

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5226926号
(P5226926)

(45) 発行日 平成25年7月3日 (2013.7.3)

(24) 登録日 平成25年3月22日 (2013.3.22)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/00 1 0 2

請求項の数 16 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-518606 (P2003-518606)
 (86) (22) 出願日 平成14年8月9日 (2002.8.9)
 (65) 公表番号 特表2005-504044 (P2005-504044A)
 (43) 公表日 平成17年2月10日 (2005.2.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/008938
 (87) 国際公開番号 W02003/013602
 (87) 国際公開日 平成15年2月20日 (2003.2.20)
 審査請求日 平成17年7月25日 (2005.7.25)
 審判番号 不服2009-16858 (P2009-16858/J1)
 審判請求日 平成21年9月11日 (2009.9.11)
 (31) 優先権主張番号 01 119 260.6
 (32) 優先日 平成13年8月9日 (2001.8.9)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 390040420
 マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツ
 ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ
 ャフテン・エー・ファオ
 Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung
 der Wissenschaften
 e. V.
 ドイツ80539ミュンヘン、ホーフガル
 テンシュトラッセ8番
 (74) 代理人 100061815
 弁理士 矢野 敏雄
 (74) 代理人 100099483
 弁理士 久野 琢也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER3 活性の阻害剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効剤として HER3 活性の阻害剤及び製薬学的に認容性の基材、希釈剤及び / 又は佐剤を含有する製薬組成物において、前記阻害剤の HER3 に対する結合が HER3 媒介シグナル伝達を減弱させ、前記阻害剤は、ハイブリドーマ細胞系 DSM ACC 2527 から産出した抗体 1 B 4 C 3 およびハイブリドーマ細胞系 DSM ACC 2517 から産出した抗体 2 D 1 D 1 2、そのフラグメント、ならびにその組換え誘導体から選択された抗 HER3 抗体であり、シグナル伝達の前記減弱が、1 B 4 C 3 により媒介された細胞表面からの HER3 分子の少なくとも部分的な消失を生じる HER3 のダウンレギュレーションにより生じるか又はシグナル伝達の前記減弱が実質的に不活性形での 2 D 1 D 1 2 により媒介された HER3 の安定化により生じる、前記組成物。

【請求項 2】

阻害剤がヒレグリンの HER3 への結合と拮抗しない、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記抗体がモノクローナル抗体又はそのフラグメントである、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記抗体が組換え抗体又は抗体フラグメントである、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 5】

組換え抗体又は抗体フラグメントがキメラ化抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体及びそのフラグメントから選択される、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 6】

前記抗体が標識付け基又はエフェクター基と結合されている、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

診断適用のための請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

治療用適用のための請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

請求項 1 から 6 までのいずれか 1 項に記載の H E R 3 活性の阻害剤の増殖過剰疾患、特に腫瘍疾患の診断、予防又は治療用の薬剤の製造用の使用であって、その際、前記阻害剤は、ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 2 5 2 7 から産出した抗体 1 B 4 C 3 およびハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 2 5 1 7 から産出した抗体 2 D 1 D 1 2、そのフラグメント、ならびにその組換え誘導体から選択された抗 H E R 3 抗体である、前記使用。

【請求項 10】

乳癌、胃腸癌、膵臓癌、前立腺癌、神経膠腫、メラノーマ又は腫瘍転移生成の診断、予防又は治療用の請求項 9 に記載の使用。

【請求項 11】

前記疾患が、H E R 3 燐酸化の増加と関連がある、請求項 9 または 10 に記載の使用。

【請求項 12】

前記疾患が、H E R 2 / H E R 3 ヘテロ二量体化の増加と関連がある、請求項 9 から 11 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 13】

前記疾患が、P l ₃ - キナーゼ、c - j u n - 末端キナーゼ、A K T、E R K 2 及び / 又は P Y K 2 の活性の増強と関連がある、請求項 9 から 12 までのいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 14】

ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 2 5 1 7。

【請求項 15】

ハイブリドーマ細胞系 D S M A C C 2 5 2 7。

【請求項 16】

請求項 14 または 15 の細胞系により産出された抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有効剤として H E R 3 活性の阻害剤、特に抗 H E R 3 抗体から成る製薬組成物に関する。更に、この組成物の増殖過剰疾患、特に腫瘍疾患の診断、予防又は治療用の使用を開示する。

【0002】

プロテインチロシンキナーゼは、細胞増殖及び分化を調節するシグナル伝達過程を媒介する酵素として公知である。受容体プロテインチロシンキナーゼは、リガンド刺激チロシンを介して基質の燐酸化に働く。H E R 3 (E r b B 3 とも称する) は、受容体プロテインチロシンキナーゼの表皮増殖因子受容体 (E G F R) サブファミリーの一員である (P l o w m a n その他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 7 (1 9 9 0)、4 9 0 5 ~ 4 9 0 9 ; K r a u s その他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 6 (1 9 8 9)、9 1 9 3 ~ 9 1 9 7 及び K r a u s その他、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 0 (1 9 9 3)、2 9 0 0 ~ 2 9 0 4)。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

HER3は、種々のタイプの癌、例えば乳癌、胃腸癌及び膵臓癌で、過剰発現すると判明している。HER3が、受容体プロテインチロシンキナーゼのEGFRサブファミリーのもうひとつの成員であるHER2と一緒に共発現すると、活性ヘテロ二量体シグナル複合体が形成される。

【 0 0 0 4 】

HER3に対するモノクローナル抗体(Rajkumarその他、Br. J. Cancer 70 (1994)、459~456)は、HER3を発現する細胞系の足場非依存性増殖に対して拮抗作用を有した。他方では、US特許5968511(WO97/35885に相応)に記載の抗HER3抗体は、HER2/HER3ヘテロ二量体のヒレグリン誘発形成を減弱させると報告されている。しかし、このような活性はHER3とのヒレグリン結合を増加させる抗体に関してのみ実証されるにすぎない。従って、もしあるとして、どのタイプの抗HER3抗体が治療適用に使用可能であるのかは明らかでない。

【 0 0 0 5 】

Vadlamudiその他(Oncogenes 18 (1999)、305~314)は、HER2受容体によるシクロオキシゲナーゼ(COX-2)経路の調節を記載している。COX-2の特異性阻害剤が、結腸直腸癌細胞の細胞分裂促進性及び浸潤性作用を抑制することができると判明した。更に、モノクローナル抗HER3抗体を用いる培養により、HER2/HER3ヘテロ二量体レベルは減少するが、COX-2発現は部分的に減少するにすぎないことが判明した。

【 0 0 0 6 】

WO 00/31048には、EGFR、HER2及びHER4のような受容体チロシンキナーゼの阻害剤として作用するキナゾリン誘導体が開示されている。しかしHER3の阻害剤は開示されていない。

【 0 0 0 7 】

WO 00/78347には、ErbB-2/ErbB-3ヘテロ二量体形成を阻止又は減弱させることから成る、細胞増殖抑止又は抑制法が開示されている。例えばこの薬剤は、抗HER2細胞外ドメイン抗体と抗HER3抗体、例えばNeomarkers販売のHER3抗体H3.105.5の組み合わせであってよい。しかし、所望の治療効果を得るためにどのタイプの抗HER3抗体が必要とされるのかは明らかでない。

【 0 0 0 8 】

US特許5804396には、HER2/HER3又はHER2/HER4又はHER3/HER4ヘテロ二量体によるシグナル伝達の抑制の活性化に有効な薬剤の分析工程から成る、増殖障害の治療用の薬剤の同定方法が記載されている。特異的なHER3阻害剤は開示されていない。

【 0 0 0 9 】

我々は、ヘルセプチン、HER2に対する拮抗モノクローナル抗体の生物学的特性をHER3抗体と比較した、即ち(i)HER3のヒレグリン結合部に対向する、HER3-ECD、ハツカネズミのモノクローナル抗体IgG1、Upstate Biotechnology、Cat. No. #05-471、(ii)我々の研究所からの抗体1B4C3及び(iii)同じく我々の研究所からの抗体2D102を、異なるHER2:HER3比を発現する浸潤性乳癌細胞系MCR-7(DKFZ ハイデルベルク)、MDA-MB-468(ATCC HTB-132)及びMDA-MB231(ATCC HTB-26)中で比較した。乳癌細胞系を / -ヒレグリン(/ -HRG)刺激の前に抗HER3抗体で前処理すると、ヘルセプチンと対照的に、HER2/HER3チロシンリン酸化含分が減少したという証拠が得られる。更に、抗HER3抗体はHER2/HER3ヘテロ二量体化を排除し、Pl₃-キナーゼのp85サブユニット及びアダプタープロテインSHCのHER3との複合体形成も減少させ、その結果、各々Pl₃-キナーゼ及びc-jun-末端キナーゼ活性(JNK)が減少する。ヘルセプチンに比して、抗HER3抗体は、 / -HRG刺激後の細胞外シグナル制御キナーゼ2(Erk2)を

ダウンレギュレーションすることも可能であった。更に我々は、抗HER3抗体で前処置後の乳癌細胞系の遊走性及び増殖性の有意な減少を実証する。我々のデータは、抗HER3抗体がHRG刺激後のシグナル伝達過程を減弱する力がヘルセプチンより強いことを明らかに示す。更に、特異的な癌タイプ、例えばメラノーマでは、抗HER3抗体は遊走性及び増殖性を減少させるために有効であるが、抗HER2抗体は有意な効果を全く示さない。これらのデータは、HER3及びそのヘテロ二量体化相手による過シグナル化を特徴とする、乳癌及びその他の悪性腫瘍の治療に、抗HER3抗体又はその他のHER3阻害剤が非常に有効であることを実証する。

【0010】

従って、本発明は、有効剤として特異的なタイプのHER3活性阻害剤及び製薬的に認容性の基材、希釈剤及び/又は佐剤を含有する製薬組成物に関する。本発明のHER3阻害剤は、HER3への阻害剤の結合がHER3媒介シグナル伝達を減弱させることを特徴とする。態様の一つでは、HER3媒介シグナル伝達の減弱を、HER3のダウンレギュレーションにより引き起こしてもよく、細胞表面からのHER3分子の少なくとも部分的な消失を生じる。本発明のもう一つの態様では、HER3媒介シグナル伝達の減弱を、細胞表面上のHER3の実質的に不活性形、即ち安定化されてない形に比して低いシグナル伝達を生じる形に安定化することによって引き起こすことができる。

【0011】

本発明の阻害剤は、ヒレグリンのHER3への結合に、特にヒレグリンのHER3への結合を減少させることによって、影響を及ぼすことができる。しかしもう一つの態様では、阻害剤はヒレグリンのHER3への結合と拮抗しない。

【0012】

有利な態様では、阻害剤は抗HER3抗体である。有利には、抗体はHER3の細胞外ドメインに対向する。しかし、その他のHER3阻害剤、特に低い分子量の阻害剤、例えばペプチド又は有機化合物を使用することもできる。

【0013】

本発明によれば用語“抗体”は、所望の活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2種の抗体から生成される多特異的抗体（例えば二特異的抗体）及び抗体フラグメントを含む。

【0014】

抗体は、Koe h l e rその他(Nature 256(1975)、495)により記載されているようなハイブリドーマ法又は組換えDNA法(例えばUS特許4816567参照)により得られるモノクローナル抗体であってよい。モノクローナル抗体は、Clacksonその他(Nature 352(1991)、624~628)及びMarksその他(J. Mol. Biol. 222(1991)、581~597)に記載の方法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。抗体はIgM、IgG、例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4であってよい。

