

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-503181  
(P2014-503181A)

(43) 公表日 平成26年2月13日(2014.2.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C O 7 K 16/30 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/30	4 B O 6 3
<b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
<b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-533138 (P2013-533138)  
 (86) (22) 出願日 平成23年9月12日 (2011.9.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月20日 (2013.5.20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/065771  
 (87) 国際公開番号 WO2012/052230  
 (87) 国際公開日 平成24年4月26日 (2012.4.26)  
 (31) 優先権主張番号 61/394,103  
 (32) 優先日 平成22年10月18日 (2010.10.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513081550  
 メディアファーマ エス. アール. エル.  
 MEDIAPHARMA S. R. L.  
 .  
 イタリア共和国 アイ-66013 キエーティ ヴィア コッレ デッラ センター オブ エクセレンス オン エイジング  
 Centre of Excellence on Aging, Via Colle dell'Ara, 1-66013 Chieti Republic of Italy

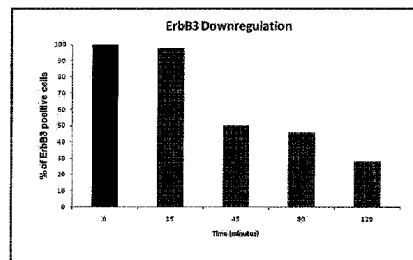
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E r b B 3 結合抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗体、特に E r b B 3 受容体に結合するモノクローナル抗体、そのような抗体を含む組成物、および、そのような抗体を用いる方法に関する。

Figure 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

E r b B 3 受容体に結合する抗体またはそのフラグメントであって、

( a ) 配列番号 1 でコードされる重鎖アミノ酸配列、または少なくともその可変領域、またはそれと少なくとも 8 0 %、好ましくは 9 0 % の配列相同性を有するアミノ酸配列、および/または

( b ) 配列番号 2 でコードされる軽鎖アミノ酸配列、または少なくともその可変領域、またはそれと少なくとも 8 0 %、好ましくは 9 0 % の配列相同性を有するアミノ酸配列を含む、

抗体またはそのフラグメント。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の抗体であって、

前記抗体の E r b B 3 への結合が、E r b B 3 仲介のシグナル伝達を減少させることを特徴とする、

抗体。

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載の抗体であって、

前記シグナル伝達の減少が、E r b B 3 の下方制御により引き起こされることを特徴とする、

抗体。

20

**【請求項 4】**

請求項 2 または 3 に記載の抗体であって、

細胞表面上の E r b B 3 のレベルを減少させる能力を有する、

抗体。

**【請求項 5】**

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体であって、

ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、特に、組み換え抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体、特に、二重特異性抗体、またはそのフラグメントである、

抗体。

30

**【請求項 6】**

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体であって、

F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F ( a b ' ) フラグメント、F v - フラグメント、ダイアボディ、S c F v、S M I P、単鎖抗体、アフイボディ、アビマー、ナノボディおよび/またはドメイン抗体である、

抗体。

**【請求項 7】**

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体であって、

前記抗体のアイソタイプが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A 1、I g A 2、I g A s e c、I g D、および I g E 抗体からなる群から選択されることを特徴とする、

抗体。

40

**【請求項 8】**

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体であって、

D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o o r g a n i s m e n u n d Z e l l k u l t u r e n ( D S M Z ) に寄託され、D S M A C C 3 0 1 8 と命名された M P - R M - 1 である、

抗体。

**【請求項 9】**

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体であって、

ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 3 0 1 8 またはその誘導体から産生され、好まし

50

くはヒト化抗体である、  
抗体。

【請求項 10】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体であって、  
配列 3 ~ 14 (配列番号 3 ~ 14) に示される、好ましくは配列 7 ~ 14 (配列番号 7 ~ 14) に示される、少なくとも 1 つの配列を含む、  
抗体。

【請求項 11】

c M P - R M - 1 # 1、c M P - R M - 1 # 2、c M P - R M - 1 # 3、c M P - R M - 1 # 4、h M P - R M - 1 # 5、h M P - R M - 1 # 6、h M P - R M - 1 # 7、h M P - R M - 1 # 8、h M P - R M - 1 # 9、h M P - R M - 1 # 10、h M P - R M - 1 # 11、h M P - R M - 1 # 12、h M P - R M - 1 # 13、h M P - R M - 1 # 14、h M P - R M - 1 # 15、h M P - R M - 1 # 16、h M P - R M - 1 # 17、h M P - R M - 1 # 18、h M P - R M - 1 # 19、h M P - R M - 1 # 20 (c : キメラ抗体 ; h : ヒト化抗体) の群から選択される、  
抗体。

10

【請求項 12】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体であって、  
標識グループと結合している、  
抗体。

20

【請求項 13】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体であって、  
エフェクターグループと結合している、  
抗体。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントをコードする核酸、またはストリンジェントな条件下でそれにハイブリダイズすることができる核酸。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の核酸を含む、  
ベクター。

30

【請求項 16】

請求項 15 に記載のベクターであって、  
発現ベクターであり、前記核酸の配列は動作可能に制御配列に結合している、  
ベクター。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の核酸または請求項 15 または 16 に記載のベクターを含む、  
宿主細胞。

【請求項 18】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 14 に記載の核酸および / または請求項 15 または 16 に記載のベクター、および、好ましくは薬学的に許容できる担体、希釈剤および / または賦形剤を含む、  
医薬組成物。

40

【請求項 19】

治療での使用のための、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

診断での使用のための、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

過剰増殖性の疾患、特に腫瘍性疾患またはがんの、治療および / または予防での使用のための、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

50

請求項 2 1 に記載の組成物であって、  
前記疾患がメラノーマ、乳がん、卵巣がん、腎臓がん、胃腸 / 大腸がん、肺がん、腎明細胞がんおよび / または前立腺がんであることを特徴とする、  
組成物。

【請求項 2 3】

請求項 1 8 から 2 2 のいずれか一項に記載の組成物であって、  
さらなる抗体または抗体フラグメントのような、さらなる活性化剤を含む、  
組成物。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の組成物であって、  
前記活性化剤が抗腫瘍剤であり、  
抗体、小分子、代謝拮抗剤、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管標的剤、  
キナーゼ阻害剤、タンパク質合成阻害剤、免疫治療剤、ホルモンまたはその類似体、およ  
び / または m T O R 阻害剤からなる群から好ましくは選択されることを特徴とする、  
組成物。

10

【請求項 2 5】

請求項 1 8 から 2 4 のいずれか一項に記載の組成物であって、  
静脈内、筋肉内、および / または皮下に投与される、  
組成物。

【請求項 2 6】

請求項 1 8 から 2 5 のいずれか一項に記載の組成物であって、  
さらなる治療的組成物および / または照射と組み合わせて投与される、  
組成物。

20

【請求項 2 7】

対象での E G F 様リガンド仲介の E r b B 3 のリン酸化を阻害する方法であって、  
先行する請求項のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合部位を、E G F 様仲介  
の E r b B 3 のリン酸化を阻害するのに十分な量で、前記対象に投与することを含む、  
方法。

【請求項 2 8】

対象での E r b B 3 に関連するがんを診断する方法であって、  
( a ) 前記対象由来の細胞を先行する請求項のいずれか一項に記載の抗体またはその抗  
原結合部位と生体外または生体内で接触させること、および、  
( b ) 細胞上での E r b B 3 への結合レベルを測定することを含み、  
異常に高いレベルの E r b B 3 への結合は、前記対象が E r b B 3 に関連するがんを患  
っていることを示すことを特徴とする、  
方法。

30

【請求項 2 9】

請求項 2 7 または 2 8 に記載の方法であって、  
前記対象がヒトであることを特徴とする、  
方法。

40

【請求項 3 0】

請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の抗体を製造する方法であって、  
請求項 1 7 に記載の宿主から前記抗体を得るステップを含む、  
方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、抗体、特に E r b B 3 受容体に結合するモノクローナル抗体であって、前記  
結合は、E r b B 3 受容体仲介のシグナル伝達を減少させるものであり、および、そのよ  
うな抗体を含む組成物、ならびに、そのような抗体を用いる方法に関する。

50

## 【背景技術】

## 【0002】

がんは、隣接する組織に浸潤して破壊する形質転換細胞の無制御な増殖により特徴付けられる疾患であり、転移と呼ばれる過程を経て、離れた解剖的部位に広がり得る<sup>1-4</sup>。転移性疾患の存在で、がんは、数か月から何年かの様々な期間に死を引き起こし得る<sup>1-4</sup>。

## 【0003】

最も用いられているがん治療薬は、細胞傷害性化学療法剤（抗芽細胞剤（antiblastic agent）または化学療法剤とも呼ばれる）である。これらの薬は、DNAを損傷する、または細胞増殖を阻害することにより作用する。この方法では、それらは、全ての急速に分裂している細胞を、がん細胞だけでなく、細胞分裂が行われている正常細胞も殺す。がん細胞に対する化学療法薬の作用の特異性欠如は、それらの投与の後にかんりの毒性の原因となる。この10年間で、基礎的な科学研究が細胞の形質転換および細胞増殖の分子メカニズムに関する我々の知識を著しく増加させて、「分子標的」薬または「標的治療」の発展につながった<sup>5</sup>。それらは特定の分子および/または機能的な異常を有するがん細胞に対して作用するように特異的に設計された薬について言及する。しかしながら、標的治療も、副作用に関係し、ほとんどの場合には、腫瘍の成長を一時的に止めることができるだけである。

## 【0004】

HER-3としても知られるErbB3受容体は、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼファミリー（ErbB）に属する。この受容体ファミリーは、4つのメンバー：ErbB1（HER1）、ErbB2（HER2）、ErbB3（HER3）およびErbB4（HER4）からなる。多くの研究が、細胞の生存、増殖、および分化、ならびに悪性転換におけるErbB受容体の重要な役割を示唆している<sup>6-7</sup>。チロシンキナーゼ受容体により仲介されるシグナル伝達は、複雑であり、2種類のリガンド：上皮成長因子（EGF）およびEGF様リガンド（例えばTGFおよびアンフィレギュリン）、ニューレグリン（NRG）、ヘレグリン（HRG）またはNeu分化因子（NDF）とも定義される、との相互作用に関わる。ErbB受容体に結合するリガンドは、受容体ホモおよびヘテロ二量体の形成および内因性のキナーゼドメインの活性化を誘導し、細胞質側末端にある特定のチロシン残基に対してリン酸化をもたらす。これらのリン酸化残基は、様々なタンパク質のための結合部位としての役目を果たし、その動員は細胞内シグナルパスウェイの活性化につながる。一般的に、ヘテロ二量体化は、ホモ二量体化よりも好ましく、ErbB2は、ErbB1（EGFまたはEGF様リガンドにより活性化される）、およびErbB3とErbB4（ニューレグリン、NRGにより活性化される）を含む、他のErbB受容体の、好ましいヘテロ二量体化パートナーである。ErbB受容体により活性化される2つの主なシグナルパスウェイは、Ras-Raf-MAPKおよびPI3K-AKTパスウェイである<sup>8-10</sup>。

## 【0005】

ErbB2遺伝子は、20～30%の乳がんにおいて増幅され、予後不良と関係がある。同様に、ErbB3受容体は、乳がん患者で過剰発現されることも示されている。ErbB2およびErbB3受容体の両方の高レベルな発現は、腫瘍の浸潤性の生物学と関係がある。実際に、NRG刺激により、ErbB2/ErbB3ヘテロ二量体は、ErbBファミリーメンバーのペアの可能な組み合わせの中で、最も強力で長く持続する増殖性細胞内シグナルを送達する<sup>8-11</sup>。様々な研究が、前立腺がん、メラノーマ、および胃がんのような多くのヒトの腫瘍型の進行における、ErbB3受容体の重要な役割を示してきた。

## 【0006】

同時に、実験的および臨床的データは、ErbB3が腫瘍の発達および進行において重要な役割を果たすことを示し、ErbB3を標的とする薬剤が、いくつかのがんの治療への新規かつ有望なアプローチを提供することができることを示唆している<sup>12-24</sup>。

科学的進歩および新しい化学療法剤および標的治療の診療への導入にも関わらず、がんは治療が困難な疾患のままであり、世界中で約13%の死亡原因となっている<sup>1-4</sup>。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

それ故に、より効果的で、できる限り毒性がより少ない、新しい抗腫瘍治療を開発する緊急の必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、特定のErbB3阻害剤が腫瘍退縮を誘導することが可能であることを見出した。特に、モノクローナル抗体MP-RM-1が、抗ErbB3阻害剤として用いられている。

10

【0009】

このように、本発明の第1の態様は、

(a) 配列番号1でコードされる重鎖アミノ酸配列、または少なくともその可変領域、またはそれと少なくとも80%の配列相同性を有するアミノ酸配列、

および/または

(b) 配列番号2でコードされる軽鎖アミノ酸配列、または少なくともその可変領域、またはそれと少なくとも80%の配列相同性を有するアミノ酸配列

20

を含む、

ErbB3受容体に結合する抗体またはそのフラグメントに関する。

【0010】

VH配列(配列番号1)

g a c g t g c a g c t g g t g g a g t c t g g g g g a g a c t t a g t g a a g c  
 c t g g a g g g t c c c t g a a a c t c t c c t g t g t a g t c t c t g g a t t  
 c a c t t t c a g t a c c t a t g g c a t g t c t t g g g t t c g c c a g a c t  
 c c a g a c a g g a g g c t g g a g t g g g t c g c a a c c a t t a g t c a t g  
 g t g a c g g t t a t a c c t a c t a t c c a g a c a g t g t g a a g g g g c g  
 a t t c a c c a t c t c c a g a g a c a a t g c c a a g a a c a c c c t g c a c  
 c t g c a a a t g a g c a g t c t g a a g t c t g a g g a c a c a g c c a t g t  
 a t t a c t g t g c a a g a c a t g g g g a t t a c g a c g a t g a t t a c t a  
 t g c t a t g g a c t a c t g g g g t c a a g g a a c c t c a g t c a c c g t c  
 t c a

30

【0011】

VL配列(配列番号2)

g a t a t t g t g a t g a c c c a g t c t c c a t c c t c c c t g a c t g t g a  
 t a g c a g g a g a g a a g g t c a c t a t g a g c t g c a a g t c c a g t c a  
 g a g t c t g t t a a a c a g t g g a a a t c a a a a g a a c t a c t t g a c c  
 t g g t a c c a a c a g a a a c c a g g g c a g c c t c c t a a a c t g t t g a  
 t c t a c t g g g c a t c c a c t a g g g a a t c t g g g g t c c c t g a t c g  
 c t t c a c a g g c a g t g g a t c t g g a a c a g a t t t c a c t c t c a c c  
 a t c a g c a g t g t g c a g g c t g a a g a c c t g g c a g t t t a t t a c t  
 g t c a g a a t g a a t a t a c t t a t c c g c t c a c g t t c g g t g c t g g  
 g a c c a a g c t g g a g c t g a a a c g g g

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】MP-RM-1が、乳がん細胞表面上のErbB3受容体の発現を減少させることを示す。

【図2】MP-RM-1が、乳がん細胞においてErbB3受容体を下方制御することを示す。

50

【図3】MP-RM-1が、ヒト乳がん細胞MDA-MB-435において、Erbb3受容体の半減期を減少させることが可能であることを示す。

【図4】MP-RM-1が、ヒト乳がん細胞SKBR-3において、Erbb3受容体の半減期を減少させることが可能であることを示す。

【図5】Erbb3受容体の半減期の減少に対するMP-RM-1の効果が、リソソーム阻害剤クロロキンにより阻害されることを示す。

【図6】MP-RM-1が、ヒト乳がんMDA-MB-435およびヒトメラノーマ細胞IR-8において、受容体リガンドNRG-1により誘導されるErbb3およびAKTのリン酸化を阻害することを示す。

