詳しく記載される。好ましい成長阻害抗体は、モノクローナル抗体4D5、例えばヒト化4D5である。

「細胞死を誘発」する抗体は、生存している細胞を生存不能とさせるものである。該細胞は一般に、E r b B 2レセプターを発現するもので、特に該細胞はE r b B 2レセプターを過剰発現する。好ましくは細胞は癌細胞、例えば乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロでは、細胞はSK-BR-3、BT474、Calu3、MDA-MB-453、MDA-MB-361又はSKOV3細胞でありうる。インビトロでの細胞死は、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で決定され、抗体依存性細胞障害活性(ADCC)又は補体依存性細胞障害活性(CDC)により誘発される細胞死と区別される。よって、細胞死に対するアッセイは、熱不活性化血清(すなわち補体の不在下)を使用し、免疫エフェクター細胞の不在下で行うことができる。抗体が細胞死を誘発可能であるか否かを測定するために、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンブルー(Mooreら, Cytotechnology 17:1-11(1995)を参照)又は7AADの取込みにより評価される膜インテグリティの損失度合いが未処理細胞と比較して評価される。好ましい細胞死誘発抗体は、BT474細胞におけるPI取込みアッセイにおいて、PIの取込みを誘発するものである(下記参照)。

「アポトーシスを誘発」する抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化、及び/又は膜小胞の形成(アポトーシス体と呼ばれる)により決定されるようなプログラム細胞死を誘発するものである。細胞は、通常E r b B 2レセプターを過剰発現するものである。好ましくは細胞は、腫瘍細胞、例えば乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロ

では、細胞はSK-BR-3、BT474、Calu3細胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361又はSKOV3細胞でありうる。アポトーシスに伴う細胞のイベントを評価するために種々の方法が利用できる。例えば、ホスファチジルセリン(P S)転位置をアネキシン結合により測定することができ；DNA断片化はDNAラダーリングにより評価することができ；DNA断片化に伴う細胞核/染色質凝結は低二倍体細胞の何らかの増加により評価することができる。好ましくは、BT474細胞を使用するアネキシン結合アッセイにおいて、アポトーシスを誘発する抗体は、未処理細胞の約2~50倍、好ましくは約5~50倍、最も好ましくは約10~50倍のアネキシン結合を誘発するという結果を生じるものである(下記参照)。時として、プロアポトーシス抗体は、Er b BレセプターのEr b Bリガンド活性化を更に阻害するであろう(例えば7F3抗体)；つまり抗体はモノクローナル抗体2C4と生物学的特性を共有する。他の状況では、抗体は、Er b BレセプターのEr b Bリガンド活性化を有意に阻害しないものでであろう(例えば7C2)。さらに、抗体は、アポトーシスを誘発しながら、S期中の細胞のパーセントの大きな低減を誘発しない7C2のようなものでありうる(例えば、コントロールに対して、これらの細胞のパーセントの約0-10%の低減だけを誘発するもの)。

10

20

30

40

50

#### 【0018】

「エピトープ2C4」は抗体2C4が結合するEr b B2の細胞外ドメイン中の領域である。2C4エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の変換プロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がEr b B2の2C4エピトープに結合するか否かを評価するために、エピトープマッピングを行うこともできる(例えば、Er b B2の約残基22から約残基584までを含む領域における任意の一又は複数の残基；Fig. 1A-B参照)。

「エピトープ4D5」は、抗体4D5(ATCC CRL 10463)が結合するEr b B2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープはEr b B2の膜貫通領域に近接している。4D5エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の変換プロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がEr b B2の4D5エピトープに結合するか否かを評価するために、エピトープマッピングを行うこともできる(例えば、約残基529から約残基625までを含む領域における任意の一又は複数の残基；Fig 1. A-B参照)。

「エピトープ3H4」は抗体3H4が結合するEr b B2の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、Er b B2の細胞外ドメインのアミノ酸配列のうち、約541~約599の残基を含む；Fig 1A-B参照。

「エピトープ7C2/7F3」は7C2及び/又は7F3抗体(各々以下のATCCで寄託)が結合するEr b B2の細胞外ドメインのN末端領域である。7C2/7F3エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、例えばAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載の通常の変換プロッキングアッセイを行うことができる。あるいは、抗体がEr b B2の7C2/7F3エピトープに結合するか否かを確認するために、エピトープマッピングを行うこともできる(例えば、Er b B2の約残基22から約残基53までの領域における任意の一又は複数の残基；Fig 1A-B参照)。

#### 【0019】

「治療」とは、治療的処置及び予防又は防止手段の両方を意味する。治療の必要があるものには、既に罹患しているもの、並びに疾患が予防されるべきものが含まれる。従って、ここでの治療されるべき哺乳動物は、疾患を有すると診断されてもよく、又は疾患に罹りやすい又は敏感であると診断されていてもよい。

治療の目的とされる「哺乳動物」とは、ヒト、家庭又は農場用動物、及び動物園、スポーツ又はペット用動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシ等を含む、哺乳動物に分類されるあらゆる動物を意味する。好ましくは哺乳動物はヒトである。

「ErbBレセプター又はErbBリガンドの異常な活性化又は生産を含む非悪性疾患又は疾患」は、ErbBレセプター又はErbBリガンドの異常な活性化又は生産がその疾患又は障害に罹っているか又は罹る素因がある患者の細胞又は組織中で生じている悪性疾患又は癌を含まない症状である。ErbBレセプターは、一般にはEGFR、ErbB2、ErbB3及び/又はErbB4であるが、通常はEGFRである。一実施態様では、その症状はEGFR、ErbB3及びErbB4からなる群から選択されるErbBレセプターの過剰な活性化を含む。ここでの疾患又は障害は、患者の細胞中における異常なErbBヘテロ二量体の生成(例えば、EGFR-ErbB2、ErbB2-ErbB3、又はErbB2-ErbB4ヘテロ二量体生成)を含む場合がある。異常な活性化はErbBレセプターの変異した形態、例えばEGFRv.II/III又はEGFRv.1、又はErbBリガンドから生じることもあり、場合によってはErbBレセプターの構成的活性を生じる。そのような異常な活性化は、ErbBリガンドの膜貫通前駆体型の異常な又は改変されたタンパク質加水分解工程によってErbBレセプターを活性化する可溶性ErbBリガンドを放出する場合がある。異常な活性化はまたErbBレセプターの欠陥性内部移行及び/又はダウンレギュレーションにより生じうる。そのような疾患又は障害の例には、自己免疫疾患(例えば、乾癬)(以下の定義を参照のこと);子宮内膜症;強皮症;再狭窄;ポリープ、例えば大腸ポリープ、鼻ポリープ又は胃腸ポリープ;線維腺腫1呼吸器疾患(以下の定義を参照のこと);胆嚢炎;神経線維腫症;多発性嚢胞腎;炎症性疾患;乾癬及び皮膚炎を含む皮膚障害;血管疾患(以下の定義を参照のこと);血管上皮細胞の異常増殖を含む症状;胃腸潰瘍;メネトリエ病、分泌性腺腫又はタンパク質消失症候群;腎臓疾患;血管由来の疾患;眼の疾患、例えば加齢黄斑変性症、推定眼ヒストプラズマ症候群、増殖性糖尿病性網膜症由来の網膜新生血管、網膜血管形成、糖尿病性網膜症、又は加齢黄斑変性症;骨関連病理、例えば変形性関節症、くる病及び骨粗鬆症;脳の虚血事象に続く損傷;線維性又は浮腫性(edemia)疾患、例えば肝硬変、肺線維症、サルコイドーシス、甲状腺炎、過粘稠度症候群、オスラー・ウェーバー-ランデュ病;慢性閉塞性肺疾患、又は火傷、外傷、放射能、発作、低酸素症又は虚血に続く浮腫;皮膚の超過敏反応;糖尿病性網膜症;ギラン・バレー症候群;移植対宿主疾患又は移植拒絶;パジェット病;骨又は関節炎症;光加齢(例えばヒトの皮膚の紫外線により引き起こされるもの);良性前立腺肥大症;アデノウイルス、ハンタウイルス、ボレリア・ブルグドルフェリー、エルシニア spp. 及び百日咳菌から選択されるある種の微生物感染;湿疹;肥厚性癬痕形成;内毒素性ショック及び真菌感染症;家族性大腸腺腫症;神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、エイズ関連痴呆症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、網膜色素変性症、脊髄筋萎縮症及び小脳変性症);骨髄異形成症候群;再生不良性貧血;虚血性傷害;肺、腎臓又は肝臓の線維症;T細胞媒介過敏性疾患;乳児肥厚性幽門狭窄症;泌尿器閉塞症候群;乾癬性関節炎;及び橋本甲状腺炎が含まれる。

#### 【0020】

「良性過剰増殖性疾患」とは、細胞増殖に関連し、医学界のメンバーが異常と認識する患者の状態を意味する。異常な状態は、障害に罹っていない生物体に観察されるレベルとは統計的に異なる特性のレベルによって特徴付けられる。細胞増殖は細胞の増殖(multiplication)による成長又は拡大を意味し、細胞分裂を含む。細胞増殖の速度は与えられた時間単位に産生される細胞数を計数することによって測定することができる。良性過剰増殖性疾患の例には乾癬とポリープが含まれる。

「呼吸器疾患」は呼吸器系に關与し、慢性気管支炎、急性喘息及びアレルギー性喘息を含む喘息、嚢胞性線維症、気管支拡張症、アレルギー性又は他の鼻炎又は副鼻腔炎、1-抗トリプシン欠乏症、咳、肺気腫、肺線維症又は過敏気道、慢性閉塞性肺疾患(pulmonary disease)、及び慢性閉塞性肺障害(lung disorder)を含む。

ここで「自己免疫疾患」は、個体の自身の組織から生じ、また該組織に対する非悪性疾患又は障害である。自己免疫疾患又は障害の例には、これらに限るものではないが、炎症反応、例えば乾癬及び皮膚炎(例えばアトピー性皮膚炎)を含む炎症性皮膚病;全身性強皮症及び硬化症;炎症性腸疾患(例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎)に関連した反応;呼吸

困難症候群(成人性呼吸困難症候群；ARDSを含む)；皮膚炎；髄膜炎；脳炎；ブドウ膜炎；大腸炎；糸球体腎炎；アレルギー病状、例えば湿疹及び喘息及びT細胞の浸潤に関連した他の病状及び慢性炎症反応；アテローム性動脈硬化症；白血球付着欠損症；リウマチ様関節炎；全身性エリテマトーデス(SLE)；真性糖尿病(例えば、I型真性糖尿病又はインスリン依存性真性糖尿病)；多発性硬化症；レノー症候群；自己免疫甲状腺炎；アレルギー性脳脊髄炎；シオルゲン(Sjorgen)症候群；若年発症糖尿病；及び結核、サルコイドーシス、多発性筋炎、肉芽種症及び血管炎に典型的に見出されるTリンパ球及びサイトカインにより媒介される急性及び遅延高血圧に関連した免疫反応；悪性貧血(アジソン病)；白血球血管外遊出に関連した疾患；中枢神経系(CNS)炎症障害；多臓器傷害症候群；溶血性貧血(限定するものではないが、クリオグロブリン血症又はクームズ陽性貧血)；重症筋無力症；抗原-抗体複合体媒介性疾患；抗糸球体基底膜疾患；抗リン脂質症候群；アレルギー性神経炎；グレーブス病；ランベルト-イートン筋無力症候群；類天疱瘡；天疱瘡；自己免疫多腺性内分泌障害；ライター病；スティフマン症候群；ベーチェット疾患；巨細胞動脈炎；免疫複合体腎炎；IgA腎症；IgM多発性神経障害；免疫血小板減少性紫斑病(ITP)又は自己免疫血小板減少病等が含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

「乾癬」は、限局性で離散した集簇性で赤みがかかり銀色鱗屑を伴った丘疹の発疹によって特徴付けられる症状である。乾癬病変は一般に主として肘、膝、頭皮、及び胴体に生じ、顕微鏡で見ると特徴的なパラケロトーシス(parakeratosis)及び乳頭間隆起の伸長を示す。該用語には、紅皮、膿疱、該疾患の中程度-重症及び困難な形態を含む乾癬の様々な形態が含まれる。

「子宮内膜症」は変質した血液を含む嚢胞をよく形成する子宮内膜組織の異所性発生を意味する。

ここでの「血管疾患又は障害」という用語は、心臓血管系を含む血管系に影響を与える様々な疾患又は障害を意味する。そのような疾患の例には、動脈硬化症、血管再閉塞、アテローム性動脈硬化症、術後血管狭窄、再狭窄、血管閉塞又は頸動脈閉塞性疾患、冠状動脈疾患、狭心症、小血管疾患、高コレステロール血症、高血圧症、及び血管内皮細胞の異常増殖又は機能を含む症状が含まれる。

「狭窄」という用語は体内の中空路(例えば管又は路)の狭小化又は狭窄を意味する。

「血管狭窄」という用語は血管の閉塞又は狭窄を意味する。血管狭窄はしばしば脂肪性沈着物(アテローム性動脈硬化症)又は血管平滑筋細胞及び内皮細胞の過剰な遊走及び増殖から生じる。動脈は特に狭窄を被りやすい。ここで使用される「狭窄」という用語はとくに最初の狭窄と再狭窄を含む。

「再狭窄」という用語は、見かけ上の成功を伴った最初の狭窄の治療後における狭窄の再発を意味する。例えば、血管狭窄の意味での「再狭窄」は、例えば血管形成術(例えば経皮経管冠動脈形成術)による脂肪性沈着物の除去、方向性冠動脈粥腫切除術又はステント等により、血管狭窄が見かけ上の成功を伴って治療された後のその再発を意味する。再狭窄の誘因の一つは内膜肥厚化である。「新生内膜過形成」及び「新生内膜形成」と同義に使用される「内膜肥厚化」という用語は、血管平滑筋細胞及び内皮細胞の過剰な増殖及び遊走の結果としての血管最内層の脈管内膜の肥厚化を意味する。再狭窄の間に生じる様々な変化はしばしば集合的に「血管壁リモデリング」と称される。

#### 【0022】

「バルーン血管形成術」及び「経皮経管冠動脈形成術」(PTCA)はしばしば同義に用いられ、冠状動脈からのプラークの除去の非外科的カテーテルベースの治療法を意味する。狭窄又は再狭窄は血流に対する抵抗の増加の結果として高血圧を生じることがよくある。

「高血圧」という用語は異常に高い血圧、つまり正常範囲の上限を超える血圧を意味する。

「ポリープ」は正常な表面レベルから外側又は上方に隆起又は突出する組織の塊を意味し、半球状、球状、又は細い茎又は比較的広い基部から広がる不規則なマウンド状構造と

して肉眼で可視できる。例には大腸、直腸及び鼻ポリープが含まれる。

「線維腺腫」は腺性上皮から誘導された良性腫瘍に関連し、そこには、増殖する線維芽細胞及び結合組織エレメントの明白な基質が存在する。これは胸部組織に共通して起こる。

「喘息」は呼吸困難を生じる症状である。気管支喘息は、気道の広範囲の狭窄がある肺の症状を意味し、平滑筋の収縮（攣縮）、粘膜の浮腫、又は気管支及び気管支梢の管腔中の粘液による場合がある。

「気管支炎」は気管支の粘膜の炎症を意味する。

「治療的有効量」という用語は哺乳動物の疾病又は疾患を治療するのに効果的な薬剤の量を意味する。

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

「E r b B 発現癌」という用語は、抗 E r b B 2 抗体が結合できるようにその細胞表面に E r b B タンパク質の存在を有するものである。

### 【0023】

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

「自己分泌」促進経路において、E r b B リガンド及びその同族の E r B レセプターの両方を産生する癌細胞の効力によって自己促進が引き起こされる。例えば、癌は、E G F R を発現又は過剰発現しても、又は E G F R リガンド(例えば、E G F、T G F -、又は H B - E G F) を発現又は過剰発現してもよい。他の実施態様では、癌は E r b B 2 を発現又は過剰発現しても、又はヘレグリン(例えば、-H R G) を発現又は過剰発現してもよい。