【0015】

抗体フラグメントは、抗体の部分、通常は抗原結合又は無傷の抗体の種々の領域から成る。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvフラグメント、ダイアボディ、単鎖抗体分子及び多特異的抗体フラグメントが含まれる。

【0016】

特に、抗体は、組換え抗体又は抗体フラグメント、更に特にキメラ抗体又はそのフラグメント(Morrisonその他、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81(1984)、6851~6855)、ヒト化抗体(Jonesその他、Nature 321(1986)、522~525; Riechmannその他、Nature 332(1988)、323~329及びPresta、Curr. Op. Struct. Biol. 2(1992)、593~596)、単鎖Fv抗体(Plueckthun: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113、Rosenburg及びMoore、EDS、Springer Verl

10

20

30

40

50

ag、N.Y.(1994)269~315頁)及びダイアボディ(Hollinger
その他、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90(1993)、64
44~6448)から選択することができる。

【0017】

特に有利な態様では、抗体は、ハイブリドーマ細胞系DSM ACC 2527又はDSM ACC 2517から産出した抗体1B4C3(IgG2a)及び2D1D12(IgG1)、又はそのフラグメント又はその組換え誘導体から選択する。1B4C3は、HER3の内面化を起こす抗体であり、2D1D12は、HER3の安定化を起こす抗体である。抗体、例えばキメラ抗体又はヒト化抗体又はそのフラグメントが更に有利であり、これらは、例えばHER3上の同じエピトープと結合することによって、沈降ハイブリドーマ細胞系によって産出した抗体と比較して実質的に同じ生物学的活性(例えば実施例に記載したように)を有する。ハイブリドーマ細胞系DSM ACC 2517は、2001年7月24日のBudapest Treaty for the Deposit of Microorganisms(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)、Mascheroder Weg 1b、38124 Braunschweig、Germany)に寄託した。抗体1B4C3を産出するハイブリドーマ細胞系DSM ACC 2527はDSMZで2001年8月7日に寄託した。

10

【0018】

本発明の抗体は、特に診断適用のために標識付け基と結合してよい。好適な標識付け基、例えば放射性基、蛍光基又はその他の標識付け基の例は、当業界で公知である。更に、特に治療適用のために抗体は、エフェクター基、例えば細胞毒性基、例えば放射性基、毒素又はその他の当業界で公知のエフェクター基と結合してよい。

20

【0019】

もう一つの有利な態様では、阻害剤は、フィブロネクチンタイプIIIドメイン又はアンチカリンのような非抗体誘導結合タンパク質から選択してもよい(Skerra、“Engineered protein scaffolds for molecular recognition”、J.Mol.Recog.13(2000)、167~187及びそこに記載の文献)。

【0020】

更に本出願は、HER3活性の阻害剤(ここで前記阻害剤のHER3に対する結合はHER3媒介シグナル伝達を減弱させる)の増殖過剰疾患、特に腫瘍疾患、例えば乳癌、胃腸癌、膵臓癌、前立腺癌、神経膠腫、メラノーマ又はその他のHER3発現又は過剰発現癌又は腫瘍転移生成の診断、予防及び/又は治療用の使用に関する。これらの疾患は、HER3シグナル伝達の増加と関連し、付随するHER3発現又はHER2発現の欠如と関連しうる。特に、この疾患は増加したHER3燐酸化及び/又は増加したHER2/HER3ヘテロ二量体化及び/又は増加したPL₃キナーゼ活性及び/又は増加したc-jun末端キナーゼ活性及び/又はAKT活性及び/又は増加したERK2活性及び/又はPYK2活性と関連する。

30

【0021】

意外にも本発明のHER3阻害剤、特に抗HER3抗体が、HER2阻害剤、例えばヘルセプチンより有意に高いシグナル伝達過程減弱力を示すことが判明した。特にメラノーマ細胞中で、HER2はメラノーマ細胞により発現されるにも拘わらず、ヘルセプチンは有意な作用を示さないが、抗HER3抗体は有効であった。

40

【0022】

有利には本発明のHER3阻害剤は、下記の特性の少なくとも一つを発揮する：

- ヒレグリン(p85)のトランス活性化されたHER3との会合の減弱、有利にはp85のHER3との結合の実質的に完全な抑制、
- GRB2のHER2との結合、HER2のHER3との結合及び/又はGRB2のSHCとの会合の抑制、

50

- 受容体チロシン磷酸化の抑制、
- A K T 磷酸化の抑制、
- 特に乳癌及びメラノーマにおける腫瘍浸潤の減弱、
- P Y K 2 チロシン磷酸化の抑制及び
- E R K 2 磷酸化の抑制。

【 0 0 2 3 】

更に、本発明は増殖過剰疾患、特に腫瘍疾患の診断、予防又は治療法に関し、これはそれが必要な患者、例えばヒトに、有効量の H E R 3 活性の阻害剤を適用することから成り、その際、この H E R 3 に対する阻害剤は H E R 3 媒介シグナル伝達を減弱する。

【 0 0 2 4 】

H E R 3 阻害剤、特に抗 H E R 3 抗体は、有効剤を生理学的に認容性の基材、希釈剤及び/又は佐剤と混合することによって、Remington's Pharmaceutical Sciencesに記載されているような、例えば乾燥凍結調剤、水溶液、分散液又は固体製剤、例えば錠剤、糖衣錠又はカプセルの形で製造することができる。

【 0 0 2 5 】

調剤は1種以上の有効化合物、例えばその他の受容体プロテインチロシンキナーゼ、例えば E G F R、H E R 2、H E R 4 又は血管内皮因子 (V E G F) の阻害剤を含有することもできる。その代わりにか又は付加的に、組成物は細胞障害剤、例えばドキソルビシン、シスプラチン又はカルボプラチン又はサイトカインから成ることができる。

【 0 0 2 6 】

本発明の阻害剤は、例えば標的細胞に対する H E R 3 の発現及び/又は活性を測定するために、診断用適用にも好適である。このような診断適用は公知方法で実施することができる。

【 0 0 2 7 】

治療すべき疾患のタイプ及び重度に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ の抗体をヒトの患者に、例えば1回以上に分けて投与するか又は連続注入により投与することができる。一般的な一日の用量は、前記した要因に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 又はそれ以上の範囲で変動してよい。治療すべき症状に応じて、数日以上 of 反復適用に関しては、治療は疾患症状の所望の抑制が生じるまで続ける。

【 0 0 2 8 】

更に本発明を下記図及び実施例につき詳説する：

実施例

1. モノクローナル抗体 - H E R 3^{EC D} は、H E R 3 及び H E R 2 の受容体チロシン磷酸化を減弱させる

乳癌細胞系 M C F - 7 (D K F Z - ハイデルベルク)、M D A - M B - 4 6 8 (A T C C H T B - 1 3 2) 及び M D A - M B - 2 3 1 (A T C C H T B - 2 6) をそれらの H E R 2 : H E R 3 の異なる比及びそれらの固有の遊走性に基づき選択したが、M D A - M B - 2 3 1 が最も浸潤性細胞系である。 - H E R 3^{EC D} (U p s t a t e B i o t e c h n o l o g y、C a t # 0 5 - 4 7 1) の機能性役割をトラスツズマブ (ヘルセプチン) と比較して評価するために、ヒレグリン (H R G) 刺激前に細胞を各々 - H E R^{EC D} 及び H C で前処理し、受容体 - 免疫沈降試験を行い、抗ホスホチロシン抗体 (P Y) でプローブした (図 1)。我々のデータは、 - H E R 3^{EC D} を用いる前処理が M C F - 7 (図 1 a) 及び M D A - M B - 2 3 1 (図 1 c) で - H R G 刺激後に H E R 3 及び H E R 2 のチロシン磷酸化含分を実質的に減少させたが、逆に M D A - M B - 4 6 8 (図 1 b) で H E R 3 チロシン磷酸化を増加させたことを示す。チロシル - 磷酸化受容体含分は劇的に減少したにも拘わらず、H E R 2 と H E R 3 間の会合は、 - H E R 3^{EC D} で更に増強した (図 1 a、b 中央上部パネルライン 4 及び 8)。対照的に、H C は、全細胞系で H R G の存在でか又はその不在で、受容体チロシル - 磷酸化をアップレギュレートし、H E R 3 及び H E R 2 の会合を促進した (図 1 a、b、c 上部パネルレーン 3、7、11 及び 15)。 - H R G に対して反応しない M D A - M B - 4 6 8 細胞の場合に

10

20

30

40

50

は、 $-HERG$ を刺激として使用した。

2. $-HER3^{EC D}$ はSHC及び Pl_3-K のHER3との会合及びGRB2のHER2との会合を排除する

次に $-HER3^{EC D}$ が、HER3の公知基質、即ち、各々MAPKカスケード活性化及び脂質シグナリングに關与するエフェクタータンパク質である、SHC及びホスファチジル-3-OH-キナーゼ(Pl_3-K)に対する作用を有するか否か調べた。従って、SHC及び Pl_3-K を前記の実験条件下で免疫沈降させ、これらエフェクターのチロシン磷酸化を評価した。図2で明らかなように、 $-HER3^{EC D}$ は細胞系MCF-7及びMDA-MB-486でSHCのチロシン磷酸化を減弱させた(図2 a、bレーン13を16と比較)。興味深いことには、SHCの会合は、MCF-7細胞で減弱されたが、MDA-MB-486では、 $-HER3^{EC D}$ はHER3のSHCとの結合の増加を生じる。 Pl_3-K の調節サブユニットの免疫沈降は實質的に同じ結果を生じた。チロシン磷酸化HER3の Pl_3-K への結合は、MCF-7で排除されたが、MDA-MB-468では増加が觀察された(図1 b、2 b)。しかし、MDA-MB-468細胞における $-HER3^{EC D}$ を用いる前処理によりSHC及び Pl_3-K のHER3への結合の増加が生じるが、HCは再び全細胞系でクロスリンク特性を示した。SHCは、HRG刺激後にアダプター分子GRB2と会合するので、SHCの減少したチロシル-磷酸化をGRB2結合を測定することによって調べた(図2 c)。従って、MCF-7細胞でGST-プルダウン分析をGST-GRB2融合及び前記したものと同一実験方法を用いて行った。確かにSHCの減少したチロシル-磷酸化の結果、GRB2のSHCに対する強力に減少した結合(図2 c下部パネル、比較レーン5及び8)及びそのHER2との会合の完全な抑制(図2 c、中央パネル、比較レーン5及び8)が生じた。これらのデータは、 $-HER3^{EC D}$ が、MCF-7でHER3に対するSHC及び Pl_3-K 結合を抑制するが、反対にMDA-MB-468では両方のタンパク質がHER3の磷酸化状態とは無関係にHER3と会合したことを明らかに示す。