【図7】Erbb3およびAKTのリガンド誘導性のリン酸化が、MP-RM-1によって時間依存的な態様で阻害されることを示す。

【図8】MP-RM-1が、Erbb3およびAKTのリガンド誘導性の活性化を拮抗することが可能であることを示す。

【図9】MP-RM-1が急速(30分)に細胞内に内部移行されることを示す。

【図10】ヒト乳がん細胞およびヒト前立腺がん細胞における、Erbb3およびAKTのリガンド誘導性の活性化に対するMP-RM-1およびトラスツズマブの効果を比較する。

【図11】MP-RM-1が、MET増幅のヒト胃がん細胞MKN-45において、基底のErbb3およびAKTのリン酸化(phosphorylation)を、阻害することが可能であることを示す。

【図12】MP-RM-1が、ヒト乳がん細胞MDA-MB-435におけるリガンド誘導性の増殖を阻害することを示す。

【図13】MP-RM-1が、ヒト前立腺がん異種移植片DU145の増殖を阻害することを示す。

【図14】マウスへの注射後4時間という早さで、ヒトメラノーマ異種移植片IR-8において、MP-RM-1がErbb3の下方制御を誘導し、AKTの活性化を阻害することを示す。

【図15】ヒトメラノーマ細胞IR-8の、cMP-RM-1#1、hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10、hMP-RM-1#20のMP-RM-1抗体変異体での処理が、細胞表面上のErbb3受容体の発現を減少させることを示す。

【図16】ヒト化変異体hMP-RM-1#6が急速(30分)に細胞内に内部移行されることを示す。

【図17】キメラ変異体cMP-RM-1#1、および、ヒト化変異体hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10、hMP-RM-1#20の抗体変異体の、ヒトメラノーマ細胞IR-8におけるErbb3の半減期に対する効果を示す。

【図18】(A)ヒト卵巣がん細胞、および(B)ヒト胃がん細胞でのErbb3およびAKTのリン酸化に対する、cMP-RM-1#1、hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10およびhMP-RM-1#20の抗体変異体の阻害効果を示す。

【図19】(A)ヒトメラノーマ細胞、または(B)ヒト胃がん細胞の軟寒天でのコロニー形成に対する、cMP-RM-1#1、hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10およびhMP-RM-1#20の抗体変異体の阻害効果を示す。

【図20】cMP-RM-1#1、hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10およびhMP-RM-1#20の抗体変異体で処理されたマウスの腫瘍異種移植片が、対照マウスのもものよりも著しく低く増殖することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、その抗体の少なくとも1つの抗原結合部位を有し、および/または、同じ生物学的活性を示す、「フラグメント」または「誘導体」を含む。

【0014】

10

20

30

40

50

さらに、抗体は、好ましくは、少なくとも1つの免疫グロブリン重鎖および少なくとも1つの免疫グロブリン軽鎖を含む。免疫グロブリン鎖は、可変領域および場合により定常領域を含む。可変領域は、相補性決定領域(CDR)、例えば、CDR1、CDR2および/またはCDR3領域、およびフレームワーク領域を含んでよい。

【0015】

本明細書において用いられる、2つのポリペプチド配列の間の「配列相同性」は、配列番号1および/または配列番号2でコードされるアミノ酸配列の好ましくは全長にわたる、配列間での同一のアミノ酸の割合を示す。本発明の好ましいポリペプチド配列は、少なくとも80%、さらに好ましくは85%、さらにより好ましくは90%、93%、95%、96%、97%、98%または99%の配列相同性を有する。

10

【0016】

他の好ましい実施態様によれば、本発明の抗体は、Erbb3受容体仲介のシグナル伝達を減少させる。前記のErbb3受容体仲介のシグナル伝達の減少は、好ましくは、Erbb3の下方制御により引き起こされる。さらなる実施態様によれば、Erbb3の下方制御は、好ましくは、細胞表面上のErbb3のレベルを減少させることにより達成され、すなわち、好ましくは、本発明の抗体は、細胞表面上のErbb3のレベルを減少させる能力を有する。

【0017】

本発明の抗体は、少なくとも1つの抗原結合部位、例えば、1つまたは2つの抗原結合部位を有してよい。

20

【0018】

本発明の抗体は、好ましくは、Erbb3の細胞外ドメインに結合する。

【0019】

抗体は、天然および/または合成起源の任意の抗体であってよく、例えば、哺乳類起源の抗体である。好ましくは、もし存在するならば、定常領域がヒトの定常領域である。可変領域は、好ましくは、哺乳類の可変領域、例えば、ヒト化またはヒトの可変領域である。

【0020】

本発明による抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。モノクローナル抗体が好ましい。特に、本発明の抗体は、好ましくは、組み換え抗体、ヒト化または完全なヒト抗体、キメラ抗体、多重特異性抗体、特に二重特異性抗体、またはそのフラグメントからなる群から選択される。

30

【0021】

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein<sup>25</sup>の方法のような任意の適切な方法によって、または組み換えDNA方法によって、生産されてよい。モノクローナル抗体は、Clacksonら<sup>26</sup>に記載されている技術を用いてファージ抗体ライブラリーから分離されてもよい。

【0022】

抗体のヒト化型は、キメラ化またはCDR移植(CDR grafting)のような、当技術分野で知られている方法によって生産されてよい。ヒト化抗体の生産のための代替方法は、当技術分野でよく知られており、例えば、欧州特許出願公開第0239400(A1)号明細書および国際公開第90/07861号パンフレットに記載されている。ヒト抗体は、in vitroの方法によって得ることもできる。適切な例は、限定されないが、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、および同類のものを含む。

40

【0023】

本発明によれば、「キメラ抗体」は、例えば、マウスとヒトのような、異なる種由来のポリペプチドを含む抗体に関する。キメラ抗体の生産は、例えば、国際公開第89/09622号パンフレット(WO89/09622)に記載されている。

【0024】

単一特異性抗体は、全てが同一の抗原に対して親和性を有する抗体である。多重特異性

50

抗体は、様々な抗原に対して親和性を有する抗体である。二重特異性抗体は、2つの異なる抗原に対して親和性を有する。

【0025】

抗体という用語は、抗体の少なくとも1つの抗原結合部位を有する「フラグメント」または「誘導体」を含む。好ましい実施態様によれば、抗体またはそのフラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')フラグメント、Fvフラグメント、ダイアボディ(diabody)、ScFv、小モジュール免疫薬剤(small modular immunopharmaceutical)(SMIP)、アフィボディ(affibody)、アビマー(avimer)、ナノボディ(nanobody)、ドメイン抗体および/または単鎖であってよい。

10

【0026】

「アビマー」は、例えば、in vitroでのエクソンシャッフリングおよびファージディスプレイを用いて改変された、多重結合タンパク質またはペプチドに関する。多重結合ドメインは連結して、単一エピトープの免疫グロブリン(immunoglobulin)ドメインと比較して、より高い親和性および特異性をもたらす。

【0027】

「ナノボディ」または単一ドメイン抗体は、単一の単量体の抗体可変領域からなる抗体フラグメントに関する。

【0028】

「アフィボディ」分子は、数多くの標的タンパク質に特異的に結合するように改変された、小さくて高い親和性のタンパク質である。

20

【0029】

本発明の抗体は、好ましくは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、およびIgE抗体型であってよい。生産される抗体は、初めはそのようなアイソタイプを有する必要はないが、むしろ、生産された抗体は任意のアイソタイプを有することができ、その抗体はアイソタイプ転換(isotype-switched)され得ることが理解されよう。

【0030】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、場合により、治療目的のために脱免疫化(deimmunized)される。

30

【0031】

本発明の特に好ましい実施態様において、抗体は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ)に2009年10月15日に寄託され、DSM ACC3018と命名されたMP-RM-1である。

【0032】

さらに好ましい実施態様によれば、抗体またはそのフラグメントは、ハイブリドーマ細胞株DSM ACC3018またはその誘導体から生産されてよい。

本発明の好ましい実施態様によれば、ハイブリドーマ細胞株DSM ACC3018またはその誘導体から生産される抗体またはフラグメントは、ヒト化抗体またはそのフラグメントである。好ましくは、このヒト化抗体は、本発明の配列3~14の少なくとも1つを含む。特に好ましい実施態様によれば、抗体は、cMP-RM-1#1、cMP-RM-1#2、cMP-RM-1#3、cMP-RM-1#4、hMP-RM-1#5、hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#7、hMP-RM-1#8、hMP-RM-1#9、hMP-RM-1#10、hMP-RM-1#11、hMP-RM-1#12、hMP-RM-1#13、hMP-RM-1#14、hMP-RM-1#15、hMP-RM-1#16、hMP-RM-1#17、hMP-RM-1#18、hMP-RM-1#19、hMP-RM-1#20(c:キメラ抗体;h:ヒト化抗体)の群から選択される。

40

【0033】

特に好ましい実施態様は、cMP-RM-1#4、hMP-RM-1#14、hMP-

50

R M - 1 # 1 7 または h M P - R M - 1 # 2 0 の群から選択された抗体に関する。

【 0 0 3 4 】

別の好ましい実施態様は、h M P - R M - 1 # 6、h M P - R M - 1 # 7、h M P - R M - 1 # 8、h M P - R M - 1 # 9、h M P - R M - 1 # 1 0、h M P - R M - 1 # 1 1、h M P - R M - 1 # 1 2、h M P - R M - 1 # 1 9 および h M P - R M - 1 # 2 0 からなる抗体グループに関する。特に好ましい抗体グループは、抗体 h M P - R M - 1 # 6、h M P - R M - 1 # 1 0 および h M P - R M - 1 # 2 0 を含む。

【 0 0 3 5 】

本発明の抗体が、例えば、薬物ターゲティングおよびイメージング応用のために、他の部分とさらに結合され得ることは、当業者にとって明らかである。そのような結合は、抗体または抗原結合部位の発現後に化学的に行われてよく、または、その結合産物は、本発明の抗体または抗原の中に D N A レベルで操作されてよい。

【 0 0 3 6 】

したがって、診断目的のために、本発明の抗体または抗体フラグメントは、標識され、すなわち標識グループに結合されてよい。適切な標識は、放射線ラベル、蛍光ラベル、適切な色素群、酵素ラベル、色素原、化学発光群、ピオチニル群、二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープなどを含む。

【 0 0 3 7 】

これらの標識化抗体または抗体フラグメントは、特に免疫組織化学分析において、または *i n v i v o* での分子イメージングのために用いられてよい。

【 0 0 3 8 】

治療目的のために、本発明の抗体または抗体フラグメントは、エフェクターグループ、特に、放射性グループまたは細胞傷害性グループのような治療エフェクターグループと結合されてよい。

【 0 0 3 9 】

標識グループまたはエフェクターグループは、潜在的な立体障害を減らすために、様々な長さのスペーサーアームによって結合されてよい。

【 0 0 4 0 】

別の態様によれば、本発明は、本発明の抗体またはそのフラグメントをコードする核酸分子、またはストリンジェントな条件下でそれにハイブリダイズすることが可能な核酸に関する。上述の抗体、抗体フラグメント、またはその誘導体をコードする本発明の核酸分子は、例えば D N A、c D N A、R N A、または合成的に生産された D N A または R N A、または、任意のこれらの核酸分子を単独または組み合わせのいずれかで含む、組み換えで生産されたキメラ核酸分子であってよい。核酸分子は、遺伝子全体またはその実質的部分、またはそのフラグメントおよび誘導体に対応する、ゲノム D N A でもよい。ヌクレオチド配列は、自然発生のヌクレオチド配列に対応し、または単一または複数のヌクレオチド置換、欠失または付加を含む。本発明の特に好ましい実施態様において、核酸分子は c D N A 分子である。

【 0 0 4 1 】

「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」の用語は、例えば、S a m b r o o k からの M o l e c u l a r C l o n i n g : A l a b o r a t o r y m a n u a l ( 1 9 8 9 )、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、N e w Y o r k、U S A の、「E x p r e s s i o n o f c l o n e d g e n e s i n E . c o l i」に記載されている標準化されたハイブリダイゼーション条件下で、2つの核酸断片がお互いにハイブリダイズすることを意味する。そのような条件は、例えば、6 . 0 x S S C 中で約 4 5 でのハイブリダイゼーションに続く、2 . 0 x S S C で 5 0、好ましくは 2 . 0 x S S C で 6 5、または 0 . 2 x S S C で 5 0、好ましくは 0 . 2 x S S C で 6 5 での洗浄工程である。

【 0 0 4 2 】

本発明の別の態様は、本発明の核酸分子を含むベクターに関する。前記ベクターは例え

10

20

30

40

50

ば、ファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターであってよい。レトロウイルスベクターは、複製可能または複製欠損であってよい。好ましくは、本発明のベクターは、核酸分子が原核生物および/または真核生物宿主細胞における転写および場合により発現を可能にする1つまたは複数の制御配列に動作可能に結合している発現ベクターである。

【0043】

本発明はさらに、本発明のベクターを含む宿主に関する。前記宿主は、原核生物または真核生物細胞または非ヒト遺伝子導入動物であってよい。宿主内に存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主のゲノム内に組み込まれるか染色体外に留まるかのいずれかでよい。

10

【0044】

宿主は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物、哺乳類のような任意の原核生物または真核生物の細胞であってよく、または、好ましくは、ヒトの細胞である。好ましい真菌細胞は、例えば、*Saccharomyces* 属のもの、特に *S. cerevisiae* 種のものである。

【0045】

本発明は加えて、前記抗体の合成が可能な条件下で本発明の宿主を培養して、前記培養液から前記抗体を回収することを含む、抗体の調製方法に関する。

【0046】

本発明のさらなる態様は、本発明の抗体またはそのフラグメント、本発明の核酸分子、ベクター、宿主、または本発明の方法により得られた抗体を含む医薬組成物に関する。本明細書で用いられる用語「組成物」は、少なくとも1つの本発明の化合物を含む。好ましくは、そのような組成物は治療/医薬または診断の組成物である。

20

本発明の診断の組成物は、本明細書で定義された過剰増殖性の疾患の発症または疾患状態を評価するために用いられてよい。

【0047】

組成物は、好ましくは、薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または賦形剤を含む。

【0048】

適切な医薬担体、賦形剤および/または希釈の例は、当技術分野でよく知られており、リン酸緩衝生理食塩溶液、水、油/水エマルジョンのようなエマルジョン、様々な型の湿潤剤、滅菌溶液などを含む。そのような担体、賦形剤および/または希釈剤を含む組成物は、よく知られた従来型の方法で処方され得る。

30

【0049】

適切な組成物の投与は、異なる方法、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、皮内、鼻腔内または気管支内投与により達成されてよい。好ましいのは静脈内、筋肉内および/または皮下投与である。

【0050】

これらの医薬組成物は、適切な用量で対象に投与されてよい。投与計画は、主治医および臨床学的因子により決定されてよい。

40

【0051】

本発明の組成物は、局所的または全身的に投与されてよい。非経口投与用の調製液は、滅菌された含水または非水の溶液、懸濁液、およびエマルジョンを含む。非水の溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、およびエチルオレイン酸のような注射可能な有機物エステルである。含水の担体は、水、アルコール/含水の溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含み、生理食塩水および緩衝培地が含まれる。非経口の賦形剤は、食塩水、リンゲルブドウ糖 (*Ringer's dextrose*)、ブドウ糖および塩化ナトリウム、乳酸リンゲル、または固定油を含む。静脈内の賦形剤は、液体および栄養の補給、電解質補給 (リンゲルブドウ糖に基づくもののような)、および同類のものを含む。例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性