E r b B レセプターを「過剰発現する」細胞は、同じ組織型の正常細胞と比較して、細胞表面の E r b B レセプター例えば E r b B 2 の有意に高いレベルを有している。このような過剰発現は、遺伝子増幅により、又は転写又は翻訳を増加させることにより引き起こされてもよい。E r b B レセプター過剰発現は、細胞表面の E r b B タンパク質存在の増加レベルを評価することにより、診断又は予後アッセイで決定されうる(例えば、免疫組織化学アッセイ; I H C、酵素抗体法、ウェスタンブロット法、リガンド結合、キナーゼ活性による)。あるいは、又は加えて、細胞の E r b B コード化核酸のレベルを測定してもよい、例えば、蛍光インサイトハイブリダイゼーション(F I S H; 1998年10月公開の W098/45479 参照)、サザンブロット法、又はポリメラーゼ連鎖反応(P C R)法、例えば

10

20

30

40

50

リアルタイム定量PCR(RT-PCR)。また、血清のような生体液中の脱落抗原(例えば、ErbB細胞外ドメイン)を測定することにより(例えば、1990年6月12日に公開の米国特許第4,933,294号;1991年4月18日公開のW091/15264;1995年3月28日公開の米国特許第5,401,638号;及びSiasら, J. Immunol. Methods 132: 73-80(1990))ErbBレセプター過剰発現を研究してもよい。前記アッセイのみならず、様々なインビボアッセイが技術熟練者において利用できる。例えば、検知できるラベル、例えば放射性同位体で任意に標識された抗体に患者の体にある細胞を暴露してもよく、患者の細胞への抗体の結合は、例えば放射活性の外側スキャンニングにより、又は抗体に先に暴露された患者から得られたバイオプシーを分析することにより評価される。

#### 【0024】

逆に、「ErbB2レセプターの過剰発現により特徴付されない」細胞は、診断アッセイにおいて、同組織型の正常細胞と比較して、ErbB2レセプターの通常のレベルよりも高く発現しないものである。

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

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

#### 【0025】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(商品名))のようなアルキル化剤;プスルファン、インブロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類;ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類;ウレドーパ(uredopa);アルトレートアミン(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramid)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類;クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チヨロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamid)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード;クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas);アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カリケアマイシン(calicheamicin)、カラピシン(carabycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ダウノルピシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)などの抗生物質;メトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物;デノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)の

10

20

30

40

50

ような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、及びフロキシウリジン(floxuridine)、5-FUのようなプリン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；オキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PKS(登録商標)；ラゾキサソ(razoxane)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニューアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピポブロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；シトシンアラビノシド(「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばパクリタキセル(タキソール、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、及びドキセタキセル(タキソテア、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲンシタピン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン、カルボプラチンのようなプラチナ類似体；ピンブラスチン；プラチナ；エトボシド(VP-16)；イフォスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン(navelbine)；ノバントロン(novantrolin)；テニボシド；ダウノマイシン；カルミノマイシン；アミノプテリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；CTP-11；トポイソメラーゼインヒビターRFS2000；ジフルオロメチロールニチン(DMFO)；レチノイン酸；エスペラマイシン；カペシタピン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働くホルモン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン(raloxifene)、4(5)-イミダゾール類を阻害するアロマターゼ、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストーン(onapristone)；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)及びニルタミド(nilutamide)；並びに上記のもの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

#### 【0026】

ここで使用されるように、「EGFR標的薬」という用語は、EGFRに結合し、場合によってはEGFR活性化を抑制する治療薬に相当する。このような薬剤の例は、EGFRに結合する抗体及び小分子を含む。EGFRに結合する抗体の例は、MAb579(ATCC CRL HB8506)、MAb455(ATCC CRL HB8507)、MAb225(ATCC CRL 8509)、MAb528(ATCC CRL HB8509)(米国特許第4,943,533号、Mendelsohnら参照)及びその変異体、例えばキメラ225(C225またはセツキシマブ(Cetuximab)；ERBUTIX(登録商標))及び再構成ヒト225(H225)(W096/40210、Imclone Systems社参照)；タイプIIマウスEGFRに結合する抗体(米国特許第5,212,290号)；米国特許第5,891,996号に記載のEGFRに結合するヒト化及びキメラ抗体；及びABX-EGFのようなEGFRに結合するヒト抗体(W098/50433、Abgenix参照)を含む。抗EGFR抗体は、細胞障害剤とコンジュゲートされ、よって免疫コンジュゲートを作る(例えば、EP659,439A2、Merck Patent

GmbH)。EGFRに結合する小分子の例は、ZD1839またはゲフィチニブ(Gefitinib)(IRESSA<sup>TM</sup>; Astra Zeneca)、CP-358774(TARCEVA<sup>TM</sup>; Genentech/OSI)及びAG1478、AG1571(SU5271; Sugen)を含む。

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、ErbBレセプターのようにチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子である。そのような阻害剤の例として、PD153035、4-(3-クロロアニリン)キナゾリン等のキナゾリン、CGP59326、CGP60261、およびCGP62706等のピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、ピルロロピリミジン(pyrrolopyrimidines)、およびピラゾロピリミジン(pyrazolopyrimidines)、4-(フェニルアミノ)-7H-ピルロロ[2,3-d]ピリミジン、カルシウム(ディフェルロイルメタン、4,5-bis(4-フルオロアニル)フタルイミド)、ニトロチオフエン成分を含むトリホスチン(tyrphostines); PD-0183805 (Warner-Lambert); アンチセンス分子(例えば、ErbBコード化核酸に結合するもの); キノキサリン(quinoxalines) (米国特許第5,804,396号); トリホスチン(米国特許第5,804,396号); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); CI-1033 (Pfizer)等のpan-ErbB阻害剤; Affmitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); メシル酸イマチニブ (Gleevac; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); セマキシニブ(Semaxanib) (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); 1NC-1C11 (Imclone); または以下に挙げるいずれかの特許文献に記載されているもの: 米国特許第5,804,396号; W099/09016 (American Cyanimid); W098/43960 (American Cyanamid); W097/38983 (Warner Lambert); W099/06378 (Warner Lambert); W099/06396 (Warner Lambert); W096/30347 (Pfizer, Inc); W096/33978 (Zeneca); W096/3397 (Zeneca); およびW096/33980 (Zeneca)だけでなく、前段落に記載したEGFR標的薬剤を含む。

#### 【0027】

ここで治療補助剤として用いる「免疫抑制剤」という用語は、宿主の免疫系を抑制または遮断するように働く物質を表す。これは、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原の発現を下方制御または抑制する、MHC抗原を遮断する、または、B細胞やT細胞へ結合する物質を含む。そのような薬剤の例として、2-アミノ-6-アリル-5-代替ピリミジン(米国特許第4,665,077号参照)、アザチオプリン(またはアザチオプリンに拒絶反応がある場合はシクロホスファミド); プロモクリプチン; グルタルアルデヒド (米国特許第4,120,649号に記載のように、MHC抗原を遮断する); MHC抗原およびMHCフラグメントに対する抗イデオタイプ抗体; シクロスポリンA; 副腎皮質ステロイドなどのステロイド、例として、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、およびデキサメタゾン; サイトカイン、または抗インターフェロン- $\alpha$ 、 $\beta$ 、または $\gamma$ 抗体を含むサイトカインレセプターアンタゴニスト; 抗腫瘍壊死因子 $\alpha$ 抗体; 抗腫瘍壊死因子 $\beta$ 抗体; 抗インターロイキン2抗体および抗IL-2レセプター抗体; 抗-L3T4抗体; 異種性抗リンパ球グロブリン; pan-T抗体、好ましくは、抗-CD3または抗CD4/CD4a抗体; LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日公開のW090/08187)、ストレプトキナーゼ; TGF- $\beta$ ; ストレプトドルナーゼ(streptodornase); 宿主由来のRNAまたはDNA; FK506; RS-61443; デオキシスベルグアニン(deoxyspergualin); ラパマイシン; T細胞レセプター (米国特許第5,114,721号); T細胞レセプターフラグメント(Offaerら, Science 251:430-432 (1991); W090/11294; およびW091/01133); およびT10B9等のT細胞レセプター抗体 (EP 340,109); LFA-1に結合する抗体、例えば、RAPTIVA(登録商標)を含む抗CD11a抗体; CD19、CD20、またはCD22等のB細胞表面抗原に結合する抗体 (例えば、RITUXAN(登録商標)を含むキメラまたはヒト化CD20抗体); インフリキシマブ(Infliximab) (REMICADE(登録商標); Centecor)を含む抗TNF- $\alpha$ 抗体等のTNFアンタゴニスト、D2E7、CDP-870 (Celltech)、およびエタネルセプト(Etanercept)(ENBREL(登録商標); Immune x)等のTNFR免疫付着因子; セリコキシブ(celicoxib)(CELEBREX(登録商標))またはMK-0966 (VIOXX(登録商標)) (米国特許第6,403,630号)等のシクロオキシゲナーゼ2(cyclooxygenase-2)(COX-2)阻害剤; キネレット(Amgen)等のIL-1アンタゴニスト; ILODECAKIN<sup>T</sup>Mを含むIL-10アゴニストを含む。

## 【 0 0 2 8 】

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

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子- 及び- ；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF- 等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF- あるいはTGF- のような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及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、 のようなインターフェロン；マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)及び顆粒球CSF(G-CSF)；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等のインターロイキン(IL)；腫瘍壊死因子、例えばTNF- 又はTNF- ；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

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

「心臓保護剤(cardioprotectant)」は、患者へのアントラサイクリン抗生物質及び/又は抗-ErbB2抗体のような薬剤の投与に關連する心筋機能障害(すなわち心筋症及び/又はうっ血性心不全)を予防する又は減じる化合物或いは組成物である。心臓保護剤は、例えば、フリーラジカル媒介心毒性効果を妨害又は減じ及び/又は酸化ストレス障害を防止或いは減じる。現定義で包含される心臓保護剤の例は、イオンキレート剤dexrazoxane(ICRF-187)(Seifertら, The Annals of Pharmacotherapy 28:1063-1072(1994))；脂肪低減剤及び/又はプロブコール(Singalら, J. Mol. Cell Cardiol. 27:1055-1063(1995))のような抗酸化剤；アミフォスチン(amifostine)(アミノチオール2-[3-アミノプロピル)アミノ]エタンチオール-二水素リン酸塩エステル、またWR-2721と呼ばれている、及びWR-1065と呼ばれる、その脱リン酸化細胞取り込み型)及びS-3-(3-メチルアミノプロピルアミノ)プロピルホスホチオ酸(WR-151327)、Greenら, Cancer Research 54:738-741(1994)を参照のこと；ジゴキシン(Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. Drug-Induced Heart Disease. New York: Elsevier 191-215[1980])；メトプロロール(Hjalmarsonら, Drugs 47: Suppl 4:31-9[1994]；及びShaddyら, Am. Heart J. 129:197-9[1995])のようなベータブロッカー；ビタミンE；アスコルビン酸(ビタミンC)；オレアノール酸、ウルソール酸及びN-アセチルシステイン(NAC)のようなラジカルスカベンジャー；アルファ-フェニル-ブチルニトロン(PBN)のようなスピントラップ化合物(Paracchiniら, Anticancer Res. 13:1607-1612(1993))；P251(Elbesen)のようなセレン有機化合物；類似物を含む。

## 【 0 0 2 9 】

## I I . 抗 E r b B 2 抗体の製造

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

### ( i ) ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、好ましくは、関連する抗原とアジュバントを複数回皮下(s c) 又は腹腔内(i p)注射することにより動物に産生される。免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えばキーホールリンベットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリプシンインヒビターに関連抗原を、二官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基による抱合)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基による)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、S O C 1<sup>2</sup>、又はRとR<sup>1</sup>が異なったアルキル基であるR<sup>1</sup> N = C = N Rにより抱合させることが有用である。

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 μg又は5 μg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫化する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物は、同じ抗原のコンジュゲートであるが、異なったタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なった架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートで追加免疫する。コンジュゲートはまたタンパク融合として組換え細胞培養中で調製することもできる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

### 【 0 0 3 0 】

### ( i i ) モノクローナル抗体

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

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

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

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

好ましい骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な

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

#### 【0031】

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

【0032】

(iii) ヒト化抗体

非ヒト抗体をヒト化する方法は従来からよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, *Nature*, 321:522-525 (1986)、Riechmannほか, *Nature*, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, *Science*, 239:1534-1536(1988))を使用し 10  
て実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は、典型的にはいくらかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要である。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。 20  
次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領域(FR)として受け入れる(Simsほか, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothiaら, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carterほか, *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*, 89:4285 (1992); Prestaほか, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく 30  
知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0033】

以下の実施例3には、Er b B 2に結合し、Er b Bレセプターのリガンド活性化を阻害する例示的なヒト化抗-Er b B 2抗体の作成が記載される。ここで特に対象とするヒト化抗体は、マウスモノクローナル抗体2C4(又はそのFab断片)と実質的に同じくらいの効果でEGF、TGF-及び/又はHRG媒介活性化を阻害し、及び/又はマウスモノクローナル抗体2C4(又はそのFab断片)と実質的に同じくらいの効果でEr b Bに結合する。ここでのヒト化抗体は、例えば、ヒト可変重鎖ドメインに取り込まれた非ヒト高頻度可変領域を含んでいても良く、Kabatら, *Sequences of Protains of Immunol Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)に示す可変ドメインの番号付けに従って、69H、71H及び73Hからなる群から選択される位置で置換されたフレームワーク領域(FR)をされに含んでいてもよい。ある実施態様では、ヒト化抗体は位置69H、71H及び73Hの内の2つ又は全てでFR置換を含む。 40

ここで対象とする例示的なヒト化抗体は、可変重鎖ドメイン相補性決定残基 G F T F T D Y T M X、ここで X は好ましくは D 又は S (配列番号：7)；D V N P N S G G S I Y N Q R F K G (配列番号：8)；及び / 又は N L G P S F Y F D Y (配列番号：9) を含んでなり、場合によっては、これらの C D R 残基のアミノ酸修飾を含んでなり、例えば、実質的に修飾は抗体の親和性を維持又は向上させる。例えば、対象とする抗体変異体は、前記の可変重鎖 C D R 配列で約 1 から約 7 又は約 5 のアミノ酸置換を有していてもよい。このような抗体変異体は、例えば以下に記載されるような親和性成熟により調製されうる。もっとも好ましいヒト化抗体は、配列番号：4 の可変重鎖ドメインアミノ酸配列を含む。

ヒト化抗体は、可変軽鎖ドメイン相補性決定残基 K A S Q D V S I G V A (配列番号：10)；S A S Y X<sup>1</sup> X<sup>2</sup> X<sup>3</sup>、ここで X<sup>1</sup> は好ましくは R 又は L、X<sup>2</sup> は好ましくは Y 又は E、及び X<sup>3</sup> は好ましくは T 又は S (配列番号：11)；及び / 又は Q Q Y Y I Y P Y T (配列番号：12)、例えば更に前段落の可変重鎖ドメイン C D R 残基を含んでなりうる。このようなヒト化抗体は、場合によっては、例えば、抗体の親和性を実質的に維持又は向上させるような前記 C D R 残基のアミノ酸修飾を含む。例えば、対象とする抗体変異体は、前記可変軽鎖 C D R 配列で約 1 から約 7 又は約 5 のアミノ酸置換を有していてもよい。このような抗体変異体は、例えば以下に記載されるような親和性成熟により調製されうる。もっとも好ましいヒト化抗体は、配列番号：3 の可変軽鎖ドメインアミノ酸配列を含む。

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

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

#### 【0034】

##### (i v) ヒト抗体

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

別に、ファージディスプレイ技術(McCaffertyら, Nature 348:552-553(1990))を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インピトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13の大きい又は小さいコートタンパク質遺伝子のいずれかにおいてイン-フレームをクローンする。繊維状粒