3. $-HER3^{EC D}$ はJNK1及び Pl_3-K 活性をダウンレギュレートする

アダプタープロテインSHCは、各々ERK2及びJNKを活性化する、増殖因子受容体の下部MAPKシグナリング経路を媒介する。 $-HER3^{EC D}$ のERK2及びJNKに対する作用を調べるために、MCF-7及びMDA-MB-468で同じ実験条件下でMAPKキナーゼアッセイを行った。全細胞系でJNK活性の強力な減少が觀察されたが、JNKに対するHCの同等の効果はMCF-7でのみ検出されたにすぎない(図3 a)。ERK2活性は $-HER3^{EC D}$ により僅かではあるが有意に減少したが、HCはERK2活性に対して全く作用を有さなかった(データ未記載)。癌浸潤における Pl_3-K の關連が最近実証されたので、我々は Pl_3-K 活性に対する $-HER3^{EC D}$ の抑制特性を調べ、 Pl_3-K アッセイを行った(図3)。MCF-7及びMDA-MB-486で Pl_3-K 活性はHRG処理細胞に比して強力に減少した(図3 a、b)。MDA-MB-486でHCは $-HER3^{EC D}$ より Pl_3-K 活性に対してより多大な作用を有した。これらのデータは、 $-HER3^{EC D}$ が、MCF-7及びMDA-MB-486細胞で、各々JNK及び Pl_3-K 活性をダウンレギュレートすることを示唆する。

4. $-HER3^{EC D}$ はHER3のエンドサイトーシスのダウンレギュレーションを増強する

HER2及びHER3は、HRG刺激後に細胞内取込され、再循環される。我々は、HER3チロシル-磷酸化の $-HER3^{EC D}$ 媒介抑制が促進されたエンドサイトーシスに起因するかを確証したいと考えた。洞察するために、MCF-7細胞を用いる時間経過を各々 $-HER3^{EC D}$ 又はHRGの不在又は存在で行い、次いでHRGを用いて刺激した(図4)。次いでHER3を膜タンパク質のビオチニル化後に免疫沈降させた。HER3が $-HER3^{EC D}$ で前処理後に急速に細胞内取込されることが觀察された(図4 b上部パネル)。HRGを細胞に適用することによって同様の効果が得られたが、2時間後にHER3は膜に戻され、3時間後に再び細胞内取込された点は異なっていた。対照として全細胞溶解物(WCL)をPYで調べた(図4 b下部パネル)。チロシル磷酸化タン

10

20

30

40

50

パク質の含分が3時間後に減少したH R G 処理細胞と比較して、H E R 3 のエンドサイトーシスの促進が - H E R 3 ^{E C D} を用いた前処理の1時間後に起こった。 - H E R 3 ^{E C D} をH C と比較するために、我々は同じ実験をH C 及び免疫沈降H E R 2 を用いて行った(図4 a 上部パネル)。著しいことには、H R G は迅速なエンドサイトーシスを生じるが、H E R 2 はどの時点でもH C を用いる前処理後に細胞内取込はされなかった。細胞内取込された受容体及び全細胞溶解物(抗ホスソチロシン(P Y)を用いてブルーブした)を比較する場合に、ホスホチロシン含分は - H E R 3 ^{E C D} で減少したが、H C では減少しなかった(図4 b 下部パネル)。我々のデータは、 - H E R 3 ^{E C D} が促進されたエンドサイトーシスにより迅速にH E R 3 をダウンレギュレートし、従って細胞をH R G 刺激に対して無反応にすることを示す。

10

5 . - H E R 3 ^{E C D} は乳癌細胞系の遊走性及び増殖性を抑制する

乳癌細胞の遊走性及び増殖性に対する - H E R 3 ^{E C D} の生物学的機能を評価するために、 - H E R 3 ^{E C D} の存在又は不在でB r d U - 取込アッセイを行い、H R G で刺激した。 - H E R 3 ^{E C D} を用いる前処理は、M C F - 7 及びM D A - M B - 4 6 8 で増殖を各々2 8 . 7 ± 6 . 1 8 % 及び2 1 . 1 ± 7 . 6 2 % 減少させた。H C はこれらの細胞系で全く作用を有さなかった(データ未記載)が、観察された増殖の抑制はE R K 2 アッセイと相関した。更に、乳癌細胞系の遊走性に対する - H E R 3 ^{E C D} の作用を調べるために、 - H E R 3 ^{E C D} の存在又は不在でM C F - 7 及びM D A - M B - 4 8 6 を用いて走化性試験を行った。M C F - 7 及びM D A - M B - 4 6 8 で各々5 9 . 1 % (P = 0 . 0 1 8) 及び5 5 . 4 % (P = 0 . 0 0 0 0 5) の遊走性の強力な減弱が観察された。更に、遊走性はM D A - M B 2 3 1 でも3 5 % 抑制されたが、有意性はもっと僅かであった(P = 0 . 0 6)。我々のデータから、M C F - 7 及びM D A - M B - 4 6 8 における増殖及び遊走性に対する - H E R 3 ^{E C D} の抑制作用が明らかに示される。

20

6 . H E R 3 に対するモノクローナル抗体の産出

次に、B a l b / c マウスをH E R 3 の細胞外部分のヒト組換え融合タンパク質及びC - 末端H i s - T a g で免疫化して、H E R 3 の細胞外ドメインに対するハツカネズミモノクローナル抗体を産出した(H E R 3 - 6 x H i s - C T)。免疫原は、H E K 細胞でトランスフェクション、G 4 1 8 を用いる選択及びにカセットの安定な発現によって得た；最高発現レベルを有するクローンの細胞培養上澄み液を集め、タンパク質を硫酸アンモニウム沈殿、透析及び次いで金属イオンアフィニティークロマトグラフィー後に精製した(N i - N T A)。品質保証は、ウェスタンブロット法により行った(データ未記載)。免疫化は製造業者プロトコルによりH E R 3 - 6 x H i s - C T 2 2 µ g の腹腔内注射により行った(Q i a g e n I m m u n E a s y M o u s e A d j u v a n t)。モノクローナル抗体を産出するハイブリドーマ細胞系は標準方法を使用して産出した。

30

7 . H E R 3 に対するモノクローナル抗体は、そのタンパク質バックボーンと優先的に結合し、H E R 3 のエンドサイトーシス過程に対して異なる作用を有する

我々は、F A C S 分析によりM C F - 7 細胞の細胞表面上の特異的天然H E R 3 を認識する3 種のモノクローナル抗体を確認した(データ未記載)。1 B 4 C 2 及び1 B 4 C 3 はI g G 2 a イソタイプ抗体であり、2 D 1 D 1 2 はI g G 1 イソタイプ抗体である。E G F R ファミリーのその他の成員との交差反応性は検出されなかった(データ未記載)。次いで、抗体がH E R 3 のグリコシル化構造と結合するのか又はタンパク質バックボーンと結合するのか及びこれが受容体のエンドサイトーシス調節に対してどんな結果をもたらすのかを調べたいと考えた。従って、M C F - 7 細胞を、細胞表面タンパク質のN - リンクしたグリコシル化を抑制するとして公知である抗生物質ツニカマイシンの存在又は不在で1 6 時間前処置した。細胞を溶解後、H E R 3 をモノクローナル抗体2 F 1 2 (H E R 3 の細胞内部分に対向する)、 - H E R 3 ^{E C D} (H E R 3 の細胞外部分)、1 B 4 C 2、1 B 4 C 3 及び2 D 1 D 1 2 と一緒に免疫沈降させた。我々のデータは、 - H E R 3 ^{E C D}、1 B 4 C 3 及び2 D 1 D 1 2 は全てH E R 3 のタンパク質バックボーンと優先的に結合するが、1 B 4 C 3 はH E R 3 のグリコシル化形とも親和性を有することを示す(図6 A)。

40

50

【 0 0 2 9 】

HER3のエンドサイトーシス過程に対する1B4C3及び2D1D12の作用を調べるために、我々は時間経過試験を行ったが、その際、MCF-7細胞を種々の時間の間各々1B4C3及び2D1D12と一緒に培養した。細胞表面タンパク質をビオチニル化し、HER3の細胞外ドメインに対する抗体を用いて沈降させ、ストレプトアビジンに対してブローブした。1B4C3は、HER3^{EC}と同様にHER3のエンドサイトーシスを促進するが、2D1D12は安定化し、従って細胞表面にHER3を蓄積したことが観察された(図6B)。

8. モノクローナル抗体1B4C3及び2D1D12は、HER3及びHER2の下流シグナルを抑制する

10

次に、1B4C3及び2D1D12がHER2及びHER3基質SHCのチロシン磷酸化を抑制することができるか否かを調べた。GRB2はHRG-刺激HER2と結合し、SHCと同様に遊走シグナルをMAPK経路に伝達するので、SHCを免疫沈降させ、並行して前処理していないか又は抗体で前処理し、次いでHRGで刺激したMCF-7細胞でGST-GRB2プルダウンを実施した(図6C)。この実験は、両方の抗体がSHCのチロシン磷酸化及びGRB2とSHCの会合を抑制することを示す。更に、抗体はSHCとHER3の会合及びHER2及びHER3間のヘテロ二量体化を抑制する。これらのデータは、2D1D12が1B4C3より強力な抑制作用を有するが、下流シグナリングが1B4C3及び2D1D12によって抑制されることを示す。

9. モノクローナル抗体2D1D12は、乳癌細胞系MDA-MB-435S、ZR-75-1及びメラノーマ細胞系Mel-Gerlachの増殖を抑制する

20

次に、二つの乳癌細胞系MDA-MB-435S(ATCC HTB-129)、ZR-75-1(ATCC CRL-1500)及びメラノーマ細胞系Mel-Gerlach(Klinikum Grosshadern、ミュンヘン)の生物学的活性の研究に着手する。この細胞系は、ヌードマウスにおけるそれらの腫瘍形成性及びそれらの高いHER3発現レベルにより選択した。HER3はメラノサイト並びに稀突起膠細胞の発現に非常に重要であるので、メラノーマ細胞はHER3を過剰発現させることを記載しておくべきである。1B4C3及び2D1D12は遊走性シグナルを排除し、その結果癌細胞の増殖性を抑制するという我々の仮説を検証するために、BrdU-取込みアッセイを抗体の存在又は不在下で行った(図7)。増殖は全細胞系で2D1D12により強力に減少したが、1B4C3はMel-Gerlachで抑制作用を有したにすぎない。総括すると、我々のデータは、HER3に対するモノクローナル抗体が、癌に対する治療の新たな武器と見なすことが出来るという最初の証拠となる。

30

【 0 0 3 0 】

抗体1B4C3及び2D1D12を産出するハイブリドーマ細胞系は、各々2001年8月7日及び2001年7月24日にDSMZに寄託した。

10. HER3抗体のシグナル伝達に対する作用

10.1. 方法

MDA-MB-435SはATCC(HTB-129)から入手し、Mel-JusoはCell Lines Service(CLS)(0282-HU)から入手した。GST-p85(a.a333~430)は、Santa Cruzから入手した。GST-GRB2は、前記したようにして精製した。Phospho-AKT(P-Ser473)はNew England Biolabs(NEB)から入手した。HER2抗体は、ハイブリドーマ培養上澄み液から、記載したようにして精製した(ATCC CRL-10463)。GST-プルダウンアッセイのために、バイトプロテイン1.25µgを使用した。BrdU-取込及び浸潤アッセイを前記したようにして行った。試験は全て少なくとも2回実施した。