50

ガスおよび同類のもののような、防腐剤および他の添加剤が存在してもよい。さらに、本発明の医薬組成物は、医薬組成物の使用目的に応じてさらなる薬剤を含む。

【0052】

特に好ましい実施態様によれば、組成物は、さらなる抗体または抗体フラグメントのような、さらなる活性化剤を含む。

【0053】

好ましくは、本発明の組成物は、少なくとも1つのさらなる抗腫瘍剤と組み合わせて用いられる。前記組み合わせは、例えば、異常な細胞増殖を阻害するのに効果的である。多くの抗腫瘍剤が当技術分野で現在知られている。一般的に、用語は、過剰増殖性障害の予防、軽減および/または治療が可能な全ての薬剤を含む。特に好ましいのは、アポトーシスを誘導する抗腫瘍剤である。

10

【0054】

好ましくは、抗腫瘍剤は、抗体、小分子、代謝拮抗剤、アルキル化剤、トポイソメラーゼ (topoisomerase) 阻害剤、微小管標的剤、キナーゼ阻害剤、タンパク質合成阻害剤、免疫療法、ホルモンまたはその類似体、および/またはmTOR阻害剤からなる群から選択される。

【0055】

本明細書で提供される抗体と組み合わせて用いることができる抗腫瘍剤の具体例は、例えば、ゲフィチニブ、ラパチニブ、スニチニブ、ペメトレキセド、ペバシズマブ、セツキシマブ、イマチニブ、アレムツズマブ、トラスツズマブ、リツキシマブ、エルロチニブ、ボルテゾミブおよび同類のものを含み、特にトラスツズマブである。本明細書に記載されクレームされる組成物に用いられる、他の具体的な抗腫瘍剤は、バクリタキセル、アントラサイクリン、フルオロピリミジン、ピンカルカロイド、白金塩のような、例えば化学療法剤を含み、特に、カペシタビン、ダウノルピシン、ダウノマイシン、ダクチノマイシン、ドキシルピシン、エピルピシン、イダルピシン、エソルピシン (esorubicin)、プレオマイシン、マホスファミド、イホスファミド、シトシンアラビノシド、ビスクロロエチルニトロソウレア (bis-chloroethylnitrosourea)、プスルファン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ミトラマイシン、プレドニゾン、ヒドロキシプロゲステロン、テストステロン、タモキシフェン、ダカルバジン、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、ペンタメチルメラミン、ミトキサントロン、アムサクリン、クロラムブシル、メチルシクロヘキシルニトロソウレア (methylcyclohexylnitrosourea)、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン (CA)、5-アザシチジン、ヒドロキシ尿素、デオキシコホルマイシン、4-ヒドロキシペルオキシシクロホスフォラミド (4-hydroxyperoxy cyclophosphoramide)、5-フルオロウラシル (5-FU)、5-フルオロデオキシウリジン (5-FUdR)、メトトレキサート (MTX)、コルヒチン、タキソール、ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド、トリメトレキサート、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール (DES) である。

20

30

【0056】

本発明の組成物は、上述の活性化剤および/または照射および/または放射線療法を含むさらなる治療的組成物と組み合わせて投与されてよい。

40

【0057】

好ましい実施態様によれば、本発明の組成物は、過剰増殖性疾患、特に腫瘍性疾患またはがんの、治療および/または予防での使用のためである。組成物は、過剰増殖性疾患、特に腫瘍性疾患またはがんを、治療および/または予防するための薬剤の製造のために用いられてもよい。

【0058】

本明細書で定義される過剰増殖性疾患は、任意の腫瘍、すなわち任意の異常な、および/または無制御な組織の新生物を含む。本明細書で使用される用語「無制御な組織の新生

50

物」は、機能障害および/または増殖制御の欠失に依存する。過剰増殖性疾患は、腫瘍性疾患および/または転移性または浸潤性がんのようながんを含む。

【0059】

過剰増殖性疾患は、好ましくは、がん、特にメラノーマ、乳がん、卵巣がん、腎臓がん、胃腸/大腸がん、肺がん、腎明細胞がんおよび/または前立腺がんのような、E r b B 3の発現、過剰発現または機能亢進と関連し、伴い、または起因する障害から選択される。特に、これらの腫瘍に関して、E r b B 3の、がんの進行および増殖を促進する役割が明らかにされており、したがって、このタンパク質の阻害は、一定の利益を与えることができる。

【0060】

本発明はさらに、疾患を治療する方法に関し、本発明の抗体は哺乳類に投与され、前記疾患は直接的または間接的にE r b B 3の異常なレベルの発現または活性と相関がある。

【0061】

本発明のさらなる態様は、E G F様仲介のE r b B 3のリン酸化を阻害するのに十分な量で上述の抗体またはその抗原結合部位を対象に投与することを含む、対象でのE G F様リガンド仲介のE r b B 3のリン酸化を阻害する方法に関する。「E r b B 3のリン酸化」は、アミノ酸残基、好ましくはチロシン残基のリン酸化をいう。

【0062】

本発明のさらに別の態様は、対象でのE r b B 3に関連するがんを診断する方法であって、

( a ) 対象由来の細胞を先行する請求項のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合部位と生体外または生体内で接触させること、および、

( b ) 細胞上でのE r b B 3への結合レベルを測定することを含み、異常に高いレベルのE r b B 3への結合は、その対象がE r b B 3に関連するがんを患っていることを示すことを特徴とする方法に向けられる。

【0063】

本発明の用語では、「異常に高い」は、がんを患っていない健康な対象と比較して、より高いE r b B 3の結合レベルを意味する。

【0064】

好ましくは、対象は動物であり、より好ましくは哺乳類であり、特に好ましくはヒトである。

【実施例】

【0065】

(実施例1) モノクローナル抗体M P - R M - 1の生産。

4週齢B a l b / cマウスは、ヒトE r b B 3受容体を導入したN I H / 3 T 3生細胞の腹腔内注射により免疫化された。7日後、マウスは免疫原の腹腔内注射をさらに受けた。さらに7日後、マウスは免疫原で静脈内にブーストされて、3日後に脾臓は細胞融合のために取り除かれた。体細胞雑種は、免疫脾臓細胞とマウス非分泌型骨髓腫細胞株N S - 1の融合により調製された。ハイブリドーマの上清は、L T R - n e o N I H / 3 T 3ではなくて、L T R - E r b B 3が導入された細胞との、微分反応度に基づいて選択された。全ての陽性のハイブリドーマ細胞のコロニーは、限界希釈により二度クローン化され、さらに特性化された。M P - R M - 1 (アイソタイプI g G 2 a ) と命名された選択されたモノクローナル抗体は、E r b B 3受容体の細胞外ドメインを特異的に認識することが見出された。

【0066】

M P - R M - 1抗体を産生するハイブリドーママウス細胞株は、D S M Z ( D e u t s c h e S a m m l u n g v o n M i k r o o r g a n i s m e n u n d Z e l l k u l t u r e n ) に寄託され、D S M A C C 3 0 1 8 と命名された。

【0067】

(実施例2) 乳がん細胞の表面上のE r b B 3受容体発現に対するM P - R M - 1の効果

10

20

30

40

50

。

## 【0068】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のMP-RM-1とともに氷上で30分間保たれ、それから37℃に戻された。望ましい時間に、細胞はトリプシン処理されて、フルオレセイン標識されたヤギ抗マウスIgG抗体で染色され、FACSにより分析された。

## 【0069】

結果：MP-RM-1は、細胞表面上のErbb3受容体発現を、時間依存的な方法で減少させる（図1）。

## 【0070】

（実施例3）乳がん細胞におけるErbb3受容体の下方制御に対するMP-RM-1の効果。

## 【0071】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、0.2% FBS DMEM中で24時間培養されて、それから、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のMP-RM-1の存在または非存在下で、15、60、120および240分間インキュベートされた。インキュベーション時間の最後に、細胞は溶解されて、Erbb3およびAKTのタンパク質レベルに関して抗Erbb3および抗AKTでのウエスタンブロッティングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗PLC-1で再検出された。

## 【0072】

結果：MP-RM-1は、120分後にErbb3受容体の下方制御を誘導する（図2）。

## 【0073】

（実施例4）乳がん細胞におけるErbb3受容体の半減期に対するMP-RM-1の効果。

## 【0074】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、0.2% FBS DMEM中で24時間培養されて、それから、MP-RM-1とともに、または、無しで、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドで追跡された。細胞は溶解されて、Erbb3およびAKTのタンパク質レベルに関して抗Erbb3および抗AKTでのウエスタンブロッティングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗PLC-1または抗アクチンで再検出された。

## 【0075】

結果：Erbb3受容体の半減期は、シクロヘキシミド追跡されたMP-RM-1処理のMDA-MB-435細胞では、PBS処理の対照細胞と比較して、著しく減少される（図3）。

## 【0076】

（実施例5）乳がん細胞におけるErbb3受容体の半減期に対するMP-RM-1の効果。

## 【0077】

材料および方法：ヒト乳がん細胞SKBR-3は、0.2% FBS DMEM中で24時間培養されて、それから、MP-RM-1の存在または非存在下で、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドで追跡された。細胞は溶解されて、Erbb3のレベルに関して抗Erbb3でのウエスタンブロッティングにより分析された。

## 【0078】

結果：Erbb3受容体の半減期は、シクロヘキシミド追跡されたMP-RM-1処理のSKBR-3細胞では、PBS処理の対照細胞と比較して、著しく減少される（図4）。

。

## 【0079】

（実施例6）MP-RM-1により誘導されるErbb3受容体の下方制御に対するクロ

10

20

30

40

50

ロキンの効果。

【0080】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、0.2% FBS上で24時間培養されて、10 $\mu$ g/mlのシクロヘキシミドで3時間追跡された。細胞は、このとき、クロロキンの存在または非存在下で、MP-RM-1とともにインキュベートされた。インキュベーション後、細胞は溶解されて、Erbb3のタンパク質レベルに関して抗Erbb3でのウエスタンブロッティングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗アクチンで再検出された。

【0081】

結果：MP-RM-1により誘導されるErbb3受容体の下方制御は、クロロキンにより阻害される(図5)。

10

【0082】

(実施例7)乳がん細胞およびメラノーマがん細胞における、リガンド誘導性のErbb3およびAKTのリン酸化に対するMP-RM-1の効果。

【0083】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435、ヒトメラノーマ細胞A375およびIR-8は、DMEMまたはRPMIでの0.2% FBS中で24時間、培養された。細胞は、1または10 $\mu$ g/mlのMP-RM-1の存在または非存在下で、2時間インキュベートされて、それから、10ng/mlのNRG-1で5分間刺激された。インキュベーション後、細胞は溶解されて、Erbb3、p-Erbb3、AKT、p-AKT、またはp-Erksのタンパク質レベルに関して抗Erbb3、抗p-Erbb3、抗AKT、抗p-AKTおよび抗p-Erksでのウエスタンブロッティングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗アクチンで再検出された。

20

【0084】

結果：MP-RM-1で事前に処理された細胞は、Erbb3およびAKTのリガンド誘導性のリン酸化の用量依存的な阻害を示す(図6)。

【0085】

(実施例8)リガンド誘導性のErbb3およびAKTのリン酸化に対するMP-RM-1の効果。

30

【0086】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、0.2% FBS DMEM中で24時間培養されて、それから、10ng/mlのNRG-1で5分間、刺激された。細胞は、このとき、NRG-1の刺激の前に、10 $\mu$ g/mlのMP-RM-1で、15、60および120分間インキュベートされた。インキュベーション後、細胞は溶解されて、Erbb3、p-Erbb3、AKTおよびp-AKTのタンパク質レベルに関して抗Erbb3、抗p-Erbb3、抗AKTおよび抗p-AKTでのウエスタンブロッティングにより分析された。

【0087】

結果：MP-RM-1で事前に処理された細胞は、Erbb3およびAKTのリガンド誘導性のリン酸化の、時間依存的な阻害を示す(図7)。

40

【0088】

(実施例9)リガンド誘導性のErbb3およびAKTのリン酸化に対するMP-RM-1の効果。

【0089】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は0.2% FBS DMEM中で24時間培養されて、それから10ng/mlのNRG-1および10 $\mu$ g/mlのMP-RM-1で5分間、同時に刺激された。インキュベーション後、細胞は溶解されて、Erbb3、p-Erbb3およびp-AKTのタンパク質レベルに関して抗Erbb3、抗p-Erbb3および抗p-AKTでのウエスタンブロッティングにより分析され

50

た。

【0090】

結果：MP-RM-1での5分の刺激は、Erbb3およびAKTのリン酸化を誘導せず、MP-RM-1は受容体アゴニストでないことを示す。対照的に、リガンド誘導性のErbb3およびAKTのリン酸化は、MP-RM-1によって部分的に阻害され、MP-RM-1は部分的な受容体アンタゴニストであることを示す(図8)。

【0091】

(実施例10)乳がん細胞MDA-MB-435におけるMP-RM-1の内部移行。

【0092】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、22×22mmのカバースリップに蒔かれて、0.2% FBS DMEM中で24時間、培養された。細胞は、それから、10μg/mlのMP-RM-1とともに氷上で30分間インキュベートされて、37℃に戻された。30および60分後、細胞は4%パラホルムアルデヒド中で固定され、PBS中で0.2% Triton-X100で透過処理され、それから、フルオレセイン標識されたヤギ抗マウス抗体(グリーン染色)、ファロイジン(Phalloidin)(レッド染色)で染色された。細胞核はブルーで対比染色された。黄色と白色の矢印は、それぞれ、細胞膜上および細胞質中でのMP-RM-1の局在化を示す。

10

【0093】

結果：MDA-MB-435細胞は、氷上でのMP-RM-1インキュベーションの30分後にヤギ抗マウスの膜の陽性(黄色矢印)を示し、MP-RM-1抗体は完全に細胞膜上に局在化されることを示す。37℃のインキュベーションの30および60分後、ヤギ抗マウスのシグナルは全体的に細胞内(白色矢印)であり、MP-RM-1は細胞ごとに内部移行されたことを示す(図9)。

20

【0094】

(実施例11)乳がん細胞および前立腺細胞におけるErbb3およびAKTのリガンド誘導性の活性化に対する、MP-RM-1およびトラスツズマブの比較効果。

【0095】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435およびヒト前立腺がん細胞DU145は、0.2% FBS RPMI中で24時間培養されて、それから、10ng/mlのNRG-1で5分間刺激された。細胞は、このとき、リガンド刺激の前に、1または10μg/mlのMP-RM-1、または10μg/mlのトラスツズマブのいずれかで2時間インキュベートされた。インキュベーション後、細胞は溶解されて、Erbb3、p-Erbb3、AKT、p-AKTおよびp-Erksのタンパク質レベルに関して抗Erbb3、抗p-Erbb3、抗AKT、抗p-AKTおよび抗p-Erksでのウエスタンブロッティングにより分析された。

30

【0096】

結果：MP-RM-1は、リガンド誘導性のErbb3およびAKTのリン酸化を、トラスツズマブと同程度に阻害する。しかしながら、Erbb3の下方制御はMP-RM-1によって誘導されるが、トラスツズマブによってはされなかった(図10)。