10

20

30

40

50

子がファージゲノムの一本鎖のDNAコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択がなされる。よって、ファージはB細胞の特性のいくつかを模倣している。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる；例えばJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3: 564-571(1993)を参照のこと。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clacksonら, *Nature*, 352: 624-628(1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライブラリーからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構成可能で、抗原(自己抗原を含む)とは異なる配列の抗体を、Marksら, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597(1991)、又はGriffithら, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第5,565,332号及び同5,573,905号を参照のこと。

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

ヒト抗-ErbB2抗体は1998年6月30日発行の米国特許第5,772,997号；1997年1月3日公開のW097/00271；及び2001年2月8日公開のW001/09187(Medarex)に記載されている。

#### 【0035】

##### (v) 抗体断片

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennanら, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合して(Fab')<sub>2</sub>断片を形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、(Fab')<sub>2</sub>断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖Fv断片(scFv)である。国際公開第93/16185号；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第5,641,870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状抗体断片は単一特異性又は二重特異性であってもよい。ErbB2に結合する単鎖細胞内抗体(scFv)はW001/56604及び米国特許第6,028,059号に記載されている。

#### 【0036】

##### (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、ErbB2タンパク質の2つの異なるエピトープに結合しうる。他のこのような抗体ではEGFR、ErbB3及び/又はErbB4に対する結合部位と、ErbB2結合部位とが結合しうる。あるいは、抗ErbB2アームは、ErbB2発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)等のIgG(FcR)に対するFcレセプター、又はT細胞レセプター分子(例えばCD2又はCD3)等の白血球上のトリガー分子に結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体はErbB2を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体はErbB2結合アーム及び細胞障害剤(例えば、サポリン(saporin)、抗インターフェロン- $\gamma$ 、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン)と結合するアームを有する。二重特異性抗体は全長抗体又は抗体断片(例えば(Fab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)として調製することができる。

W096/16673には、抗-ErbB2/抗-FcRIII抗体が記載され、米国特許第5,837,234号には、二重特異性抗-ErbB2/抗-FcRI抗体が開示されている。二重特

異性抗-E r b B 2 / F c a 抗体はW098/02463、二重特異性抗-E r b B 2 / 抗-C D 3 抗体を教示する米国特許第5,821,337号に示されている。

二重特異性抗体を作成する方法は当該分野において既知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの鎖は異なる特異性を持っている(Millsteinら, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ(四部雑種)は10個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法がW093/8829及びTraunackerら、EMBO J. 10:3655-3659(1991)に開示されている。

10

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C H 2 及びC H 3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1 )を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

20

#### 【0037】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分には免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、W094/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 1 21:210 (1986)を参照されたい。

30

米国特許第5,731,168号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインのC<sub>H</sub>3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

40

二特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4,676,980号)及びHIV感染の治療(W091/00360、W092/200373及びEP03089)等の用途が提案されてる。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4,676,980号に記載されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')<sub>2</sub>断片を産生する手順を記

50

述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b '断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b '-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b '-チオールに再転換し、他のF a b '-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

#### 【0038】

最近の進歩により、大腸菌からF a b '-S H断片の直接の回収が容易になり、これは科学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Exp. Med., 175:217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F (a b ' )<sub>2</sub>分子の製造を記述している。各F a b '断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役させて二重特異性抗体を形成する。従って、形成された二重特異性抗体は、ヒト乳腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発すると同時に、E r b B 2レセプターを過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞へ結合することが可能であった。

10

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

20

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

30

#### 【0039】

##### (vii) 他のアミノ酸配列の修飾

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

40

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

50

めに、a l a スキャンニング又はランダム突然変異誘発を標的コドン又は領域で実施し、発現された抗-E r b B 2 抗体変異体を所望の活性についてスクリーニングする。

アミノ酸配列挿入は、1 残基から 1 0 0 以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ-及び/又はカルボキシル末端融合物、並びに-又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入物を含む。末端挿入物の例は、N-末端メチオニル残基を持つ抗-E r b B 2 抗体又は細胞障害ポリペプチドに融合した抗体を含む。抗-E r b B 2 抗体分子の他の挿入変異体は、抗体の血清半減期を向上させる酵素(A D E P T)又はポリペプチドの抗-E r b B 2 抗体のN-又はC-末端への融合物を含む。

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

【 0 0 4 0 】

表1

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

【 0 0 4 1 】

抗体の生物学的特性における実質的な修飾は、( a ) 置換領域のポリペプチド骨格の構

10

20

30

40

50

造、例えばシート又はヘリックス構造、(b) 標的部位もしくは(c) 側鎖全体における分子の電荷又は疎水性、を維持する効果において実質的に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けできる：

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

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類のものに交換することが必要であろう。 10

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

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体の一又は複数の高度可変領域残基の置換を含む(例えばヒト化又はヒト抗体)。一般的に、さらなる発展のために選択されて得られた変異体は、それらが生成された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を生成する簡便な方法はファージディスプレイを使用する親和性突然変異である。簡単に述べれば、高度可変領域部位(例えば、6-7部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された抗体変異体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM 1 3 の遺伝子I I I 産物への融合物として一価形式で表示される。ファージディスプレイ変異体は、次いで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾の候補となる高度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャンニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高度可変領域残基を同定することができる。あるいは、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトE r b B 2 との接点を同定するのが有利である。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されたら、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。 20 30

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

#### 【0042】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N-結合又はO-結合の何れかである。N-結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)というトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O-結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。 40

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

抗-E r b B 2 抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、これらに限られないが、天然源から 50

の単離（自然に生じるアミノ酸配列変異体の場合）又はオリゴヌクレオチド媒介（又は部位指向性）突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による初期調製された変異体又は抗-ErbB2抗体の非変異体の調製を含む。

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

Fc領域配列を変異させ、C1q結合を減少または改良した変異型抗体はW099/51642に記載されている。Fc領域配列を変異させ、FcR結合機能を変異させた変異型抗体はW000/42072に記載されている。

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば米国特許第5,739,277号に記載されているようにして、抗体(特に抗体断片)にサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで用いられる場合、用語「サルベージレセプター結合エピトープ」は、IgG分子のインビボ血清半減期を向上させる原因となるIgG分子(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、又はIgG<sub>4</sub>)のFc領域のエピトープを意味する。

【0043】

(viii) 所望の特性を有する抗体のスクリーニング

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

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

例えば、抗-ErbB2抗体によりMCF7乳癌細胞株へのHRG結合の阻害は、以下の実施例1に記載のような24穴プレートフォーマットでの氷上単層MCF7培地を用いて実施されてもよい。抗-ErbB2モノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、30分間インキュベートしてもよい。<sup>125</sup>I標識化rHRG<sub>1177-224</sub>(25pm)を、次に加え、インキュベーションを4から16時間続けてもよい。用量反応曲線が作成され、対象とする抗体のためにIC<sub>50</sub>値を算出する。一実施態様では、ErbBレセプターのリガンド活性化を阻害する抗体は、このアッセイで約50nM以下の、より好ましくは約10nM以下のMCF7細胞へのHRG結合抑制のIC<sub>50</sub>を有しうる。抗体が、Fab断片のような抗体断片である場合、このアッセイにおけるMCF7細胞へのHRG結合抑制のIC<sub>50</sub>は、例えば約100nM以下、より好ましくは50nM以下である。

あるいは、又は更に加えて、ErbBヘテロ-オリゴマーに存在するErbBレセプターのErbBリガンド刺激性チロシンリン酸化を阻害する抗-ErbB2抗体の能力が評価されうる。例えば、ErbBレセプターを内性的に発現する又はそれらを発現するように形質移入された細胞は、抗体と共にインキュベートされ、次いでErbBリガンド依存性チロシンリン酸化活性を抗-ホスホチロシンモノクローナル(場合によっては、検出可能

10

20

30

40

50

なラベルとコンジュゲートされたもの)を用いてアッセイされる。米国特許第5,766,863号に記載されるキナーゼレセプター活性アッセイもまた、E r b Bレセプター活性化及び抗体による該活性の阻害を測定するのに利用できる。

#### 【0044】

一実施態様では、以下の実施例1に記載されるような本来M C F 7細胞のp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G促進を阻害する抗体をスクリーニングしてもよい。例えば、M C F 7細胞を24穴プレートに蒔き、E r b B 2に対するモノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、室温で30分間インキュベートし；次いで最終濃度が0.2 n Mになるようにr H R G 1<sub>177-224</sub>をそれぞれの穴に加え、インキュベーションを8分間続けてもよい。培地をそれぞれの穴から吸引し、100 µ lのS D Sサンプル緩衝液(5% S D S、25 m M D T T、及び25 m M トリス-H C l、p H 6.8)を加えることで、反応を終了させる。それぞれのサンプル(25 µ l)を、4-12%勾配ゲル(N o v e x)で電気泳動し、ニフ化ビニリデン膜に電気泳動的に形質移入してもよい。抗リン酸化チロシン(1 µ g/ml)免疫プロットが進み、M r ~ 180,000の顕著な活性バンドの強度が反射率濃度測定により定量されうる。選択された抗体は、好ましくはこのアッセイのコントロールの約0-35%まで、p 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激を有意に抑制する。反射率濃度測定により決定されたp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激抑制の用量反応曲線が作成され、対象とする抗体のためにI C<sub>50</sub>値を算出してもよい。一実施態様では、E r b Bレセプターのリガンド活性化を阻害する抗体は、このアッセイで約50 n M以下の、より好ましくは約10 n M以下のp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激抑制のI C<sub>50</sub>を有しうる。抗体が、F a b断片のような抗体断片である場合、このアッセイにおけるp 1 8 0チロシンリン酸化のH R G刺激抑制のI C<sub>50</sub>は、例えば約100 n M以下、より好ましくは50 n M以下である。

例えば、基本的にSchaeferら、Oncogene 15:1385-1394(1997)に記載されているように、M D A - M B - 1 7 5細胞での抗体の成長抑制効果を調べてもよい。このアッセイによると、M D A - M B - 1 7 5細胞は抗-E r b B 2モノクローナル抗体(10 µ g/ml)で4日間処理され、クリスタルバイオレットで染色した。抗-E r b B 2抗体とのインキュベーションにより、この細胞株での成長抑制効果はモノクローナル抗体2 C 4により示されたものと同じように示されうる。更なる実施態様においては、外因性H R Gはこの抑制を有意に反転させない。好ましくは、抗体は、外因性H R Gのある又は無い両方の状態で、モノクローナル抗体4 D 5よりも広範囲に(及び場合によってはモノクローナル抗体7 F 3よりも広範囲に)M D A - M B - 1 7 5細胞の細胞増殖を抑制することができるであろう。

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

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

#### 【0045】

10

20

30

40

50

細胞死を誘発する抗体を選択するために、例えばPI、トリパンブルー又は7AADの取込みにより示される膜インテグリティの損失度合いをコントロールと比較して求める。好ましいアッセイは「BT474細胞を使用するPI取込みアッセイ」である。このアッセイでは、BT474細胞(アメリカン・タイプ・カルチュア・コレクション[Rockville, MD])が、ダルベッコの変性イーグル培地(D-MEM)；10%の熱不活性化FBS(Hyclone)と2mMのL-グルタミンを補ったハムのF-12(50:50)で培養される。(従って、アッセイは補体及び免疫エフェクター細胞の不在下で行われる)。BT474細胞を100×20mm皿に、皿当たり $3 \times 10^6$ の密度で播種し、一晚付着させたままにする。ついで培地を除去し、新しい培地を単独で、又は10 $\mu$ g/mlの適切なMAbを含む培地と取り替える。細胞を3日間インキュベートする。各処理に続いて、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により分離する。ついで、1200rpm、5分間、4で細胞を遠心分離し、ペレットを3mlのCa<sup>2+</sup>結合氷冷バッファ(10mMのHepes、pH7.4、140mMのNaCl、2.5mMのCaCl<sub>2</sub>)に再懸濁させ、細胞凝塊除去のために35mmのストレーナキャップ付き12×75チューブ(チューブ当たり1ml、処理グループ当り3チューブ)に等分する。サンプルをFACSCAN(商品名)フローサイトメータとFACSCONVERT(商品名)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析する。PI取込みにより測定されるような、統計的に有意なレベルの細胞死を誘発する抗体が選択される。

10

アポトーシスを誘発する抗体を選択するためには、BT474細胞を使用するアネキシン結合アッセイが利用できる。BT474細胞を培養し、先の段落において記載したように皿に播種する。ついで培地を回収し、新しい培地を単独で、又は10 $\mu$ g/mlの適切なMAbを含む培地と取り替える。3日間インキュベートした後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理により分離する。ついで細胞を遠心分離し、Ca<sup>2+</sup>結合氷冷バッファに再懸濁させ、細胞死アッセイに対して上述したようにチューブに等分する。ついでチューブに標識化アネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1 $\mu$ g/ml)を入れる。サンプルをFACSCAN(商品名)フローサイトメータとFACSCONVERT(商品名)セルクエスト(CellQuest)ソフトウェア(Becton Dickinson)を使用して分析する。対照に対して、統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘発する抗体がアポトーシス誘発抗体として選択される。

20

アネキシン結合アッセイに加えて、BT474細胞を使用するDNA染色アッセイが利用できる。このアッセイを行うために、先の2段落に記載したように関心のある抗体で処理されたBT474細胞を、37で2時間、9 $\mu$ g/mlのHOECHST33342(商品名)と共にインキュベートし、ついでMODFITLT(商品名)ソフトウェア(Verity Software House)を使用し、EPICSELITE(商品名)フローサイトメータ(Coulter Corporation)で分析する。このアッセイを使用し、未処理細胞(最大100%のアポトーシス細胞)よりも2倍又はそれ以上(好ましくは3倍以上)のアポトーシス細胞のパーセンテージの変化を誘発する抗体が、プロアポトーシス抗体として選択される。

30

関心のある抗体により結合したErbb2上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするため、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及びDavid Lane編(1988)に記載されているような通常の交差ブロッキングアッセイを実施することができる。別法として、従来から公知の方法により、エピトープマッピングを実施することもできる(例えば、ここでFig. 1A及び1B参照)。

40

【0046】

(ix) 免疫コンジュゲート

また本発明はここで記載され、細胞障害剤、例えば化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物または動物由来の酵素活性毒又はそれらの断片)、又は放射性アイソトープ(すなわち、放射性コンジュゲート)に抱合した抗体を含有する免疫コンジュゲートに関する。

このような免疫コンジュゲートの生成に有用な化学療法剤は上述している。抗体のコンジュゲート及び一つ以上の小分子毒素、例えばカリケアミシン(calicheamicin)、マイタ

50

ンシン(maytansine)(米国特許第5,208,020号)、トリコテン(trichothene)及びCC1065もここにおいて考慮される。

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

その他の対象免疫コンジュゲートは、一つ以上のカリケアマイシン(calicheamicin)分子と共役している抗ErB2抗体を包含する。抗体のカリケアマイシンファミリーは、サブピコモル濃度で、二重鎖DNAの割れ目を作ることができる。使用されるであろうカリケアマイシンの構造類似体は、限定されるものではないが、 $1^I$ 、 $2^I$ 、 $3^I$ 、N-アセチル $1^I$ 、PSAG及び $1^I$ (Hinmanら, Cancer Research 53:3336-3342(1993)及びLodeら, Cancer Research 58:2925-2928(1998))を含む。また、米国特許第5,714,586号; 5,712,374号; 5,264,586号; 及び5,773,001号参照、文献明示によりここに取り込む。

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

#### 【0047】

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

種々の放射性核種が放射性コンジュゲート抗ErB2抗体の生成に利用できる。具体例にはAt $^{211}$ 、I $^{131}$ 、I $^{125}$ 、Y $^{90}$ 、Re $^{186}$ 、Sm $^{153}$ 、Bi $^{212}$ 、P $^{32}$ 及びLuの放射線各種が含まれる。

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

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

10

20

30

40

50

あるいは、抗 E r b B 2 抗体及び細胞毒性剤を含んでなる融合タンパク質を、例えば組み換え技術又はペプチド合成で製造してもよい。ケモカイン（例えば、RANTES）と融合した抗 E r b B 2 抗体の免疫コンジュゲートは W098/33914 に記載されている。