40

10.2. 結果及び討論

MDA-MB-435S及びMel-JusoにおけるHER2及びHER3受容体の表面発現を試験するために、付加的にそれらの発現レベルをFACS分析により測定した

50

(図8 A、B)。我々はこれらの細胞系でHER2及びHER3発現を観察し、どのHER3抗体がヒレグリン(HRG)媒介シグナル伝達に対して作用するのかによって分子機構の詳細な分析を続けた。従って、ヒトの乳癌細胞系MDA-MB-435S及びメラノーマ細胞系Mel-JusoでGST-プルダウンアッセイを実施した。休止期細胞をHER3抗体1B4C3、2D1D12、対照抗-HER2抗体及びP1(3)K阻害剤LY294002で前処理し、次いで-HRGで刺激した。細胞溶解後、タンパク質レベルは正常化し、HER3は6個の潜在的p85結合部を有するので、バイトとしてGST-p85(a.a333~430)を用いるGST-プルダウンアッセイを実施した。ホスホチロシン(PY)に対するウェスタンブロットにより、抗-HER2及び1B4C3が同じようにトランス活性化されたHER3とのp85会合を減少させるが、LY294002(マイナスの対照)はMDA-MB-435Sでp85結合に対して抑制作用を有さないことが分かる(図8C)。しかし2D1D12はMDA-MB-435SでHER3とp85の結合をほぼ完全に排除する(図8C)。

【0031】

ヒトメラノーマ細胞系Mel-Jusoで、1B4C3及び2D1D12は同様にHER3とのp85の会合を減少させるが、抗HER2は、p85の受容体会合のより著しい減少を発揮する(図8D)。再びLY294002はp85結合に対して抑制作用を全く示さなかった(図8D)。更に、MDA-MB-435Sで125kDa及び66kDaでホスホチロシンブロットで若干著しいチロシン磷酸化帯及びMel-Jusoで125kDaで主要な帯のみを観察した。P1(3)Kはフォーカルアドヒージョンキナーゼ(FAK)と物理的に会合することが公知であり、従って我々はブロットをFAK抗体で再プローブした(図8C、D下部パネル)。我々のデータは、両方の細胞系で2D1D12及びP1(3)K阻害剤LY294002がp85とのFAK会合を排除したことを示す。ブロットのHER2及びHER3抗体を用いる再プローブにより、補足HER3の量の減少及びそのHER2とのヘテロ二量体化の減少が確認された(図8C、D中央パネル)。総括すると、我々のデータは、HER3及びHER2抗体は受容体チロシン磷酸化レベルを減少させるにも拘らず、受容体関連エフェクタータンパク質の二次レベルでの異なる応答を調節することができることを示す。

【0032】

GRB2は直接HER2と結合するだけであり、HER3に関しては間接的にSHCを介して結合するので、我々は付加的にバイトとしてGST-GRB2を用いるGST-プルダウン試験を同じ試験条件及び前記のヒト腫瘍細胞で実施した(図9A、B)。我々は、1B4C3及び2D1D12は160及び185kDa間の受容体チロシン磷酸化を減少させるが、LY294002は抑制作用を全く有さないことを観察した(図9A、B上部パネル)。しかし細胞の抗HER2抗体を用いる前処理により、受容体のチロシン磷酸化の増加が引き起こされ、これは更に-HRGで増強することができた。HER2、HER3及びSHC抗体を用いる再プローブは、1B4C3及び2D1D12が実質的にHER2とのGRB2結合及びHER3とのその間接的会合(図9A、B中央パネル)並びにSHCとのその会合(図9A、B下部パネル)を両方の細胞系で抑制することを示す。他方では、抗HER2抗体はHER2及びSHCに対するGRB2結合を増加させる。

【0033】

抗体媒介下流シグナリングを更に洞察するために、前記試験の全細胞溶解(WCL)を分析した(図10)。全細胞タンパク質のホスホプロテイン含分を調べた時に、両方の細胞系で抗HER2は構造的に受容体を活性化したが、1B4C3及び2D1D12は受容体のチロシン磷酸化を抑制したことを観察した(図10A上部パネル)。ここでもLY294002は作用を有さなかった。

【0034】

HRGがマイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)経路を活性化して、細胞増殖、細胞存続及び種々の遺伝子の転写増強を生じることが確立される。HER2及びHER3抗体のHRG誘発MAPK活性に対する作用を調べるために、MDA-MB435

10

20

30

40

50

S 及び Me1 - J u s o 全細胞抽出の免疫プロットをホスホ - E R K (T 2 0 2 / Y 2 0 4) 抗体を用いてプローブした (図 1 0) 。 M A P K E R K 1 / 2 (p 4 4 / p 4 2) の燐酸化によって、受容体の活性化にも拘わらず、抗 H E R 2 は E R K 1 燐酸化を僅かに減弱させたが、1 B 4 C 3 及び 2 D 1 D 1 2 は E R K 1 燐酸化に対して抑制作用を全く有さなかったことが判明した (図 1 0 A 中央パネル) 。更にプロットを再プローブすることによって、同じ量の荷重タンパク質が確認された (図 1 0 A 下部パネル) 。

【 0 0 3 5 】

更に、P 1 (3) K の下流標的であり、細胞生存の重要な役割を演じる A K T の活性化状態を調べた。抗 H E R 2 、 1 B 4 C 3 及び 2 D 1 D 1 2 が Me1 - J u s o メラノーマ細胞で A K T 燐酸化を著しく抑制したことを観察した (図 1 0 B 上部パネル) 。 M D A - M B - 4 3 5 S 乳癌細胞で、H E R 2 及び H E R 3 の抗体が両方とも A K T 燐酸化を有意に減弱させた (図 1 0 C) 。 L Y 2 9 4 0 0 2 を陽性対照として使用した。この観察は、活性化された A K T の著しく増加した発現を有する乳癌患者は遠隔転移で再発し易く、そのため臨床結果が悪くなるので非常に重要である (P r e z - T e n o r i o G その他、British Journal of Cancer、86、540 ~ 545 (2002)) 。

【 0 0 3 6 】

モノクローナル抗体 1 B 4 C 3 及び 2 D 1 D 1 2 は、乳癌細胞系 M D A - M B - 4 3 5 S 及びメラノーマ細胞系 Me1 - J u s o の増殖及び遊走を抑制する。

【 0 0 3 7 】

細胞周期プログレッション及び腫瘍浸潤に対する 1 B 4 C 3 及び 2 D 1 D 1 2 の抑制機能を評価するために、B r d U - 取込み及び浸潤アッセイを行った (図 1 1) 。

【 0 0 3 8 】

2 D 1 D 1 2 を用いて前処理した M D A - M B - 4 3 5 S 及び Me1 - J u s o 細胞で - H R G 刺激 B r d U - 取込みの明らかな減少が見られた (図 1 1 A) 。浸潤アッセイにより、抗 H E R 3 抗体 2 D 1 D 1 2 及び 1 B 4 C 3 が、M D A - M B - 4 3 5 S 乳癌及び Me1 - J u s o メラノーマ細胞の浸潤を実質的に減らしたことが明らかになった。意外にも、H E R 2 抗体 4 D 5 は M D A - M B - 4 3 5 S の抑制を示したに過ぎず、メラノーマ細胞系 Me1 - J u s o では、受容体が細胞表面で発現したが、抑制は示さなかった (図 1 1 B 、 C 及び図 8 A 、 B) 。我々の結果は、抗 H E R 3 抗体の乳癌及びメラノーマ治療用の使用を示唆する。

【 0 0 3 9 】

モノクローナル抗体 2 D 1 d 1 2 は、P Y K 2 のヒレグリン刺激燐酸化を抑制する。

【 0 0 4 0 】

我々は、細胞内チロシンキナーゼ P Y K 2 が関与し、H E R 3 により燐酸化されることを前に実証したが、これは P K Y 2 が H E R 3 のメディエーターとして作用することを示す。これと一致して、ドミナントネガティブ P Y K 2 は、神経膠腫細胞の H R G 媒介浸潤を抑制した。従って、H R G 誘発 P Y K 2 チロシン燐酸化に対する抗 H E R 3 抗体の作用を調べることにした。我々は休止期の S F 7 6 7 ヒト神経膠腫細胞を抗 H E R 2 、 1 B 4 C 3 及び 2 D 1 D 1 2 で前処理し、次いで細胞を - H R G で刺激した。溶解及び等タンパク質量に関して標準化後、P Y K 2 を免疫沈降させ、ホスホチロシンに対してプロットした (P Y) 。抗 H E R 2 及び 1 B 4 C 3 は P Y K 2 のチロシン燐酸化に対して抑制作用を有さなかったが、2 D 1 D 1 2 は P Y K 2 チロシン燐酸化を著しく減弱させた (図 1 2 A) 。従って、抗 H E R 3 抗体は P Y K 2 の H R G 誘発チロシン燐酸化に有効である。

【 0 0 4 1 】

W C L のホスホ - E R K 抗体を用いる免疫プロットをプローブすることによって、細胞を抗 H E R 2 、 1 B 4 C 3 及び 2 D 1 D 1 2 で前処理することによって - H R G 活性化 E R K 2 燐酸化を抑制したことを観察した (図 1 2 B 中央パネル) 。E R K 抗体を用いて再プローブすることによって、荷重タンパク質の等量が確認された (図 1 2 B 下部パネル) 。ここでも我々のデータは、H E R 3 抗体が M D A - M B - 4 3 5 S 、 M e 1 - J u s

10

20

30

40

50

o 及び S F 7 6 7 で、H R G 媒介シグナリング現象をダウンレギュレートすることを示す。更に、我々の分析は、H E R 2 及び H E R 3 のエクドメインに対抗する抗体が分化シグナリングを調節し、下流エフェクタータンパク質の明らかな応答を引き起こすことを示す。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 2 】

【図 1】受容体 - 免疫試験の結果を表す図である。(実施例 1)

【図 2】受容体 - 免疫試験の結果を表す図である。(実施例 2)

【図 3】P 1₃ - K アッセイの図である。(実施例 3)

【図 4】受容体 - 免疫試験の結果を表す図である。(実施例 4)

【図 5】受容体 - 免疫試験の結果を表す図である。

【図 6】受容体 - 免疫試験の結果を表す図である。(実施例 7、8)

【図 7】増殖アッセイの結果を表す図である。(実施例 9)

【図 8】補足データを表す図である。(実施例 10)

【図 9】補足データを表す図である。(実施例 10)

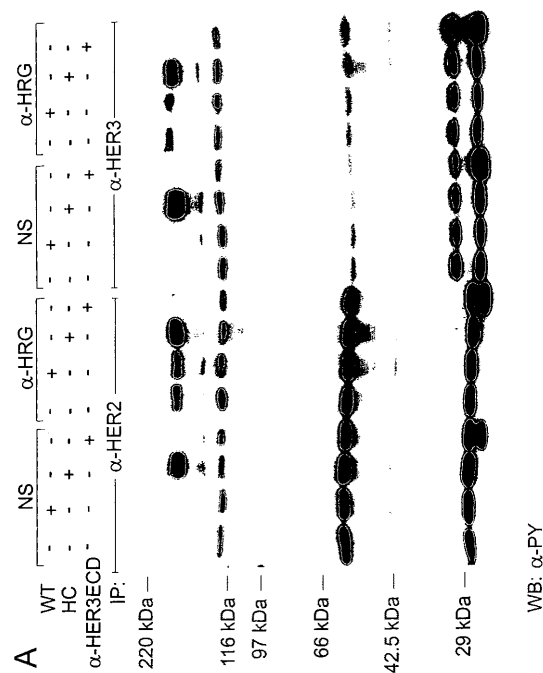
【図 10】補足データを表す図である。(実施例 10)

【図 11】補足データを表す図である。(実施例 10)

【図 12】補足データを表す図である。(実施例 10)