【0097】

(実施例12)MET増幅の胃がん細胞における、MET/Erbb3/AKTシグナル伝達軸(signaling axis)に対するMP-RM-1の効果。

40

【0098】

材料および方法：ヒト胃がん細胞MKN-45は、0.2% FBS DMEM中で24時間培養された。細胞は、それから、1および10μg/mlのMP-RM-1、または10μg/mlのトラスツズマブ、または0.1、1、および10μg/mlのMET阻害剤SU11274にさらされた。細胞はそれから溶解されて、Erbb3、p-Erbb3、AKT、p-AKTおよびp-METのタンパク質レベルに関して抗Erbb3、抗p-Erbb3、抗AKT、抗p-AKTおよび抗p-METでのウエスタンブロッティングにより分析された。

50

## 【0099】

結果：MKN-45細胞は、リガンド非依存性、MET依存性のErbB3受容体およびAKTのリン酸化を示す。トラスツマブはしないが、MP-RM-1は、この基礎活性(basal activity)を阻害する。さらに、MP-RM-1は、in vivoにおけるリガンド非依存性(ligand-independent)のMET/ErbB3の関連性を破壊することが可能である(図11)。

## 【0100】

(実施例13)乳がん細胞のリガンド誘導性の増殖に対するMP-RM-1の効果。

## 【0101】

材料および方法：ヒト乳がん細胞MDA-MB-435は、0.2% FBS RPM I中で24時間培養されて、それから、1または10 $\mu$ g/mlのMP-RM-1の存在または非存在下で、10ng/mlのNRG-1で48時間インキュベートされた。インキュベーションの最後に、細胞はトリプシン処理されて計測された。

10

## 【0102】

結果：MP-RM-1は、用量依存的な方法で、MDA-MB-435細胞の、リガンド誘導性の増殖を阻害する(図12)。

## 【0103】

(実施例14)前立腺がん異種移植片に対するMP-RM-1の効果。

## 【0104】

材料および方法：ヒト前立腺がん異種移植片は、 $5 \times 10^6$ のDU145細胞を5週齢CD1ヌードマウスに皮下注射することにより樹立された。異種移植が明白な場合に、マウスは10匹の2つのグループに分離された。その2つのグループは同等の平均腫瘍量を有した。1つのグループは、PBSバッファーでの20mg/kgのMP-RM-1の腹腔内注射を週に2回受け、一方で、その他はPBSのみを受けた(対照群)。腫瘍量はキャリパーにより毎日モニターされた。エラーバーは、各グループでのSEを示した。MP-RM-1で処理されたマウスとPBSで処理された(対照)マウスとの間の、 $P = 0.01$ は有意差(有意差)を表し、 $P = 0.006$ は有意差(有意差)を表す。

20

## 【0105】

結果：MP-RM-1で処理されたマウスは、対照マウスと比較して最大で60%までの腫瘍量の減少を示す(0.42cm<sup>3</sup>対0.96cm<sup>3</sup>)(図13)。

30

## 【0106】

(実施例15)メラノーマ異種移植片におけるErbB3の下方制御およびAKTのリン酸化に対するMP-RM-1のin vivoでの効果。

## 【0107】

材料および方法：メラノーマ異種移植片IR-8を有するヌードマウスは、200 $\mu$ gのMP-RM-1で処理され、または、されなかった(U)。4時間、16時間、および24時間後、腫瘍は回収され、50mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM EDTA、0.1% NP-40、250mM NaCl、ロイペプチン、ペプスタチン(pepstatine)、アプロチニンおよびフェニルメチルスルフォニルフルオリド(phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride)存在下の50mM NaFを含む溶解バッファー(w:v; 1:10)中で、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズされた。ホモジネートは、4にて13000rpmで10分間遠心分離された。上清の一定分量は、ErbB3、AKTおよびp-AKTのタンパク質レベルに関して抗ErbB3、抗AKT、抗p-AKTでのウエスタンブロッティングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗PLC-1で再検出された。

40

## 【0108】

結果：マウスへの注射後最初の4時間、メラノーマ異種移植片において、MP-RM-1は、ErbB3の下方制御を誘導し、AKTのリン酸化を阻害する(図14)。

## 【0109】

50

(実施例16) MP-RM-1抗体のキメラおよびヒト化型の生産。

【0110】

非ヒト抗体をヒト化する方法は、当技術分野でよく知られている。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒト源からそれに導入された1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、「移入(import)」残基と呼ばれ、一般的に、「移入」可変領域から取られる。ヒト化は、公知の方法(27-29)に従って、特に、齧歯類CDRまたはCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列で置換することにより、基本的に行なうことができる。したがって、そのような「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり(米国特許第4816567号)、ここで、無傷のヒト可変領域よりも実質的に少ないのが非ヒト種由来の対応する配列で置換されている。実際には、ヒト化抗体は、一般的に、いくつかのCDR残基、および、場合により、いくつかのフレームワーク領域(FR)の残基が、齧歯類抗体における類似の部位由来の残基で置換されているヒト抗体である。

10

【0111】

MP-RM-1抗体のキメラおよびヒト化型を生産するために、従来法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いて)、MP-RM-1抗体を産生するハイブリドーマ細胞(DSMZに寄託され、DSM ACC 3018と命名された)が増やされ、全RNAが抽出され、抗体の可変領域をクローニングしてシーケンスするために、RT-PCRが行われた。

【0112】

MP-RM-1抗体の可変領域の配列情報に基づき、前記領域の20の異なる変異体が、標準的な方法を用いた遺伝子合成により得られた。

20

抗体のキメラ化のために、マウス定常領域がヒト定常領域と置き換えられた。重鎖(HC)の2つのキメラ型がIgG1コンテキスト(context)内に作成され、重鎖(HC)の2つのキメラ型がIgG3コンテキスト内に作成された。

【0113】

抗体のヒト化のために、マウス由来の相補性決定領域(CDR)が、ヒト抗体フレームワークへ移植された。

【0114】

重鎖(HC)のヒト化型16個が、IgG1およびLC-kappaコンテキスト内に作成された。それぞれの型は、FR中の特異的 point mutation によって特徴付けられる。

30

【0115】

配列情報:

キメラ配列

配列3: キメラIgG1 HC配列

mnfglrlliflvltlkgvqcdvqLVESGGDLVKPGGSLKLS CVVS  
 GFTFSTYGM~~SWVRQTPDRRLEWVATI~~SHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNAKNTLHLQMS~~SLKSEDT~~AMY~~YCAR~~HGDYDDDDYAM~~DY~~WG  
 QGTSVTFSS~~astkgpsvfplapsksts~~gg~~taalgclvkdyfpe~~  
 pvtvswns~~galtsgvhtfpav~~lq~~ssglyslssvv~~tv~~pssslgtq~~  
 tyicnvn~~hkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapel~~lg~~gpsv~~  
 flfppkpk~~dtlmisrtp~~ev~~tcvvvdvshedpevkfnwyvdgvev~~  
 h~~naktkpreeqynstyrvvsvl~~tl~~vlhqdw~~l~~ngkeykckvs~~nk~~al~~  
 p~~apiektiskakgqpre~~p~~qv~~yt~~lppsreemtknqvs~~l~~tc~~lv~~k~~gf  
 y~~psdiavewesngqpennykt~~t~~ppvlds~~dg~~sfflyskltvdk~~sr  
 w~~qqgnvfscsvmhealhnhytqks~~l~~sl~~sp~~gk~~

40

50

## 【0116】

配列4A：キメラ I g G 2 H C 配列

mnfglrlliflvltlkgvqcdvqLVESGGDLVKPGGSLKLS CVVS  
 GFTFSTYGMSWVRQTPDRRLEWVATISHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNAKNTLHLQMSSLKSEDTAMY<sup>Y</sup>CARHGDYDDDYYAMDYWG  
 QGTSVTFS *sastkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpe*  
*pvtvswnsгалтsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssnfgtq*  
*tytcnvdhkp<sup>s</sup>ntkvdk<sup>t</sup>ver<sup>k</sup>ccvecppcpappvagpsvflfp* 10  
*pkpkdtlmisr<sup>t</sup>pevtcvvvdvshedpe<sup>v</sup>qfnwyvdgmevh<sup>n</sup>ak*  
*tkpreeqfnstfrvsvl<sup>t</sup>vvhqdwlngkeykckvsnkglpapi*  
*ektisktkgqpre<sup>p</sup>qv<sup>y</sup>tlppsreem<sup>t</sup>knqvsl<sup>t</sup>clvkgy<sup>p</sup>sd*  
*isvewesngqpennyk<sup>t</sup>tpmlds<sup>d</sup>g<sup>s</sup>fflyskltvdksr<sup>w</sup>qqg*  
*nvfscsvmhealhnhytqkslslspgk*

## 【0117】

配列4B：キメラ I g G 3 H C 配列

mnfglrlliflvltlkgvqcdvqLVESGGDLVKPGGSLKLS CVVS 20  
 GFTFSTYGMSWVRQTPDRRLEWVATISHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNAKNTLHLQMSSLKSEDTAMY<sup>Y</sup>CARHGDYDDDYYAMDYWG  
 QGTSVTFS *sastkgpsvfplapcsrstsggtaalgclvkdyfpe*  
*pvtvswnsгалтsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtq*  
*tytcnvn<sup>h</sup>kp<sup>s</sup>ntkvdk<sup>r</sup>velk<sup>t</sup>plgdtthtcprcpe<sup>p</sup>ks<sup>c</sup>dt<sup>p</sup>*  
*ppcprcpe<sup>p</sup>ks<sup>c</sup>dtpppcprcpapellggpsvflfp<sup>p</sup>pkpkdtlm*  
*isr<sup>t</sup>pevtcvvvdvshedpe<sup>v</sup>qfkwyvdgvevh<sup>n</sup>aktkpreeqy*  
*nstfrvsvl<sup>t</sup>vlhqdwlngkeykckvsnkalpapi<sup>e</sup>ktisktk* 30  
*gqpre<sup>p</sup>qv<sup>y</sup>tlppsreem<sup>t</sup>knqvsl<sup>t</sup>clvkgy<sup>p</sup>sdia<sup>v</sup>ewes<sup>s</sup>*  
*gqpennynttpmlds<sup>d</sup>g<sup>s</sup>fflyskltvdksr<sup>w</sup>qqgnifscsvm*  
*healhn<sup>r</sup>ftqkslslspgk*

## 【0118】

配列5：キメラ LC KAPPA 配列

mesqtqvllisllfwvsgtcgdIVMTQSPSSLTVIAGEKVTMSCK  
SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF 40  
 TGS<sup>G</sup>SGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNE<sup>Y</sup>TYPLTFGAGTKLEI  
*krtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvc<sup>l</sup>lnnfy<sup>p</sup>reak<sup>v</sup>qwk<sup>v</sup>*  
*dna<sup>l</sup>qsgnsqesvteqds<sup>k</sup>dstyslss<sup>t</sup>ltl<sup>s</sup>kadyek<sup>h</sup>kv<sup>y</sup>ac*  
*evthqglsspvtksfnr<sup>g</sup>ec*

## 【0119】

配列6：キメラ LC LAMBDA 配列

mesqtqvli sllfwvsgtcgdIVMTQSPSSLTVIAGEKVTMSCK  
SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF  
 TGS GSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNEYTYPLTFGAGTKLTV  
 Lgqpk aapsvtlfp pss eelqanka tlvc lisd fypgavtvawk  
 adsspvkagvet ttpskqsnnkya assylsl tpeqwks h r s y s c  
 qvthe g s t v e k t v a p t e c s

【0120】

ヒト化配列

10

配列7：ヒト化IgG1 HC配列1

mnf glrliflvltlkgvqc d v qLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS  
 GFTFSTTYGMSWVRQTPDKRLEWVATISHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNAKNTLYLQMSS LKSEDTAMY YCARHGDYDDDYAMDYWG  
 QGTLVTVS s a s t k g p s v f p l a p s s k s t s g g t a a l g c l v k d y f p e  
 p v t v s w n s g a l t s g v h t f p a v l q s s g l y s l s s v v t v p s s s l g t q  
 t y i c n v n h k p s n t k v d k r v e p k s c d k t h t c p p c p a p e l l g g p s v  
 f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v  
 h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l  
 p a p i e k t i s k a k g q p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l t c l v k g f  
 y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r  
 w q q g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

20

【0121】

配列8：ヒト化IgG1 HC配列2

mnf glrliflvltlkgvqc d v qLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVS  
 GFTFSTTYGMSWVRQAPGKGLEWVATISHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARHGDYDDDYAMDYWG  
 QGTLVTVS s a s t k g p s v f p l a p s s k s t s g g t a a l g c l v k d y f p e  
 p v t v s w n s g a l t s g v h t f p a v l q s s g l y s l s s v v t v p s s s l g t q  
 t y i c n v n h k p s n t k v d k r v e p k s c d k t h t c p p c p a p e l l g g p s v  
 f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v v d v s h e d p e v k f n w y v d g v e v  
 h n a k t k p r e e q y n s t y r v v s v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k a l  
 p a p i e k t i s k a k g q p r e p q v y t l p p s r e e m t k n q v s l t c l v k g f  
 y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s k l t v d k s r  
 w q q g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s p g k

30

40

【0122】

配列9：ヒト化IgG1 HC配列3

mnfglrlliflvltlkqvqcdvqLVESGGDLVKPGGSLKLSCVAS  
 GFTFSTYGMSWVRQTPDKRLEWVATISHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHGDYDDDDYYAMDYWG  
 QGTTVTVS *sastkgpsvfplapsksstsggtaalgclvkdyfpe*  
*pvtvswnsгалtsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtq*  
*tyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsv*  
*flfppkpkdtmlisrtpvctcvvvdvshedpevkfnwyvdgvev*  
*hnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkal*  
*papiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltcclvkgrf*  
*ypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflyskltvdksr*  
*wqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk*

10

## 【0123】

配列10：ヒト化IgG1 HC配列4

mnfglrlliflvltlkqvqcdvqLVESGGDLVKPGGSLKLSCVAS  
 GFTFSTYGMSWVRQTPDRRLEWVATISHGDGYTYYPDSVKGRFT  
 ISRDNAKNTLHLQMSSLKSEDTAMYYCARHGDYDDDDYYAMDYWG  
 QGTTVTVS *sastkgpsvfplapsksstsggtaalgclvkdyfpe*  
*pvtvswnsгалtsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtq*  
*tyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellggpsv*  
*flfppkpkdtmlisrtpvctcvvvdvshedpevkfnwyvdgvev*  
*hnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkal*  
*papiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltcclvkgrf*  
*ypsdiavewesngqpennykttppvlds dgsfflyskltvdksr*  
*wqqgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk*

20

30

## 【0124】

配列11：ヒト化LC KAPPA配列1

mesqtqvllisllfwvsgtcgdIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK  
 SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF  
 SSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNEYTYPLTFGGGKLEI  
*krtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkv*  
*dnalqsgnsqesvteqdskdstyslssstltskadyekhkvyac*  
*evthqglsspvtksfnrgec*

40

## 【0125】

配列12：ヒト化LC KAPPA配列2

mesqtqvli sllfwvsgtcgdIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK  
SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESSGVPSRF  
 SSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQNEYTYPLTFGGQGTKVEI  
*krtvaapsvfi fppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssstl t l skadyekhkvyac*  
*evthqglsspvtksfnrgec*

