

(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2013-544492

(P2013-544492A)

(43) 公表日 平成25年12月19日(2013.12.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 163 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-527341 (P2013-527341)	(71) 出願人	513032275
(86) (22) 出願日	平成23年9月2日 (2011.9.2)		グラクソスミスクライン、インテレクチュ
(85) 翻訳文提出日	平成25年4月24日 (2013.4.24)		アル、プロパティ、ディベロップメント
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/050322		、リミテッド
(87) 国際公開番号	W02012/031198		GLAXOSMITHKLINE INT
(87) 国際公開日	平成24年3月8日 (2012.3.8)		ELLECTUAL PROPERTY
(31) 優先権主張番号	61/379,840		DEVELOPMENT LIMITED
(32) 優先日	平成22年9月3日 (2010.9.3)		イギリス国ミドルセックス、ブレントフォ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ード、グレート、ウエスト、ロード、98
(31) 優先権主張番号	61/440,460		O
(32) 優先日	平成23年2月8日 (2011.2.8)	(74) 代理人	100117787
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 勝沼 宏仁
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な抗原結合タンパク質

(57) 【要約】

本開示は、HER3に結合する、抗体などの抗原結合タンパク質、このような抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、前記抗原結合タンパク質を含んでなる医薬組成物、および製造方法に関する。本開示はまた、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、胃癌、黒色腫およびHER3を過剰発現するその他の癌に関連する疾患の治療または予防におけるこのような抗原結合タンパク質の使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 2、配列番号 3 および配列番号 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する軽鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項 3】

配列番号 2 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 3 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 4 で示される C D R アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに配列番号 6 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 7 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 8 で示される C D R アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなる、請求項 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

配列番号 21 のアミノ酸残基 184 ~ 329 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する、請求項 3 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 5】

20

配列番号 23、配列番号 24 および配列番号 25 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 27、配列番号 28 および配列番号 29 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する軽鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 6】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 5 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 7】

配列番号 23 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 24 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 25 で示される C D R アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 27 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 28 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 29 で示される C D R アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなる、請求項 6 に記載の抗原結合タンパク質。

30

【請求項 8】

配列番号 21 のアミノ酸残基 184 ~ 329 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する、請求項 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9】

配列番号 45、配列番号 46 および配列番号 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 49、配列番号 50 および配列番号 51 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する軽鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質。

40

【請求項 10】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 9 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 11】

配列番号 45 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 46 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 47 で示される C D R アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 49 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 50 で示される C D R

50

アミノ酸配列、および配列番号 51 で示される CDR アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなる、請求項 10 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 12】

配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する、請求項 11 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 13】

配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 33 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの CDR を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 35、配列番号 36 および配列番号 37 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの CDR を有する軽鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質。

10

【請求項 14】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 13 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 15】

配列番号 31 で示される CDR アミノ酸配列、配列番号 32 で示される CDR アミノ酸配列、および配列番号 33 で示される CDR アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに配列番号 35 で示される CDR アミノ酸配列、配列番号 36 で示される CDR アミノ酸配列、配列番号 37 で示される CDR アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなる、請求項 14 に記載の抗原結合タンパク質。

20

【請求項 16】

配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する、請求項 15 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 17】

配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの CDR を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 12、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 18、配列番号 19 および配列番号 20 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの CDR を有する軽鎖可変領域を含んでなる、抗原結合タンパク質。

30

【請求項 18】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 17 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 19】

配列番号 10 で示される CDR アミノ酸配列、配列番号 11 で示される CDR アミノ酸配列、および配列番号 12 で示される CDR アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに配列番号 12 で示される CDR アミノ酸配列、配列番号 7 で示される CDR アミノ酸配列、および配列番号 8 で示される CDR アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域か、または配列番号 18 で示される CDR アミノ酸配列、配列番号 19 で示される CDR アミノ酸配列、および配列番号 20 で示される CDR アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域かを含んでなる、請求項 18 に記載の抗原結合タンパク質。

40

【請求項 20】

配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含んでなる二量体の形成を阻害する、請求項 19 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 21】

配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 22】

配列番号 22 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

50

【請求項 23】

配列番号 44 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 24】

配列番号 30 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 34 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 25】

配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 13 で示されるアミノ酸配列および配列番号 17 で示されるアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

10

【請求項 26】

配列番号 30 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 57 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 27】

請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 28】

配列番号 38 で示される核酸配列および配列番号 39 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 27 に記載の単離された核酸。

【請求項 29】

配列番号 59 で示される核酸配列および配列番号 60 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 27 に記載の単離された核酸。

20

【請求項 30】

請求項 5 に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 31】

配列番号 40 で示される核酸配列および配列番号 41 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 30 に記載の単離された核酸。

【請求項 32】

請求項 9 に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 33】

配列番号 52 で示される核酸配列および配列番号 53 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 32 に記載の単離された核酸。

30

【請求項 34】

配列番号 61 で示される核酸配列および配列番号 62 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 32 に記載の単離された核酸。

【請求項 35】

請求項 13 に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 36】

配列番号 42 で示される核酸配列および配列番号 43 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 35 に記載の単離された核酸。

【請求項 37】

請求項 26 に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離された核酸。

40

【請求項 38】

配列番号 42 で示される核酸配列および配列番号 58 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 37 に記載の単離された核酸。

【請求項 39】

請求項 17 に記載の抗原結合タンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項 40】

配列番号 54 で示される核酸配列、配列番号 55 で示される核酸配列、および配列番号 56 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 39 に記載の単離された核酸。

50

【請求項 4 1】

配列番号 6 3 で示される核酸配列、配列番号 6 4 で示される核酸配列、および配列番号 6 5 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる、請求項 3 9 に記載の単離された核酸。

【請求項 4 2】

請求項 2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0 および 4 1 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる、発現ベクター。

【請求項 4 3】

請求項 2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0 および 4 1 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる、組換え宿主細胞。

10

【請求項 4 4】

請求項 2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0 および 4 1 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程、および抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなる、抗原結合タンパク質の生産方法。

【請求項 4 5】

請求項 1、5、9、1 3、1 7、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5 および 2 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質と薬学上許容される担体とを含んでなる、医薬組成物。

20

【請求項 4 6】

被験体において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項 1、5、9、1 3、1 7、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5 および 2 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、前記被験体の癌が治療される工程を含んでなる、方法。

【請求項 4 7】

被験体において癌を治療する方法であって、

a) 乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される癌を有する被験体を特定する工程；および

b) 治療上有効な量の請求項 2 2 に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の癌が治療される工程を含んでなる、方法。

30

【請求項 4 8】

c) 前記癌が配列番号 2 1 のアミノ酸残基 1 8 4 ~ 3 2 9 を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記タンパク質が配列番号 2 1 で示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 4 8 に記載の方法。

40

【請求項 5 0】

被験体において癌を治療する方法であって、

a) 乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される癌を有する被験体を特定する工程；および

b) 治療上有効な量の請求項 2 4 に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の癌が治療される工程を含んでなる、方法。

【請求項 5 1】

c) 癌が配列番号 2 1 のアミノ酸残基 3 3 0 ~ 4 9 5 を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる、請求項 5 0 に記載の方法。

50

【請求項 5 2】

前記タンパク質が配列番号 2 1 で示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される病態の治療のための薬剤の製造における、請求項 1、5、9、13、17、21、22、23、24、25 および 26 のいずれか一項に記載の物質の使用。

【請求項 5 4】

配列番号 2 1 のアミノ酸残基 1 8 4 ~ 3 2 9 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する、抗原結合タンパク質。

10

【請求項 5 5】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 5 6】

配列番号 2 1 のアミノ酸残基 3 3 0 ~ 4 9 5 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する、抗原結合タンパク質。

【請求項 5 7】

前記抗原結合タンパク質がキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 5 6 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 5 8】

a) 請求項 2 9、3 5 および 3 8 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、- 1、6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が不活性化されている）；および

20

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

【請求項 5 9】

前記組換え宿主細胞が C H O K 1 S V 細胞である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

請求項 5 8 に記載の方法により生産された抗原結合タンパク質。

30

【請求項 6 1】

a) 請求項 2 9、3 5 および 3 8 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該発現ベクターは、I g G 1 F c ドメインアミノ酸残基と I g G 3 F c ドメインアミノ酸残基の双方を有するキメラ F c ドメインをコードする F c 核酸配列を含んでなる）；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

【請求項 6 2】

前記 F c 核酸配列が、配列番号 4 0 で示される核酸配列および配列番号 4 2 で示される核酸配列からなる群から選択される核酸にインフレームで融合されている、請求項 6 1 に記載の方法。

40

【請求項 6 3】

請求項 6 2 に記載の方法によって生産された抗原結合タンパク質。

【請求項 6 4】

a) 請求項 2 9、3 5 および 3 8 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含有する発現ベクターを含有する組換え宿主細胞を培養する工程（該発現ベクターは I g G 1 F c ドメインアミノ酸残基と I g G 3 F c ドメインアミノ酸残基の双方を有するキメラ F c ドメインをコードする F c 核酸配列をさらに含んでなり、かつ、該組換え宿主細胞では、

50

- 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が不活性化されている) ; および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程
を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

【請求項 6 5】

前記 F c 核酸配列が、配列番号 4 0 で示される核酸配列および配列番号 4 2 で示される核酸配列からなる群から選択される核酸にインフレームで融合されている、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記組換え宿主細胞が C H O K 1 S V 細胞である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

請求項 6 4 に記載の方法によって生産された抗原結合タンパク質。

【請求項 6 8】

被験体において前癌状態を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項 1、5、9、13、17、21、22、23、24、25 および 26 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の前癌状態が治療される工程を含んでなる、方法。

【請求項 6 9】

被験体において前癌状態を治療する方法であって、

a) 前癌状態を有する被験体を特定する工程 ; および
b) 治療上有効な量の請求項 2 2 に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の前癌状態が治療される工程
を含んでなる、方法。

【請求項 7 0】

c) 前記癌が配列番号 2 1 のアミノ酸残基 1 8 4 ~ 3 2 9 を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程
をさらに含んでなる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記タンパク質が配列番号 2 1 で示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

被験体において前癌状態を治療する方法であって、

a) 前癌状態を有する被験体を特定する工程 ; および
b) 治療上有効な量の請求項 2 4 に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の癌が治療される工程
を含んでなる、方法。

【請求項 7 3】

c) 前記癌が配列番号 2 1 のアミノ酸残基 3 3 0 ~ 4 9 5 を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程
をさらに含んでなる、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記タンパク質が配列番号 2 1 で示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

H E R 3 受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する C D R H 3 を含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 7 6】

H E R 3 受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する C D R H 1、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する C D R H 2、配列番号 4 で示さ

10

20

30

40

50

れるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項77】

HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号23で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号25で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号27で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号28で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号29で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる、抗原結合タンパク質。

10

【請求項78】

HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号31で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号33で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号35で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号36で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号37で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項79】

HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号45で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号46で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号47で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号49で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号50で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号51で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる、抗原結合タンパク質。

20

【請求項80】

HER3受容体に特異的に結合し、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号14で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号15で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号16で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる、抗原結合タンパク質。