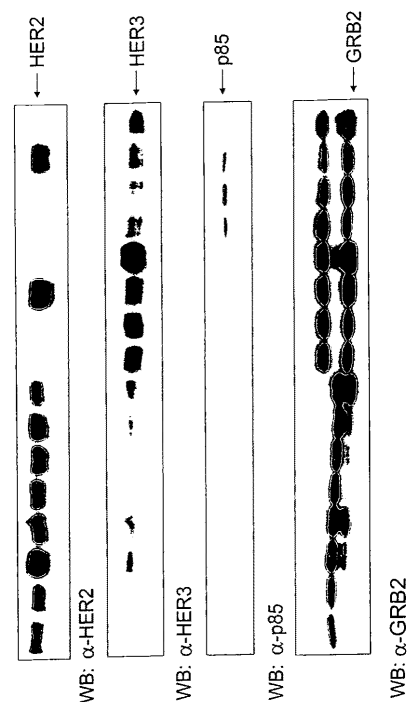
10

【図 1 - 1】



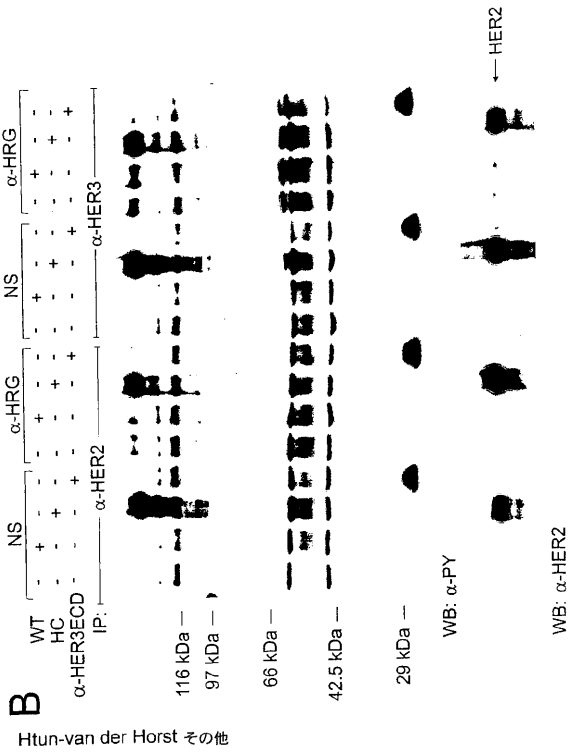
Htun van der Horst その他

【図 1 - 2】

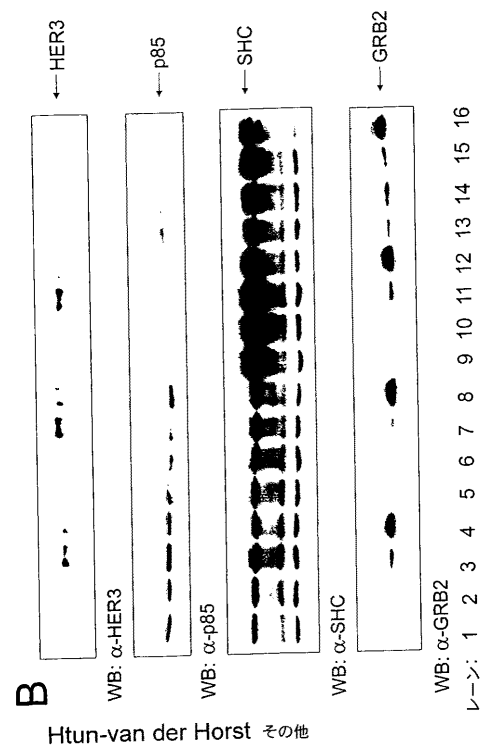


Htun-van der Horst その他

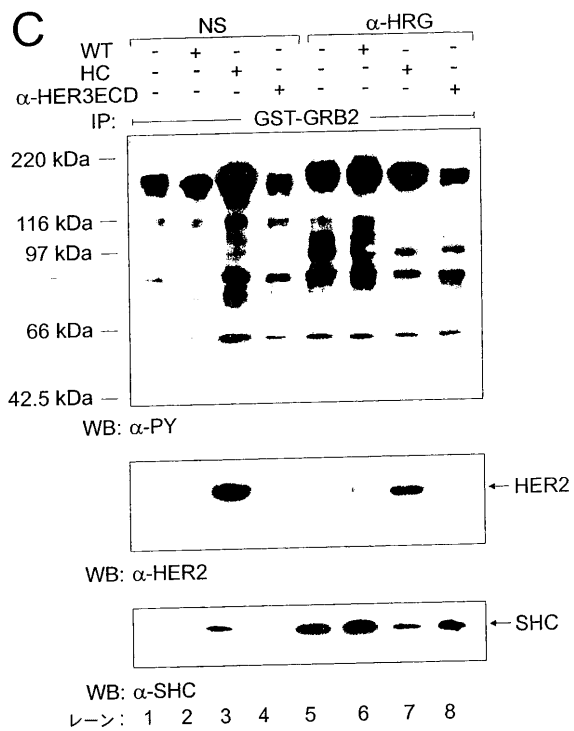
【図 1 - 3】



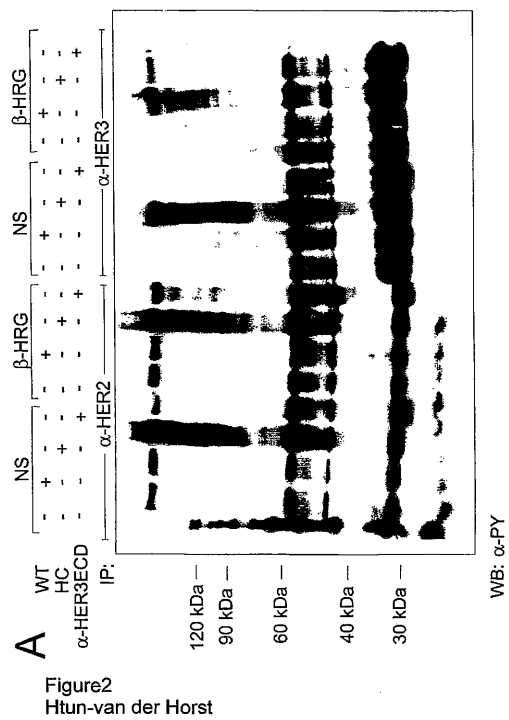
【図 1 - 4】



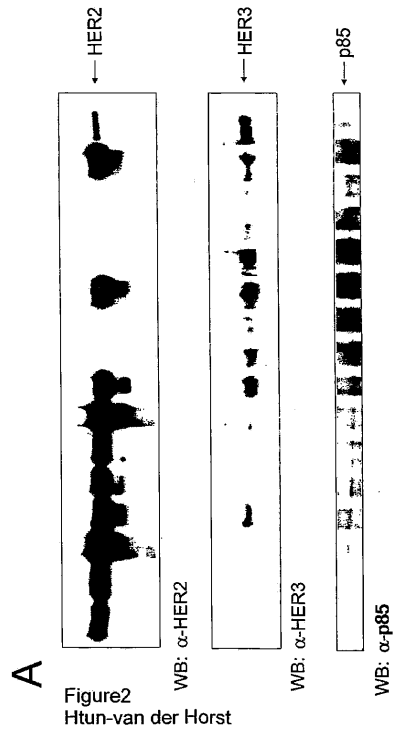
【図 1 - 5】



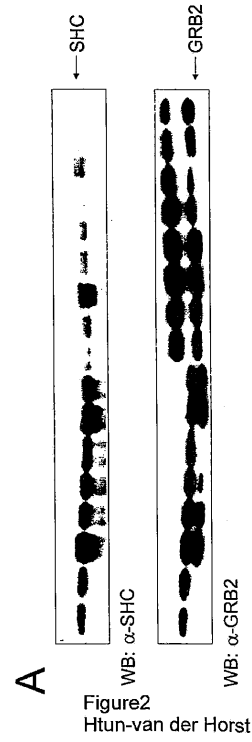
【図 2 - 1】



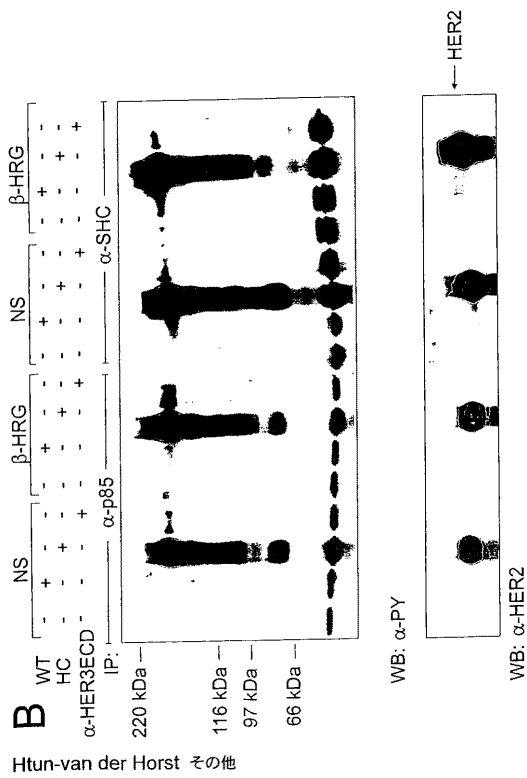
【 図 2 - 2 】



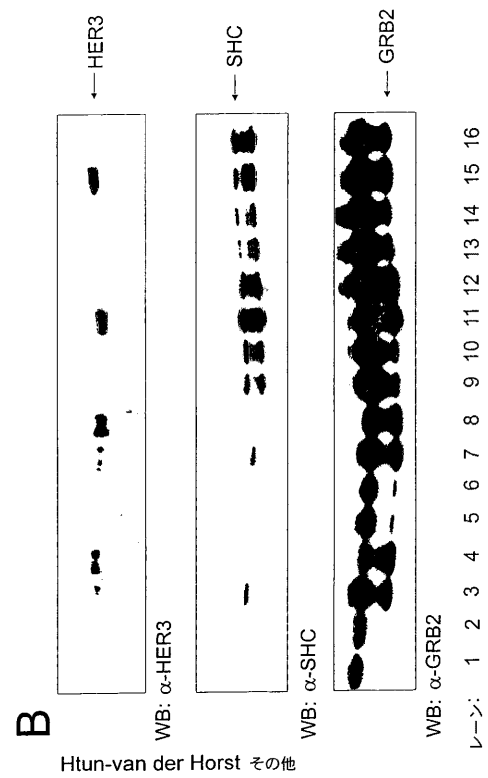
【 図 2 - 3 】



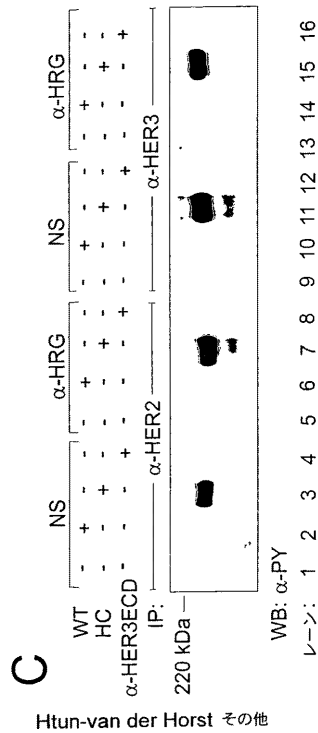
【 図 2 - 4 】



【 図 2 - 5 】

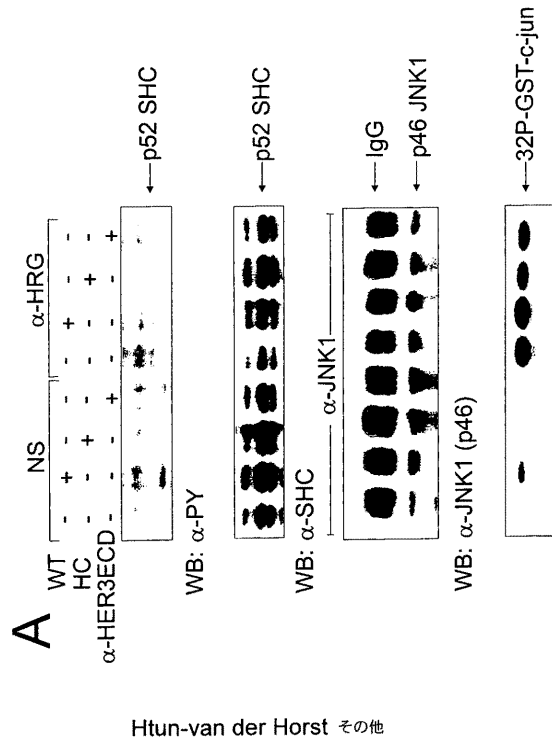


【 図 2 - 6 】