## 【0126】

配列13：ヒト化LC KAPPA配列3

10

mesqtqvli sllfwvsgtcgdIVMTQSPDSLTVSLGERATINCK  
SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESSGVPDRF  
 SSGSGGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQNEYTYPLTFGGGKLEL  
*krtvaapsvfi fppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssstl t l skadyekhkvyac*  
*evthqglsspvtksfnrgec*

## 【0127】

配列14：ヒト化LC KAPPA配列4

20

## 【0128】

mesqtqvli sllfwvsgtcgdIVMTQSPSSLTVSLGERATMSCK  
SSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESSGVPDRF  
 SSGSGGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCQNEYTYPLTFGGGKLEL  
*krtvaapsvfi fppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslssstl t l skadyekhkvyac*  
*evthqglsspvtksfnrgec*

- ・シグナルペプチドは小文字（イタリック体でない）
- ・可変領域は大文字、CRDsは下線
- ・定常領域は小文字のイタリック体
- ・点変異は太字

30

## 【0129】

4個のキメラの、および、16個のヒト化の、合成遺伝子がpCDNA3.1プラスミド発現ベクター中に置かれて、それから、モノクローナル抗体の合成を獲得するために、チャイニーズハムスター卵巣-S(CHO-S)細胞に導入された。表1は、20個の異なるベクターの組み合わせおよび相対的な抗体の名前を示す。

## 【0130】

## 【表 1】

表 1. MP-RM-1 抗体の 20 個の異なる変異体のベクターの組み合わせ

ベクターの組み合わせ	抗体名	
pCDNA3.1 HC-IgG1 CHIM - pCDNA3.1 LC-kappa CHIM	cMP-RM-1 #1	
pCDNA3.1 HC-IgG1 CHIM - pCDNA3.1 LC-lambda CHIM	cMP-RM-1 #2	
pCDNA3.1 HC-IgG3 CHIM - pCDNA3.1 LC-kappa CHIM	cMP-RM-1 #3	
pCDNA3.1 HC-IgG3 CHIM - pCDNA3.1 LC-lambda CHIM	cMP-RM-1 #4	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU1 - pCDNA3.1 LC-kappa HU1	hMP-RM-1 #5	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU1 - pCDNA3.1 LC-kappa HU2	hMP-RM-1 #6	10
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU1 - pCDNA3.1 LC-kappa HU3	hMP-RM-1 #7	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU1 - pCDNA3.1 LC-kappa HU4	hMP-RM-1 #8	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU2 - pCDNA3.1 LC-kappa HU1	hMP-RM-1 #9	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU2 - pCDNA3.1 LC-kappa HU2	hMP-RM-1 #10	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU2 - pCDNA3.1 LC-kappa HU3	hMP-RM-1 #11	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU2 - pCDNA3.1 LC-kappa HU4	hMP-RM-1 #12	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU3 - pCDNA3.1 LC-kappa HU1	hMP-RM-1 #13	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU3 - pCDNA3.1 LC-kappa HU2	hMP-RM-1 #14	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU3 - pCDNA3.1 LC-kappa HU3	hMP-RM-1 #15	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU3 - pCDNA3.1 LC-kappa HU4	hMP-RM-1 #16	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU4 - pCDNA3.1 LC-kappa HU1	hMP-RM-1 #17	20
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU4 - pCDNA3.1 LC-kappa HU2	hMP-RM-1 #18	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU4 - pCDNA3.1 LC-kappa HU3	hMP-RM-1 #19	
pCDNA3.1 HC-IgG1 HU4 - pCDNA3.1 LC-kappa HU4	hMP-RM-1 #20	

c : キメラ抗体 ; h : ヒト化抗体

## 【 0 1 3 1 】

( 所望の特性を有する抗体の一次スクリーニング )

20 個の異なる抗体変異体を含む上清は、それらが、リガンド誘導性の E r b B 3 および A k t のリン酸化を阻害する、および、ヒトメラノーマ細胞 I R - 8 における E r b B 3 の下方制御を促進する、能力に関して試験された。変異体のリン酸化に対する阻害効果は、長期の分析で ( N R G - 1 刺激の前に、10 μ g / m l の抗体変異体で 2 時間、細胞の処理 ) または短期の分析で ( 抗体変異体および N R G - 1 への、5 分間の共暴露 ( c o - e x p o s u r e ) 、評価された。結果は、長期および短期の分析の両方で、E r b B 3 および A K T のリン酸化の阻害および E r b B 3 の下方制御において、4 つの抗体変異体、すなわち、c M P - R M - 1 # 1、h M P - R M - 1 # 6、h M P - R M - 1 # 10、h M P - R M - 1 # 20 が最も活性があったことを示す ( 表 2 ) 。

## 【 0 1 3 2 】

【表 2】

表 2. MP-RM-1 抗体変異体のスクリーニング

AMP-RM-1 抗体変異体	アイソタイプ	阻害効果 (LT) <sup>1</sup>	阻害効果 (ST) <sup>2</sup>	下方制御 <sup>3</sup>
cMP-RM-1 #1	IgG1	+++	++++	+++
cMP-RM-1 #2	IgG1	+++	+	++
cMP-RM-1 #3	IgG3	+++	+	++
cMP-RM-1 #4	IgG3	++++	+/-	+
hMP-RM-1 #5	IgG1	+++	++	+
hMP-RM-1 #6	IgG1	+++	++++	+++
hMP-RM-1 #7	IgG1	+++	++++	++
hMP-RM-1 #8	IgG1	+++	++++	++
hMP-RM-1 #9	IgG1	+++	++++	++
hMP-RM-1 #10	IgG1	+++	++++	+++
hMP-RM-1 #11	IgG1	+++	++++	++
hMP-RM-1 #12	IgG1	+++	++++	++
hMP-RM-1 #13	IgG1	+++	++	++
hMP-RM-1 #14	IgG1	++++	++	++
hMP-RM-1 #15	IgG1	+++	++	++
hMP-RM-1 #16	IgG1	+++	+	++
hMP-RM-1 #17	IgG1	++++	++	++
hMP-RM-1 #18	IgG1	+++	++	+
hMP-RM-1 #19	IgG1	+++	++++	++
hMP-RM-1 #20	IgG1	++++	++++	++

10

20

<sup>1</sup> NRG-1での5分間の刺激後に抗体変異体で2時間インキュベートされたIR-8細胞の、Erbb3およびAktのリン酸化状態を示す；<sup>2</sup>抗体変異体およびNRG-1で5分間同時にインキュベートされたIR-8細胞のErbb3およびAKTのリン酸化状態を示す；<sup>3</sup>ウエスタンブロッティングおよびFACS分析により評価された、抗体変異体のErbb3の下方制御を促進する能力を示す。

30

## 【0133】

これらの結果に基づき、4個の抗体変異体cMP-RM-1#1、hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10、およびhMP-RM-1#20が選択され、Protein A capture (HiTrap Protein A HP、GE Healthcare)を用いて精製され、Erbb3受容体の内部移行とErbb3受容体の下方制御を促進する、および、in vitroおよびin vivoでのヒト腫瘍細胞の増殖を阻害する、それらの能力に関してさらに試験された。

40

## 【0134】

(実施例17)ヒトメラノーマ細胞の表面上のErbb3受容体発現に対する、キメラおよびヒト化MP-RM-1抗体変異体の効果。

## 【0135】

材料および方法：ヒトメラノーマ細胞IR-8は、10μg/mlのキメラ(cMP-RM-1#1)またはヒト化(hMP-RM-1#6、hMP-RM-1#10、hMP-RM-1#20)のMP-RM-1抗体変異体の存在下で、氷上で30分間保たれ、それから、37℃に60分間戻された。細胞は回収されて、フルオレセイン標識されたヤギ抗ヒトIgG抗体で染色され、FACSにより分析された。

## 【0136】

結果：キメラおよびヒト化MP-RM-1抗体変異体は、ヒトメラノーマ細胞IR-8

50

の表面上の E r b B 3 受容体発現の減少を誘導する ( 図 1 5 ) 。

【 0 1 3 7 】

( 実施例 1 8 ) ヒトメラノーマ細胞における h M P - R M - 1 # 6 の内部移行。

【 0 1 3 8 】

材料および方法：ヒトメラノーマ細胞 I R - 8 は、15 × 15 mm のカバースリップに蒔かれて、R P M I での 0 . 2 % F B S 中で 2 4 時間、培養された。細胞は、それから、10 μ g / m l のヒト化 M P - R M - 1 # 6 とともに氷上で 3 0 分間インキュベートされて、37 °C に戻された。30 分後、細胞は 4 % パラホルムアルデヒド中で固定され、P B S 中で 0 . 2 % T r i t o n - X 1 0 0 で透過処理され、それから、フルオレセイン標識されたヤギ抗ヒト抗体 ( グリーン ) 、ファロイジン ( レッド ) で染色された。細胞核はブルーで対比染色された。グリーン染色はヒト化 M P - R M - 1 # 6 抗体の局在化を示す。

10

【 0 1 3 9 】

結果：氷中で保たれたヒトメラノーマ細胞 I R - 8 では、h M P - R M - 1 # 6 抗体変異体が細胞膜上に局在化する ( グリーンの輪 ) 。細胞を 37 °C に 3 0 分間変更した後は、抗体は全体的に細胞内に局在化され、内部移行を示す ( 図 1 6 ) 。同様の結果が、c M P - R M - 1 # 1 、h M P - R M - 1 # 1 0 、および h M P - R M - 1 # 2 0 で得られた ( 示さず ) 。

【 0 1 4 0 】

( 実施例 1 9 ) ヒトメラノーマ細胞での E r b B 3 受容体の半減期に対する、キメラおよびヒト化 M P - R M - 1 抗体変異体の効果。

20

【 0 1 4 1 】

材料および方法：ヒトメラノーマ細胞 I R - 8 は、R P M I での 0 . 2 % F B S 中で 2 4 時間培養され、それから、c M P - R M - 1 # 1 、h M P - R M - 1 # 6 、h M P - R M - 1 # 1 0 または h M P - R M - 1 # 2 0 の抗体変異体の存在または非存在下で、10 μ g / m l のタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド ( C H X ) で追跡された。細胞は溶解されて、p - E r b B 3 のタンパク質レベルに関して抗 p - E r b B 3 特異的抗体でのウエスタンブロットティングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗 A K T で再検出された。

【 0 1 4 2 】

結果：シクロヘキシミド追跡されたヒトメラノーマ細胞 I R - 8 では、抗体変異体への暴露は、P B S に暴露した対照細胞と比較して、E r b B 3 受容体の半減期を著しく減少させる ( 図 1 7 ) 。

30

【 0 1 4 3 】

( 実施例 2 0 ) ヒト卵巣がん細胞およびヒト胃がん細胞における、E r b B 3 および A K T のリン酸化および E r b B 3 受容体の下方制御に対する、キメラおよびヒト化 M P - R M - 1 抗体変異体の効果。

【 0 1 4 4 】

材料および方法：( A ) ヒト卵巣がん細胞 O V C A R - 8 は、R P M I での 0 . 2 % F B S 中で 2 4 時間培養された。細胞は、それから、10 μ g / m l の c M P - R M - 1 # 1 、h M P - R M - 1 # 6 、h M P - R M - 1 # 1 0 または h M P - R M - 1 # 2 0 の抗体変異体で 2 時間、事前に処理され、10 n g / m l の N R G - 1 で 1 0 分間刺激された。細胞は溶解されて、E r b B 3 、p - E r b B 3 、A K T 、p - A K T のレベルに関して抗 E r b B 3 、抗 p - E r b B 3 、抗 A K T 、抗 p - A K T 特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングにより分析された。( B ) ヒト胃がん細胞 M K N - 4 5 は、D M E M での 0 . 2 % F B S 中で 2 4 時間、培養された。細胞は、それから、10 μ g / m l の c M P - R M - 1 # 1 、h M P - R M - 1 # 6 、h M P - R M - 1 # 1 0 または h M P - R M - 1 # 2 0 の抗体変異体または 1 μ g / m l の M E T 阻害剤 S U 1 1 2 7 4 に 2 時間さらされた。細胞は溶解されて、p - M E T 、p - E r b B 3 および E r b B 3 のレベルに関して抗 p - M E T 、抗 p - E r b B 3 および抗 E r b B 3 特異的抗体でのウエスタ

40

50

ンプロットニングにより分析された。同じフィルターが、ローディングのコントロールのために抗 A K T で再検出された。

【 0 1 4 5 】

結果：抗体変異体でのヒト卵巣がん O V C A R - 8 の処理は、E r b B - 3 および A K T のリガンド誘導性のリン酸化を阻害し、E r b B 3 受容体の下方制御を促進する（図 1 8）。M K N - 4 5 細胞は、リガンド非依存性、M E T 依存性の、E r b B 3 受容体のリン酸化を示す。M P - R M - 1 抗体変異体は、この基礎活性を阻害することができる（図 1 8）。

【 0 1 4 6 】

（実施例 2 1）キメラおよびヒト化 M P - R M - 1 抗体変異体は、ヒトメラノーマ細胞およびヒト胃がん細胞のコロニー形成能力を阻害する。

10

【 0 1 4 7 】

材料および方法： $1.5 \times 10^4$  のヒトメラノーマ I R - 8 またはヒト胃がん細胞 M K N - 4 5 は、10% F B S を含む R P M I 1 6 4 0 中の 0.3% アガロースに懸濁され、6 穴プレートシャーレ中の 0.5% アガロースの 2 m l 層の上に重ねられた。細胞は、5% C O 2 を含む加湿雰囲気中で 37 °C にてインキュベートされた。アガロース凝固後、5 ~ 10 ~ 20  $\mu$ g / m l の c M P - R M - 1 # 1、h M P - R M - 1 # 6、h M P - R M - 1 # 10 または h M P - R M - 1 # 20 の抗体変異体または P B S がシャーレに添加された。処理の投与は隔日毎に繰り返される。10 倍率での 4 個の異なる顕微鏡視野におけるコロニー数は、10 ~ 16 日後に光学顕微鏡により決定された。

20

【 0 1 4 8 】

結果：示された M P - R M - 1 抗体変異体は、軟寒天中の I R - 8 および M K N - 4 5 のコロニーの数および大きさを減少させる（図 1 9 A - B）。棒グラフは、それぞれでのクローン数を表す。

【 0 1 4 9 】

（実施例 2 2）ヒト卵巣がん異種移植片に対する、キメラおよびヒト化 M P - R M - 1 抗体変異体の効果。

【 0 1 5 0 】

材料および方法：ヒト卵巣がん異種移植片 O V C A R - 8 は、 $5 \times 10^6$  の細胞を 7 週齢 C D 1 ノードマウスに皮下注射することにより樹立された。2 日後、マウスは無造作に 10 匹の 5 つのグループに分けられ、週に 2 回、4 週間、賦形剤（P B S）または 20 m g / k g の c M P - R M - 1 # 1、h M P - R M - 1 # 6、h M P - R M - 1 # 10 または h M P - R M - 1 # 20 の抗体変異体で腹腔内注射された。腫瘍量はキャリパーによりモニターされた。エラーバーは、各グループでの S E を示した。矢印は処理の開始（S）および終了（E）を示す。

30

【 0 1 5 1 】

結果：キメラまたはヒト化抗体変異体を有するマウスの腫瘍異種移植片は、対照マウスのものよりも、有意にゆっくり増殖する（ $P < 0.05$ ）（図 2 0）。

[ 参考文献 ]

References :

40

1. World Health Statistics, World Health Organization, 2008.
2. A Jemal, R Siegel, E Ward et al. Cancer Statistics, 2009. CA Cancer J Clin 59 : 225-49 (2009).
3. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. Nat Rev Cancer ; 6:449-58 (2006).
4. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2:563-72 (2002).
5. Gossage L, Eisen T. Targeting multiple kinase pathways: a change in paradigm. Clin Cancer Res. Mar 9 (2010).
6. N.E. Hynes, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. Cu

50

rr Opin Cell Biol 21(2):177-84 (2009).