30

【請求項81】

HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号18で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号19で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号20で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項82】

医療に用いるための、請求項45に記載の医薬組成物。

【請求項83】

乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫の治療に用いるための、請求項45に記載の医薬組成物。

40

【請求項84】

哺乳類において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項1、5、9、13、17、21、22、23、24、25および26のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を投与することを含んでなる、方法。

【請求項85】

前記哺乳類がヒトである、請求項84に記載の方法。

【請求項86】

前記癌が乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫から選

50

択される、請求項 8 4 または 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

配列番号 1 0 0 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 を有する重鎖配列と、配列番号 1 0 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 2 3 8 を有する軽鎖配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質。

【請求項 8 8】

フコシル化グリカンを含んでなる、請求項 8 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 8 9】

前記フコシル化グリカンが G 0、G 2、G 0 F、G 2 F、G 1、M a n 5、G 1 F および G 1 F ' からなる群から選択される、請求項 8 8 に記載の抗原結合タンパク質。

10

【請求項 9 0】

非フコシル化グリカンを含んでなる、請求項 8 7 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9 1】

前記非フコシル化グリカンが G 0、G 2、G 1 および M a n 5 からなる群から選択される、請求項 9 0 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9 2】

配列番号 1 0 2 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 を有する重鎖配列と、配列番号 1 0 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 2 3 8 を有する軽鎖配列とを含んでなる、抗原結合タンパク質

【請求項 9 3】

20

フコシル化グリカンを含んでなる、請求項 9 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9 4】

前記フコシル化グリカンが G 0、G 2、G 0 F、G 2 F、G 1、M a n 5、G 1 F および G 1 F ' からなる群から選択される、請求項 9 3 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9 5】

非フコシル化グリカンを含んでなる、請求項 9 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9 6】

前記非フコシル化グリカンが G 0、G 2、G 1 および M a n 5 からなる群から選択される、請求項 9 5 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 9 7】

30

配列番号 1 0 0 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 をコードする、単離された核酸。

【請求項 9 8】

配列番号 1 0 1 で示される核酸配列を含んでなる、請求項 9 7 に記載の単離された核酸。

【請求項 9 9】

配列番号 1 0 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 2 3 8 をコードする、単離された核酸。

【請求項 1 0 0】

配列番号 1 0 5 で示される核酸配列を含んでなる、請求項 9 9 に記載の単離された核酸。

40

【請求項 1 0 1】

配列番号 1 0 2 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 をコードする、単離された核酸。

【請求項 1 0 2】

配列番号 1 0 3 で示される核酸配列を含んでなる、請求項 1 0 1 に記載の単離された核酸。

【請求項 1 0 3】

請求項 9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0 1 および 1 0 2 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる、発現ベクター。

50

【請求項 104】

請求項 97、98、99、100、101 および 102 のいずれか一項に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる、組換え宿主細胞

【請求項 105】

前記 - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT8 遺伝子が存在する、請求項 104 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 106】

CHO K1 細胞である、請求項 105 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 107】

前記 - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT8 遺伝子が不活性化されている、請求項 104 に記載の組換え宿主細胞。

10

【請求項 108】

CHO K1SV 細胞である、請求項 107 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 109】

請求項 87、88、89、90、91、92、93、94、95 および 96 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質と薬学上許容される担体とを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 110】

被験体において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項 87、88、89、90、91、92、93、94、95 および 96 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の癌が治療される工程を含んでなる、方法。

20

【請求項 111】

被験体において癌を治療する方法であって、

a) 乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される癌を有する被験体を特定する工程；および

b) 治療上有効な量の請求項 87、88、89、90、91、92、93、94、95 および 96 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を被験体に投与し、それにより、被験体の癌が治療される工程を含んでなる、方法。

【請求項 112】

c) 前記癌が配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる、請求項 111 に記載の方法。

30

【請求項 113】

前記タンパク質が配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される病態の治療のための薬剤の製造における、請求項 87、88、89、90、91、92、93、94、95 および 96 のいずれか一項に記載の物質の使用。

40

【請求項 115】

a) 請求項 97 または請求項 98 に記載の単離された核酸を含んでなり、かつ、請求項 97 または請求項 100 に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、- 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT8 遺伝子が活性である）；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

【請求項 116】

前記組換え宿主細胞が CHO K1 細胞である、請求項 115 に記載の方法。

50

【請求項 1 1 7】

請求項 1 1 5 に記載の方法によって生産された抗原結合タンパク質。

【請求項 1 1 8】

a) 請求項 9 7 または請求項 9 8 に記載の単離された核酸を含んでなり、かつ、請求項 9 7 または請求項 1 0 0 に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、 α - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT 8 遺伝子が不活性化されている）；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程
を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

10

【請求項 1 1 9】

前記組換え宿主細胞が CHO K 1 SV 細胞である、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

請求項 1 1 8 に記載の方法によって生産された抗原結合タンパク質。

【請求項 1 2 1】

a) 請求項 9 9 または請求項 1 0 0 に記載の単離された核酸を含んでなり、かつ、請求項 1 0 1 および請求項 1 0 2 に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、 α - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT 8 遺伝子が活性である）；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程
を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

20

【請求項 1 2 2】

前記組換え宿主細胞が CHO K 1 細胞である、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

請求項 1 2 1 に記載の方法によって生産された抗原結合タンパク質。

【請求項 1 2 4】

a) 請求項 9 9 または請求項 1 0 0 に記載の単離された核酸を含んでなり、かつ、請求項 1 0 1 および請求項 1 0 2 に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、 α - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT 8 遺伝子が不活性化されている）；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程
を含んでなり、それにより、抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法。

30

【請求項 1 2 5】

前記組換え宿主細胞が CHO K 1 SV 細胞である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

請求項 1 2 4 に記載の方法によって生産された抗原結合タンパク質。

【請求項 1 2 7】

被験体において前癌状態を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項 8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5 および 9 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の前癌状態が治療される工程を含んでなる、方法。

40

【請求項 1 2 8】

被験体において前癌状態を治療する方法であって、

a) 前癌状態を有する被験体を特定する工程；および

b) 治療上有効な量の請求項 8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5 および 9 6 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の前癌状態が治療される工程
を含んでなる、方法。

50

【請求項 129】

c) 流体を前記被験体に投与する工程
をさらに含んでなる、請求項 128 に記載の方法。

【請求項 130】

c) 前記癌が配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程
をさらに含んでなる、請求項 128 に記載の方法。

【請求項 131】

前記タンパク質が配列番号 21 で示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 130 に記載の方法。

10

【請求項 132】

医療に用いるための、請求項 109 に記載の医薬組成物。

【請求項 133】

乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫の治療に用いるための、請求項 109 に記載の医薬組成物。

【請求項 134】

哺乳類において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の請求項 87、88、89、90、91、92、93、94、95 および 96 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質を投与することを含んでなる、方法。

【請求項 135】

前記哺乳類がヒトである、請求項 134 に記載の方法。

20

【請求項 136】

前記癌が乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫から選択される、請求項 134 または 135 に記載の方法。

【請求項 137】

乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される病態の治療において用いるための、請求項 1 ~ 136 のいずれか一項に記載の抗原結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本出願は、2010年9月3日に出願された米国仮特許出願第 61 / 379, 840 号の利益および 2011年2月8日に出願された米国仮特許出願第 61 / 440, 460 号の利益を主張するものである。上記出願の全教示は引用することにより本明細書の一部とされる。

【0002】

(開示の分野)

本開示は、HER3 受容体に結合する、抗体などの抗原結合タンパク質、このような抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチド、前記抗原結合タンパク質を含んでなる医薬組成物、および製造方法に関する。本開示はまた、種々の癌に関連する疾患の治療または予防におけるこのような抗原結合タンパク質の使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

HER3 (ErbB3 と呼ばれる) (配列番号 21) は、受容体の ErbB / HER タンパク質ファミリーまたは上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) ファミリーを含んでなる、構造的に関連のある 4 つの受容体チロシンキナーゼのうちの 1 つである。これらの受容体は、およそ 620 のアミノ酸を含む細胞外領域と、一回膜貫通領域と、細胞質チロシンキナーゼドメインから構成される。各ファミリーメンバーの細胞外領域は、L1、S1 (CR1)、L2 および S2 (CR2) という 4 つのサブドメインから構成される (ここで、「L」はロイシンリッチリピートドメインを表し、「CR」はシステインリッチ領域

50

を表す)。これらの受容体の活性化は一般に、リガンドにより誘発される受容体の二量体化を必要とする。HER3はこのファミリーの中で、リガンド(ニューレグリン-1、NRG; ヘレグリン、HRG; 表1参照)結合ドメインを有するが、キナーゼドメインにおけるある特定のアミノ酸変異の存在のために固有のチロシンキナーゼ活性を持たないという点で独特である。従って、HER3はリガンドと結合できるが、ホモ二量体としては、タンパク質のリン酸化を介して細胞にシグナルを伝達することがない。しかしながら、HER3は、キナーゼ活性を有する他のEGF受容体ファミリーメンバーとヘテロ二量体(例えば、HER1/HER3; HER2/HER3; HER3/HER4)を形成して有効なシグナル伝達能部分を形成する。特に注目されるのはHER2とのペアリングであり、これはHER2/HER3の組合せが、PI3K/pAKT経路をはじめとする種々の細胞内経路を介して最高の増殖能を有すると思われるからである。HER3がHER2と二量体を形成すると、生じたシグナル伝達複合体は、HER2成分に対する抗体(ペルツズマブなど)によって破壊され得る。さらに、HER2と同時発現すると、HRGに対するHER3の親和性が高まり得る。最近、HER3と他の細胞表面受容(c-METなどの、HERファミリー外のものを含む)の相互作用が、ある種の抗癌薬に対する耐性に関する重要な逃避機構として浮上した。HER3の異なるアイソフォームをコードする選択的転写スプライス変異体が、完全にではないが特徴付けがなされている。1つのアイソフォームは膜間領域を欠き、細胞外へ分泌される。この形態は膜結合型の活性を隔離リガンドにより調節する働きをすると考えられる。HER3の、他の受容体とのヘテロ二量体化は、細胞の増殖および生存に重要な経路の活性化をもたらす。従って、これらの経路の制御された発現および活性化は、生物の正常な成長に必要であり、これが損なわれると疾病に至り得る。

10

20

【0004】

HERタンパク質ファミリーのこの4つのメンバーは、潜在的増殖因子リガンドのサブセットによって活性化されると、ホモ二量体、ヘテロ二量体およびより高次のオリゴマーを形成することができる。下記の表1にHERファミリー受容体の既知のリガンドを列挙する。

【0005】

【表 1】

表 1

<u>ErbB (HER) 受容体</u>	<u>リガンド</u>
EGFR	上皮細胞増殖因子 (EGF) トランスフォーミング増殖因子 α (TGF α) アンフィレグリン (AR) エピジェン
EGFR & HER4	ベータセルリン (BTC) ヘパリン結合増殖因子 (HB-EGF) エプレグリン (EPR)
HER2	無し
HER3 & HER4	ニューレグリン 1/ヘレグリン (NRG-1; HRG) ニューレグリン 2 (NRG-2)
HER4	ニューレグリン 3 (NRG-3) ニューレグリン 4 (NRG-4) トモレグリン