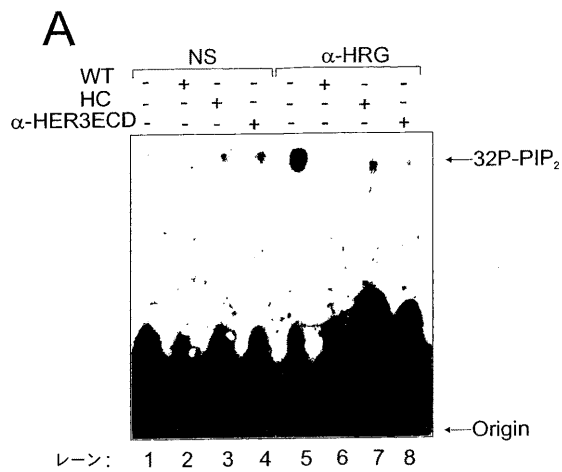
Htun-van der Horst その他

【 図 3 - 1 】



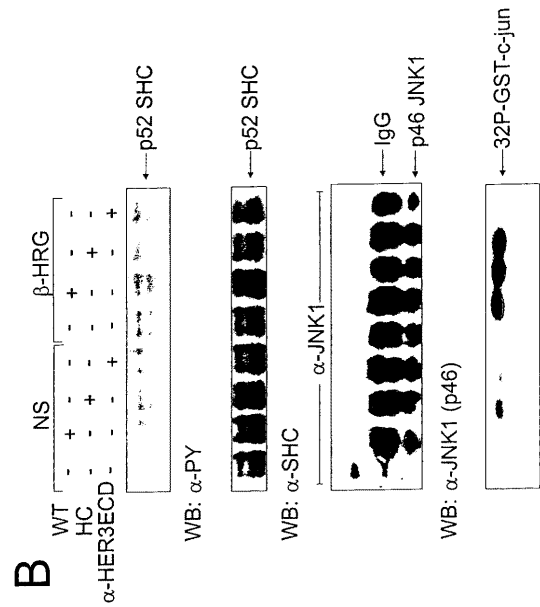
Htun-van der Horst その他

【 図 3 - 2 】



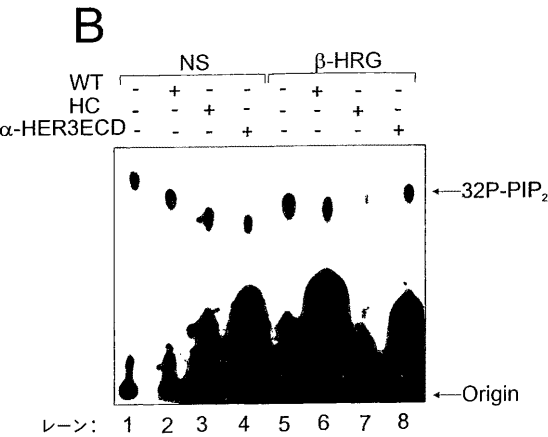
Htun-van der Horst その他

【 図 3 - 3 】



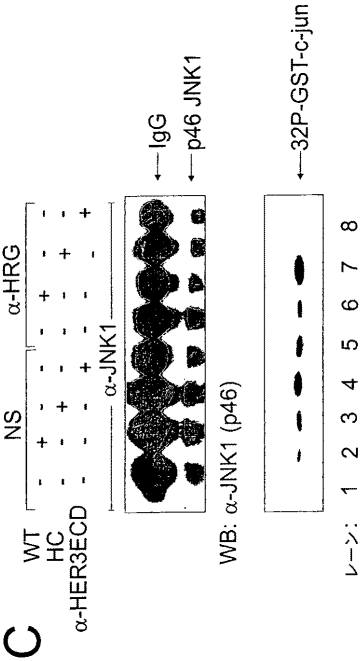
Htun-van der Horst その他

【 図 3 - 4 】



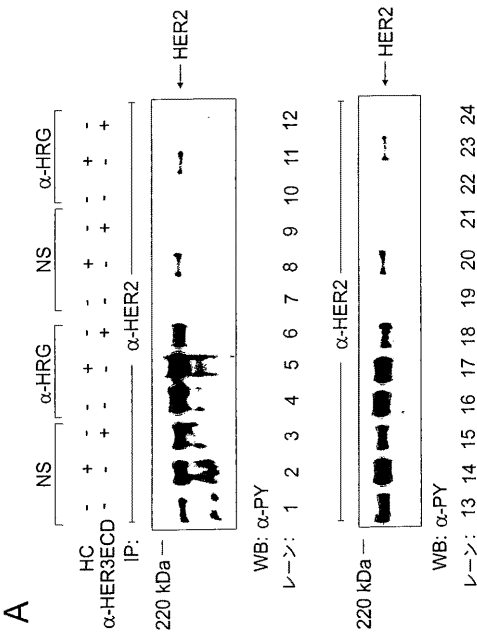
Htun-van der Horst その他

【 図 3 - 5 】



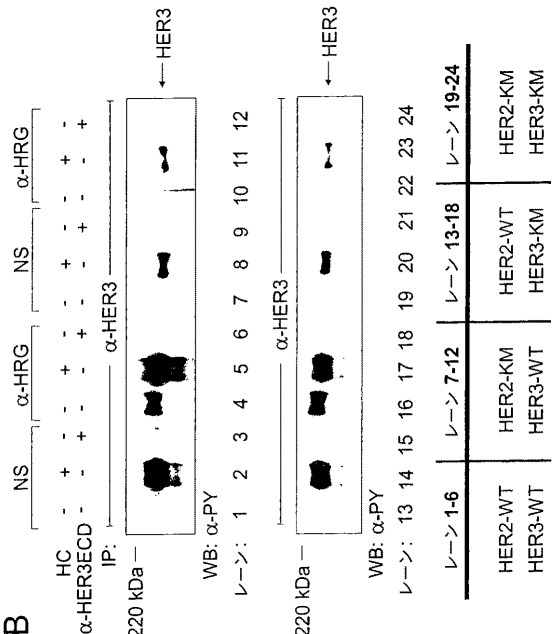
Htun-van der Horst その他

【 図 4 - 1 】



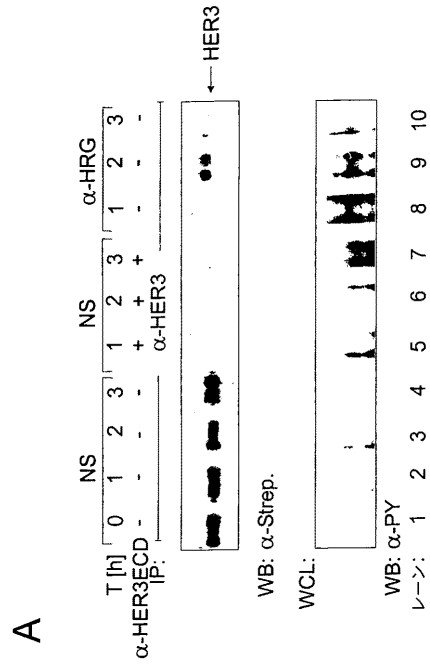
Htun-van der Horst その他

【 図 4 - 2 】



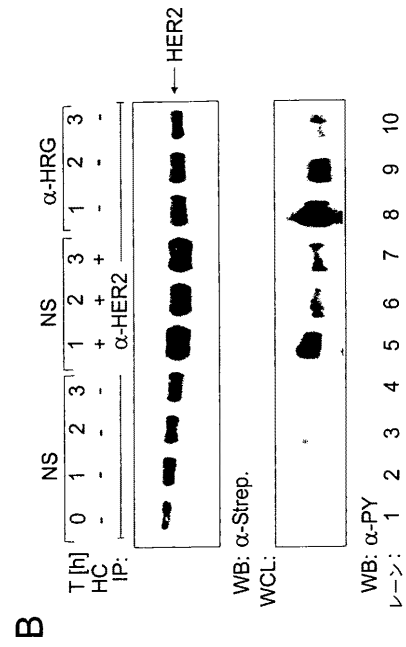
Htun-van der Horst その他

【図 5 - 1】



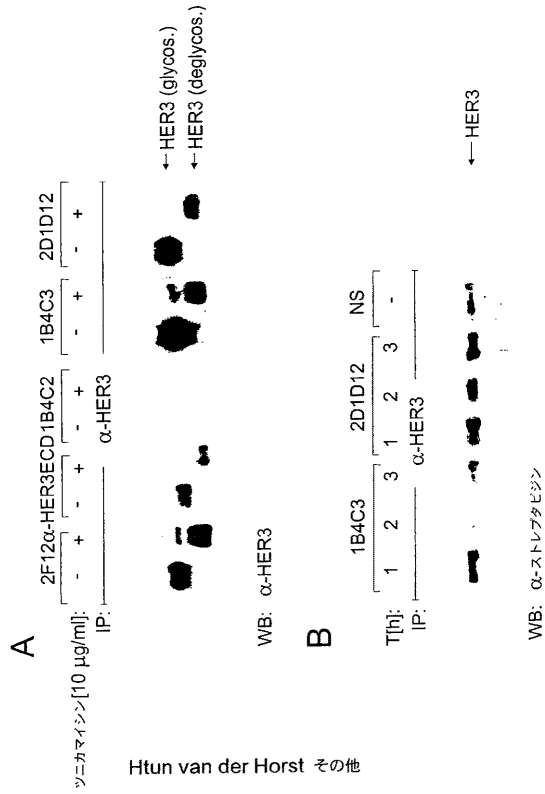