7. T.Holbro, G.Civenni, N.E. Hynes, The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res* 284, 99-110 (2003).

8. Browne BC, O'Brien N, Duffy et al. HER-2 signaling and inhibition in breast cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 9(3): 419-38(2009).

9. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/ERBB2 action in breast cancer. *Oncogene* 19 (53) : 6102-14 (2000).

10. Alimandi M, Wang LM, Bottaro D et al. Epidermal growth factor and betacellul in mediate signal transduction through co-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. *EMBO J* 16(18): 5608-17 (1997).

11. Alimandi M, Romano A, Curia MC, Muraro R et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 10(9) : 1813-21 (1995).

12. N.E. Hynes, Targeting ERBB receptors in cancer. *Recent Results Cancer Res.* 172, 45-57 (2007).

13. N.E. Hynes, H.A. Lane, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-54 (2005).

14. J.Baselga and S.M. Swain, Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat.Rev.Cancer.* 9,463-75, (2009).

15. B.Tanner, D Hasenclever, K Stern et al. ErbB3 predicts survival in Ovarian cancer. *J.Clin.Onco.* 24, 17-23 (2006).

16. M.Reschke, D.Mihic-Probst, E.H. van der Horst et al. ERBB3 is a determinant for poor prognosis in Melanoma. *Clin.Canc.Res.* 14, 5188-97 (2008).

17. M. Soler, F Manicni, O.Meca-Cortes et al. ERBB3 is requisite for the maintenance of neuregulin-dependent and -independent attributes of malignant progression in prostate cancer cells. *Int.J.Cancer* 125,2565-75 (2009).

18. D.F. Stern, ERBB3/ERBB3 and ERBB2/ERBB2 duet in mammary development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 13, 215-23 (2008).

19. J.A. Engelman, K. Zejnullahu, T Mitsudomi et al. MET amplification leads to Gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signalling. *Science* 316, 1039-43 (2007).

20. L.M. Weiner, M.V. Dhodapkar and S. Ferrone. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy.

21. X. Huang, L. Gao, S. Wang et al. Heterotrimerization of the growth factor receptors ErbB2, ErbB3, and Insulin-like growth factor-I receptor in breast cancer cells resistant to Herceptin. *Canc.Res.*

22. T.Holbro, R. Beerli, F. Maurer et al. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation.

23. Y Yarden. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities.

24. M.R. Freeman. HER-2/ERBB3 heterodimers in prostate cancer: whither HER1/EGFR? *Cancer Cell* 6:427-428 (2004).

25. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-497.

26. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; 352(6336):624-8.

27. Jones et al., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature*, 321:522-525 (1986).

28. Riechmann et al., Reshaping human antibodies for therapy, *Nature*, 332:323-32

10

20

30

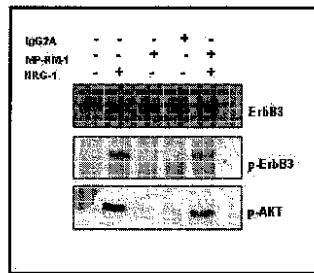
40

50

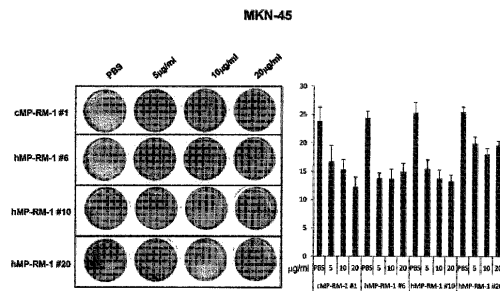
7 (1988).