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

#### 【 0 0 4 8 】

##### ( x ) 抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ治療法 ( A D E P T )

また、本発明の抗体は、プロドラッグ（例えばペプチジル化学療法剤、W081/01145 を参照）を活性化酵素に転化させるプロドラッグ活性化酵素に抗体をコンジュゲートさせることにより、A D E P T において使用することができる。例えば W088/07378 及び米国特許第 4,975,278 号を参照されたい。

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

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

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

#### 【 0 0 4 9 】

##### ( x i ) 他の抗体修飾

抗体の他の修飾がここで検討される。例えば、抗体は、様々な非タンパク質性 (nonproteinaceous) のポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン類、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーの 1 つに結合されてもよい。また抗体は、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術は Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol 編 (198

10

20

30

40

50

0)に開示されている。

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

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

【0050】

### III. 医薬製剤

本発明で使用される抗体の治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能なキャリア、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する抗体とを混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol, Ed., [1980])、調製され保管される。許容できる担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液; アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤; 防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド; 塩化ヘキサメトニウム; 塩化ベンズアルコニウム; 塩化ベンゼトニウム; フェノール、ブチル又はベンジルアルコール; アルキルパラベン類、例えばメチル又はプロピルパラベン; カテコール; レゾルシノール; シクロヘキサノール; 3-ペンタノール; 及びm-クレゾール); 低分子量(残基数10個未満)ポリペプチド; 血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質; ポリビニルピロリドン等の親水性重合体; グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、ヒスチジン又はリシン等のアミノ酸; グルコース、マンノース又はデキストリン等の単糖類、二糖類又は他の炭水化物、EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖類、ナトリウム等の塩形成対イオン; 金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体); 及び/又はTWEEN(商品名)、PLURONICS(商品名)又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。好ましい凍結乾燥抗-ErbB2抗体の形態は、W097/04801に記載され、文献明示によりここに取り込む。

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

また活性成分は、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンに捕捉することができる。このような技術はRemington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, A. Osol編(1980)に開示されている。

徐放性調製物を調製してもよい。徐放性調製物の適切な例には、抗体を含む固体疎水性重合体の半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスはフィルム又はマイクロカプセル

10

20

30

40

50

ル等の成形品の形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えばポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸とD-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注入可能なマイクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

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

#### 【0051】

IV. 抗Erbb2抗体を用いた治療

本発明によれば、抗Erbb2抗体を、様々な非悪性疾患および疾患の治療に使用することが考えられている。

疾病又は疾患の例として、自己免疫疾患(例えば、乾癬)、前述参照;子宮内膜症;強皮症;再狭窄;大腸ポリープ、鼻ポリープ、または消化管ポリープ等のポリープ;線維腺腫;呼吸器疾患(前述参照);胆嚢炎;神経線維腫症;多発性嚢胞腎疾患;炎症性疾患;乾癬および皮膚炎を含む皮膚疾患;血管系疾患(前述参照);血管上皮細胞の異常増殖が関与する症状;炎症性腸疾患;メネトリ工病、分泌性腺腫、またはタンパク質減少症;副腎性疾患;血管形成性疾患;老年性黄斑変性症、予測される眼性ヒストプラズマ症候群(presumed ocular histoplasmosis syndrome)、増殖性糖尿病網膜症由来の網膜血管新生、網膜血管新生、糖尿病網膜症、または老年性黄斑変性症等の眼疾患;変形性関節症、くる病および骨粗鬆症等の骨関連病変;脳虚血後障害;肝硬変、肺線維症、サルコイドーシス、甲状腺炎、全身性高粘性症候群(hyperviscosity syndrome systemic)、オースラー-ウェーバー-ランデュ病、慢性閉塞性肺疾患、または火傷、外傷、放射線、脳卒中、低酸素症、または虚血などの線維性または浮腫疾患;皮膚の過敏症反応;糖尿病性網膜症および糖尿病性腎症;ギラン-バレー症候群;移植片対宿主病または移植片拒絶反応;パジェット病;骨または関節炎;フォトエイジング(例えば、ヒトの皮膚のUV照射);良性前立腺肥大;アデノウイルス、ハンタウイルス、ライム病菌、エルシニア菌、および百日咳菌から選択した微生物性病原体を含む微生物感染症;血小板凝集による血栓;子宮内膜症、卵巣過剰刺激症候群、子宮前症、機能不全子宮出血、または機能性子宮出血等の生殖性症状;滑膜炎;急性および慢性腎症(増殖性糸球体腎炎および糖尿病誘発性腎性疾患を含む);湿疹;肥大性癍痕形成;内毒性ショック(endotoxic shock)および真菌感染;家族性大腸ポリープ症;神経変性疾患(例えば、アルツハイマー氏病、AIDS関連認知症、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、網膜色素変性症、脊髄性筋萎縮症、および小脳変性症);骨髄異形成症候群;再生不良性貧血;虚血性損傷;肺、腎臓、または肝臓の線維症;T細胞媒介性過敏症疾患;乳児肥大性幽門狭窄(infantile hypertrophic pyloric stenosis);泌尿器系閉塞性症候群;乾癬性関節炎;および橋本甲状腺炎を含む。

#### 【0052】

ここでの治療に好ましい症状には、乾癬、子宮内膜症、強皮症、血管系疾患(例えば、再狭窄、アテローム動脈硬化、冠動脈疾患、または高血圧)、大腸ポリープ、線維腺腫、または呼吸器疾患(例えば、喘息、気管支炎(bronchitis、bronchieactasis)、嚢胞性線維症)を含む。

一般に患者は、例えば患部組織などに、抗Erbb2抗体が患者体内の細胞に結合できるように、Erbb2発現細胞を有する。

Erbb2レセプター、例えば、EGFR、またはErbb2リガンドの異常活性化または発現は、患者細胞、例えば患者の患部組織において起こりうる。Erbb2レセプターの異常活性化は、Erbb2レセプター及び/又はErbb2リガンドの増幅、過剰発現、又は異常産生に起因しうる。本発明の一実施態様では、診断又は予後アッセイは、Erbb2レセプター(又はErbb2リガンド)の異常産生又は活性化が患者に起こっているかどうかを検出することによる。例えば、Erbb2レセプター及び/又はリガンドの遺伝子増幅及び/又は過剰発現が決定されるであろう。そのような増幅/過剰発現を決定するための様々

10

20

30

40

50

なアッセイは、当業者に有用であり、前述したようにIHC、FISH、及びシエッド(s hed)抗体アッセイが含まれる。あるいは、又は加えて、試料中又は試料付属物におけるTGF-等のErbbリガンドレベルは公知の手順により決定される。そのようなアッセイは、試験しようとする試料中におけるタンパク質及び/又はそれをコードする核酸を検出するものである。一実施態様では、試料中のErbbリガンドレベルは、免疫組織化学(IHC)(例としてScherら, Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995)を参照)を用いて決定されうる。あるいは、又は加えて、試験しようとする試料中のErbbリガンドコード化核酸のレベルは、例えば、FISH、サザンブロット法、又はPCR技術によって可能である。

さらに、ErbbレセプターまたはErbbリガンドの過剰発現または増幅は、インビボ診断アッセイ、例えば、検出しようとする分子に結合し、検出用標識(例えば、放射性同位体)に結合させた分子(抗体など)を投与して、標識の局在化を外的にスキャンすることによって評価可能である。

#### 【0053】

あるいは、Erbbヘテロダイマー、特にEGFR-Erbb2、Erbb2-Erbb3、又はErbb2-Erbb4ヘテロダイマーを治療前に患者、例えば患者の患部組織において検出する。非共有結合のタンパク質-タンパク質相互作用、又は対象のタンパク質間に近接を示す他の作用を検出するには様々な方法が有用である。Erbbヘテロダイマーを検出する例示的方法には、免疫沈降法などの免疫親和性に基づく方法；蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)(Selvin, Nat. Struct. Biol., 7:730-34 (2000); GadellaおよびJovin, J Cell Biol. 129:1543-58 (1995); およびNagyら, Cytonaetiy 32:120-131 (1998))；標準的な直接又は非直接的蛍光抗体技術及び共焦点レーザー顕微鏡を用いたEGFR又はErbb3によるErbb2の共局在化；直接抗体結合法に対するレーザー走査画像法(laser scanning imaging)(LSI)及びハイスループット法におけるEGFR又はErbb3いずれかによるErbb2の共局在化、例としてマイクロウェルプレート(Zuckら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11122-27 (1999))；またはeTag<sup>TM</sup>アッセイ系(Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA; および2001年12月6日発行の米国特許出願公開第2001/0049105号)等、制限なく含まれる。

抗-Erbb2抗体を、例えばポラスのような又はある期間の連続注入による静脈注射、筋肉内、腹膜内、脳髄内、皮下、関節内、滑膜内、クモ膜下腔内、経口、局所、又は吸入によるような既知の方法によってヒト患者に投与される。静脈または皮下的抗体投与が好ましい。

他の治療法を、抗-Erbb2抗体の投与と組み合わせてもよい。組み合わせ投与は、別々の形態又は単一の製薬形態を用いた同時投与、及び好ましくは両方の(又は全てが)それらの生物学的活性を同時に発揮するような期間をもったそれぞれの順序での連続投与を含む。

一つの好ましい実施態様では、患者は2つの異なる抗-Erbb2抗体で治療される。例えば、患者は、Erbbレセプターのリガンド活性化を阻害する第1の抗-Erbb2抗体、又はモノクローナル抗体2C4、並びに成長抑制のある第2の抗-Erbb2抗体(例えば、ハーセプチン(登録商標))又はErbb2過剰発現細胞のアポトーシスを促進する抗-Erbb2抗体(例えば7C2、7F3又はそのヒト化変異体)の生物学的活性を有する抗体で治療されてもよい。好ましくはこのような組み合わせ治療は、相乗的な治療効果を生じる。例えば、ハーセプチン治療に应答しない患者を、ハーセプチン(登録商標)で治療した後、rhuma2C4で治療する。他の実施態様では、患者をまずrhuma2C4で処置してからハーセプチン(登録商標)治療を行う。また更に好ましい実施態様では、患者はrhuma2C4とハーセプチン(登録商標)の両方で同時に治療されうる。

また、EGFR、Erbb3、Erbb4、又は血管内皮増殖因子(VEGF)に対する抗体の投与とともに、抗-Erbb2抗体または複数の抗体を組み合わせることが望まれる。

#### 【0054】

10

20

30

40

50

一実施態様では、本発明の治療は、抗-ErbB2抗体（または複数の抗体）、および一又は複数の化学療法剤、細胞障害性剤、又は成長阻害剤の組み合わせ投与を含んでなるものであり、異なる化学療法剤のカクテル同時投与を含む。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の指示に従って使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは、Chemotherapy Service M.C.Perry編，Williams & Wilkins，Baltimore，MD(1992)に記載されている。

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

10

#### 【0055】

ときに、心臓保護剤(治療に関する心筋機能障害を防止する又は減少するために)又は一又は複数のサイトカインを患者に同時投与することも適している。またEGFR標的薬又は抗-血管形成剤を同時投与してもよい。前記の治療法に加えて、患者は、癌細胞の取り出し手術及び/又は放射線治療を受けてもよい。

ここでの抗-ErbB2抗体はまた、相補的な、及び潜在的に相乗的な治療効果を生じるように、定義の章で前記したようなEGFR-標的薬、チロシンキナーゼ阻害剤及び/又は免疫抑制剤と組み合わせてもよい。

前記の同時投与される任意の薬剤の適した投与量は、現在使用されている投与量で、薬剤と抗-ErbB2抗体の組み合わせ作用(相乗効果)に応じて少なくともてもよい。

20

病気の予防又は治療のための抗体の適切な投与量は、上述するように、治療される病気の種類、病気の重症度及び過程、抗体を防止目的で投与するのか治療目的で投与するのか、過去の治療、患者の臨床歴及び抗体の応答性、手当てをする医師の裁量に依存するであろう。抗体は一度に又は一連の処置にわたって患者に適切に投与される。病気の種類及び重症度に応じて、疾患のタイプや重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与又は連続注入のいずれであれ、約1µg/kgないし15mg/kg(例えば、好ましくは約0.1、又は0.5-約20又は30mg/kg)の抗体が患者への最初の投与量の候補である。上述した因子に応じて、典型的な一日の投与量は約1µg/kgから100mg/kgあるいはそれ以上の範囲である。数日間又はそれ以上の繰り返し投与の場合、症状に応じて、病気の徴候の望ましい抑制が生じるまで処置を維持する。抗体の好ましい投与量は、約0.5mg/kgから約30mg/kgの範囲であろう。従って、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、6mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、又は15mg/kgの一又は複数の用量(又はその任意の組み合わせ)で、患者に投与されてもよい。これらの用量は、断続的に、例えば、毎週又は3週間毎、毎月又は3又は4か月毎に投与されうる(例えば、患者は、ErbB2抗体の約2から約20、例えば約6用量を受ける)。高い初負荷用量は、一又は複数の低用量の後に投与されうる。例示的な用法は、約4mg/kgの初負荷用量を、毎週約2mg/kgの抗-ErbB2抗体を維持した後に投与することを含む。しかしながら、他の投薬計画も有効であろう。この治療の進行状態は通常の技術やアッセイで容易にモニターされる。

30

#### 【0056】

抗体及び/又は補助療法の「治療的有効量」とは、経験のある医師によって決定される。例えば、元の状態と比較して、乾癬については、医師の包括的評価(Physician's Global Assessment)(PGA)変化及び/又は乾癬領域及び重症度インデックス(Psoriasis Area and Severity Index)(PASI)スコアを改善する抗体及び/又は付加的に投与する薬剤の量；子宮内膜症については痛みを軽減、及び/又は子宮内膜症の病変を軽減する抗体及び/又は付加的に投与する薬剤の量；血管疾患については、経皮的冠動脈形成術(PTCA)の繰り返し処置の必要を減少させる、及び/又は管腔サイズが改善される抗体及び/又は付加的に投与する薬剤の量；呼吸疾患については、肺機能(例えば、1秒量の努力呼気量(FEV1)、努力肺活量(FVC)、セント・ジョージ呼吸質問表、及び/又は呼吸困難スコア)等を改善する抗体及び/又は付加的に投与する薬剤の量である。

40

50

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

患者への抗体タンパク質の投与のみならず、本出願は、遺伝子療法による抗体の投与についても検討する。抗体をコードする核酸のこのような投与は、「治療的効果量の抗体の投与」という表現に包含される。例えば、1996年3月14日に公開の W096/07321、および遺伝子治療により投与される H E R 2 に対する抗体に関する2001年8月9日公開の W001/56604 参照。

#### 【 0 0 5 7 】

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

現在インビボ核酸移入技術で好ましいのは、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、又はアデノ関連ウイルス)、及び脂質ベースの系(例えば、遺伝子の脂質媒介移入に有用な脂質は、例えば、D O T M A、D O P E、及びD C - C h o lである)での形質移入を含む。幾つかの状況では、核酸供給源を標的細胞をターゲティングする薬剤、例えば細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体又は標的細胞上のレセプターのリガンドなどとともに提供するのが望ましい。リボソームが用いられる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質が、ターゲティング及び/又は取り込みの促進のために用いられ、例えば、特定の細胞型向性のキャプシドタンパク質又はその断片、サイクリングにおいて内部移行を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内局在化をターゲティングし細胞内半減期を向上させるタンパク質である。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wu等, J. Biol. Chem., 262:4429-4432 (1987)及びWagner等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990)に記載されている。現在知られている遺伝子標識化及び遺伝子治療プロトコールの概説については、Anderson等, Science, 256:808-813 (1992)を参照のこと。また、W0 93/25673及びそこに引用された参考文献も参照。

#### 【 0 0 5 8 】

##### V . 製造品

本発明の他の実施態様では、前述した疾患の治療に有用な物質を含有する製造品が提供される。製造品は容器、ラベル及びパッケージ挿入物を含んでなる。適切な容器には、例えばボトル、ガラス瓶、シリンジ等が含まれる。容器はガラス又はプラスチックのような様々な材料で形成することができる。容器は病状の治療に有効な組成物を収容しており、滅菌した出入口を有している(例えば、容器は皮下注射針により貫通可能なストッパーを具備する静脈溶液用のバック又はガラス瓶であってよい)。組成物中の少なくとも1つの活性剤は抗 - E r b B 2 抗体である。ラベル又はパッケージ挿入物には、組成物が、選択された病状、例えば E r b B レセプターの異常活性化又は産生及び/又は良性過剰増殖性