10

20

【 0 0 0 6 】

マウスでは、E r b Bファミリーのいずれのメンバーによるシグナル伝達が欠損しても、肺、皮膚、心臓および脳を含む臓器の欠陥による胚致死に至る。

【 0 0 0 7 】

他方、過剰なE r b B / H E Rシグナル伝達は、多様な固形腫瘍種の発達に関連づけられている。E r b B - 1 (E G F R / H E R 1) およびE r b B - 2 (H E R 2) は多くのヒト癌に見られ、それらの過剰なシグナル伝達はこれらの腫瘍の発達および悪性度における重要な因子である可能性がある。例えば、E G F Rは、肺癌および結腸癌を含む多くの癌で過剰発現される。このような状況でこの受容体の活性を阻害するには、セツキシマブ、ゲフィチニブ、エルロチニブなどの薬物が用いられる。現在とりわけハーセプチン、タモキシフェンおよびラパチニブで治療されている乳癌では、H E R 2 遺伝子が増幅され、そのタンパク質が過剰発現される。これらの治療に対する感受性からの逃避が癌においてますます増えてきている問題であり、なぜより新規で有効な治療が必要とされるのかという理由である。H E R 3 遺伝子の増幅および / またはそのタンパク質の過剰発現は多くの癌で報告されている。最近、例えばゲフィチニブに対して獲得された耐性はH E R 3 の活性亢進に関連づけることができるということが示された。これは獲得されたc - M E Tの過剰発現に関連づけられ、c - M E TはH E R 3をリン酸化し、これが次に重要な細胞増殖 / 生存経路であるP I 3 K / A k t経路を活性化する。

30

40

【 0 0 0 8 】

H E R 3 受容体 (配列番号 2 1) は独特な特性を持ち、H E R 受容体ファミリーにより媒介される細胞シグナル伝達経路の重要な分岐点を占める。H E R 3 受容体はまた、一般的な癌治療薬に対する耐性機構における関連づけがますます進んでいる。H E R 3 受容体は機能的に活性なキナーゼドメインを欠いているため、従来の小分子では「創薬標的」とはなり得ない。しかしながら、種々の重要な増殖、生存および分化経路におけるその活性

50

を他の細胞表面受容体との相互作用に頼る細胞表面受容体としてであれば、HER3受容体は生物薬学的アプローチに魅力的な標的である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

よって、HER3受容体を標的とする治療用抗体、およびこのような抗体で癌を治療する方法の必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(開示の概要)

本開示の一態様は、配列番号2、配列番号3および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；および/または配列番号6、配列番号7および配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0011】

本開示の別の態様は、配列番号23、配列番号24および配列番号25からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；および/または配列番号27、配列番号28および配列番号29からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0012】

本開示の別の態様は、配列番号45、配列番号46および配列番号47からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；および/または配列番号49、配列番号50および配列番号51からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0013】

本開示の別の態様は、配列番号31、配列番号32および配列番号33からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；および/または配列番号35、配列番号36および配列番号37からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0014】

本開示の別の態様は、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；および/または配列番号12、配列番号7、配列番号8、配列番号18、配列番号19および配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0015】

本開示の別の態様は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0016】

本開示の別の態様は、配列番号22で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列

10

20

30

40

50

と、配列番号 26 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0017】

本開示の別の態様は、配列番号 44 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 48 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0018】

本開示の別の態様は、配列番号 30 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 34 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

10

【0019】

本開示の別の態様は、配列番号 9 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 13 で示されるアミノ酸配列および配列番号 17 で示されるアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0020】

本開示の別の態様は、配列番号 30 で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号 57 で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0021】

本開示の別の態様は、配列番号 21 のアミノ酸残基 184 ~ 329 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

20

【0022】

本開示の別の態様は、配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する HER3 受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0023】

本開示の別の態様は、HER3 受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH1、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH2、配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH3、配列番号 6 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L1、配列番号 7 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L2、および配列番号 8 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L3 を含んでなる抗原結合タンパク質である。

30

【0024】

本開示の別の態様は、HER3 受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号 23 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH1、配列番号 24 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH2、配列番号 25 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH3、配列番号 27 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L1、配列番号 28 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L2、および配列番号 29 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L3 を含んでなる抗原結合タンパク質である。

40

【0025】

本開示の別の態様は、HER3 受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号 31 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH1、配列番号 32 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH2、配列番号 33 で示されるアミノ酸配列を有する CDRH3、配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L1、配列番号 36 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L2、および配列番号 37 で示されるアミノ酸配列を有する CDR L3 を含んでなる抗原結合タンパク質である。

【0026】

本開示の別の態様は、HER3 受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号 45 で示され

50

るアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号46で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号47で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号49で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号50で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号51で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

【0027】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号14で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号15で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号16で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

10

【0028】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号18で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号19で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号20で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

20

【0029】

本開示はまた、単離された核酸、発現ベクター、組換え宿主細胞、抗原結合タンパク質の生産方法、医薬組成物、癌を治療する方法、使用、および抗原結合タンパク質（その総てが本開示のこれらの態様に関連する）の生産方法も提供する。

【0030】

本開示の別の態様は、配列番号100で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～466を有する重鎖配列と、配列番号104で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～238を有する軽鎖配列とを含んでなる抗原結合タンパク質である。

【0031】

本開示の別の態様は、配列番号102で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～466を有する重鎖配列と、配列番号104で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～238を有する軽鎖配列とを含んでなる抗原結合タンパク質である。

30

【0032】

本開示の別の態様は、配列番号100で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～466をコードする単離された核酸である。

【0033】

本開示の別の態様は、配列番号104で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～238をコードする単離された核酸である。

【0034】

本開示の別の態様は、配列番号102で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基20～466をコードする単離された核酸である。

40

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】B×PC3膀胱癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒトHER3受容体リン酸化の、抗HER3抗体による阻害。

【図2】CHL-1黒色腫細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒトHER3受容体リン酸化の、抗HER3抗体による阻害。

【図3】N87胃癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒトHER3受容体リン酸化の、抗HER3抗体による阻害。

【図4】SK-BR-3乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒトHER3受容体リン酸化の、抗HER3抗体による阻害。

50

【図 5】B T - 4 7 4 乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 6】M C F - 7 乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 7】B x P C 3 膵臓癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒト A k t リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 8】C H L - 1 黒色腫細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒト A k t リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 9】N 8 7 胃癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒト A k t リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

10

【図 10】S K - B R - 3 乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヒト A k t リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 11】S K - B R - 3 乳癌細胞における上皮細胞増殖因子 (E G F) により誘導されるヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 12】S K - B R - 3 乳癌細胞におけるベータセルリンにより誘導されるヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 13】上皮細胞増殖因子受容体 (E G F R) および H E R 3 を形質導入した C H O 細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 14】H E R 2 および H E R 3 を形質導入した C H O 細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

20

【図 15】H E R 4 および H E R 3 を形質導入した C H O 細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害。

【図 16】癌細胞系統における、ヘレグリンにより誘導されるヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害 (ホスホ - H E R 3 E L I S A I C 5 0 値) 。

【図 17】マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) は全長ヒト H E R 3 E C D およびヒト H E R 3 ドメイン I I I に結合する。

【図 18】マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) は全長ヒト H E R 3 E C D およびヒト H E R 3 ドメイン I I に結合する。

30

【図 19】ヒト化 1 D 9 ポテリジェント (商標) 抗体は全長ヒト H E R 3 E C D およびヒト H E R 3 ドメイン I I I に結合する。

【図 20】ヒト化 1 D 9 アクリタマブ (商標) 抗体は全長ヒト H E R 3 E C D およびヒト H E R 3 ドメイン I I I に結合する。

【図 21】ヒト化 1 D 9 抗体は全長ヒト H E R 3 E C D およびヒト H E R 3 ドメイン I I I に結合する。

【図 22】(a) マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) は、フローサイトメトリー分析により評価した場合、ヒト M C F - 7 乳癌細胞上の H E R 3 を認識する。(b) マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) 抗体は、フローサイトメトリー分析により評価した場合、ヒト B x P C 3 膵臓癌細胞上の H E R 3 を認識する。

40

【図 23】(a) ヒト化 1 D 9 抗体、ヒト化アクリタマブ (商標) 1 D 9 抗体、およびヒト化ポテリジェント (商標) 抗体は、フローサイトメトリー分析により評価した場合、ヒト C H L - 1 黒色腫細胞上の H E R 3 を認識する。(b) ヒト化 1 D 9 抗体、ヒト化アクリタマブ (商標) 1 D 9 抗体、およびヒト化ポテリジェント (商標) 抗体は、フローサイトメトリー分析により評価した場合、ヒト B x P C 3 膵臓癌細胞上の H E R 3 を認識する。

【図 24】マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) およびマウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) は、ヘレグリンにより誘導される B x P C 3 膵臓癌細胞の増殖を阻害する。

50

【図25】マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)およびマウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)は、ヘレグリンにより誘導されるMCF-7乳癌細胞の増殖を阻害する。

【図26】ヒト化1D9アクリタマブ(商標)抗体およびマウス1D9抗体は、ヘレグリンにより誘導されるBxPC3膵臓癌細胞の増殖を阻害する。

【図27】マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1)、マウス24H5抗体(M5.24H5.C2)、キメラ1D9抗体およびキメラ15D5抗体は、ヘレグリンにより誘導されるBxPC3膵臓癌細胞の浸潤を阻害する。

【図28】マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.H10)およびヒト化1D9抗体は、ヒトCHL-1黒色腫細胞において受容体のインターナリゼーションを誘導した。

【図29】(a)マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)は、B16F10細胞上で発現されたマウスHER3と交差反応する。(b)マウス24H5抗体(M5.24H5.C2)は、B16F10細胞上で発現されたマウスHER3と交差反応する。(c)マウス15D5抗体(M5.15D5.1C1)は、B16F10細胞上で発現されたマウスHER3と交差反応する。

【図30】B16F10同一遺伝子型腫瘍モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス1D9抗体の有効性。マウスB16F10黒色腫細胞のボーラスi.v.注射を投与したC57BL/6マウスを、アイソタイプ対照、マウスHer3 mAb(m1D9)またはジェムザール(GEMZAR)(商標)(ゲムシタピン)で処置し、肺における腫瘍細胞の定着に対する効果を評価した。アイソタイプ対照およびm1D9は、B16F10注射後の3日目(25または50mg/kg、i.p.)と、7日目および11日目(5または25mg/kg、i.p.)に投与した。ジェムザール(商標)は3日目のみに投与した(20mg/kg、i.v.)。20日目に湿重測定のために肺を回収した。m1D9による処置は、アイソタイプ対照に比べて、肺重量に用量依存的低下をもたらした($p < 0.01$; ダネットの事後検定を用いた一元配置ANOVA)。NTB = 非担癌マウス