29. Verhoeyen et al., Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity, Science, 239:1534-1536 (1988).

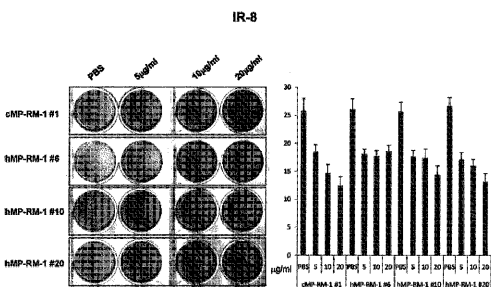
【 図 8 】  
Figure 8



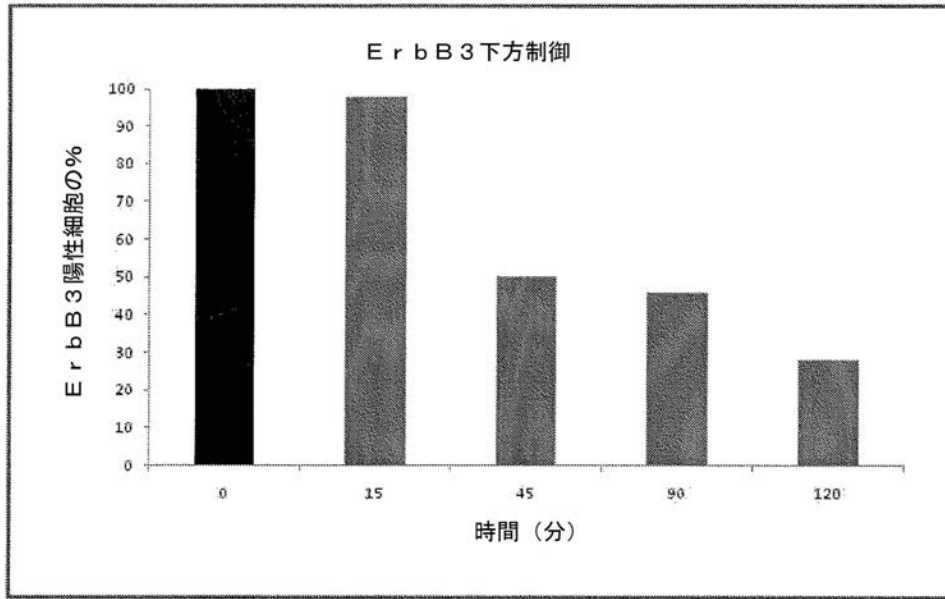
【 図 1 9 B 】  
Figure 19B



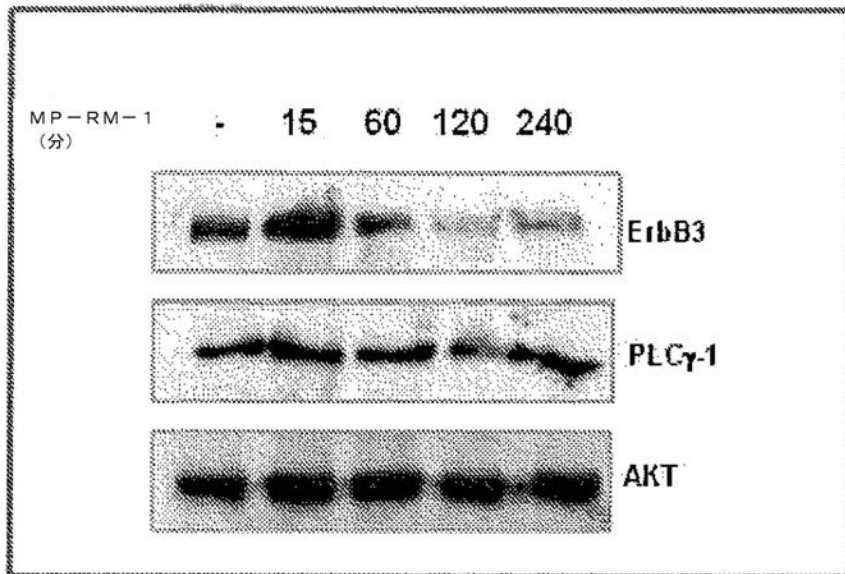
【 図 1 9 A 】  
Figure 19A



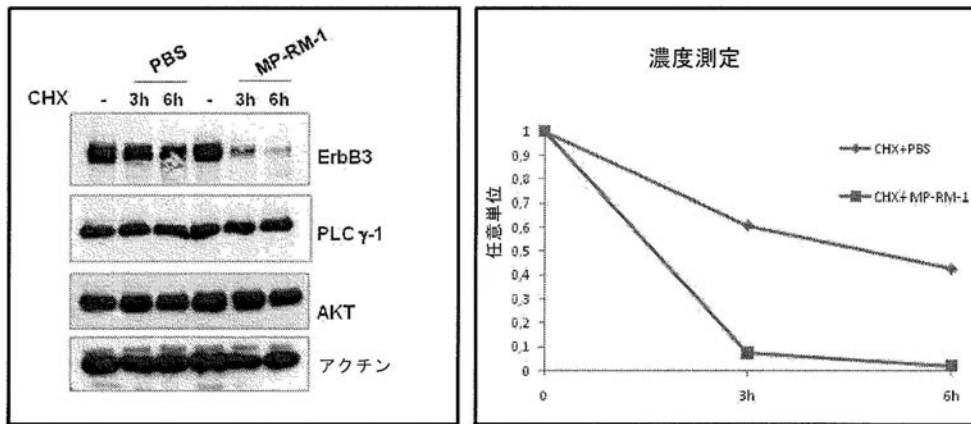
【 図 1 】



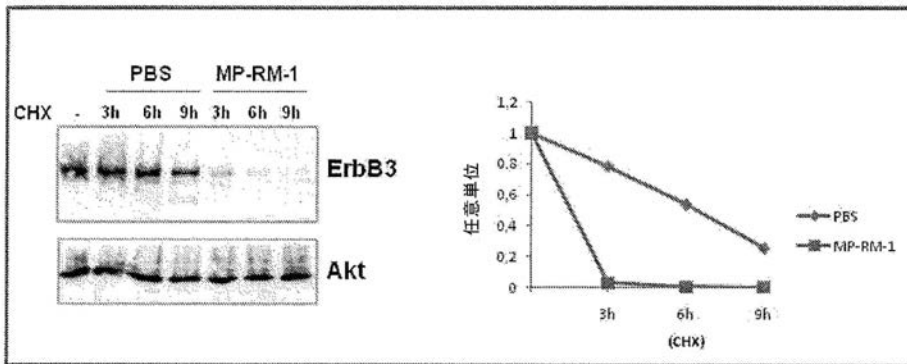
【 図 2 】



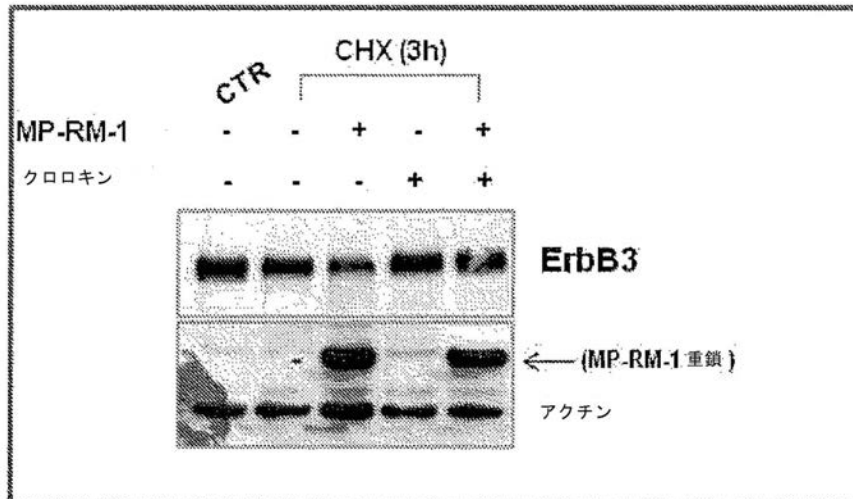
【 図 3 】



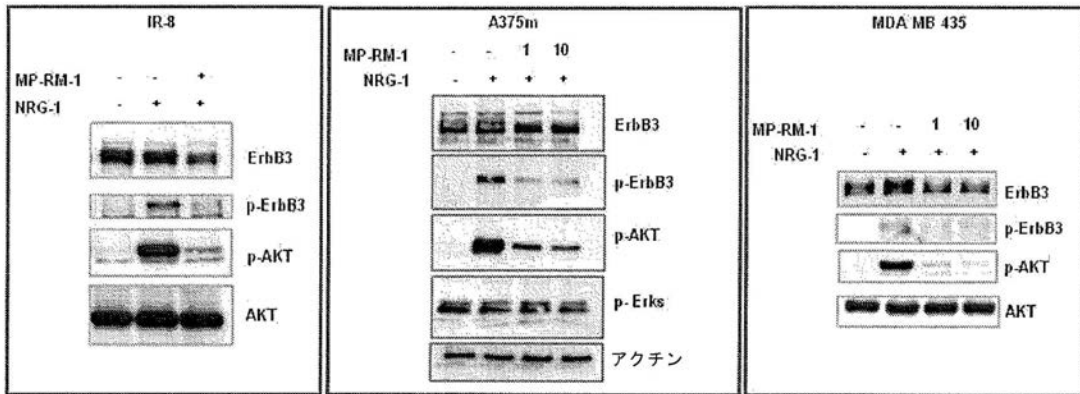
【 図 4 】



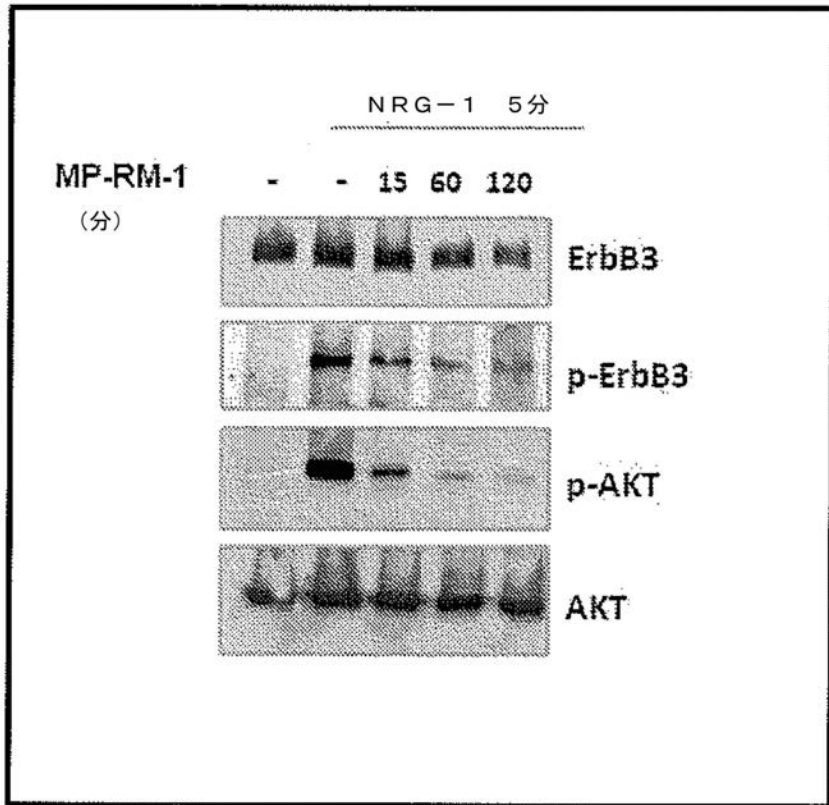
【 図 5 】



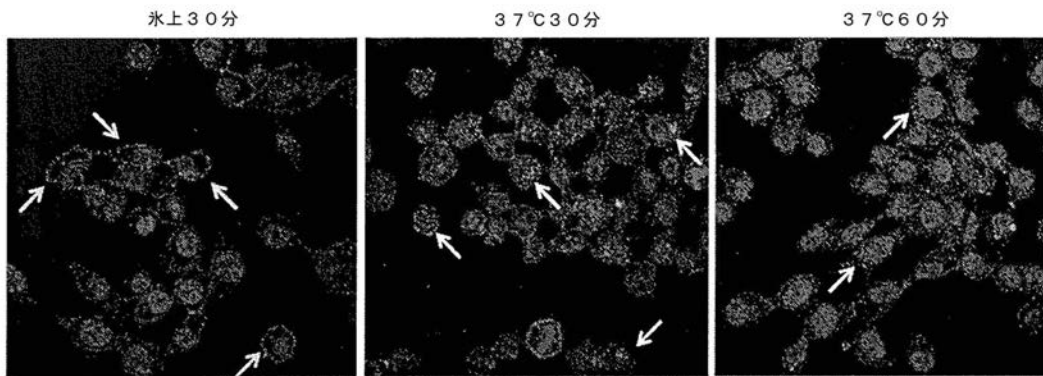
【 図 6 】



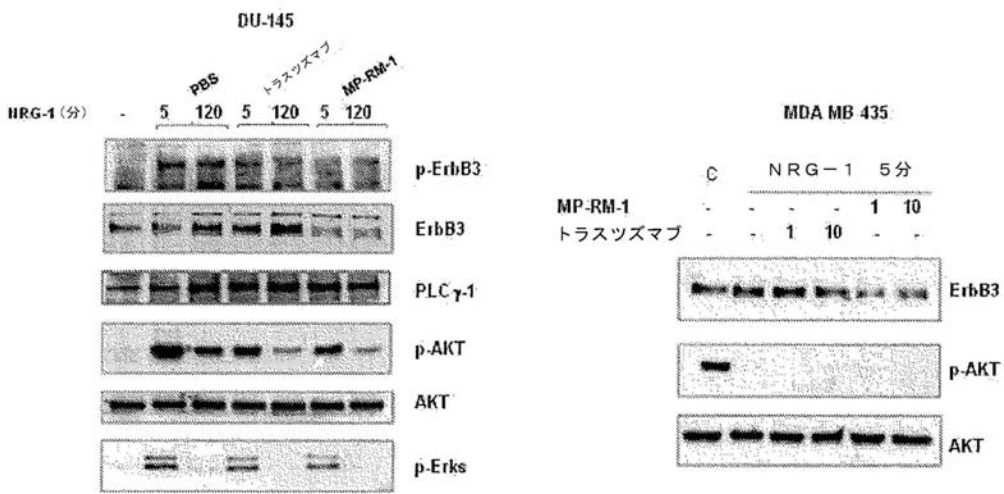
【 図 7 】



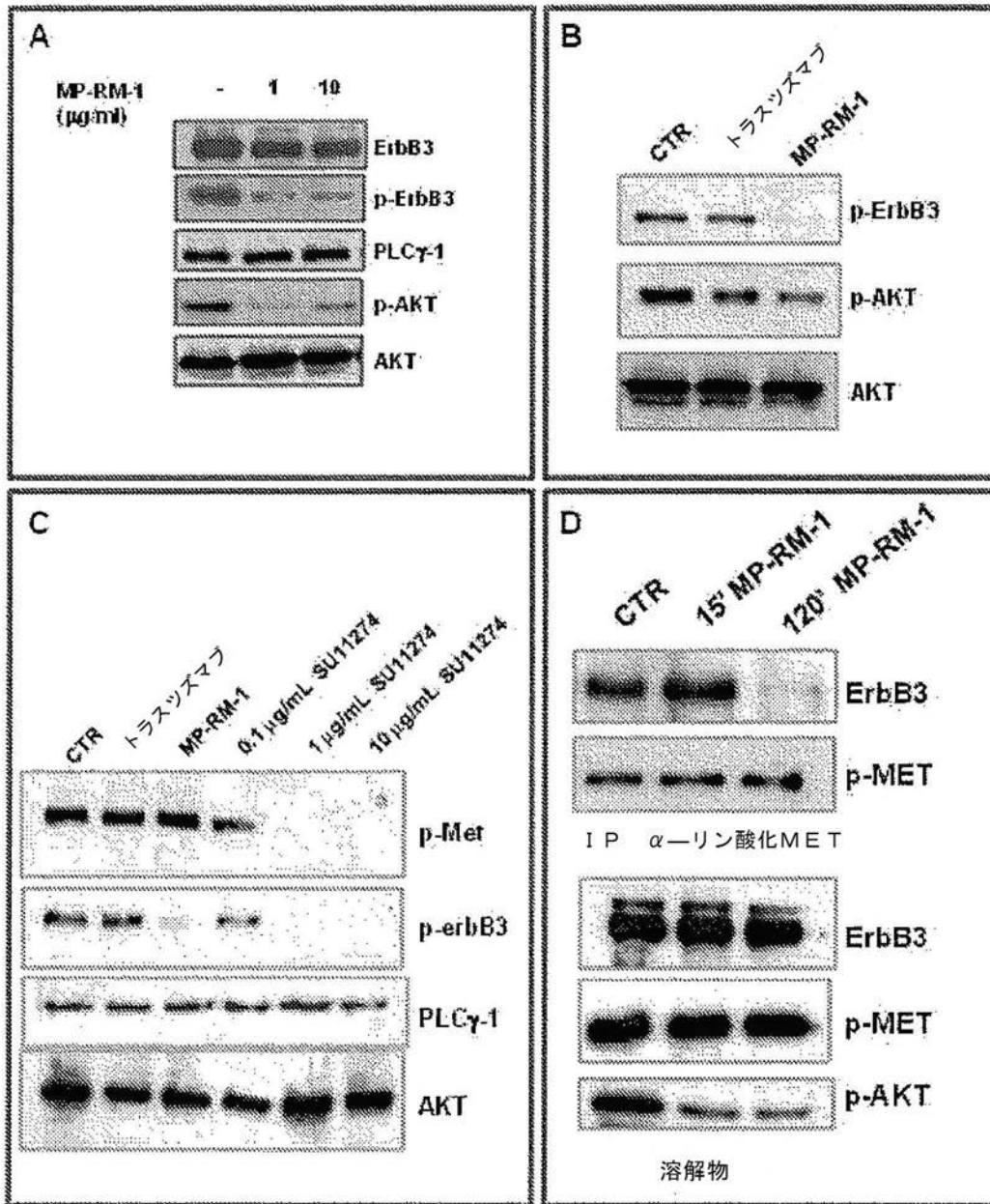
【 図 9 】



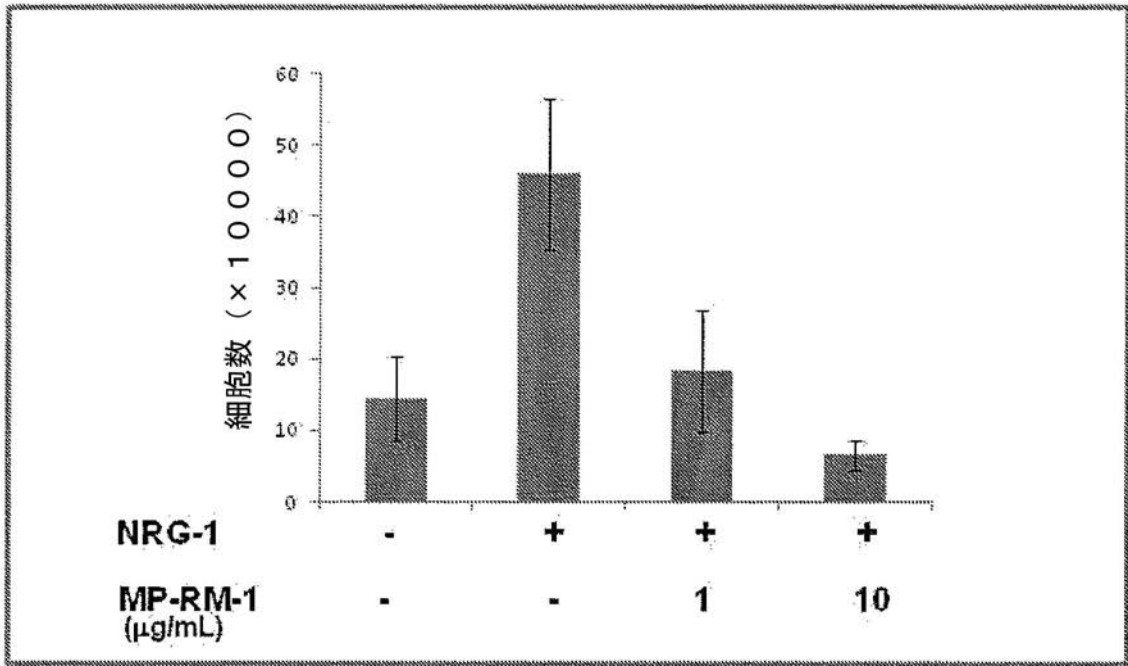
【 図 10 】



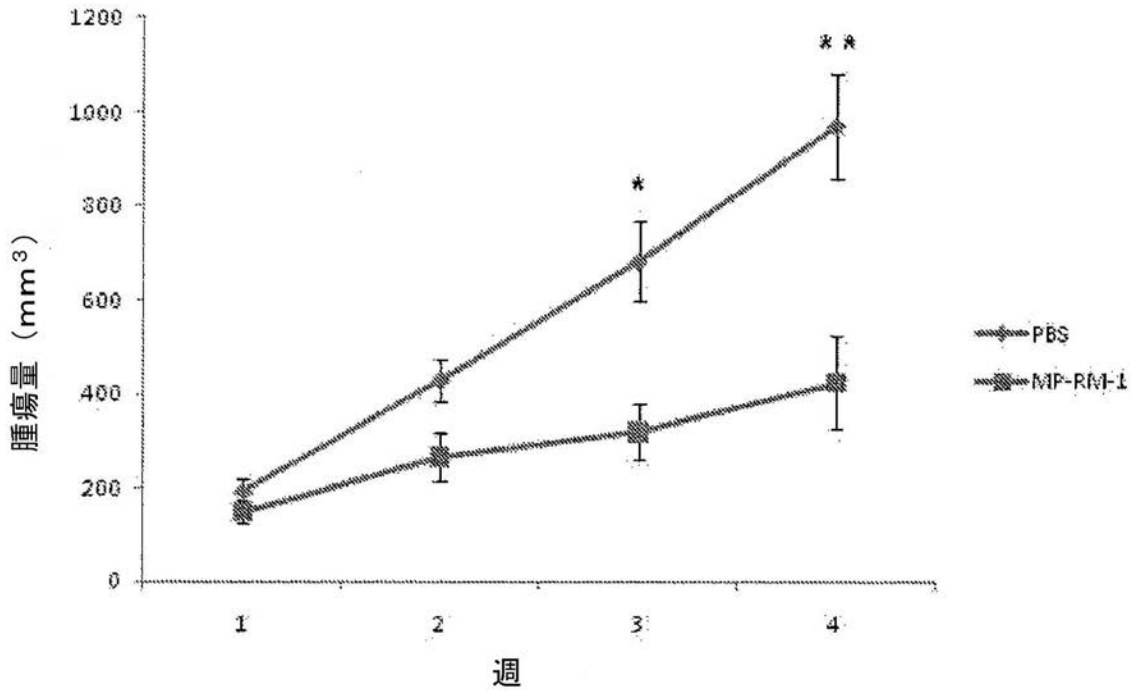
【 図 1 1 】



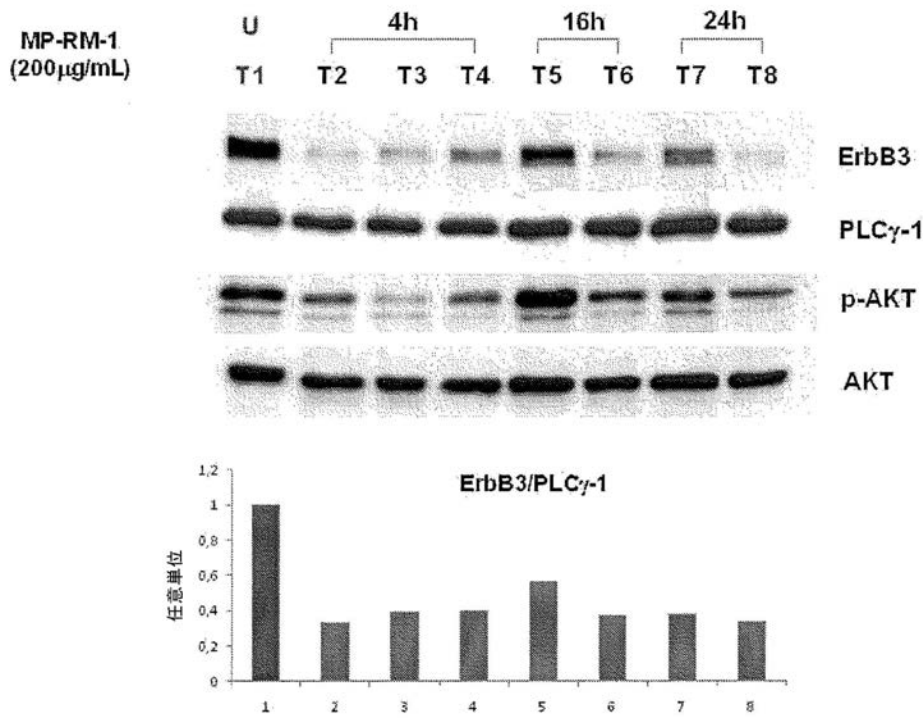
【 図 1 2 】



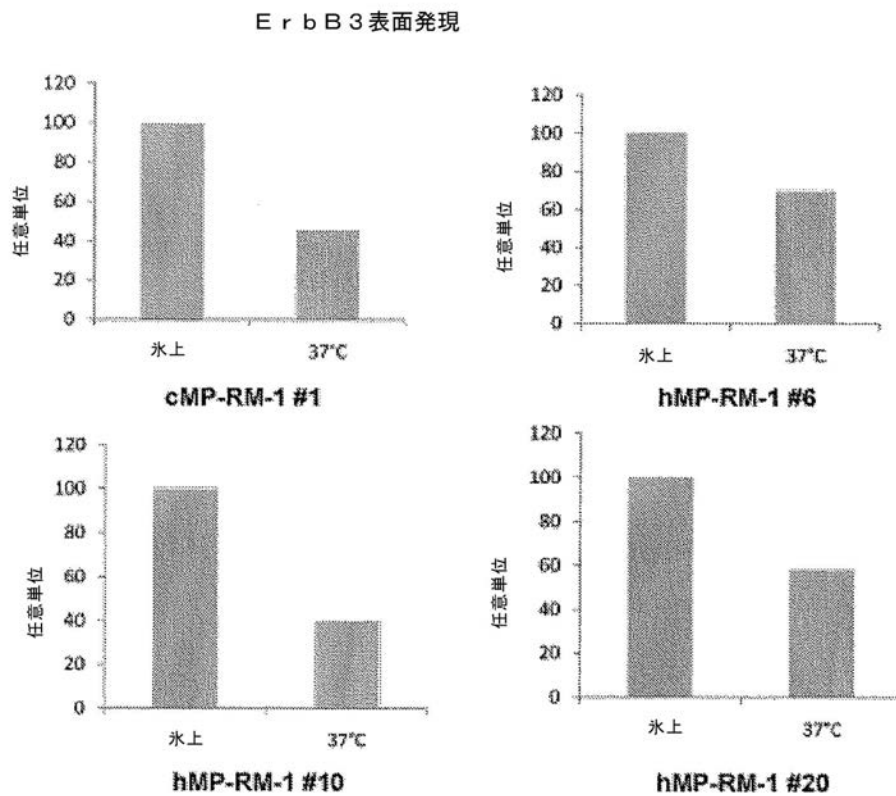
【 図 1 3 】



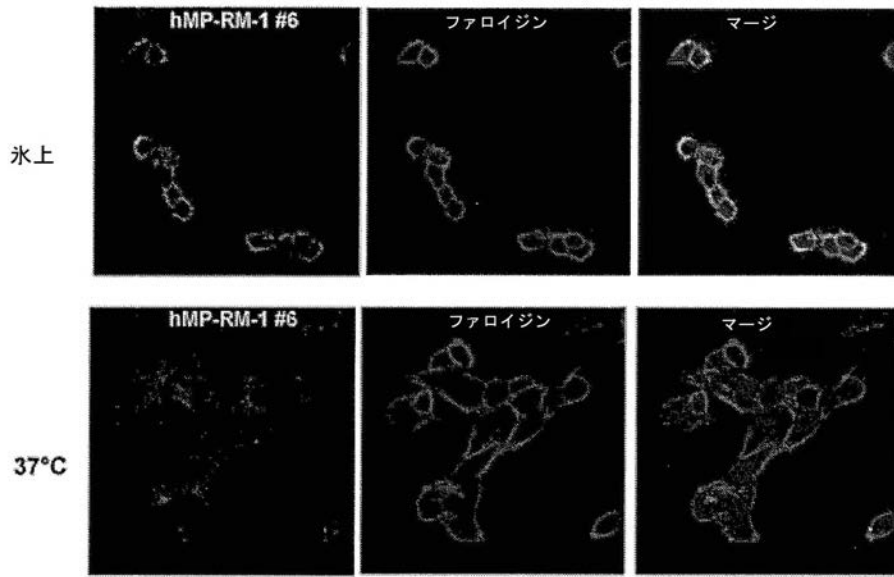
【 図 1 4 】



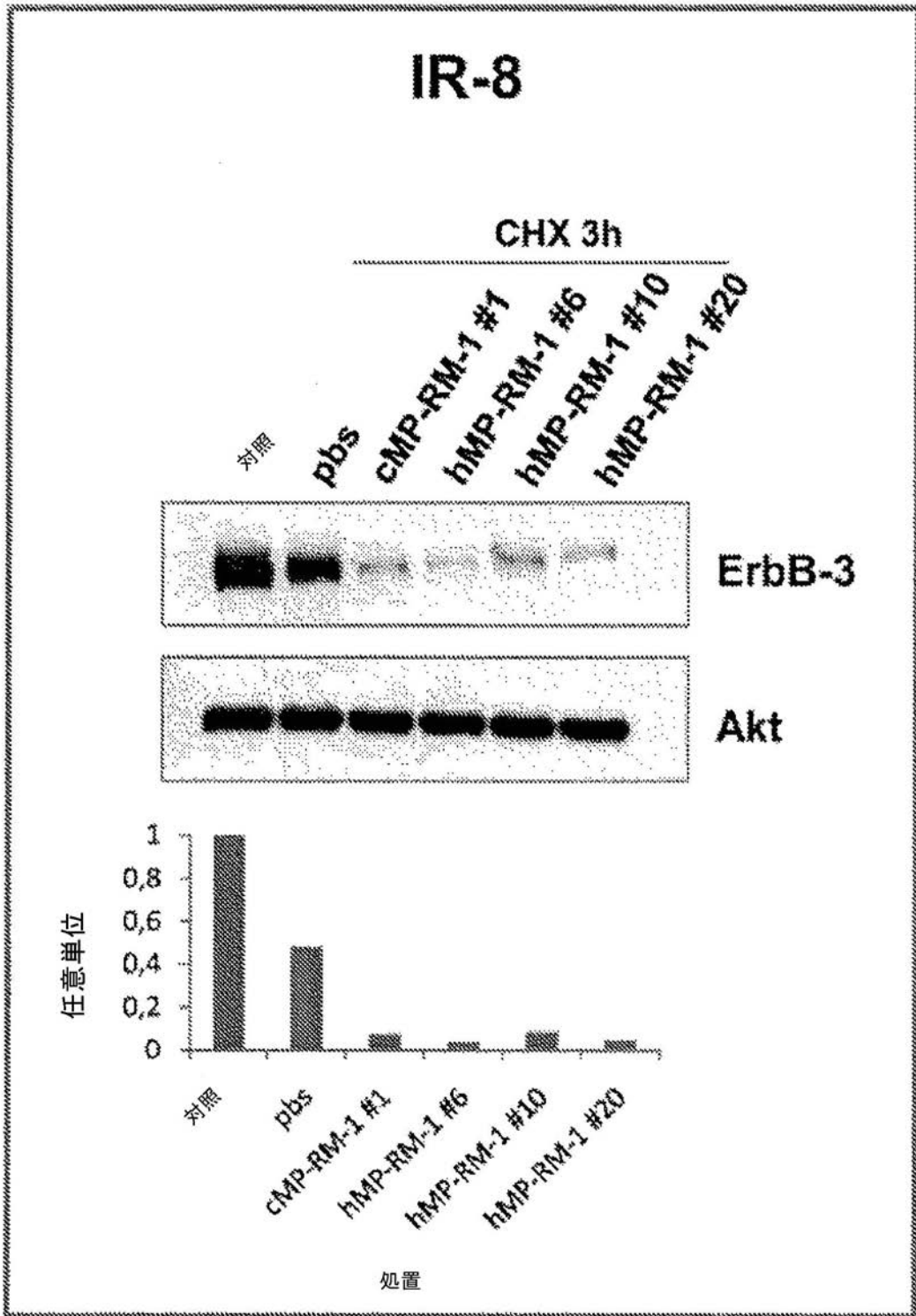
【 図 1 5 】



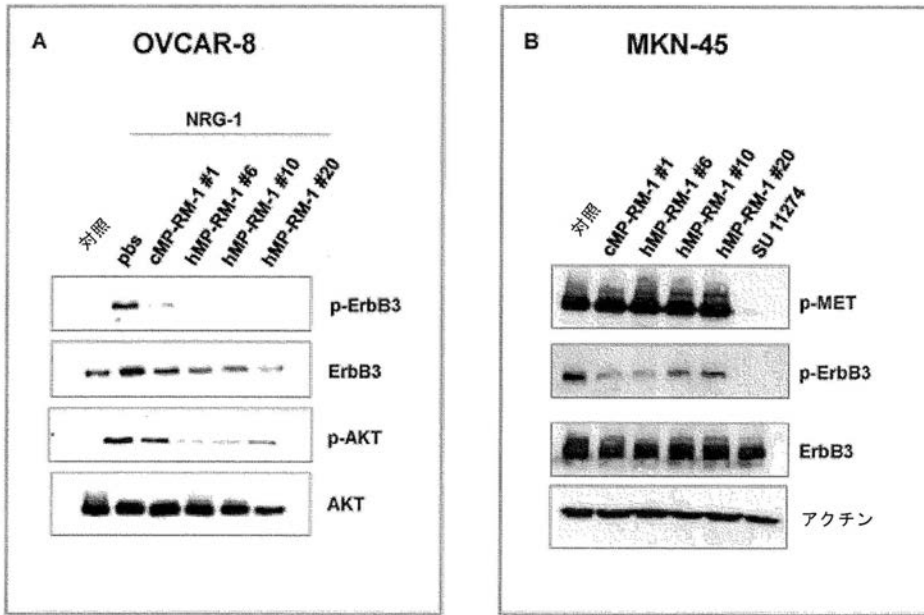
【 図 1 6 】



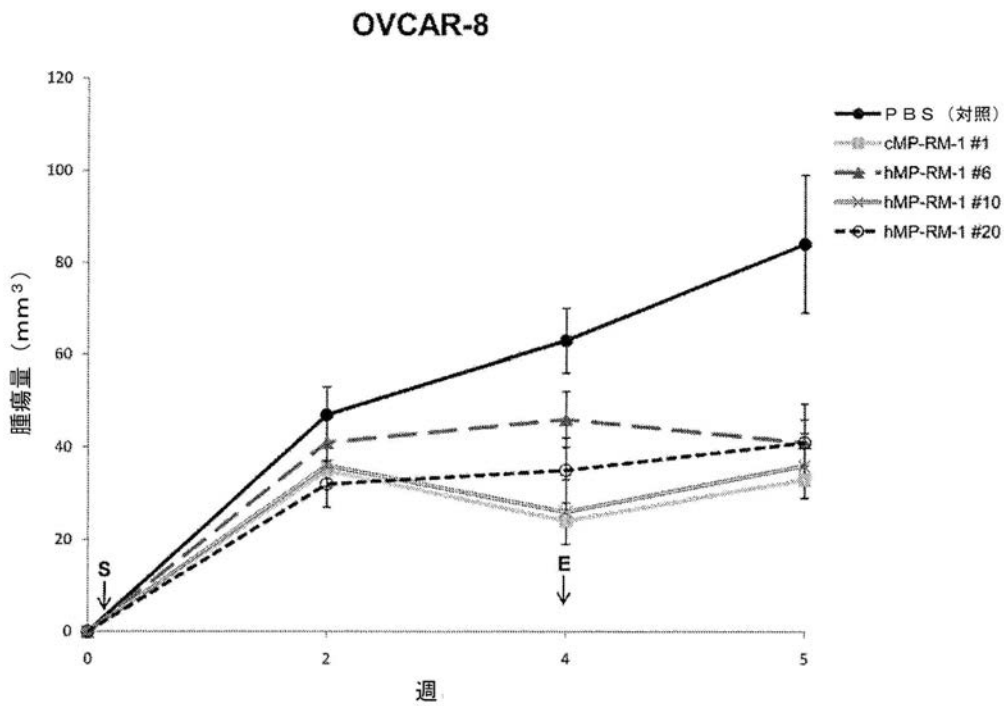
【 图 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 2 0 】



【 配 列 表 】

2014503181000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/065771

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/32 A61K39/395 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/077028 A2 (U3 PHARMA AG [DE]; AMGEN INC [US]; ROTHE MIKE [DE]; TREDER MARTIN [DE]) 12 July 2007 (2007-07-12) the whole document, especially page 7, lines 12-23, page 21, lines 15-25, page 29, line 29 - page 31, line 9, page 53, line 25 - page 56, line 15, examples -----	1-30
X	WO 2008/100624 A2 (MERRIMACK PHARMACEUTICALS INC [US]; SCHOEBERL BIRGIT [US]; NIELSEN ULR) 21 August 2008 (2008-08-21) the whole document, especially page 34, line 30 - page 35, line 19, examples 1-14 -----	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 November 2011		Date of mailing of the international search report 09/12/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, Annette

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/065771

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007077028 A2	12-07-2007	AR 056857 A1	24-10-2007
		AU 2006332065 A1	12-07-2007
		BR PI0620803 A2	22-11-2011
		CA 2633222 A1	12-07-2007
		CN 101365723 A	11-02-2009
		CN 102174105 A	07-09-2011
		EA 200801621 A1	30-12-2008
		EP 1984402 A2	29-10-2008
		JP 2009521913 A	11-06-2009
		KR 20080099235 A	12-11-2008
		SG 174017 A1	29-09-2011
		TW 200804420 A	16-01-2008
		US 2008124345 A1	29-05-2008
		US 2010183631 A1	22-07-2010
		WO 2007077028 A2	12-07-2007
		ZA 200805474 A	27-05-2009
-----			
WO 2008100624 A2	21-08-2008	AU 2008216600 A1	21-08-2008
		CA 2678181 A1	21-08-2008
		CN 101674846 A	17-03-2010
		CO 6231000 A2	20-12-2010
		CR 11029 A	29-12-2009
		EA 200901119 A1	29-10-2010
		EC SP099637 A	28-12-2009
		EP 2129396 A2	09-12-2009