Htun-van der Horst その他

【図 5 - 2】



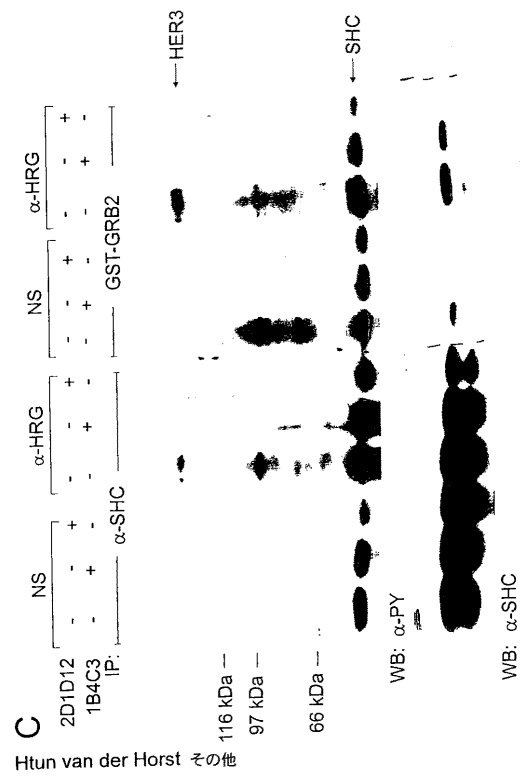
Htun-van der Horst その他

【図 6 - 1】



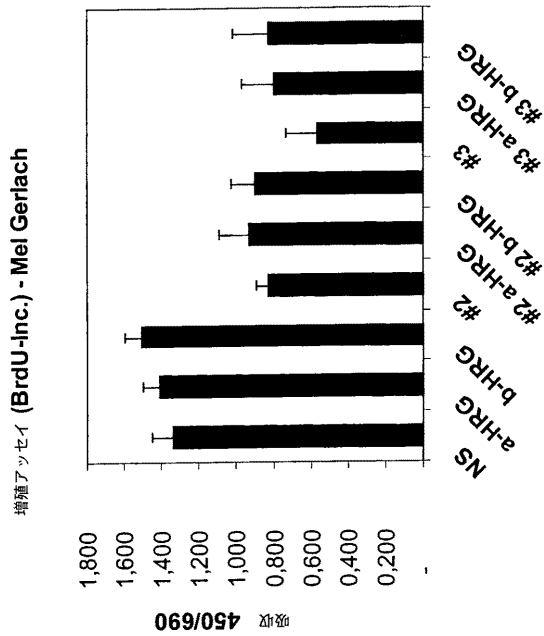
Htun van der Horst その他

【図 6 - 2】



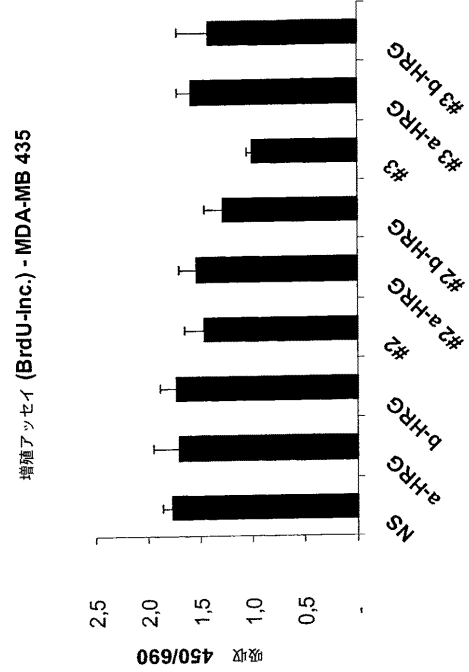
Htun van der Horst その他

【図 7 - 1】



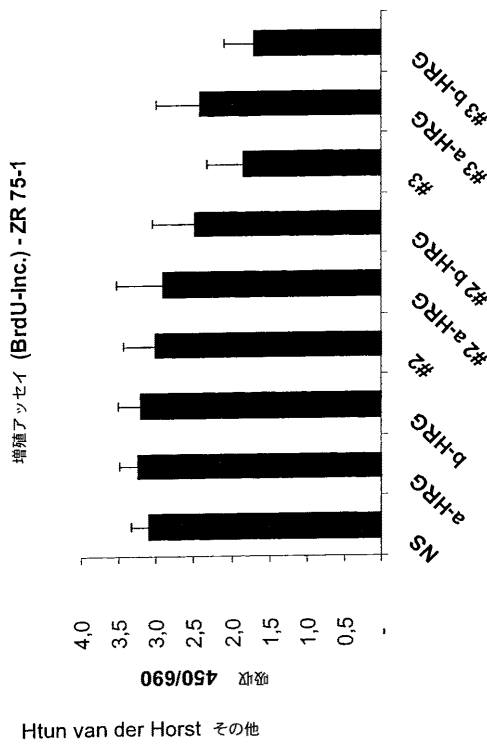
Htun van der Horst その他

【図 7 - 2】



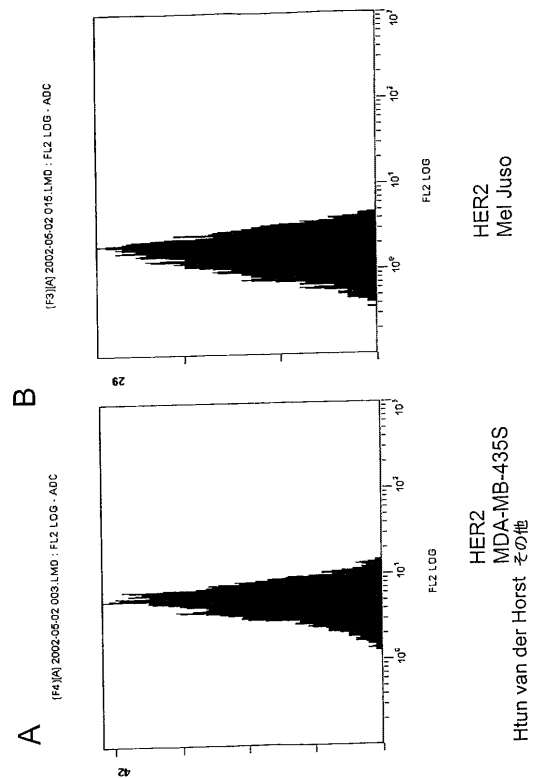
Htun van der Horst その他

【図 7 - 3】

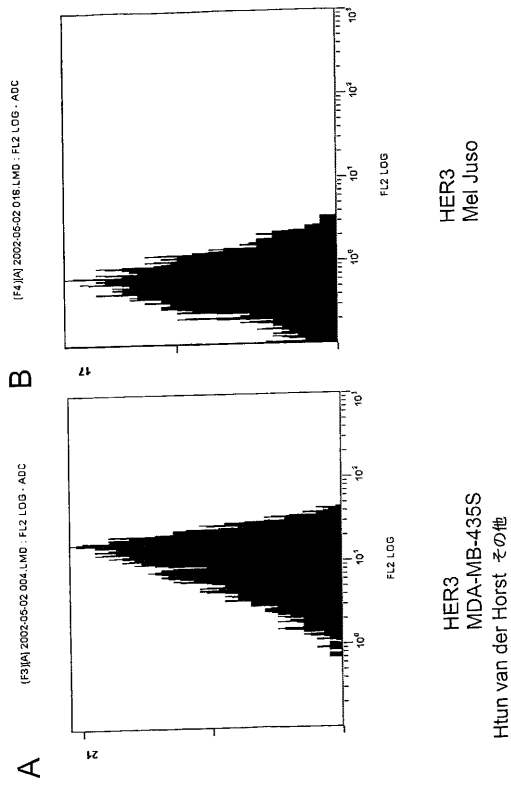


Htun van der Horst その他

【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 8 - 3】

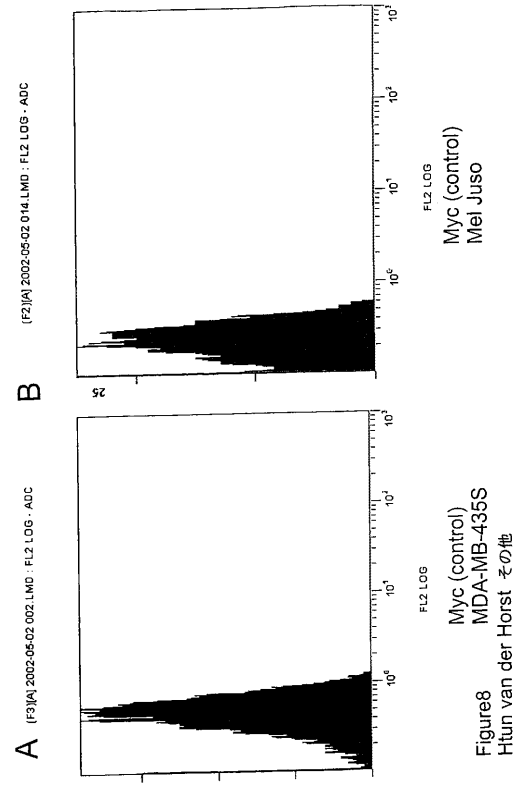
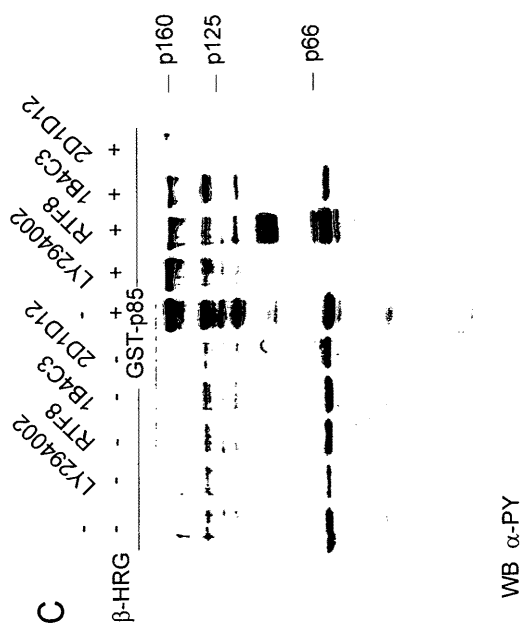