【図31】B16F10同一遺伝子型腫瘍モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス15D5抗体の有効性。マウスB16F10黒色腫細胞のボーラスi.v.注射を投与したC57BL/6マウスを、アイソタイプ対照、マウスHer3 mAb(m15D5)またはジェムザール(商標)で処置し、肺における腫瘍細胞の定着に対する効果を評価した。アイソタイプ対照およびm15D5は、B16F10注射後の3日目(25または50mg/kg、i.p.)と、7日目および11日目(5または25mg/kg、i.p.)に投与した。ジェムザール(商標)は3日目のみに投与した(20mg/kg、i.v.)。20日目に湿重測定のために肺を回収した。ジェムザール(商標)およびm15D5による処置は、肺重量の低下をもたらしたが、アイソタイプ対照に比べて25/50mg/kg m15D5のみが統計学的に有意であった($p < 0.05$; ダネットの事後検定を用いた一元配置ANOVA)。NTB = 非担癌マウス

【図32】CHL-1異種移植モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス1D9抗体の有効性。5~100mg/kg i.p.の、マウス抗HER3 mAbであるm1D9で週に2回処置したところ、CB-17 SCIDマウスにおいてCHL-1腫瘍の増殖の低下がもたらされた。移植後24日目および27日目に、アイソタイプ対照と比較して用量依存的かつ統計学的に有意な低下が見られた(* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図33】CHL-1異種移植モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス15D5抗体の有効性。5~100mg/kg i.p.の、マウス抗HER3 mAbであるm15D5で週に2回処置したところ、CB-17 SCIDマウスにおいてCHL-1腫瘍の増殖の低下がもたらされた。移植後20、24および27日目に、アイソタイプ対照と比較して用量依存的かつ統計学的に有意な低下が見られた(* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分

10

20

30

40

50

析)。

【図34】B x P C 3 異種移植モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス1D9抗体の有効性。0.5 ~ 50 mg / kg i. p. の、マウス抗HER3 mAbであるm1D9で週に2回処置したところ、CB - 17 SCIDマウスにおけるB x P C 3 腫瘍増殖に用量依存的かつ統計学的に有意な低下がもたらされた (* * p < 0.01 ; * * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図35】B x P C 3 異種移植モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス15D5抗体の有効性。0.5 ~ 50 mg / kg i. p. の、マウス抗HER3 mAbであるm15D5で週に2回処置したところ、CB - 17 SCIDマウスにおけるB x P C 3 腫瘍増殖に用量依存的および統計学的に有意な低下がもたらされた (* * p < 0.01 ; * * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図36】NCI - N 87 異種移植モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス1D9抗体の有効性。CB - 17 SCIDマウスを75または100 mg / kg i. p. のm1D9で週に2回処置したところ、ビヒクル対照と比較してN 87 腫瘍の増殖の低下がもたらされた。アイソタイプ(isotype)対照であるマウスIgG2bでも同様の低下が見られた (* * p < 0.01 ; * * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図37】NCI - N 87 異種移植モデルにおける、マウス抗HER3 mAbであるマウス15D5抗体の有効性。CB - 17 SCIDマウスを75または100 mg / kg i. p. のm15D5で週に2回処置したところ、ビヒクル対照群またはアイソタイプ対照群と比較してN 87 腫瘍体積の低下がもたらされたが、違いは統計学的に有意なものではなかった。

【図38】CHL - 1 異種移植モデルにおける、キメラ抗HER3 mAbであるキメラ1D9抗体の有効性。5 ~ 50 mg / kg i. p. の、キメラ抗HER3 mAbであるCh1D9で週に2回処置したところ、CB - 17 SCIDマウスにおいてCHL - 1 腫瘍の増殖の低下がもたらされた。移植後24日目および27日目に、アイソタイプ対照と比較して用量依存的かつ統計学的に有意な低下が見られた (* p < 0.05 ; * * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図39】CHL - 1 異種移植モデルにおける、ヒト化抗HER3 mAbであるヒト化15D5抗体の有効性。5 ~ 50 mg / kg i. p. の、ヒト化抗HER3 mAbであるh15D5で週に2回処置したところ、CB - 17 SCIDマウスにおいてCHL - 1 腫瘍の増殖の低下がもたらされた。移植後24日目および27日目に、アイソタイプ対照と比較して用量依存的かつ統計学的に有意な低下が見られた (* p < 0.05 ; * * p < 0.01、* * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図40】CHL - 1 異種移植モデルにおける、ヒト化抗HER3 mAbであるヒト化1D9 RR抗体の有効性。5 ~ 50 mg / kg i. p. のヒト化1D9 RRで週に2回処置したところ、CB - 17 SCIDマウスにおいてCHL - 1 腫瘍の増殖の低下がもたらされた。この腫瘍増殖の低下は、移植後29日目および34日目で、アイソタイプ(isotype)対照と比較して、総ての用量レベルで同等かつ統計学的に有意なものであった (* * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図41】CHL - 1 異種移植モデルにおけるヒト化1D9 RRアクリタマブ(商標)の有効性。5 ~ 50 mg / kg i. p. のヒト化1D9 RRアクリタマブ(商標)で週に2回処置したところ、CB - 17 SCIDマウスにおいてCHL - 1 腫瘍の増殖の低下がもたらされた。この腫瘍増殖の低下は、移植後29日目および34日目で、アイソタイプ(isotype)対照と比較して、総ての用量レベルで同等かつ統計学的に有意なものであった (* * * p < 0.001 ; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反

10

20

30

40

50

復測定分析)。

【図42】CHL-1異種移植モデルにおけるヒト化1D9 R Rポテリジェント(商標)の有効性。5~50mg/kg i.p.のヒト化1D9 R Rポテリジェント(商標)で週に2回処置したところ、CB-17 SCIDマウスにおいてCHL-1腫瘍の増殖の低下がもたらされた。この腫瘍増殖の低下は、移植後29日目および34日目で、アイソタイプ(isotype)対照と比較して、用量依存性的かつ統計学的に有意なものであった(* * * $p < 0.001$; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図43】B x PC3異種移植モデル(皮下移植片)における、キメラ抗HER3 mAbであるキメラ1D9抗体の有効性。CB-17 SCIDマウスを、0.5~50mg/kg i.p.の、キメラ抗HER3 mAbであるch1D9で週に2回処置して、B x PC3腫瘍の増殖に対する効果を評価した。0.5、5および50mg/kg処置群では移植後33日目に、また、50mg/kg群では36日目にも、アイソタイプ対照と比較して用量依存性的かつ統計学的に有意な腫瘍増殖の低下が見られた(* * $p < 0.01$; * * * $p < 0.001$; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図44】B x PC3異種移植モデル(皮下移植片)における、ヒト化抗HER3 mAbであるヒト化15D5抗体の有効性。CB-17 SCIDマウスを、0.5~50mg/kg i.p.の、ヒト化抗HER3 mAbであるh15D5で週に2回処置して、B x PC3腫瘍の増殖に対する効果を評価した。50mg/kg群では移植後33日目および36日目に、アイソタイプ対照と比較して腫瘍増殖の低下が見られた(* * $p < 0.01$; ボンフェローニ事後検定を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図45】B x PC3異種移植モデル(皮下移植片)における、ヒト化1D9 R R抗体の有効性。0.5~50mg/kgのh1D9 R Rを、B x PC3担癌CB-17 SCIDマウスに週に2回i.p.投与して、腫瘍細胞の増殖に対する効果を判定した。20mg/kg群において見られた腫瘍体積の低下は、36日目までにアイソタイプ対照レベルに戻った(* $p < 0.05$; * * * $p < 0.001$; ボンフェローニ事後検定比較を用いた二元配置ANOVA反復測定分析)。

【図46】B x PC3異種移植モデル(同所移植片)におけるキメラ1D9抗体およびヒト化15D5抗体の有効性。B x PC3膵臓癌断片を雌CB-17 SCIDマウスの膵臓に同所移植した。腫瘍体積が80~100mm³に達したところで、50mg/kgの、HER3 mAbであるh15D5およびch1D9を、週に2回投与した。腫瘍体積は超音波(Vevo画像解析)により1週間毎に測定した。抗HER3 mAbで処置すると、移植後5週目、6週目および7週目にアイソタイプ対照と比較して腫瘍増殖に有意な低下を生じた(* * $p < 0.01$; * * * $p < 0.001$; ボンフェローニ事後検定比較による二元配置)。

【図47】NCI-N87異種移植モデルにおけるヒト化1D9 R R抗体および変異体の有効性。CB-17 SCIDマウスに、50mg/kgの示されたヒト化HER3 mAb(ヒト化1D9 R R抗体、ヒト化1D9 R Rポテリジェント(商標)抗体およびヒト化1D9 R Rアクリタマブ(商標)抗体)を週に2回、i.p.投与して、N87腫瘍細胞の増殖に対する効果を判定した。h1D9 R Rポテリジェント(商標)群では37日目に、h1D9 R Rアクリタマブ(商標)群では44日目に、アイソタイプ対照と比較して、統計学的に有意な腫瘍体積の低下が見られた(* $p < 0.05$; ボンフェローニ事後検定比較を用いた二元配置ANOVA)。

【図48】標的細胞としてHER3を形質導入したHEK293、およびエフェクター細胞としてヒトPBL(ドナー2126)を用いたADCCアッセイ。

【図49】標的細胞としてCHL-1細胞、およびエフェクター細胞としてのヒトPBL(ドナー2126)を用いたADCCアッセイ。

【図50】標的細胞としてHER3を形質導入したHEK293細胞、およびエフェクター細胞としてカニクイザルPBL(70-105)を用いたADCCアッセイ。

10

20

30

40

50

【図 5 1】標的細胞として H E R 3 を形質導入した H E K 2 9 3 細胞、およびエフェクター細胞としてカニクイザル P B L (7 0 - 1 1 3) を用いた A D C C アッセイ。

【図 5 2】標的細胞として C H L - 1 細胞、およびエフェクター細胞としてカニクイザル P B L (7 0 - 1 0 5) を用いた A D C C アッセイ。

【図 5 3】標的細胞として C H L - 1 細胞、およびエフェクター細胞としてカニクイザル P B L (7 0 - 1 1 3) を用いた A D C C アッセイ。

【図 5 4】H E R 3 B A C M A M (商標) を形質導入した H E K 2 9 3 標的細胞、およびカルピオケム (CALBIOCHEM) (商標) ウサギ補体を用いた C D C アッセイ。

【図 5 5】ヒト H E R 3 E C D (配列番号 6 6 ; 共結晶化断片) のドメイン I I I とマウス 1 D 9 軽鎖可変領域およびマウス 1 D 9 重鎖可変領域 (共結晶化マウス 1 D 9 抗体由来 F a b) との間のアミノ酸接触を示す X 線結晶構造。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 3 6 】

本開示は抗原結合タンパク質および関連の主題を提供する。

【 0 0 3 7 】

本明細書において「 H E R 3 」および「 H E R 3 受容体」とは、互換的であり、 H E R 3 の全長非プロセシング前駆体形態 ; C 末端ドメインの翻訳後切断から生じる成熟 H E R 3 ; 潜在型および非潜在 (活性) 型のうちのいずれか 1 つを意味する。本明細書において「 H E R 3 」および「 H E R 3 受容体」はまた、 H E R 3 受容体に関連する 1 以上の生物活性を保持する H E R 3 受容体の任意のフラグメントおよび変異体を意味する。