		JP 2010518820 A	03-06-2010
		KR 20100014426 A	10-02-2010
		MA 31254 B1	01-03-2010
		US 2009291085 A1	26-11-2009
		WO 2008100624 A2	21-08-2008
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/531 A	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	
	G 0 1 N 33/574 A	
	G 0 1 N 33/574 D	
	C 1 2 Q 1/02	

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

(74)代理人 100113376

弁理士 南条 雅裕

(74)代理人 100179394

弁理士 瀬田 あや子

(74)代理人 100168491

弁理士 武井 紀英

(72)発明者 ムラーロ ラファエラ

イタリア共和国 アイ - 0 0 0 6 2 ローマ ブラッチャーノ ヴィア デラ ロッブラ 2

(72)発明者 イアコベリ ステファノ

イタリア共和国 アイ - 0 0 1 9 8 ローマ ヴィア キアーナ 4 8

(72)発明者 ティナリ ニコラ

イタリア共和国 アイ - 6 5 0 1 5 モンテジルヴァーノ ヴィア キエーティ 3 5

(72)発明者 サラ ジャンルーカ

イタリア共和国 アイ - 6 5 1 2 5 ペスカーラ ヴィア エマニュエル ディ シモーネ 4

(72)発明者 トラーニ サラ

イタリア共和国 アイ - 6 3 0 8 2 カステル ディ ラーマ ヴィア ポー 7 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA04 DA02 EA04 GA03 GA11

4B063 QA01 QA19 QQ08 QS33

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA14

4B065 AA90X AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08

CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 AA19 MA02 MA65 NA14 ZB26

4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 AA35 AA37 BB31 CC02 DD62 EE01

	EE03	GG02	GG03	GG04						
4C086	AA01	AA02	EA16	MA01	MA02	MA04	MA65	MA66	NA14	ZB26
4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	MA02	MA65	MA66	NA14	ZB26	
4H045	AA11	BA10	BA41	DA76	EA20	EA51	FA74			

专利名称(译)	ErbB3结合抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014503181A</a>	公开(公告)日	2014-02-13
申请号	JP2013533138	申请日	2011-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	媒体制药SRL MEDIAPHARMA		
申请(专利权)人(译)	媒体制药上课.伯爵.埃尔.		
[标]发明人	ムラーロラファエラ イアコベリステファノ ティナリニコラ サラジャンルーカ トラーニサラ		
发明人	ムラーロラファエラ イアコベリステファノ ティナリニコラ サラジャンルーカ トラーニサラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61K39/395 A61K48/00 A61K31/7088 A61K35/76 A61P35/00 A61K45/00 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/574 C12Q1/02 A61K39/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/32 C07K2317/24 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/77 A61K39/39558 A61K45/06 C07K16/40		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/30 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61K31/7088 A61K35/76 A61P35/00 A61K45/00 G01N33/53.D G01N33 /531.A G01N33/53.Y G01N33/574.A G01N33/574.D C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024 /GA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QS33 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065 /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA65 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/AA35 4C085/AA37 4C085 /BB31 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA65 4C086 /MA66 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087/MA65 4C087/MA66 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	61/394103 2010-10-18 US		
其他公开文献	JP5995851B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及与ErbB3受体结合的抗体，特别是单克隆抗体，包含这种抗体的组合物以及使用这种抗体的方法。

Figure 1