10

20

30

40

50

疾病又は疾患が関与する非悪性疾患又は疾患の治療に使用されることが示されている。更に製造品は、(a) E r b B 2 に結合し、E r b B 2 を過剰発現する細胞の成長を抑制する第1の抗体を含んでなる組成物である、容器内に含有された該組成物を有する第1の該容器；及び(b) E r b B 2 に結合してE r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する第2の抗体を含んでなる組成物である、容器内に含有された該組成物を有する第2の該容器を含んでなるものでもよい。本発明の該実施態様の製造品は、第1及び第2の抗体組成物が前節で定義したような疾病又は疾患由来の非悪性疾患又は疾患の治療に使用できることが記載されるパッケージ挿入物を更に含んでいてもよい。更に、パッケージ挿入物は、組成物(E r b B 2 に結合してE r b B レセプターのリガンド活性化を阻害する抗体を含む)の使用者に、抗体を用いた治療と前節に記載した任意の補助的治療(例えば、化学療法剤、E G F R 標的薬、抗血管形成剤、免疫抑制剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗-ホルモン化合物、心臓保護剤及び/又はサイトカイン)と組み合わせることを説明していてもよい。あるいは、又は加えて、製造品は、製薬的に許容可能なバッファー、例えば、注入のための静菌性水(B W F I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロース溶液を収容する第2(又は第3)の容器をさらに具備する。さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、市販及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでいてもよい。

10

## 【0059】

## V I I I . 材料の寄託

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

20

抗体名	ATCC 番号	寄託日
7 C 2	ATCC HB-12215	1996年10月17日
7 F 3	ATCC HB-12216	1996年10月17日
4 D 5	ATCC CRL 10463	1990年5月24日
2 C 4	ATCC HB-12697	1999年4月8日

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

## 【0060】

## 実施例 1

## モノクローナル抗体 2 C 4 の作成と特徴付け

E r b B 2 の細胞外ドメインに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体 2 C 4、7 F 3 及び 4 D 5 を、Fendlyら, Cancer Research 50:1550-1558(1990)に記載されているようにして作成した。簡単には、Hudziakら, Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)84:7158-7163(1987)に記載されているようにして作成された N I H 3 T 3 / H E R 2 - 3 4 0 0 細胞(約  $1 \times 10^5$  E r b B 2 分子/細胞を発現)を 2 5 m M の E D T A を含有するリン酸緩衝食塩水(P B S)で収集し、B A L B / c マウスを免疫化するために使用した。マウスに、0、2、5 及び 7 週に、0 . 5 m l の P B S に  $10^7$  細胞が入ったものを腹腔内注射した。<sup>3 2</sup> P 標識化 E r b B 2 を免疫沈降させた抗血清を有するマウスに、9 及び 1 3 週に、小麦芽凝集素-セファロース(W G A)精製 E r b B 2 膜抽出物を腹腔内注射した。続いて 0 . 1 m l の E r b B 2 調製物を静脈内注射し、脾細胞をマウス骨髄腫株 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 と融合させた。

30

40

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

モノクローナル抗体 2 C 4、7 F 3 及び 4 D 5 に結合される E r b B 2 エピトープを、競合結合分析により決定した(Findlyら Cancer Research 50:1550-1558(1990))。交差阻害研究は、量的蛍光のための P A N D E X (商品名)スクリーン機を用いて完全な細胞上で蛍光検定することにより、抗体で実施された。それぞれのモノクローナル抗体は、確立した方法(Wofsyら Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287, Mishel and Schiigi

50

(eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980))を用いて、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)とコンジュゲートした。NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub>細胞の集密的な単層をトリプシン処理し、1回洗浄し、更に0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)及び0.1%NaN<sub>3</sub>を含有する冷たいPBS中に、 $1.75 \times 10^6$ 細胞/mlで再懸濁した。最終濃度1%のラテックス粒子(IDC、ポートランド、OR)をPANDEX(商品名)プレート膜の目詰まりを減少させるために追加した。懸濁液中の細胞、20 $\mu$ l、及び20 $\mu$ lの精製モノクローナル抗体(100 $\mu$ g/mlから0.1 $\mu$ g/ml)をPANDEX(商品名)プレートの穴に加え、30分間氷上でインキュベートした。所定希釈のFITC標識されたモノクローナル抗体20 $\mu$ lをそれぞれの穴に加え、30分間インキュベートし、洗浄し、更に蛍光がPANDEX(商品名)で定量された。モノクローナル抗体は、無関係なモノクローナル抗体コントロールに比較して50%又はそれ以上で他の結合をそれぞれ阻害した場合に、エピトープを共有するとみなされた。この実験において、モノクローナル抗体4D5、7F3及び2C4はそれぞれ、エピトープI、G/F及びFを指定した。  
【0061】

モノクローナル抗体2C4、7F3及び4D5の成長抑制特性は、乳癌細胞株、SK-BR-3(Hudziakら Molec. Cell. Biol. 9(3):1165-1172(1989)参照)を用いて評価された。簡単には、SK-BR-3細胞を0.25%(vol/vol)トリプシンで検定し、 $4 \times 10^5$ 細胞/mlの密度で培地体に完全に懸濁した。100 $\mu$ l( $4 \times 10^4$ 細胞)に等分したものを96穴微量希釈プレートに入れ、細胞を付着させ、ついで培地のみ又はモノクローナル抗体を含有する培地(最終濃度5 $\mu$ g/ml)100 $\mu$ lを加えた。72時間後、プレートをPBS(pH7.5)で2回洗浄し、クリスタルバイオレット(メタノール中0.5%)で染色し、Sugarmanら Science 230:943-945(1985)に記載されたようにして関連のある細胞増殖を分析した。モノクローナル抗体2C4及び7F3はSK-BR-3関連細胞増殖をそれぞれ約20%及び約38%阻害したのに比べて、モノクローナル抗体4D5は56%阻害した。

モノクローナル抗体2C4、4D5及び7F3を、MCF7細胞の全細胞溶解物からのM<sub>r</sub>180,000の範囲のタンパク質のHRG促進性チロシンリン酸化を阻害する能力について評価した(Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996))。MCF7細胞は既知のErbbレセプターをすべて発現するが、比較的低いレベルであることが報告されている。Erbb2、Erbb3、及びErbb4はほとんど同一の分子サイズを有し、全細胞溶解物をウエスタンブロット分析で評価する場合、タンパク質がリン酸化チロシンであると識別することはできない。

しかしながら、これらの細胞は、外因性付加HRGが無い状態で使用されるアッセイ条件下で、それらがM<sub>r</sub>180,000の範囲でチロシンリン酸化タンパク質の検出不可能な程低いレベルを示すために、HRGチロシンリン酸化アッセイに理想的である。

#### 【0062】

MCF7細胞を24穴プレートに蒔き、Erbb2に対するモノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、室温で30分間インキュベートした；次いでrHRG<sub>1177-244</sub>を0.2nMの最終濃度になるまでそれぞれの穴に加え、インキュベーションを8分続けた。培地をそれぞれの穴から注意深く取り除き、100 $\mu$ lのSDSサンプル緩衝液(5%SDS、25mM DTT、及び25mM トリス-HCl、pH6.8)の付加により反応を停止した。それぞれのサンプル(25 $\mu$ l)を4-12%勾配ゲル(Novex)で電気泳動し、次いでニフツ化ポリビニリデン膜に電気泳動的に移動した。前記したように(Holmesら Science 256:1205-1210(1992); Sliwkowskiら J. Biol. Chem. 269:14661-14665(1994))、抗リン酸化チロシン(4G10、UBI由来、1 $\mu$ g/mlで使用)イムノブロットを進め、M<sub>r</sub>~180,000で顕著な反応バンドの強度を反射率濃度で定量した。

モノクローナル抗体2C4、7F3及び4D5は、M<sub>r</sub>180,000でHRG促進チロシンリン酸化シグナルの生成を有意に抑制した。HRGの無い場合、これらの抗体はM<sub>r</sub>180,000の範囲のタンパク質のチロシンリン酸化を促進することができない。また、これらの抗体は、EGFR(Fendlyら Cancer Research 50:1550-1558(1990))、Erbb3、又は

10

20

30

40

50

ErbbB4と交差反応しない。抗体2C4及び7F3はコントロールの<25%でp180チロシンリン酸化のHRG促進を有意に阻害した。モノクローナル抗体4D5は、~50%までチロシンリン酸化のHRG促進を阻害することができた。Fig. 2Aは反射率濃度に決定されるp180チロシンリン酸化のHRG促進の2C4又は7F3阻害曲線を示す。4パラメーターフィットを用いたこれらの抑制曲線の評価から、それぞれ2C4及び7F3の $2.8 \pm 0.7$  nM及び $29.0 \pm 4.1$  nMのIC<sub>50</sub>を得た。

#### 【0063】

抗-ErbbB2抗体によるMCF7乳癌細胞株へのHRG結合の抑制は、24穴プレート形態の氷上単層培地で実施された(Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996))。抗-ErbbB2モノクローナル抗体をそれぞれの穴に加え、30分間インキュベートした。<sup>125</sup>I-標識rHRG<sub>1177-224</sub>(25 pm)が加えられ、インキュベーションを4から16時間続けた。Fig. 2Bには、MCF7細胞に対するHRG結合の2C4又は7F3抑制の用量・反応曲線が示される。様々な濃度の2C4又は7F3を<sup>125</sup>I-標識rHRG<sub>1</sub>の存在した状態でMCF7細胞とインキュベートし、抑制曲線をFig. 2Bに示した。これらのデータの分析から、それぞれ2C4及び7F3の $2.4 \pm 0.3$  nM及び $19.0 \pm 7.3$  nMのIC<sub>50</sub>を得た。2C4及び7F3の最大抑制~74%は、チロシンリン酸化のデータと一致していた。

MCF7細胞で見られる抗-ErbbB2抗体の効果が一般的な減少であるかどうかを決定するために、ヒト腫瘍細胞株を2C4又は7F3と共にインキュベートし、特定の<sup>125</sup>I-標識rHRG<sub>1</sub>結合の程度が決定された(Lewisら Cancer Research 56:1457-1465(1996))。この研究の結果は、Fig. 3に示される。ErbbB2をほとんど又は全く発現しないと報告されている乳癌細胞株MDA-MB-468を除いて、すべての細胞株で2C4又は7F3のどちらかにより<sup>125</sup>I-標識rHRG<sub>1</sub>の結合を有意に抑制することができた。残りの細胞株においては、これらの細胞株にわたって広く変化するErbbB2発現のレベルで、ErbbB2を発現することが報告される。実際に、試験された細胞株中のErbbB2発現の程度は、2桁以上にまで変化する。例えば、BT-474及びSK-BR-3が $\sim 10^6$  ErbbB2レセプター/細胞を発現するのに対して、BT-20、MCF7、及びCaov3は、 $\sim 10^4$  ErbbB2レセプター/細胞を発現する。これらの細胞の広範囲のErbbB2発現及び前記のデータから、ErbbB2とErbbB3又はErbbB4の間の相互作用はそれ自体、原形質膜の表面にある高親和性相互作用であることが推論される。

#### 【0064】

外因性rHRG<sub>1</sub>がある場合とない場合とで、MDA-MB-175及びSK-BR-3細胞上でのモノクローナル抗体2C4及び4D5の成長抑制効果を測定した(Schaeferら Oncogene 15:1385-1394(1997))。MDA-MB-175細胞のErbbB2レベルは、通常の乳房上皮細胞で見られるレベルよりも4-6倍高く、ErbbB2-ErbbB4レセプターは構成的にMDA-MB-175細胞のリン酸化チロシンである。MDA-MB-175細胞は抗-ErbbB2モノクローナル抗体2C4及び4D5(10 µg/ml)と4日間処理された。クリスタルバイオレット染色アッセイにおいて、2C4でのインキュベーションはこの細胞株での強い成長抑制効果を示した(Fig. 4A)。外因性HRGはこの抑制を有意には反転しない。言い換えると、2C4はErbbB2過剰発現細胞株SK-BR-3での抑制効果を示さない(Fig. 4B)。モノクローナル抗体2C4は外因性HRGのある場合と無い場合の両方で、モノクローナル抗体4D5よりもより広くMDA-MB-175細胞の増殖を抑制することができる。4D5による細胞増殖の抑制は、ErbbB2発現のレベルに依存する(Lewisら Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263(1993))。SK-BR-3細胞で66%の最大抑制が示された(Fig. 4B)。しかしながらこの効果は外因性HRGによって得ることはできない。

#### 【0065】

##### 実施例 2

モノクローナル抗体2C4に阻害されるErbbB2のErbbB3とのHRG依存性結合

10

20

30

40

50

E r b B 2 に結合する E r b B 3 の能力を共免疫沈降実験で試験した。  $1.0 \times 10^6$  の M C R 7 又は S K - B R - 3 細胞を、10%ウシ血清(F B S)と10mM H E P E S、p H 7.2(成長培地)を含有する50:50のD M E M / H a m ' s F 1 2 培地の6穴細胞培養プレートに蒔き、一晚接触させた。細胞を実験開始前に血清なしの成長培地に2時間おいて枯渇させた。

細胞をリン酸緩衝生理食塩水(P B S)で簡単に洗浄し、次いで10mM H E P E S、p H 7.2(結合緩衝液)、又は結合緩衝液のみ(コントロール)のどちらかを含有する0.2%w/vウシ血清アルブミン(B S A)、R P M I 培地で希釈された100nMの指示抗体のそれぞれとともにインキュベートする。室温で1時間おいた後、H R Gを半分の穴に5nMの最終濃度まで加える(+)。同量の結合緩衝液を他の穴に加える(-)。インキュベーションはおよそ10分間続けられた。

上澄みを吸引により取り除き、細胞を0.2mM P M S F、10 $\mu$ g/mlロイペプチン、及び10T U/mlアプロチニンを含有するR P M I、10mM H E P E S、p H 7.2、1.0%v/vトリトンX-100<sup>T M</sup>、1.0%w/vC H A P S(溶解緩衝液)に溶解した。

E r b B 2 を親和性ゲル(Affi-Prep10、Bio-Rad)に共有結合したモノクローナル抗体を用いて免疫沈降した。この抗体(Ab-3、Oncogene Science)は細胞質ドメインエピトープを認識する。免疫沈降は、それぞれの溶解物に固定された抗体、約8.5 $\mu$ gを含有する10 $\mu$ lのゲル懸濁液を加えることにより実施され、サンプルを室温で2時間混合させた。次いでゲルを遠心分離により集めた。結合していない物質を取り除くために、ゲルを溶解緩衝液を用いてバッチ的に3回洗浄した。次いでS D S サンプル緩衝液を加え、サンプルを沸騰したウォーターバスの中で、軽く温めた。

#### 【0066】

上澄みを4-12%のポリアクリラミドゲル上に流し、ニトロセルロース膜上にエレクトロブロットした。E r b B 3 の存在は、その細胞質ドメインエピトープ(c-17、Santa Cruz Biotech)に対するポリクローナル抗体でのブロットをプローブすることにより調べられる。ブロットは、化学ルミネセント基質(E C L、Amersham)を用いて可視化した。

F i g . 5 A 及び5 B のコントロールのレーンに示されるように、それぞれM C F 7 及びS K - B R - 3 細胞において、E r b B 3 は、細胞がH R Gで促進される場合にのみE r b B 2 免疫沈殿物中に存在した。細胞が最初にモノクローナル抗体2 C 4 とインキュベートされる場合、E r b B 3 シグナルはM C F 7 細胞で消滅する(F i g . 5 A、レーン2 C 4 +)かあるいはS K - B R - 3 細胞で減少する(F i g . 5 B、レーン2 C 4 +)。F i g . 5 A - B に示されるように、ハーセプチン(商品名)よりも実質的に効果的に、モノクローナル抗体2 C 4 はM C F 7 及びS K - B R - 3 の両方の細胞でE r b B 3 のE r b B 2 とのヘレグリン依存性結合を阻害する。ハーセプチンとのプレインキュベーションはM C F 7 溶解物でE r b B 3 シグナルを減少させるが、S K - B R - 3 溶解物由来のE r b B 3 共沈の量にはほとんど又は全く効果を有しない。E G F レセプターに対する抗体(Ab-1、Oncogene Science)とのプレインキュベーションは、どちらの細胞株においてもE r b B 2 との共免疫沈降のE r b B 3 の能力に全く効果が無い。