【 0 0 3 8 】

H E R 3 受容体の全長非プロセシング前駆体型は、プロペプチドと、成熟タンパク質を形成する C 末端ドメインを、シグナル配列とともに、または伴わずに含んでなる。この形態はポリタンパク質としても知られる。 H E R 3 受容体前駆体は単量体またはホモ二量体として存在し得る。

【 0 0 3 9 】

成熟 H E R 3 は、 H E R 3 前駆体タンパク質の C 末端から切断されるタンパク質であり、 C 末端ドメインとしても知られる。成熟 H E R 3 は単量体、ホモ二量体、または H E R 3 潜在複合体として存在し得る。条件に応じて、成熟 H E R 3 はこれらの異なる形態の組合せの間で平衡状態を確立し得る。

【 0 0 4 0 】

H E R 3 プロペプチドは、シグナル配列の切断の後に H E R 3 前駆体タンパク質の N 末端ドメインから切断されるポリペプチドである。プロペプチドは latency-associated peptide (L A P) としても知られる。 H E R 3 プロペプチドは、成熟 H E R 3 上の、プロペプチド結合ドメインと非共有結合的に結合することができる。

【 0 0 4 1 】

H E R 3 受容体抗原結合タンパク質は、 H E R 3 受容体の前駆体型、成熟型、単量体型、二量体型、潜在型および活性型のいずれか 1 つまたはいずれかの組合せと結合することができる。該抗原結合タンパク質は、単量体型および / または二量体型の成熟 H E R 3 受容体と結合することができる。該抗原結合タンパク質は、プロペプチドおよび / またはフォリスタチンと複合体を形成している H E R 3 受容体と結合することができる。あるいは、該抗原結合タンパク質は、 H E R 2 受容体または他の H E R 3 相互作用受容体と複合体 (例えば、 H E R 3 のヘテロ二量体) を形成している H E R 3 受容体と結合することができる。

【 0 0 4 2 】

本明細書において「抗原結合タンパク質」とは、単離された抗体、抗体フラグメント、抗原結合フラグメントおよびその他のタンパク質構築物 (例えば、 H E R 3 受容体 (配列番号 2 1) と結合することができるドメイン、配列番号 2 1 のアミノ酸残基 1 8 4 ~ 3 2 9 を含んでなる H E R 3 受容体のドメイン I I 、または配列番号 2 1 のアミノ酸残基 3 3 0 ~ 4 9 5 を含んでなる H E R 3 受容体のドメイン I I I) を意味する。

【 0 0 4 3 】

「抗体」とは、本明細書では広義において、免疫グロブリン様ドメインを有する分子を意味して用いられ、モノクローナル抗体、組換え抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体およびヘテロコンジュゲート抗体（モノクローナル抗体／ドメイン抗体コンジュゲートなど）；単一可変ドメイン；ドメイン抗体；抗原結合フラグメント；免疫学的に有効なフラグメント；一本鎖Fv；ダイアボディー；T A N D A B S（商標）などを含む（別の「抗体」形式に関する要約としては、Holliger, et al., *Nature Biotechnology*, Vol 23, No. 9: 1126-1136 (2005)を参照）。

【 0 0 4 4 】

本明細書において「単一可変ドメイン」とは、異なる可変領域またはドメインとは無関係に抗原またはエピトープに特異的に結合する抗原結合タンパク質可変ドメイン（例えば、 V_H 、 V_{HH} 、 V_L ）を意味する。

【 0 0 4 5 】

本明細書において「ドメイン抗体」または「dAb」とは、抗原と結合することができる「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と同じと考えられる。免疫グロブリン単一可変ドメインはヒト抗体可変ドメインであり得るが、齧歯類 V_{HH} dAb（例えば、WO 00 / 29004に開示）、テンジクザメ V_{HH} dAbおよびラクダ科 V_{HH} dAbなどの多種由来の単一抗体可変ドメインも含む。ラクダ科 V_{HH} は、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダおよびグアナコをはじめ、天然状態で軽鎖を欠いた重鎖抗体を産生する種に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドである。このような V_{HH} ドメインは当技術分野で利用可能な標準的技術に従ってヒト化することができ、このようなドメインは「ドメイン抗体」とみなされる。本明細書において、 V_H はラクダ科 V_{HH} ドメインを含む。NARVは、テンジクザメをはじめとする軟骨性魚類で同定された、別のタイプの免疫グロブリン単一可変ドメインである。これらのドメインは新規な抗原受容体可変領域(Novel Antigen Receptor variable region)（一般にV(NAR)またはNARVと略される）としても知られる。詳細についてはMol. Immunol. 44, 656-665 (2006)およびUS 20050043519A（引用することにより本明細書の一部とされる）を参照。

【 0 0 4 6 】

本明細書において「ドメイン」とは、そのタンパク質の残りの部分とは独立な三次構造を有する折り畳まれたタンパク質構造を意味する。一般に、ドメインはタンパク質の個別の機能特性を担い、多くの場合、そのタンパク質および／またはドメインの残りの部分の機能を欠損することなく他のタンパク質に付加、移動または移入可能である。本明細書において「免疫グロブリン単一可変ドメイン」とは、抗体可変ドメインに特徴的な配列を含んでなる、折り畳まれたポリペプチドドメインである。従って、免疫グロブリン単一可変ドメインには、完全な抗体可変ドメインおよび改変可変ドメイン（例えば、1以上のループが抗体可変ドメインに特徴的なものではない配列に置き換えられた抗体可変ドメイン）、または末端切断されているかまたはN末端もしくはC末端伸長を含んでなる抗体可変ドメイン、ならびに全長ドメインの少なくとも結合活性および特異性を保持する、折り畳まれた可変ドメインフラグメントが含まれる。ドメインは、別の可変領域またはドメインとは独立に、抗原またはエピトープに結合することができる。

【 0 0 4 7 】

「エピトープ結合ドメイン」とは、別のV領域またはドメインとは独立に、抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインを意味し、これはドメイン抗体(dAb)、例えば、ヒト、ラクダ科もしくはサメ免疫グロブリン単一可変ドメインであってもく、またはそれはCTLA-4（エヴィボディ）；リボカリン；Aタンパク質のZ領域（アフィボディ、SpA）、A領域（アビマー／マキシボディ）などのAタンパク質由来分子；GroELおよびGroESなどの熱ショックタンパク質；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリンリピートタンパク質（DARPin）；ペプチドアプタマー；C型レクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒトクリスタリンおよびヒトユビキチン（アフィリン

10

20

30

40

50

); PDZドメイン; ヒトプロテアーゼ阻害剤のサソリ毒 *kunitz* 型ドメイン; およびフィブロネクチン(アドネクチン)からなる群から選択される足場の誘導体であってもよく、天然のリガンド以外のリガンドとの結合性を持たせるためにタンパク質工学的操作が施されている。

【0048】

抗原結合フラグメントは、ドメインなどの非抗体タンパク質足場上に1以上のCDRを配置することによって提供され得る。このドメインはドメイン抗体であってもよく、またはそれはCTLA-4(エヴィボディ); リボカリン; Aタンパク質のZ領域(アフィボディ、SpA)、A領域(アビマー/マキシボディ)などのAタンパク質由来分子; GroELおよびGroESなどの熱ショックタンパク質; トランスフェリン(トランスボディ); アンキリンリピートタンパク質(DARPin); ペプチドアプタマー; C型レクチンドメイン(テトラネクチン); ヒトクリスタリンおよびヒトユビキチン(アフィリン); PDZドメイン; ヒトプロテアーゼ阻害剤のサソリ毒 *kunitz* 型ドメイン; およびフィブロネクチン(アドネクチン)からなる群から選択される足場の誘導体であってもよく、天然のリガンド以外の抗原(HER3受容体など)との結合性を持たせるためにタンパク質工学的操作が施されている。

10

【0049】

CTLA-4(細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4)は主にCD4+T細胞上で発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは可変ドメイン様Ig折り畳みを有する。抗体のCDRに対応するループを異種配列と置換することにより異なる結合特性を付与することができる。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4分子は、エヴィボディとしても知られている。詳細についてはJournal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照。

20

【0050】

リボカリンは、ステロイド、ピリン、レチノイドおよび脂質などの疎水性小分子を輸送する細胞外タンパク質ファミリーである。リボカリンは、円錐形構造の開口端に多くのループがある強固なシート二次構造を有し、種々の標的抗原に結合するように操作することができる。アンチカリンはサイズが160~180アミノ酸で、リボカリンに由来する。詳細については、Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000)、US 7 250 297 B1およびUS 2 007 022 463 3を参照。

30

【0051】

アフィボディは、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)のAタンパク質に由来する足場であり、抗原と結合するように操作することができる。このドメインは約58アミノ酸の3つのらせん束からなる。表面残基の無作為化によりライブラリーが作製されている。詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004)およびEP 1 641 818 A1参照。

【0052】

アビマーは、Aドメイン足場ファミリー由来の多重ドメインタンパク質である。約35アミノ酸の天然ドメインは、定義されたジスルフィド結合構造をとっている。Aドメインファミリーが呈する天然変異のシャッフリングにより多様性が作り出されている。詳細については、Nature Biotechnology 23(12), 1556-1561 (2005)およびExpert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)参照。

40

【0053】

トランスフェリンは、単量体血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは許容表面ループにペプチド配列を挿入することによって別の標的抗原に結合するように操作することができる。操作されたトランスフェリン足場の例としては、トランスボディがある。詳細については、J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)を参照。

【0054】

設計アンキリンリピートタンパク質(DARPin)は、統合膜タンパク質の細胞骨格への連結を媒介するタンパク質ファミリーであるアンキリンに由来する。アンキリンの1

50

つの繰り返し単位は、2本のらせんと1つのターンからなる33残基のモチーフである。これらは、各繰り返し単位の第1のらせんとターンの残基を無作為化することにより種々の標的抗原に結合するように操作することができる。それらの結合面は、分子の数を増やすことにより増やすことができる（親和性成熟法）。詳細については、J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)およびJ. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007)およびUS 20040132028 A1参照。

【0055】

フィブロネクチンは、抗原に結合するように操作可能な足場である。アドネクチンは、ヒトIII型フィブロネクチン(FN3)における15の繰り返し単位のうちの10番目のドメインの天然アミノ酸配列骨格からなる。サンドイッチの一方の末端の3つのループは、アドネクチンが対象とする治療標的を特異的に認識できるように操作することができる。詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005)、US 20080139791、WO 2005056764およびUS 6818418 B1を参照。

【0056】

ペプチドアプタマーは、定常足場タンパク質、一般に、チオレドキシン(TrxA)(活性部位に挿入された拘束型の可変ペプチドループを含む)からなるコンビナトリアル認識分子である。詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)参照。