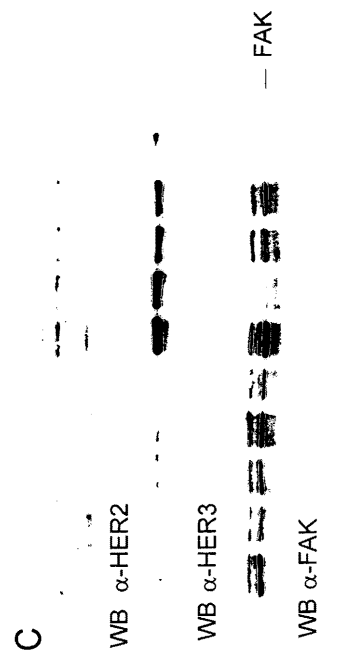
Figure 8

【図 8 - 4】



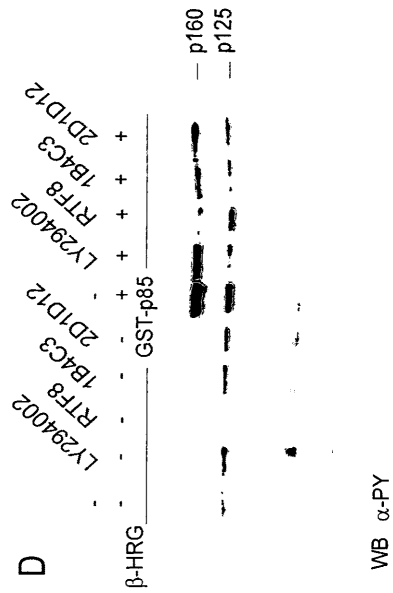
補足データ
Htun van der Horst その他

【図 8 - 5】



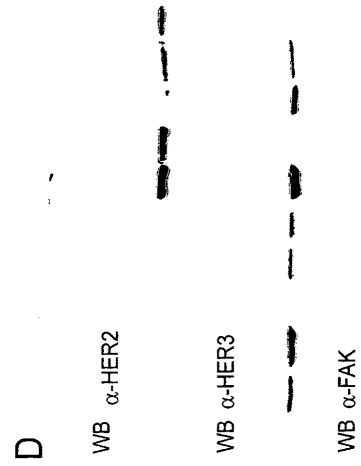
補足データ
Htun van der Horst その他

【図 8 - 6】



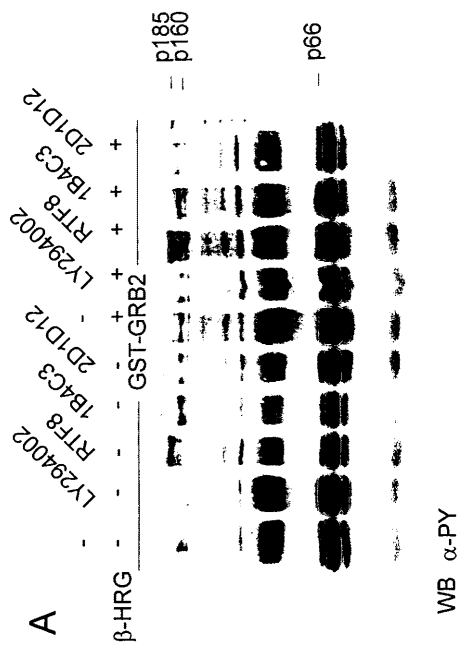
補足データ
Htun van der Horst その他

【図 8 - 7】



補足データ
Htun van der Horst その他

【図 9 - 1】



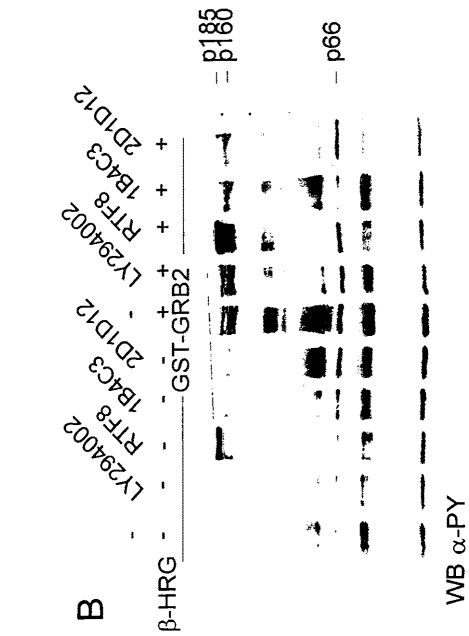
補足データ
Htun van der Horst その他

【図 9 - 2】

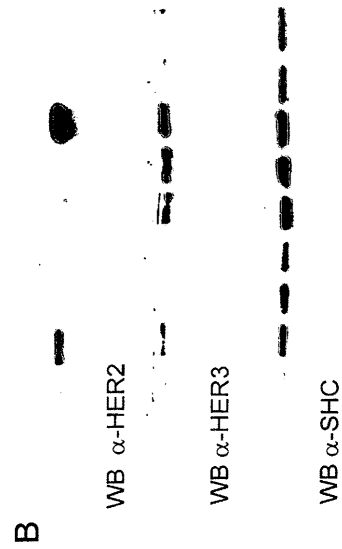


補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 9 - 4 】

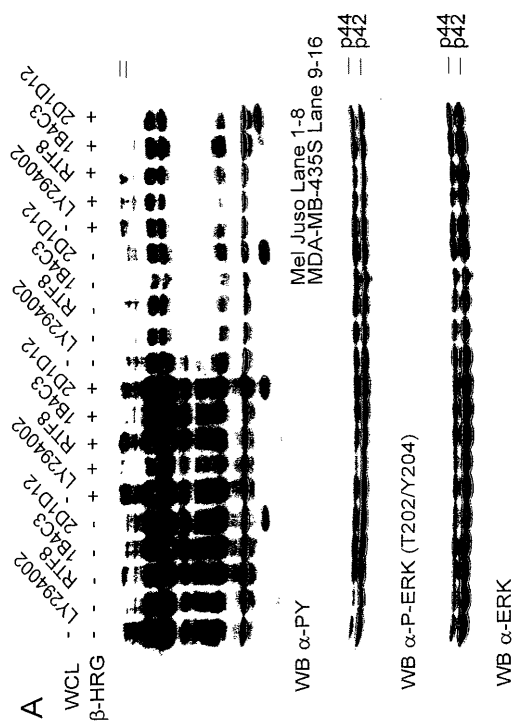


補足データ
Htun van der Horst その他



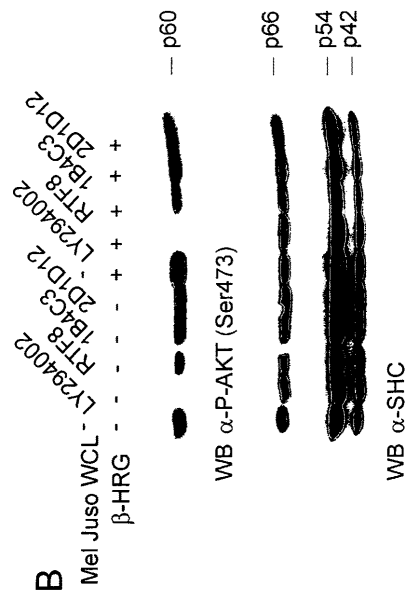
補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 1 0 - 1 】



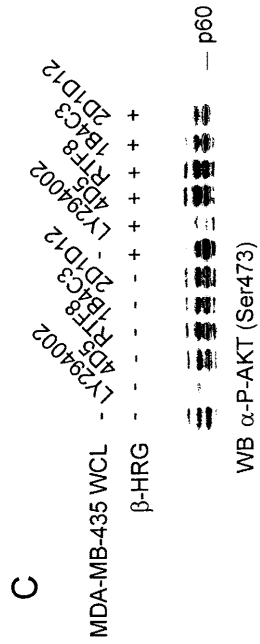
補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 1 0 - 2 】



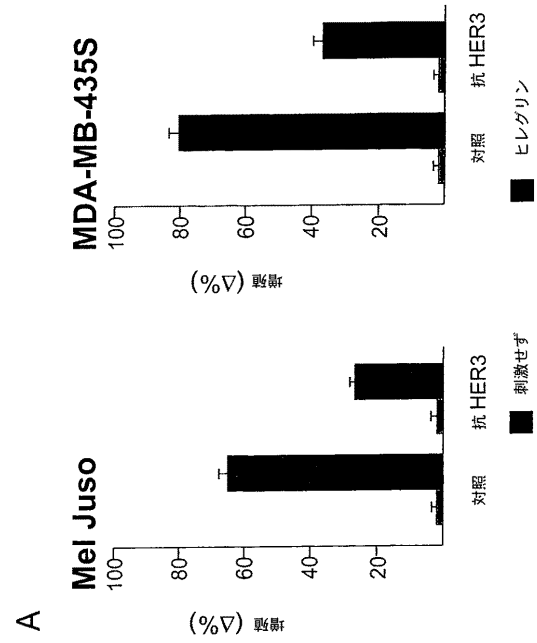
補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 1 0 - 3 】



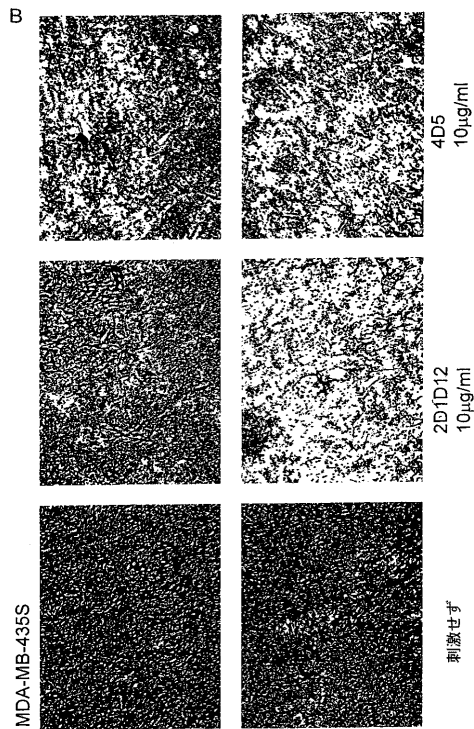
補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 1 1 - 1 】



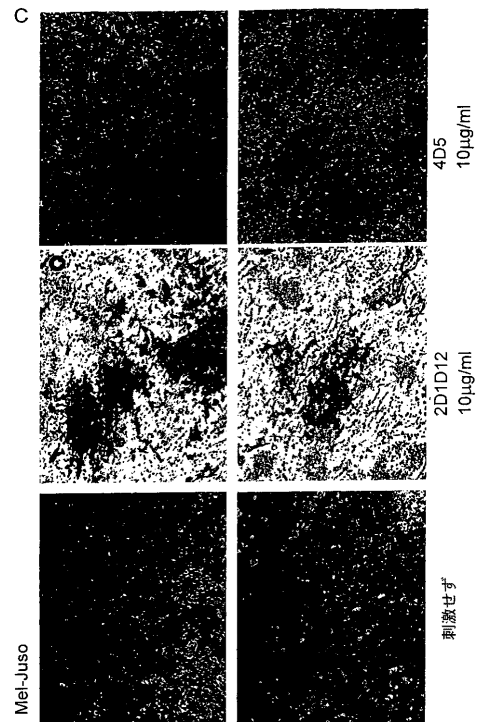
補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 1 1 - 2 】



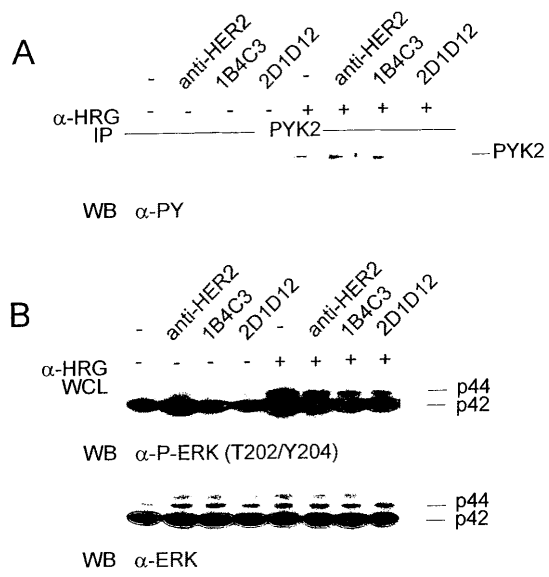
補足データ
Htun van der Horst その他

【 図 1 1 - 3 】



補足データ
Htun van der Horst その他

【図 12】



補足データ

Htun van der Horst その他

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 Z

(74)代理人 100114890
 弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(74)復代理人 100114292
 弁理士 来間 清志

(74)復代理人 100182545
 弁理士 神谷 雪恵

(72)発明者 アクセル ウルリッヒ
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン ブルンシュトラッセ 5

(72)発明者 エドゥワルト トゥン－ファン デア ホルスト
 ドイツ連邦共和国 ミュンヘン ブルーメンシュトラッセ 23

合議体

審判長 内田 淳子
 審判官 前田 佳与子
 審判官 荒木 英則

(56)参考文献 国際公開第00/78347(WO,A1)
 特表2000-508526(JP,A)
 Oncogene, 1999年, Vol. 18, p. 305-314

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K
 CA(STN)
 MEDLINE(STN)