#### 【0067】

##### 実施例3

##### ヒト化2 C 4 抗体

最初にマウスモノクローナル抗体2 C 4 の様々なドメインをマウス/ヒトキメラF a b 断片を生成させるベクターにクローン化した。全R N Aを市販のプロトコールに続いてストラタジーンR N A 抽出キットを用いてハイブリドーマ細胞から単離した。様々なドメインをR T - P C R により増幅し、ゲルを精製し、前記されるように(Caterら PNAS(USA)89:4285(1992); 及び米国特許第5,821,337号)、ヒト 定常ドメイン及びヒトC<sub>H</sub>1ドメインを含有するp U C 1 1 9 をもとにしたプラスミドの誘導体に挿入した。その結果に生じたプラスミドをF a b 断片の発現のために大腸菌株1 6 C 9 に移した。培養物の成長、タンパク質発現の誘発、及びF a b 断片の増幅については前に記載した(Wetherら J. Immunol

10

20

30

40

50

. 157:4986-4995(1996); Prestaら Cancer Research 57:4593-4599(1997))。

精製したキメラ2C4Fab断片を、MCF7細胞への<sup>125</sup>I-HRG結合の抑制及びMCF7細胞のp180チロシンリン酸化のrHRG活性化の抑制の能力に関してマウス親抗体2C4と比較した。Fig 6Aに示されるように、キメラ2C4Fab断片はヒト乳癌細胞株、MCF7の高親和性Erbb2-Erbb3結合部位の形成を妨害するのに非常に効果的である。無傷のマウス2C4から算出された関連するIC<sub>50</sub>の値は、4.0 ± 0.4 nMであるのに対して、Fab断片からの値は7.7 ± 1.1 nMである。Fig. 6Bに示されるように、一価のキメラ2C4Fab断片は、HRG依存性rbb2-Erbb3活性化を妨害するのに非常に効果的である。完全なマウスモノクローナル抗体2C4から算出されるIC<sub>50</sub>の値は6.0 ± 2 nMであるが、Fab断片からの値は15.0 ± 2 nMである。 10

【0068】

キメラクロンのDNA配列により、CDR残基を同定することができる(Kabatら, Sequences of Protein of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Seavise, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))(Fig. 7A及びB)。オリゴヌクレオチド部位指定突然変異を用いて、これら6つのCDR領域の全てを、前記したようなプラスミドVX4(Prestaら, Cancer research 57:4593-4599(1997))に含まれた完全なヒトフレームワーク(V<sub>L</sub>サブグループI及びV<sub>H</sub>サブグループIII)に導入した。結果物「CDR-スワップ」由来のタンパク質を発現し、前記のようにして精製した。結合研究は2つのバージョンを比較して実施した。簡単には、NUNC MAXISORP(商品名)プレートを1 µg/mlのErbb2細胞外ドメイン(ECD; W090/14357に記載されたようにして作成)の50 mM炭酸緩衝液、pH9.6、4℃で一晩覆い、次いで、室温で1時間ELISA希釈液(0.5% BSA、0.05%ポリソルベート20、PBS)で阻害した。ELISA希釈液の連続希釈サンプルをプレート上で2時間インキュベートした。洗浄の後、結合したFab断片をストレプトアビジンコンジュゲートホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(Sigma)に続いてビオチン化マウス抗-ヒト抗体(ICN634771)を用いて検出し、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersdish, MD)を基質として使用した。吸高度は450 nmで読取った。Fig. 8Aに示されるように、全ての結合は、CDR-スワップヒトFab断片の構築に効果はなかった。 20

ヒト化Fabの修復結合のために、突然変異体を、CDR-スワップ由来のDNAを鋳型として用いて構築した。コンピューター作成モデル(Fig. 9)を用いて、これらの突然変異体は、変化がCDR構造又は抗体-抗原相互作用を変化させる位置にそれらのマウスの複製物のために、ヒトフレームワーク領域残基を変化させて生成した。突然変異体は表2に示す。 30

【0069】

表2

ヒト化2C4FR突然変異の表示

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

10

## 【0070】

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

20

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

30

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

40

## 【0071】

5回のパニングの後、個々のクローンを再びファージELISAで分析した。個々のクローンをコスター96穴U-型組織培養プレートで生育し、ファージをヘルパーファージの添加により促進した。一晚の生育の後、大腸菌細胞をペレット化し、ファージ含有上澄みを96穴プレートに移し、室温で1時間ファージをMPBSTで阻害した。ErbB2ECDでコートされたNUNC MAXISORP(商品名)プレートもまた、前記のようにしてMPBSTで阻害した。阻害されたファージを2時間プレート上でインキュベートした。洗浄の後、結合したファージを、3,3',5,5',-テトラメチルベンジジン(商品名)を基質として用いた後にMPBSTで1:5000に希釈したフォースラディッシュ・ペルオキシダーゼ-コンジュゲート抗-M13モノクローナル抗体(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.

50

27-9421-01)を用いて検出した。吸光度は450nmで読取られた。

最も高いシグナルを持つ、それぞれのライブラリ由来の48クローンをDNA配列決定した。最も頻繁に生じる配列を持つこれらのクローンは、前記したような可溶性Fabの発現をするベクターにサブクローン化される。これらのFabを促進し、精製されたタンパク質及び精製されたFabを前記したようにしてELISAにより結合を分析し、結合をスターティングヒット化2C4.574バージョンのものと比較する。

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

【0072】

10

表3

2C4.574の親和性成熟由来の突然変異の表示

突然変異体名	574からの変化	突然変異体/574*
H3.A1	serH99trp, methH34leu	0.380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu	0.087
H1.3.B3	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu	0.572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu	0.569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu	0.561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, methH34leu	0.552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, methH34leu	0.215
654	serL50trp, methH34leu	0.176
655	methH34ser	0.542
659	serL50trp, methH34ser	0.076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, serH99trp	0.175
L3G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu, serH99trp	0.218
H1.3.B3.H3.A1	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu, serH99trp	0.306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu, serH99trp	0.248
654.H3.A1	serL50trp, methH34leu, serH99trp	0.133
654.L3.G6	serL50trp, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0.213
654.L3.29	serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0.236
654.L3.36	serL50trp, methH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0.141

20

30

40

\* Erb2-ECDELISAにおいて、初期曲線の間ODを与えるのに必要な突然変異量の、初期曲線の間ODを与えるのに必要な574の量に対する率。1.0よりも低い数字は、ErbB2に574よりもよく結合することを示す。

【0073】

次の突然変異体もまた構築し、評価している：

659.L3.G6	serL50trp, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
659.L3.G11	serL50trp, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
659.L3.29	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, ileL96asn

50

659.L3.36 serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, ileL94leu, tyrL96pro  
 L2F5.L3G6 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys  
 L2F5.L3G11 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly  
 L2F5.L29 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn  
 L2F5.L36 serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro  
 L2F5.L3G6.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys  
 L2F5.L3G11.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly  
 L2F5.L29.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn  
 L2F5.L36.655 serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro  
 【 0 0 7 4 】

10

相同性スキャンにより次の突然変異体が構築されている：

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

20

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

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

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

30

【 0 0 7 5 】

#### 実施例 4

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

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

40

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

50

プロット法により調べた。

【0076】

Fig. 10に示されるように、モノクローナル抗体は、ハーセプチン(商品名)よりも大きな程度でMAPKのEGF、TGF- $\beta$ 及びHRG媒介活性化を有意に阻害した。これらのデータは、モノクローナル抗体2C4がERFG又はErBB3のどちらかとの結合に使用されるErBB2の表面に結合し、従ってシグナル伝達レセプター複合体の生成を妨げることを示唆した。

モノクローナル抗体2C4もまた、ヘレグリン(HRG)依存性Akt活性化を阻害することが示された。PI3キナーゼシグナル伝達経路の活性化は細胞生存にとって重要である(Carrawayら J. Biol. Chem. 270:7111-6(1995))。腫瘍細胞において、PI3キナーゼ活性化は浸潤性表現型の役割を担う(Tanら Cancer Research. 59:1620-1625,(1999))。生存経路はセリン/チロシンキナーゼAKTに主に媒介される(Bosら Trends Biochem Sci. 20: 441-442(1995))。ErBB2とErBB3又はEGFRのどちらかの間で形成される複合体は、それぞれヘレグリン又はEGFに関するこれらの経路を開始させることができる(Olayioyeら Mol. & Cell. Biol. 18:5042-51(1998); Karunagaranら, EMBO Journal. 15:254-264(1996); 及びKrymskayaら Am. J. Physiol. 276: L246-55(1999))。2C4を有するMCF7乳癌細胞のインキュベーションはヘレグリン媒介AKT活性化を抑制する。更に、ヘレグリン添加の無い場合に存在するAKT活性化の基本的なレベルは、2C4の添加により更に減少する。これらのデータは、2C4がPI3キナーゼのErBBリガンド活性化を阻害し、これがアポトーシスを招きうることを示唆する。増加したアポトーシスに対する感受性は化学療法の毒性影響に対する腫瘍細胞のより高い感受性において顕著である。

従って、モノクローナル抗体2C4は2つの主なシグナル伝達経路MAPキナーゼ(主な増殖経路)及びPI3キナーゼ(主な生存/抗アポトーシス経路)を通してErBBシグナル伝達を開始するリガンドを阻害する。

【0077】

実施例5

乾癬の治療

乾癬は上皮性過剰増殖、分化の阻害、炎症、および過剰真皮性血管形成を特徴とする遺伝性の皮膚疾患である。アメリカ乾癬基金によるとアメリカでは乾癬患者は7百万以上に上る。医師の治療を受けている乾癬患者のおよそ30%が中程度～重度の病型であると推測される。最も一般的な乾癬型である、プラーク乾癬は銀白の鱗屑で覆われた皮膚の炎症性斑(「病斑」)の特徴がある。乾癬は、2、3のプラークに限られることもあるし、皮膚でも最も一般的なところとして頭皮、膝、肘、および胴体の広い範囲にわたることもある。乾癬は非常に可視的なものであるが、伝染性疾患ではない。よく知られた治療はないが、乾癬患者はさまざまな免疫学的調節剤または免疫抑制剤、例えば、活性化T細胞を選択的に標的とするシクロスポリン、タクロリムス(FK506)、およびDAB389IL2を用いた治療に成功裏に反応している。

ここでは、中程度～重度の乾癬患者に、rhUMA b2C4またはヒト化7F3のような抗ErBB2抗体を、0.5-30mg/kgを1回または数回の用量で、一週間毎、3週間毎、またはより少ない頻度(例えば、約3か月毎)で投与した。治療は例えば、症状の改善がみられるまで、医師の判断で続けた。さらに、病状の再発の治療は熟考した。

【0078】

中程度～重度の乾癬患者を抗ErBB2抗体のみで治療する間、本発明は、免疫抑制剤、及び/又は局所療法、及び/又は光線療法等の補助療法の同時投与を考慮する。抗ErBB2と組み合わせて用いる薬剤の例として、シクロスポリン; タクロリムス(FK506); DAB389 IL2; メトトレキサート等の化学療法剤; 紫外線A光線とソラレン; ステロイド、例としてグルココルチコステロイド(最も好ましくは、プレドニゾン、又はメチルプレドニゾン); OKT-3モノクローナル抗体; アザチオプリン; プロモクリプチン; 異種性抗リンパ球グロブリン; 抗LFA-1抗体; エファリズマブ(RAPTIVA(登録商標))等の

抗 L F A - 1 抗体 ; 抗 C D 2 0 抗体であるリツキシマブ (RITUXAN(登録商標))等の B 細胞表面抗原に結合する抗体 ; エタネルセプト (ENBREL(登録商標); Amgen)、インフリキシマブ (REMICADE(登録商標); Centcor)、D 2 E 7、又は C D P - 8 7 0 (Celltech)等の T N F アンタゴニスト ; キネレット (Amgen)等の I L - 1 アンタゴニスト ; ILODECAKIN<sup>TM</sup>を含む I L - 1 0 アゴニスト ; C O X - 2 阻害薬 ; ゲフィチニブ (IRESSA<sup>TM</sup>)、CP-358,774 (TARCEVA<sup>TM</sup>)等の E G F R 標的薬剤又はチロシンキナーゼ阻害薬 ; 他の薬剤、例としてメトキシサレン、ヒドロコルチゾン、カルシポトリエン、アンスラリン、コールタール、ベタメサゾン、ベタメサゾン酢酸塩 / ベタメサゾンリン酸ナトリウム、コルチゾン酢酸塩、デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸ナトリウム、メチルプレドニゾロン酢酸塩、ヒドロコルチゾンリン酸ナトリウム、プレドニゾロン、プレドニゾロンリン酸ナトリウム、又はこれらいずれかの薬剤又は療法の併用が含まれる。第 2 の薬剤は E r b B 2 抗体の投与前、同時に、又は投与後に用いることができる。

10

医師の包括的評価 (Physician's Global Assessment) (PGA) 変化、及び / 又は乾癬領域及び重症度インデックス (Psoriasis Area and Severity Index) (PASI) スコアを含めて、元の状態と比較して疾患の臨床兆候及び症状の変化をモニタリングすることによって効果を評価することができる。

【 0 0 7 9 】

#### 実施例 6

##### 子宮内膜症の治療

子宮内膜症は、子宮組織の異所性に起こり、たびたび変質血液を含む嚢胞を形成する。子宮内膜症は、3% から 18% の女性に発症すると推測される。15 - 44 歳の入院女性に共通した婦人科的診断があり、53% の青年期女性に正当な医師評価に十分なだけの骨盤痛がみられる。

20

子宮内膜症患者に、r h u M A b 2 C 4 またはヒト化 7 F 3 のような抗 E r b B 2 抗体を、例えば、0.5 - 30 mg / kg を 1 回または数回の用量で、一週間毎、3 週間毎、またはより少ない頻度 (例えば、約 3 か月毎) の投与計画に従って投与した。場合によっては、免疫抑制剤、E G F R 標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害薬、経口避妊薬又はホルモン、例としてプロゲステロン、黄体化ホルモン (L H) 又は卵胞刺激ホルモン (F S H) 、ダナゾール又はゴナドトロフィン放出ホルモン (G n R H) アゴニスト、フィットエストロゲン、イソフラボン、抗エストロゲン (例として、ベンゾチオフェン、ドロロキシフェン、又はベンゾフラン)、アロマターゼ阻害薬、ノルエチンドロン酢酸塩、ロイプロリド酢酸塩、ナファレリン酢酸塩、クラブラン酸カリウム / チカルシリンジソディウム、及び / 又はゴセレリン酢酸塩でさらに患者を治療する。第 2 の薬剤は E r b B 2 抗体の投与前、同時に、又は投与後に用いることができる。

30

治療は痛みを軽減及び / 又は子宮内膜症病変を減少させうる。

【 0 0 8 0 】

#### 実施例 7

##### 血管系疾患の治療

血管形成術、外科手術又はステント移植後の再狭窄 ; アテローム動脈硬化 ; 冠動脈疾患 ; 高血圧 ; 又は他の血管系疾患の治療又は予防のために、r h u M A b 2 C 4 またはヒト化 7 F 3 のような抗 E r b B 2 抗体を用いることができる。