【0057】

マイクロボディは、3~4個のシステイン架橋を含む25~50アミノ酸長の天然マイクロタンパク質に由来する。マイクロタンパク質の例としては、Kalata B1、コトキシニンおよびノッティンがある。マイクロタンパク質はループを有し、このループをマイクロタンパク質の全体的な折り畳みに影響を与えずに25個までのアミノ酸を含むように操作することができる。操作されたノッティンドメインの詳細については、WO 2008098796を参照。

【0058】

他のエピトープ結合ドメインとしては、種々の標的抗原の結合特性を操作するための足場として使用されてきたタンパク質が含まれ、これにはヒトクリスタリンおよびヒトユビキチン(アフィリン)、ヒトプロテアーゼ阻害剤のkunitz型ドメイン、Ras結合タンパク質AF-6のPDZドメイン、サソリ毒(カリブドトキシニン)、C型レクチンドメイン(テトラネクチン)が含まれる(これらは、Handbook of Therapeutic Antibodies (2007, Stefan Dubel 編)の第7章Non-Antibody ScaffoldsおよびProtein Science 15:14-27 (2006)に総説されている)。本開示のエピトープ結合ドメインは、これらの代替タンパク質ドメインのいずれに由来してもよい。

【0059】

抗原結合フラグメントまたは免疫学的に有効なフラグメントは、部分的な重鎖または軽鎖可変配列を含んでなくてもよい。フラグメントは少なくとも5、6、8または10アミノ酸の長さである。あるいは、フラグメントは少なくとも15、少なくとも20、少なくとも50、少なくとも75、または少なくとも100アミノ酸の長さである。

【0060】

本明細書において抗原結合タンパク質に関して「特異的に結合する」とは、その抗原結合タンパク質がHER3受容体と、ならびに他の(例えば、無関連の)タンパク質とは全くもしくは有意に結合しない、HER3受容体内の別個のドメインまたは別個のアミノ酸配列と結合することを意味する。しかしながら、この用語はこの抗原結合タンパク質がまた関連の深い分子(例えば、HER2受容体)と交差反応し得るということを排除するものではない。本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、HER2受容体などの関連の深い分子と結合する場合よりも少なくとも2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、または1000倍大きい親和性でHER3受容体と結合し得る。

【0061】

本明細書に示される範囲は、記載されている特定の範囲内の全ての値と特定の範囲の終端の値を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 2 】

抗原結合タンパク質 - H E R 3 相互作用の結合親和性 (K_D) は、1 m M 以下、1 0 0 n M 以下、1 0 n M 以下、2 n M 以下または 1 n M 以下であり得る。あるいは、 K_D は、5 ~ 1 0 n M の間；または 1 ~ 2 n M の間であり得る。 K_D は、1 p M ~ 5 0 0 p M の間；または 5 0 0 p M ~ 1 n M の間であり得る。該抗原結合タンパク質の結合親和性は、結合定数 (K_a) および解離定数 (K_d) によって決定される ($K_D = K_d / K_a$)。結合親和性は B I A C O R E (商標) により、例えば、A タンパク質をコーティングしたセンサー表面に試験抗体を捕捉し、この表面に H E R 3 受容体を流すことによって測定することができる。あるいは、結合親和性は、F O R T E B I O (商標) により、例えば、A タンパク質をコーティングしたニードル上に試験抗体受容体を捕捉し、この表面に H E R 3 受容体を流すことによって測定することもできる。

10

【 0 0 6 3 】

K_d は、 $1 \times 10^{-3} \text{ M s}^{-1}$ 以下、 $1 \times 10^{-4} \text{ M s}^{-1}$ 以下、または $1 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1}$ 以下であり得る。 K_d は、 $1 \times 10^{-5} \text{ M s}^{-1} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ M s}^{-1}$ の間；または $1 \times 10^{-4} \text{ M s}^{-1} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M s}^{-1}$ の間であり得る。 K_d が遅いと、抗原結合タンパク質 - リガンド複合体の解離が遅くなり、リガンドの中和が改善される。本明細書に記載の抗原結合タンパク質結合親和性および関連のデータの例を表 2 に示す。

【 0 0 6 4 】

【表 2】

表 2

20

HER3 リードおよび 競合因子	マウス 15D5 抗体	キメラ 15D5 抗体	ヒト化 15D5 抗体 (H4L1)	マウス 1D9 抗体	キメラ 1D9 抗体	ヒト化 1D9 抗体 (H6L2)
HER3 と結合するド メイン	II	II	II	III	III	III
Ig クラス	マウス IgG1		ヒト IgG1	マウス IgG2b		ヒト IgG1
親和性-ECD (KD)	~2nM	~1nM	3. 5nM	~1nM	~1nM	4. 1nM
親和性-ドメイン II	70pM	20pM	74pM			
親和性-ドメイン III				390pM	198pM	18 pM
親和性-ドメイン I						

30

40

【 0 0 6 5 】

表 2 では、「マウス 1 5 D 5 抗体」は、配列番号 1 ~ 8 で示される、重鎖可変鎖、軽鎖可変鎖、相補性決定領域およびフレームワーク領域を含んでなるモノクローナル抗体を意味し；「ヒト化 1 5 D 5 抗体」は、配列番号 2 2 ~ 2 9 で示される、重鎖可変鎖、軽鎖可

50

変鎖、相補性決定領域およびフレームワーク領域を含んでなるモノクローナル抗体を意味し；「マウス1D9抗体」は、配列番号44～51で示される、重鎖可変鎖、軽鎖可変鎖、相補性決定領域およびフレームワーク領域を含んでなるモノクローナル抗体を意味し；「ヒト化1D9抗体」は、配列番号30～37で示される、重鎖可変鎖、軽鎖可変鎖、相補性決定領域およびフレームワーク領域を含んでなるモノクローナル抗体を意味する。特に、表2の「ヒト化1D9」モノクローナル抗体は、配列番号30で示されるアミノ酸配列の重鎖可変領域と配列番号57で示されるアミノ酸配列の軽鎖可変鎖、ならびに配列番号30～33および配列番号35～37で示される対応する相補性決定領域を含んでなる。

【0066】

「ECD」とは、細胞外ドメインを意味し、HER3に関しては、配列番号21で示されるアミノ酸配列を有するものなどのHER3アイソフォームのうちドメインI、II、IIIおよびIVを含んでなるペプチド鎖を表し得る。

【0067】

本明細書において「中和する」とは、*in vitro*または*in vivo*においてHER3の生物活性が本明細書に記載の抗原結合タンパク質の存在下で、該抗原結合タンパク質の不在下におけるHER3の活性と比較して低減されることを意味する。中和は、限定されるものではないが、HER3のそのリガンドへの結合を遮断すること、HER3のそのリガンドによる活性化を防ぐこと、HER3受容体またはそのリガンドをダウンレギュレートすること、受容体の「活性な」（例えば、シグナル伝達能のある）立体配座をとる能力を妨げること、受容体のホモ、ヘテロまたはオリゴマー形成能を遮断すること、またはそうでなければ受容体活性もしくはエフェクター機能に影響を与えることの1以上のによるものであり得る。

【0068】

HER3受容体活性の測定には、限定されるものではないが、リン酸化受容体（pHER3）、リン酸化AKT（pAKT）、HER3とHER（またはその他の）受容体ファミリーのメンバーとの複合体形成、PI3キナーゼ、ERK2、c-JunまたはPYK2活性の低下、HER3発現腫瘍細胞系統の増殖、前記系統の軟寒天内での増殖能（クローン増殖）、このような系統の、リガンドに応答した経膜移動などのレベルを測定する方法が含まれる。

【0069】

生物活性の低減または阻害は部分的であっても完全なものであってもよい。中和抗原結合タンパク質は、HER3受容体の活性を、抗原結合タンパク質の不在下でのHER3活性に比べて少なくとも20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、82%、84%、86%、88%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%中和し得る。機能アッセイでは、IC₅₀は、生物学的応答をその最大の50%低減する濃度である。

【0070】

中和は、当業者に公知の、または本明細書に記載の1以上のアッセイを用いて判定または測定することができる。例えば、抗原結合タンパク質のHER3への結合は、サンドイッチELISA、BIACORE（商標）、FMAT、FORTEBIO（商標）、または同様の*in vitro*アッセイで評価することができる。

【0071】

ELISAに基づく受容体結合アッセイを用い、抗原結合タンパク質の存在下、プレートに固定化されたそのリガンドであるニューレグリン1およびニューレグリン2に対するHER3受容体の結合を測定することによって抗原結合タンパク質の中和活性を測定することができる。

【0072】

あるいは、細胞系受容体結合アッセイを用い、受容体結合、下流シグナル伝達、および遺伝子活性化の阻害を測定することによって抗原結合タンパク質の中和活性を測定するこ

10

20

30

40

50

とができる。

【 0 0 7 3 】

*in vivo*における中和は、例えば、HER3により媒介される機能および/またはシグナル伝達のいずれか1つまたは組合せの変化(例えば、リン酸化HER3(pHER3)、リン酸化AKT(pAKT)、HER3とHER(またはその他の)受容体ファミリーのメンバーとの複合体形成の低下、PI3キナーゼ、ERK2、c-JunまたはPYK2活性の低下)を示す動物における多くの異なるアッセイを用いて、およびまた、例えば腫瘍異種移植モデルにおいて腫瘍細胞増殖を妨げる、低減する、または減退させる抗原結合タンパク質の能力を測定することによって、測定することができる。

【 0 0 7 4 】

本明細書において「エフェクター機能」とは、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および補体依存性細胞傷害性(CDC)により媒介される応答、Fcにより媒介される食作用およびFcRn受容体を介した抗体再循環の1以上を意味するものとする。抗体の定常領域と種々のFc受容体(FcR)の間の相互作用は、抗体のエフェクター機能を媒介すると考えられている。有意な生物学的作用は、エフェクター機能、特に、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、補体固定(補体依存性細胞傷害性またはCDC)、食作用(抗体依存性食作用またはADCP)および抗体の半減期/クリアランスの結果であり得る。通常、エフェクター機能媒介能には抗体の抗原への結合が必要であり、全ての抗体が全てのエフェクター機能を媒介するわけではない。

【 0 0 7 5 】

エフェクター機能は、例えば、ADCCエフェクター機能の測定のための、FcRIIのナチュラルキラー細胞への結合またはFcRIの単球/マクロファージへの結合を介するものを含む、いくつかの方法で測定することができる。例えば、本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、ナチュラルキラー細胞アッセイで等価の野生型抗体またはその抗原結合フラグメントに対して測定した場合に、高いADCCエフェクター機能を示す。このようなアッセイの例は、Shields et al, 2001 The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, p6591-6604; Chappel et al, 1993 The Journal of Biological Chemistry, Vol 268, p25124-25131; Lazar et al, 2006 PNAS, 103; 4005-4010に見出すことができる。CDC機能を測定するためのアッセイの例としては、1995 J Imm Meth 184:29-38に記載されているものが挙げられる。

【 0 0 7 6 】

所望のエフェクター特性に応じて、抗体の重鎖定常領域に対して種々の改変を行うことができる。a)従来経路による補体の活性化;およびb)抗体依存性細胞傷害性の媒介、の機能を実質的に欠くヒト定常領域は、IgG4定常領域およびIgG2定常領域を含む。特定の突然変異を含むIgG1定常領域は、Fc受容体との結合を低下させることと、それゆえADCCおよびCDCを低下させることが別々に記載されている(Duncan et al. Nature 1988, 332; 563-564; Lund et al. J. Immunol. 1991, 147; 2657-2662; Chappel et al. PNAS 1991, 88; 9036-9040; Burton and Woof, Adv. Immunol. 1992, 51;1-84; Morgan et al., Immunology 1995, 86; 319-324; Hezareh et al., J. Virol. 2001, 75 (24); 12161-12168)。残基Asn297における特定の突然変異またはグリコシル化の変更を含むヒトIgG1定常領域がFc受容体への結合を増強することもまた記載されている。また、これらがADCCおよびCDCを増強する場合もあることも示されている(Lazar et al. PNAS 2006, 103; 4005-4010; Shields et al. J Biol Chem 2001, 276; 6591-6604; Nechansky et al. Mol Immunol, 2007, 44; 1815-1817)。

【 0 0 7 7 】

IgG抗体では、ADCCおよびADCPを含むエフェクター機能は、重鎖定常領域と免疫細胞の表面に存在するFc受容体ファミリーとの相互作用によって媒介される。ヒトの場合、これらにはFcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16)が含まれる。抗原に結合した抗体とFc/Fc複合体の形成との間の相互作用は、細胞傷害性、免疫細胞活性化、食作用および炎症性サイトカインの放出

10

20

30

40

50

をはじめとする一定範囲の作用を誘導する。定常領域における特定の置換（S 2 3 9 D / I 3 3 2 Eを含む）は、ある特定のFc受容体に対する重鎖定常領域の親和性を高め、従って、その抗体のエフェクター機能を増強することが知られている(Lazar et al. PNAS 2006)。本明細書において「由来する」とは、その材料の物理的起源であるという意味で供給源を定義するだけでなく、対照供給源に起源しないが、その材料と構造上同一である材料を定義することを意図するものであることは当業者には明白である。よって、「ドナー抗体に見られる残基」は、必ずしもドナー抗体から精製されたものである必要はない。

【0078】

「単離された」とは、抗原結合タンパク質または核酸などの分子が、それが本来見出され得る環境から取り出されていることを意図する。例えば、この分子は、本来それが通常一緒に存在する物質から精製されてもよい。例えば、サンプル中のこの分子の質量は全質量の95%であり得る。

10

【0079】

本明細書において「発現ベクター」とは、目的の核酸を真核細胞もしくは原核細胞などの細胞、または目的の核酸配列がタンパク質などのペプチド鎖として発現される無細胞発現系に導入するために使用可能な単離された核酸を意味する。このような発現ベクターは、例えば、コスミド、プラスミド、ウイルス配列、トランスポゾン、および目的の核酸を含んでなる直鎖核酸であり得る。発現ベクターが細胞または無細胞発現系（例えば、網状赤血球溶解液）に導入されると、目的の核酸によりコードされているタンパク質が転写/翻訳機構によって産生される。本開示の範囲内の発現ベクターは、真核生物または原核生物での発現に必要な要素を提供することができ、ウイルスプロモーター駆動ベクター（例えば、CMVプロモーター駆動ベクター、例えば、pcDNA3.1、pCEP4およびそれらの誘導体）、パキウウイルス発現ベクター、ショウジョウバエ発現ベクター、およびヒトIg遺伝子プロモーターなどの哺乳類遺伝子プロモーターにより駆動される発現ベクターが挙げられる。他の例としては、原核生物発現ベクター（例えば、T7プロモーター駆動ベクター、例えば、pET41）、ラクトースプロモーター駆動ベクターおよびアラビノース遺伝子プロモーター駆動ベクターが挙げられる。当業者ならば、他の多くの好適な発現ベクターおよび発現系を認識することができるであろう。

20

【0080】

本明細書において「組換え宿主細胞」とは、細胞へのその導入に先立って単離された目的の核酸配列を含んでなる細胞を意味する。例えば、目的の核酸配列は発現ベクター内にあってよく、なお、この細胞は原核細胞でも真核細胞でもよい。真核細胞の例としては、限定されるものではないが、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、HepG2、653、SP2/0、NS0、293、HeLa、骨髄腫、リンパ腫細胞またはそれらの任意の誘導体などの哺乳類細胞がある。最も好ましくは、真核細胞はHEK293、NS0、SP2/0またはCHO細胞である。大腸菌(*E. coli*)は、原核細胞の一例である。本開示による組換え細胞は、トランスフェクション、細胞融合、不死化、または当技術分野で周知の他の手法によって作製することができる。細胞にトランスフェクトされた目的の核酸配列（発現ベクターなど）は、染色体外にあってよいし、またはその細胞の染色体に安定に組み込まれてもよい。

30

40

【0081】

「キメラ抗体」とは、アクセプター抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域と会合した、ドナー抗体に由来する天然可変領域（軽鎖および重鎖）を含む、作出された抗体の一種を意味する。

【0082】

「ヒト化抗体」とは、非ヒトドナー免疫グロブリンに由来するそのCDRを有し、その分子の残りの免疫グロブリン由来部分は1以上のヒト免疫グロブリンに由来している、作出された抗体の一種を意味する。さらに、フレームワーク支持残基は、結合親和性を保持するために変更することができる（例えば、Queen et al. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)を参照）。好適

50

なヒトアクセプター抗体は、ドナー抗体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列との相同性により、慣用データベース、例えば、K A B A T (商標) データベース、ロス・アラモス・データベースおよびスイス・プロテイン・データベースから選択されるものであり得る。ドナー抗体のフレームワーク領域との相同性(アミノ酸に基づく)により同定されたヒト抗体は、ドナー C D R の挿入のための重鎖定常領域および/または重鎖可変フレームワーク領域を提供するのに適切であり得る。軽鎖定常領域または可変フレームワーク領域を供与し得る適切なアクセプター抗体も同様にして選択することができる。アクセプター抗体重鎖および軽鎖は同じアクセプター抗体に起源する必要はないということに留意されたい。従来技術には、このようなヒト化抗体を生産するいくつかの方法の記載がある(例えば、E P - A - 0 2 3 9 4 0 0 および E P - A - 0 5 4 9 5 1 参照)。

10

【0083】

「ドナー抗体」とは、その可変領域、C D R、または他の機能的フラグメントもしくはその類似体のアミノ酸配列を第1の免疫グロブリンパートナーに与える抗体を意味する。よって、このドナーは、変更された免疫グロブリンコード領域と、結果として発現される、ドナー抗体に特徴的な抗原特異性および中和活性を有する、変更された抗体を提供する。

【0084】

「アクセプター抗体」とは、ドナー抗体とは異種であり、その重鎖および/もしくは軽鎖フレームワーク領域、ならびに/またはその重鎖および/または軽鎖定常領域をコードするアミノ酸配列の全て(または任意の一部)を第1の免疫グロブリンパートナーに与える抗体を意味する。ヒト抗体はアクセプター抗体であり得る。

20

【0085】

「V_H」および「V_L」とは、抗原結合タンパク質の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をそれぞれ意味して本明細書で用いられる。

【0086】

「C D R」とは、抗原結合タンパク質の相補性決定領域のアミノ酸配列と定義される。これらは免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である。免疫グロブリンの可変部分には、3つの重鎖 C D R と3つの軽鎖 C D R (または C D R 領域)が存在する。従って、本明細書において「C D R」とは、3つ全ての重鎖 C D R、3つ全ての軽鎖 C D R、全ての重鎖および軽鎖 C D R、または少なくとも1つの C D R を意味し、ここで、少なくとも1つの C D R は C D R H 3 である。

30

【0087】

本明細書を通して、可変ドメイン配列および全長抗体配列のアミノ酸残基は、K a b a t ナンバリング法に従って付番されている。同様に、実施例において用いる「C D R」、「C D R L 1」、「C D R L 2」、「C D R L 3」、「C D R H 1」、「C D R H 2」、「C D R H 3」も K a b a t ナンバリング法に従う。詳細については、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)を参照。

【0088】

可変ドメイン配列および全長抗体配列のアミノ酸残基に関する別のナンバリング法も存在することは、当業者には明らかである。また、C D R 配列に関しても、例えば、Chothia, et al. (1989) Nature 342: 877-883に示されているものなどの別のナンバリング法が存在する。抗体の構造およびタンパク質折り畳みは、他の残基も C D R 配列の一部とみなせることを意味する場合があります、当業者ならばこういったことが理解できるであろう。

40

【0089】

当業者に利用可能な C D R 配列の他のナンバリング法としては、「A b M」法 (U n i v e r s i t y o f B a t h) および「c o n t a c t」(U n i v e r s i t y C o l l e g e L o n d o n) 法がある。K a b a t、C h o t h i a、A b M および c o n t a c t 法のうち少なくとも2つを用いて最小重複領域を決定し、「最小結合単位」を設定することができる。最小結合単位は、1つの C D R の一部分であり得る。

50

【 0 0 9 0 】

下記の表 3 は、各 C D R または結合単位に対して各ナンバリング法を用いた 1 つの定義を表す。K a b a t ナンバリング法は表 3 で可変ドメインアミノ酸配列のナンバリングのために使用されている。C D R 定義には、用いる個々の刊行物によって違うものがあること留意されたい。

【 0 0 9 1 】

【表 3】

表 3

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	Contact CDR	最 小 結 合 単 位
H1	31-35/35A/35 B	26-32/33/ 34	26-35/35A/35 B	30-35/35A/35 B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

10

20

【 0 0 9 2 】

本明細書において「抗原結合部位」とは、抗原に特異的に結合することができる抗原結合タンパク質上の部位を意味する。これは単一ドメイン（例えば、エピトープ結合ドメイン）もしくは 1 本鎖 F v (S c F v) ドメインであってよく、または標準的な抗体に見られるような、対合した V_H / V_L ドメインであってよい。

【 0 0 9 3 】

本明細書において「エピトープ」とは、抗原結合タンパク質の特定の結合ドメインと接触する抗原の部分を意味する。エピトープは、抗原に由来する本質的に直鎖のアミノ酸配列を含んでなる直鎖であってよい。あるいは、エピトープは、配座型(conformational)であっても不連続型であってもよい。例えば、配座エピトープは、構造制約要素を必要とするアミノ酸残基を含んでなる。不連続エピトープは、他の配列により分離された、すなわち、抗原の一次配列においては連続した配列ではないアミノ酸残基を含んでなる。その抗原の 3 次および 4 次構造上、不連続エピトープのこれらの残基は、抗原結合タンパク質が結合するに十分近接する。

30

【 0 0 9 4 】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列に関して「同一」または「配列同一性」とは、適当な挿入または削除を伴って最適にアラインして比較した場合の、2 つの核酸配列または 2 つのアミノ酸配列間の同一性の程度を示す。