40

血管狭窄は、血流に対する抵抗性の増加の結果として高血圧を引き起こす。さらに、組織への血液供給の減少は壊死の原因にもなりえ、深刻な障害につながる炎症反応を引き起こす。例として、心筋梗塞は、酸素欠乏と心筋組織の局所的細胞死の結果として起こる。経皮経管冠動脈形成術 (P T C A) 、単に「バルーン形成術」は、閉塞性の冠動脈疾患の非外科的カテーテルに基づく処置である。この方法では、カテーテルを血管に導入し、プラークを機能的に取り除くためにプラークの部位でバルーンを膨らませる。あるいは、ステントは円滑な血流を回復させるために移植される。しかしながら、「インステント再狭窄」として知られるように、移植したステント内にさえ新内膜形成が起こる。例えば、ステント設置により早期に血栓沈着及び急性の炎症、肉芽組織の発達、および最終的には平

50

滑筋細胞の増殖及び細胞外基質合成が起こる (VirmaniおよびFarb, Curr. Opin. Lipidol. 10: 499-506 (1999))。バイパス術は重症な例の患部血管にしか行われず、通常、複数回血管形成術を行った例では血流回復に失敗する。

バルーン血管形成術は、狭窄の治療に広く用いられるが、長期成功は再狭窄に限られる。再狭窄はPTCA後の血管開放の維持の因子を制限して続き、患者の30 - 50%に起こり、著しい死亡率や健康保険費用の原因となる。再狭窄の根底にあるメカニズムは、血管リコイル、陰性血管再構築、血栓形成、および新内膜過形成の影響の複合である。重要なことに、これらの事象は相互に関連している。例えば、新内膜過形成は、局所血栓および損傷した動脈片の放出による成長因子により刺激され、他の成長刺激因子タンパク質の発現亢進に働き、結果として急性の増殖および炎症反応が起こる。例えば、内皮損傷は血管平滑筋細胞においてEGF、EGF様因子およびEGFRの発現を引き起こし、それらにより自己分泌的にそれらの増殖が刺激され、内皮肥大および再狭窄が引き起こされる。血管壁における細胞外基質(ECM)形成および集積は、バルーン形成術後に起こるもう一つの重要な再狭窄因子である。

#### 【0081】

本実施例では、血管系疾患である又は血管系疾患と思われる患者の例として、再狭窄に対してrhMab2C4またはヒト化7F3で治療する。0.5 - 30 mg/kgを1回または数回の用量で、一週間毎、3週間毎、またはより少ない頻度(例えば、約3か月毎)の投与計画に従って投与した。患者は一般的に少なくとも4週間、およそ3か月間治療した。一実施態様では、抗体はステント上をコートしている、例として抗体はゆっくりと放出される状態である。このようなコーティングは、ステントに対して抗体が化学的に交差結合する、又はステントのシリンダーに抗体を挿入すること等による。場合によってはさらに、補助療法として外科的処置、または塩酸プロプラノロール、他のErbb2アンタゴニスト、EGFR標的薬剤、チロシンキナーゼ阻害薬、又は冠動脈疾患治療薬、血圧調節薬剤、コレステロール低下薬剤を含む、抗酸化薬、ICAM1, 2および3, VCAM-1またはPECAM-1等の接着分子調節薬剤、脂質低下薬、抗血小板薬、抗血栓剤、カルシウムチャネル阻害薬、アンジオテンシン交換酵素(ACE)阻害薬、遮断薬、チクロピジン、クロピドグレル、抗組織因子抗体またはアンタゴニスト、経口第VIIa因子阻害薬、ビパリンジン、NapC2、ロベロックス、フラグラニン、ARB ACEレセプターアンタゴニスト、ヒルディン、ヒルレグ、メラガトロン、エプチフィバチド、アブシキシマブ、およびアスピリンによる治療を行う。第2の薬剤はErbb2抗体の投与前、同時に、又は投与後に用いることができる。

抗Erbb2抗体の投与は、PTCAの繰返し処置の必要性を減少させる。医師は管腔のサイズを決定して、ここでの治療効果を決定した。

#### 【0082】

##### 実施例8

##### 呼吸器疾患の治療

呼吸器系疾患、喘息(例えば、中程度から重度の喘息)、慢性気管支炎(例えば、中程度から重度の慢性気管支炎)、気管支拡張症(bronchiectasis)、中程度から重度の気管支拡張症を含む、嚢胞性線維症の患者にも、本発明にしたがって、rhMab2C4またはヒト化7F3のような抗Erbb2抗体を用いて治療する。抗体0.5 - 30 mg/kgを1回または数回の用量で、場合によって、一週間毎、3週間毎、またはより少ない頻度(例えば、約3か月毎)の投与計画に従って投与した。場合によって、さらに、プレドニゾン等の免疫抑制薬、速効型アゴニスト及びアトロピン作動性気管支拡張薬、持続型気管支拡張薬、吸入ステロイド、IgEアンタゴニスト、抗IgE抗体、例としてオマリズマブ(Xolair™)等のヒト化抗IgE抗体を含む、他のErbb2アンタゴニスト、EGFR標的薬剤又はTarceva™又はIRESSA™等のチロシンキナーゼ阻害薬; 及び/又は他の改良された治療法、例としてザフィルルカスト、硫酸アルブテロール、プロピオン酸フルチカゾン/キシナホ酸サルメテロール、フルニソリド、テオフィリン、硫酸メタプロテレール、臭化イプラトロピウム、トリアムシノロン・アセトニド、硫酸テルブタリン、酢酸ベ

タメタゾン/リン酸ナトリウムベタメタゾン、ベタメタゾン、硫酸アルブテロール/臭化イプラトロピウム、酢酸コルチゾン、デキサメタゾン、リン酸ナトリウムデキサメタゾン、酢酸メチルプレドニゾロン、硫酸アルブテロール/臭化イプラトロピウム、プロピオン酸フルチカゾン、フマル酸ホルモテロール、ヒドロコルチゾン、リン酸ナトリウムヒドロコルチゾン、ダイフィリン、ダイフィリン/グアイフェネシン、酢酸ピルブテロール、リン酸ナトリウムプレドニゾロン、ヨウ化カリウム、プレドニゾン、エピネフリン、塩酸エフェドリン/グアイフェネシン、硫酸アルブテロール、アルブテロール、ブデソニド、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、キシナホ酸サルメテロール、モンテルカストナトリウム、コハク酸ナトリウムメチルプレドニゾロン、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、アルブテロール、塩酸レバルブテロール、ジロートン、臭化イプラトロピウム、硫酸テルブタリン、ヨウ化カリウム、キシナホ酸サルメテロール、塩酸モキシフロキサシン、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、クラリスロマイシン、セファクロル、セフチブテン二水和物、セフロキシムアキセチル、セフェprozil、シプロフロキサシン、塩酸シプロフロキサシン、オフロキサシン、レボフロキサシン、ロラカルベフ、セフジニル、シラスタチンナトリウム/イミペネム、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、セフジトレンピボキシル、セフィキシム、ガチフロキサシン、およびセフポドキシムプロキセチル等を用いて治療する。第2の薬剤はE r b B 2抗体の投与前、同時に、又は投与後に用いることができる。

10

肺機能、例えば、1秒量の努力呼気量(F E V 1)、努力肺活量(F V C)、セント・ジョージ呼吸質問表、及び/又は呼吸困難スコア)を評価して効果を決定することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0083】

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

30

【図1B】トランケーション突然変異分析及び部位特異的突然変異誘発(Nakamuraら J. of Virology 67(10):6179-6191(1993); 及びRenzら J. Cell Biol. 125(6):1395-1406(1994))により決定されたE r b B 2の細胞外ドメイン(E C D)(シグナル配列を含み、F i g . 1 Aに示される、アミノ酸配列)内の残基22 - 645のエピトープマッピングを示した。種々のE r b B 2 - E C D切断又は点変異を、ポリメラーゼ連鎖反応法を使用してc D N Aから調製した。E r b B 2変異体は、哺乳類発現プラスミドにおけるg D融合タンパク質として発現された。この発現プラスミドとして、挿入c D N Aの下流に位置するポリアデニル化シグナルとS V 40末端を有するサイトメガロウイルスのプロモーター/エンハンサーが使用される。プラスミドD N Aを293S細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション1日後、細胞を、<sup>35</sup>Sメチオニン及び<sup>35</sup>Sシステインを各々25 μ C iと、透析されたウシ胎児血清を1%含むメチオニン及びシステインフリーの低グルコースD M E M中で、一晩かけて代謝標識した。上清を回収し、E r b B 2 M A b又は

40

50

対照抗体のいずれかを上清に添加し、4 で 2 - 4 時間インキュベートした。複合体を沈殿させ、10 - 20 % のトリシン SDS 勾配ゲルに塗布し、100 V で電気泳動にかけた。ゲルは膜上にエレクトロブロットされ、これをオートラジオグラフィで分析した。Fig. 1 B に示されるように抗-ErbB2 抗体 7C2、7F3、2C4、7D3、3E8、4D5、2H11 及び 3H4 は様々な ErbB2 ECD エピトープに結合する。

【図 2 A】MCF7 細胞の rHRG 1 活性化での抗-ErbB2 モノクローナル抗体 2C4 及び 7F3 を示す。Fig. 2 A はチロシンリン酸化の HRG 刺激の 2C4 又は 7F3 抑制の反応曲線を示す。

【図 2 B】MCF7 細胞の rHRG 1 活性化での抗-ErbB2 モノクローナル抗体 2C4 及び 7F3 を示す。Fig. 2 B は 2C4 又は 7F3 により MCF7 細胞に結合される  $^{125}\text{I}$ -標識 rHRG  $_{177-244}$  の抑制の反応曲線を示す。 10

【図 3】抗-ErbB2 モノクローナル抗体 2C4 及び 7F3 によりヒト癌細胞株のパネルに結合した特異的  $^{125}\text{I}$ -標識 rHRG  $_{177-244}$  の抑制を示す。モノクローナル抗体コントロールは、rHRG 結合を阻害しないアイソタイプ適合マウスモノクローナル抗体である。非特異的  $^{125}\text{I}$ -標識 rHRG  $_{177-244}$  結合は、100 nM の rHRG 1 の存在下で実施された並行したインキュベーションから決定された。非特異的  $^{125}\text{I}$ -標識 rHRG  $_{177-244}$  結合の値は、試験された全ての細胞株全体の 1 % よりも小さかった。

【図 4 A】MDA-MB-175 細胞の増殖でのモノクローナル抗体 2C4 及び 4D5 の効果を示す。実験は 1 % の血清を含む培地で実施された。抗-ErbB2 抗体又は培地のみを加え、細胞を 37 で 2 時間インキュベートした。置換 rHRG 1 (1 nM) 又は培地のみを加え、細胞を 4 日間インキュベートした。単層を洗浄し、0.5 % クリスタルバイオレットで染色/固定した。細胞増殖を決定するために吸高度を 540 nM で測定した。 20

【図 4 B】SK-BR-3 細胞の増殖でのモノクローナル抗体 2C4 及び 4D5 の効果を示す。実験は 1 % の血清を含む培地で実施された。抗-ErbB2 抗体又は培地のみを加え、細胞を 37 で 2 時間インキュベートした。置換 rHRG 1 (1 nM) 又は培地のみを加え、細胞を 4 日間インキュベートした。単層を洗浄し、0.5 % クリスタルバイオレットで染色/固定した。細胞増殖を決定するために吸高度を 540 nM で測定した。

【図 5 A】低/標準レベルに ErbB2 を発現する MCF7 細胞の ErbB2 の ErbB3 とのヘレグリン (HRG) 依存性関連のモノクローナル抗体 2C4、ハーセプチン (商品名) 抗体又は抗 EGFR 抗体の効果を示す; 前記実施例 2 を参照。 30

【図 5 B】高レベルに ErbB2 を発現する SK-BR-3 細胞の ErbB2 の ErbB3 とのヘレグリン (HRG) 依存性関連のモノクローナル抗体 2C4、ハーセプチン (商品名) 抗体又は抗 EGFR 抗体の効果を示す; 前記実施例 2 を参照。

【図 6 A】完全なマウスモノクローナル抗体 2C4 (mu2C4) 及びキメラ 2C4 Fab 断片の活性を比較する。Fig. 6 A は、キメラ 2C4 Fab 又は完全なマウスモノクローナル抗体 2C4 による MCF7 細胞に結合する  $^{125}\text{I}$ -HRG の抑制を示す。MCF7 細胞を 24 穴プレート (1 x 10<sup>5</sup> 細胞/穴) に蒔き、約 85 % 集密性まで 2 日間、生育した。結合実験は、Lewsら Cancer Research 56:1457-1465(1996) に記載されるようにして実施された。

【図 6 B】完全なマウスモノクローナル抗体 2C4 (mu2C4) 及びキメラ 2C4 Fab 断片の活性を比較する。Fig. 6 B は、Lewsら Cancer Research 56:1457-1465(1996) に記載されるようにして実施された MCF7 細胞の p180 チロシンリン酸化の rHRG 1 活性化の抑制を示す。 40

【図 7 A】マウスモノクローナル抗体 2C4 可変軽鎖 (V<sub>L</sub>) (配列番号. 1); ヒト化 2C4 バージョン 574 の V<sub>L</sub> ドメイン (それぞれ配列番号. 3)、及びヒト V<sub>L</sub> コンセンサスフレームワーク (hum 1、軽サブグループ I) (配列番号. 5) のアミノ酸配列の配置を示す。相補正決定領域 (CDR) はブラケットにある。

【図 7 B】マウスモノクローナル抗体 2C4 可変重鎖 (V<sub>H</sub>) ドメイン (配列番号. 2); ヒト化 2C4 バージョン 574 の V<sub>H</sub> ドメイン (配列番号. 4)、及びヒト V<sub>H</sub> コンセンサスフレームワーク (hum III、重鎖サブグループ III) (配列番号. 6) のアミノ酸配列の配置 50

を示す。相補正決定領域(CDR)はブラケットにある。

【図8A】実施例3のELISAにより決定されるキメラFab2C4(Fab.v1)及びErbB2細胞外ドメインに対するいくつかのヒト化2C4変異体の結合を示す。

【図8B】実施例3のELISAにより決定されるキメラFab2C4(Fab.v1)及びErbB2細胞外ドメインに対するいくつかのヒト化2C4変異体の結合を示す。

【図8C】実施例3のELISAにより決定されるキメラFab2C4(Fab.v1)及びErbB2細胞外ドメインに対するいくつかのヒト化2C4変異体の結合を示す。

【図9】標識された白のCDR主鎖(L1、L2、L3、H1、H2、H3)を有するモノクローナル抗体2C4のVL及びVHドメインのリボン・ダイアグラムである。ヒト化する間に突然変異誘発により評価されたVH側鎖(実施例3、表2参照)も、示された。

【図10】モノクローナル抗体2C4又はEGF、TGF-上のハーセプチン(商品名)、又は分裂促進活性化プロテインキナーゼ(MAPK)のHRG-媒介活性化の効果を示す。

10

【図1A】

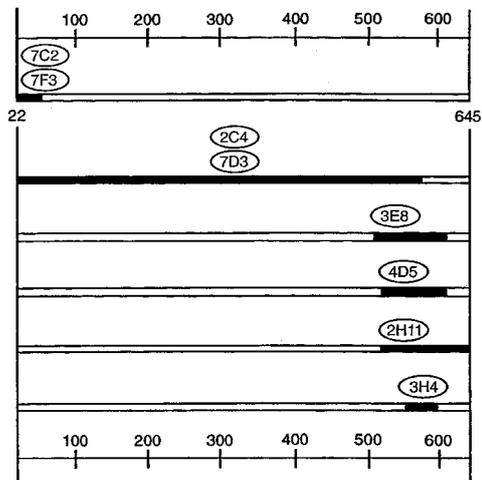
```

1  MELAAALRWG LLIALLPFGA ASTDVCYGTGTD MKLRIPASPE THLDMLRHLY GGCQVQVGNL ELTYLPTWAS LSLFLDQIQEV QGVYLIHQ VRCVPLQRLR
201  IYRGTQLFED NYALAVLDNG DPLAWTPTVT GASFGELREL QLRSLTEILK GCYLQRNFQ LCTQDTIMK DIFHNQOLA LTLIDWNSR ACHPSPCK
301  GSRKWGSESE DCQSLTHTYC AGGCARCKGP LPDCCHEQC MAGCGERHS DCLACLHFNH SGICELHCA LVTWVDVFE SNEPDEGVT FQASCVTACF
401  YNYLSTDVGS CTVVCPVHNQ EVYAEEDGTQ CEKCSKPCAR VCVGLGMBHL REYRAVTSAN IQEPAQCKKI FGLSLFLPES FGDSPASNTA PLQPRLOVYF
501  ETEBEITGYL YISNPFDSL P DUSYFNQLQV IGRILLNGA YSUTLQSLGI SWLGLRSIRE LOSGLALHHI NHELCPVHTV FMDQCFRNPH QALLHTANRP
601  EDECVGREGA CHQLCARGHC MFRPPTQCVN CSQFLAGQEC VBERCVLQGL PREYVNBHC LPCHPECPQ NGSTVCTGGE ADCQVACAHY KDPFFCTIAC

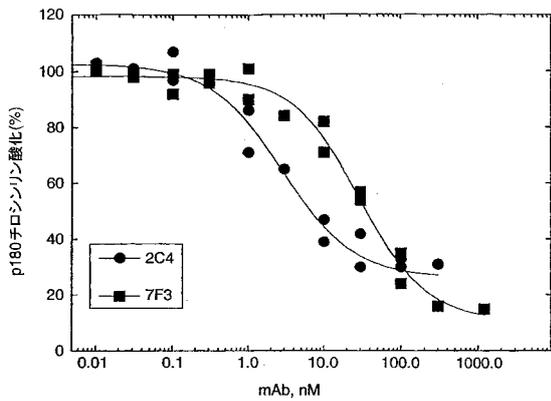
```

【図1B】

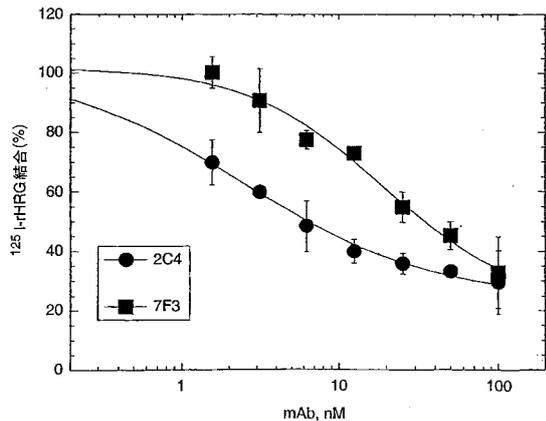
7C2	aa	22-53	(31 残基)
7F3	aa	22-53	(31 残基)
2C4	aa	22-584	(562 残基)
7D3	aa	22-584	(562 残基)
3E8	aa	512-625	(113 残基)
4D5	aa	529-625	(96 残基)
2H11	aa	529-645	(116 残基)
3H4	aa	541-599	(58 残基)



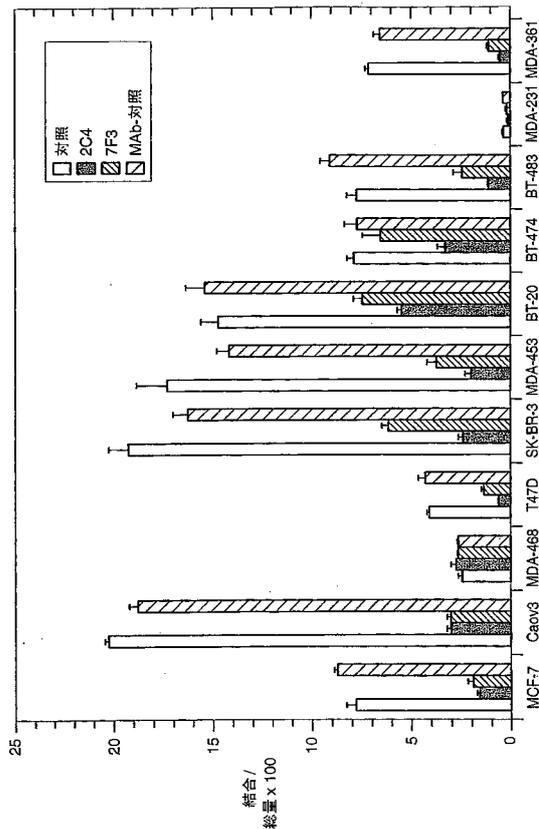
【 図 2 A 】



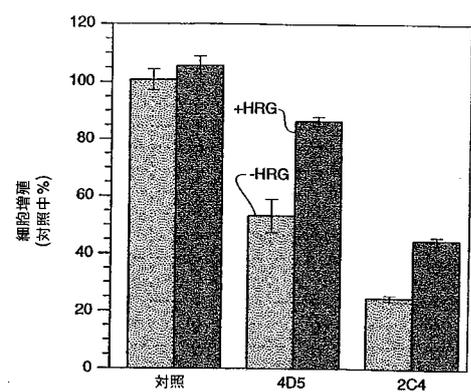
【 図 2 B 】



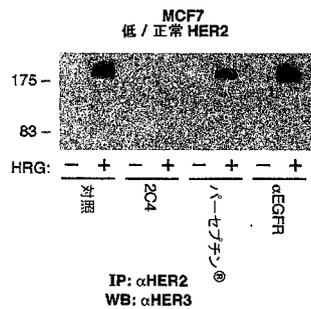
【 図 3 】



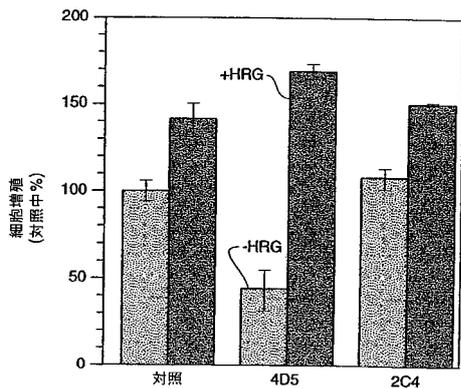
【 図 4 A 】



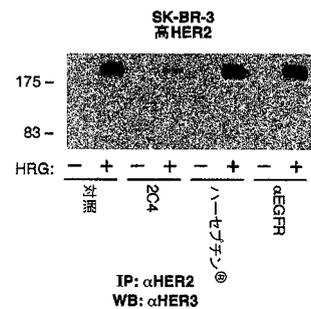
【 図 5 A 】



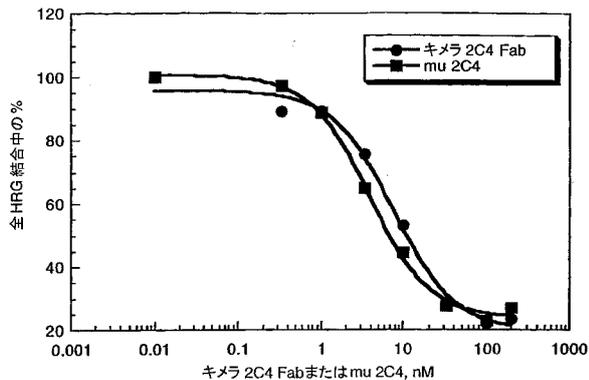
【 図 4 B 】



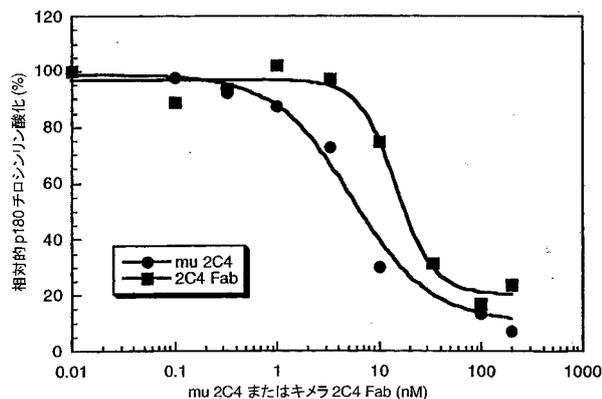
【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 7 A 】

可変軽鎖

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVITC	{KASQDVSIGWA}	WYQQRP	*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	{KASQDVSIGWA}	WYQQKP	*
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITC	{RASQISNYLA}	WYQQKP	*

	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY {SASYRYT}	GVPDRFTGSGGTDFTLTSSVQA	*	*
574	GKAPKLLIY {SASYRYT}	GVPSRFGSGGTDFTLTSSVQA	*	*
hum κI	GKAPKLLIY {AASSLES}	GVPSRFGSGGTDFTLTSSVQA	*	*

	90	100	
2C4	EDLAVYYC {QQYIYPYT}	FGGGTKLEIK	(配列番号:1)
574	EDFATYYC {QQYIYPYT}	FGGGTKVEIK	(配列番号:3)
hum κI	EDFATYYC {QQYNSLPWT}	FGGGTKVEIK	(配列番号:5)

【 図 7 B 】

可変重鎖

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTQVSKISCKAS	{GFTFTDVTMD}	WVRQS	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	{GFTFTDVTMD}	WVRQA	*
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	{GFTFSSYAMS}	WVRQA	*

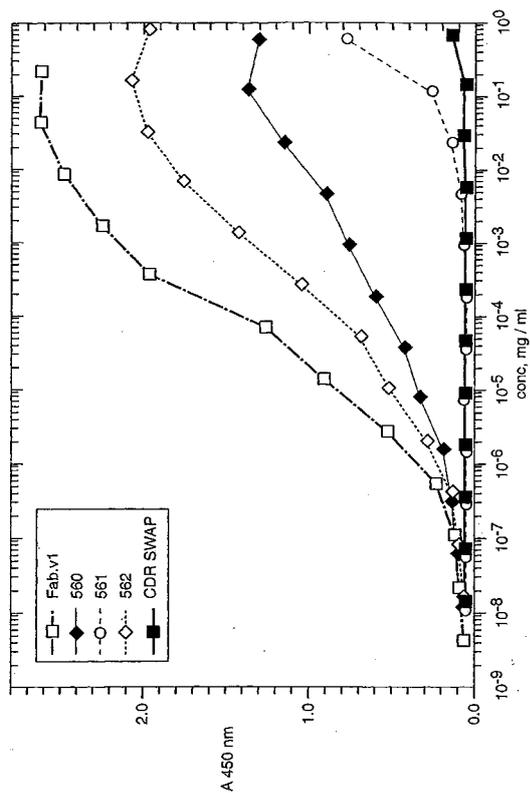
  

	50	a	60	70	80
2C4	HGKSLIEWIG {DWNPNSSGGSIYNQRFK}	G	KASLTVDRSSRIVYM	*	*
574	PGKGLEWVA {DWNPNSSGGSIYNQRFK}	G	RFTLSVDRSKNTLYL	*	*
hum III	PGKGLEWVA {VISGDDGGSTYYADSVK}	G	RFTISRDNKNTLYL	*	*

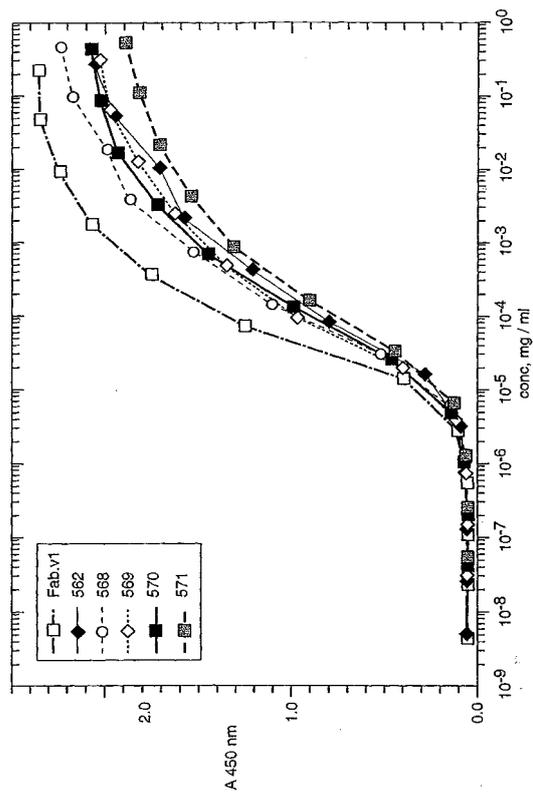
  

	abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	{NLGSPSYFDY}	WGQGLTLTVSS	(配列番号:2)	*
574	QMSLR AEDTAVYYCAR	{NLGSPSYFDY}	WGQGLTLTVSS	(配列番号:4)	*
hum III	QMSLR AEDTAVYYCAR	{GRVGSYLDY}	WGQGLTLTVSS	(配列番号:6)	*

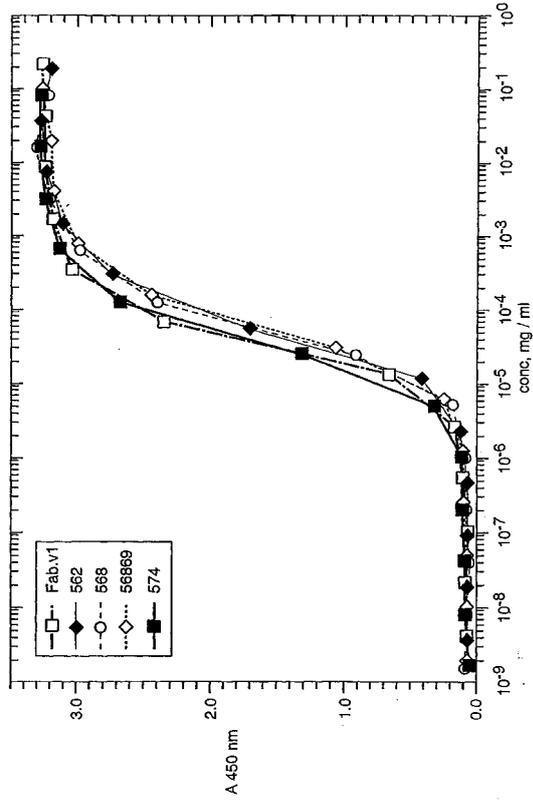
【 図 8 A 】



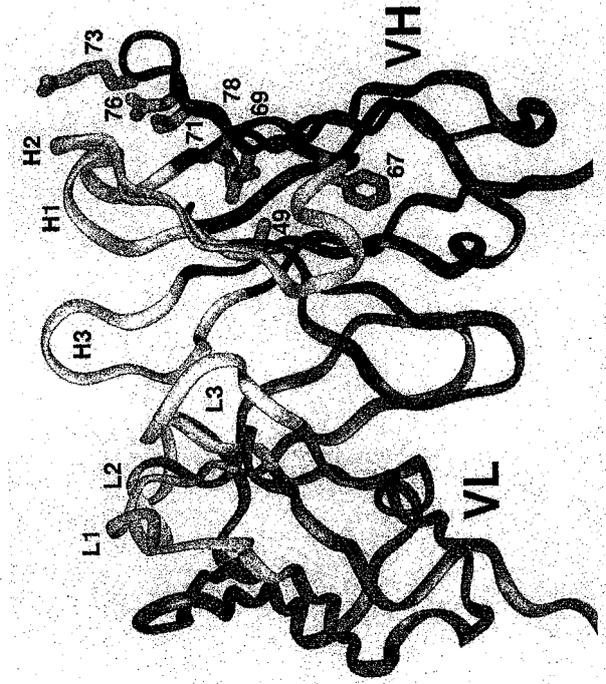
【 図 8 B 】



【 図 8 C 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】



EGF	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
TGFα	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HRG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2C4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ハーセプチン®	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/10</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>9/12</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/10
<b>A 6 1 P</b>	<b>11/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/10 1 0 1
<b>A 6 1 P</b>	<b>11/06</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/12
<b>A 6 1 P</b>	<b>11/08</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	11/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>15/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	11/06
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	11/08
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/06</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	15/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>27/16</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	17/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	17/06
			A 6 1 P	27/16
			A 6 1 P	35/00

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ブルネッタ, ポール, ジー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 1 0, サン フランシスコ, ハンプシャー ストリート 1 2 5 7

Fターム(参考) 4C084 AA19 DA01 MA02 NA05 ZA362 ZA422 ZA542 ZB082 ZB112 ZB262  
ZB352 ZC032 ZC202 ZC332 ZC372 ZC422 ZC432  
4C085 AA13 AA14 AA21