40

【 0 0 9 5 】

2 つの配列間の同一性 % は、それらの配列が共通に持つ同一位置の数の関数であり（すなわち、同一性 % = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）、その 2 配列の最適なアライメントのために導入する必要のあるギャップの数および各ギャップの長さを考慮する。2 配列間の配列比較および同一性 % の決定は、下記のような数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

【 0 0 9 6 】

2 つのヌクレオチド配列間の同一性 % は、G C G ソフトウェアパッケージの G A P プロ

50

グラムを使用し、NWSgapdna.CMPマトリクスおよびギャップウェイト40、50、60、70または80およびギャップレングス1、2、3、4、5または6を用いて決定することができる。2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の同一性はまた、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているMeyers, et al., Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)のアルゴリズムを使用し、PAM120ウェイト・レシジュ・テーブル、ギャップレングスペナルティー12およびギャップペナルティー4を用いて決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間の同一性は、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込まれているNeedleman, et al., J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)アルゴリズムを使用し、Blossum 62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、およびギャップウェイト16、14、12、10、8、6もしくは4およびレングスウェイト1、2、3、4、5もしくは6を用いて決定することができる。

10

【0097】

例として、ポリヌクレオチド配列は、参照配列と100%同一である参照ポリヌクレオチド配列と同一であり得、または参照配列と比較した際にある整数値(例えば、少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、98もしくは99%同一)までのヌクレオチド変異を含み得る。このような変異は少なくとも1つのヌクレオチド欠失、置換(塩基転位(transition)および塩基転換(Transversion)を含む)または挿入から選択され、なお、これらの変異は参照ヌクレオチド配列の5'末端もしくは3'末端、またはこれらの末端位の間のある位置に存在してもよく、参照配列のヌクレオチド間に個々に、もしくは参照配列内に1以上の連続する群として点在していてもよい。ヌクレオチド変異の数は、本明細書に記載される参照ポリヌクレオチド配列のヌクレオチド総数に個々の同一性のパーセント数(100で割る)を掛け、その積を参照ポリヌクレオチド配列の前記ヌクレオチド総数から引くことによって求められる。すなわち：

20

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

式中、 n_n はヌクレオチド変異の数であり、 x_n は本明細書に記載される参照ポリヌクレオチド配列(参照ポリヌクレオチド配列例の「配列表」の核酸配列を参照)のヌクレオチド総数であり、 y は、50%であれば0.50、60%であれば0.60、70%であれば0.70、75%であれば0.75、80%であれば0.80、85%であれば0.85、90%であれば0.90、95%であれば0.95、98%であれば0.98、99%であれば0.99、または100%であれば1.00であり、 \cdot は掛け算の記号であり、 x_n と y の積が整数でない場合には、 x_n からそれを引く前に端数を切り捨てて最も近い整数にする。

30

【0098】

同様に、ポリペプチド配列は、本明細書に記載されるポリペプチド参照配列(参照ポリペプチド配列例の「配列表」のアミノ酸配列を参照)と同一であり得(すなわち、100%同一)、または参照配列と比較した際にある整数値までのアミノ酸変異を含んでもよく、その結果、同一性は100%未満、例えば、少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、98または99%同一となる。このような変異は少なくとも1つのアミノ酸欠失、置換(保存的および非保存的置換を含む)または挿入からなる群から選択され、なお、これらの変異は参照ポリペプチド配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端、またはこれらの末端位の間のある位置に存在してもよく、参照配列のアミノ酸間に個々に、もしくは参照配列内に1以上の連続する群として点在していてもよい。ある同一性のアミノ酸変異の数は、ポリペプチド参照配列によりコードされるポリペプチド配列のアミノ酸総数に個々の同一性のパーセント数(100で割る)を掛け、その積を本明細書に記載されるポリペプチド参照配列(例えば、配列番号1~21参照)の前記アミノ酸総数から引くことによって求められる。すなわち：

40

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は参照ポリペプチド配列のアミノ酸総数であり、 y は、50%であれば0.50、60%であれば0.60、70%であれば0.70

50

、75%であれば0.75、80%であれば0.80、85%であれば0.85、90%であれば0.90、95%であれば0.95、98%であれば0.98、99%であれば0.99、または100%であれば1.00であり、・は掛け算の記号であり、 x_a と y の積が整数でない場合には、 x_a からそれを引く前に端数を切り捨てて最も近い整数にする。

【0099】

同一性%はその配列の全長にわたって求めてよい。本明細書に定義されるように、「75%を越える同一性」とは、75%、80%、85%、95%および99を越える同一性%、ならびにこの範囲内のあらゆる別個の値、および別個の部分範囲を含む。

【0100】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」はそれぞれ、2以上のアミノ酸残基を含んでなる分子を意味する。ペプチドは単量体または多量体であり得る。

【0101】

当技術分野においては、ある種のアミノ酸置換が「保存的」とであるとみなされることは十分に認識されている。アミノ酸は共通する側鎖の特性に基づいていくつかの群に分けられ、抗原結合タンパク質の結合親和性の総てまたは実質的に総てを維持する群内での置換は保存的置換とみなされる。表4参照。本明細書に開示される抗原結合タンパク質は、「保存的」アミノ酸置換を含んでなり得る。

【0102】

【表4】

表4

側鎖	メンバー
疎水性	met, ala, val, leu, ile
中性・親水性	cys, ser, thr
酸性	asp, glu
塩基性	asn, gln, his, lys, arg
鎖の配向に影響を及ぼす残基	gly, pro
芳香族	trp, tyr, phe

【0103】

本開示の一態様は、配列番号2、配列番号3および配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；ならびに/または配列番号6、配列番号7および配列番号8からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域とを含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。本開示の抗原結合タンパク質は、本明細書に開示されるマウスまたはヒト化1D9、15D5、22A5モノクローナル抗体に由来するCDRH3などの少なくとも1つのCDRH3を含んでなることが好ましい。

【0104】

本開示はまた、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供し、ここで、該抗原結合タンパク質はキメラ抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される。

【0105】

本開示はまた、配列番号2で示されるCDRアミノ酸配列、配列番号3で示されるCDRアミノ酸配列、および配列番号4で示されるCDRアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに配列番号6で示されるCDRアミノ酸配列、配列番号7で示されるCDRアミ

ノ酸配列、および配列番号 8 で示される C D R アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなり、H E R 3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。

【0106】

本開示はまた、配列番号 21 のアミノ酸残基 184 ~ 329 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。配列番号 21 のアミノ酸残基 184 ~ 329 は、H E R 3 のドメイン I I を含んでなる。H E R 3 のドメイン I I は、ヘテロ二量体形成などの二量体形成に関与する。

【0107】

本開示の別の態様は、配列番号 23、配列番号 24 および配列番号 25 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 27、配列番号 28 および配列番号 29 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する軽鎖可変領域を含んでなり、H E R 3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

10

【0108】

本開示はまた、配列番号 23 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 24 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 25 で示される C D R アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに配列番号 27 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 28 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 29 で示される C D R アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなり、H E R 3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。

20

【0109】

本開示の別の態様は、配列番号 45、配列番号 46 および配列番号 47 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 49、配列番号 50 および配列番号 51 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する軽鎖可変領域を含んでなり、H E R 3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0110】

本開示はまた、配列番号 45 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 46 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 47 で示される C D R アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 49 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 50 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 51 で示される C D R アミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなり、H E R 3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。

30

【0111】

本開示はまた、配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 は、H E R 3 のドメイン I I I を含んでなる。H E R 3 のドメイン I I I は、H E R 3 受容体によるリガンド結合に関与する。

【0112】

本開示の別の態様は、配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 33 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % を越える配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 35、配列番号 36 および配列番号 37 からなる群から選択されるアミノ酸配列と 75 % 以上の配列同一性を有する少なくとも 1 つの C D R を有する軽鎖可変領域を含んでなり、H E R 3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

40

【0113】

本開示の別の態様は、配列番号 31 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号 32 で示される C D R アミノ酸配列、および配列番号 33 で示される C D R アミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに / または配列番号 35 で示される C D R アミノ酸配列、配列番号

50

36で示されるCDRアミノ酸配列、および配列番号37で示されるCDRアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0114】

本開示の別の態様は、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%を越える配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する重鎖可変領域；ならびに/または配列番号12、配列番号7、配列番号8、配列番号18、配列番号19および配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列と75%以上の配列同一性を有する少なくとも1つのCDRを有する軽鎖可変領域を含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

10

【0115】

本開示はまた、配列番号10で示されるCDRアミノ酸配列、配列番号11で示されるCDRアミノ酸配列、および配列番号12で示されるCDRアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；ならびに配列番号12で示されるCDRアミノ酸配列、配列番号7で示されるCDRアミノ酸配列、および配列番号8で示されるCDRアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域か、または配列番号18CDRで示されるアミノ酸配列、配列番号19で示されるCDRアミノ酸配列、および配列番号20で示されるCDRアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域かを含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質を提供する。

【0116】

本開示はまた、HER3に特異的に結合し、かつ、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含んでなる二量体の形成を阻害する抗原結合タンパク質を提供する。当業者が十分に認識するように、二量体形成の阻害は、本開示の抗原結合タンパク質の存在下と不在下の双方で二量体の量をアッセイすることによって判定することができる。このような二量体形成アッセイは当技術分野で周知であり、例えば、共沈降に基づくアッセイまたは2ハイブリッドアッセイが挙げられる。

20

【0117】

本開示の別の態様は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0118】

本開示の別の態様は、配列番号22で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号26で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

30

【0119】

本開示の別の態様は、配列番号44で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号48で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0120】

本開示の別の態様は、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号34で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

40

【0121】

本開示の別の態様は、配列番号9で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号13で示されるアミノ酸配列および配列番号17で示されるアミノ酸配列からなる群から選択される軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0122】

本開示の別の態様は、配列番号30で示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域配列と、配列番号57で示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域配列とを含んでなり、HER3受容体に特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

50

【 0 1 2 3 】

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合タンパク質をコードする単離された核酸を提供する。

【 0 1 2 4 】

本開示はまた、配列番号 38 で示される核酸配列および配列番号 39 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 1 2 5 】

本開示はまた、配列番号 59 で示される核酸配列および配列番号 60 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

10

【 0 1 2 6 】

本開示はまた、配列番号 40 で示される核酸配列および配列番号 41 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 1 2 7 】

本開示はまた、配列番号 52 で示される核酸配列および配列番号 53 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 1 2 8 】

本開示はまた、配列番号 42 で示される核酸配列および配列番号 43 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

20

【 0 1 2 9 】

本開示はまた、配列番号 42 で示される核酸配列および配列番号 58 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 1 3 0 】

本開示はまた、配列番号 54 で示される核酸配列、配列番号 55 で示される核酸配列、および配列番号 56 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

30

【 0 1 3 1 】

本開示はまた、配列番号 63 で示される核酸配列、配列番号 64 で示される核酸配列、および配列番号 65 で示される核酸配列からなる群から選択される少なくとも 1 つの核酸を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 1 3 2 】

本開示はまた、本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを提供する。

【 0 1 3 3 】

本開示はまた、本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を提供する。

40

【 0 1 3 4 】

本開示はまた、HER3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法であって、本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程；および前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなる方法を提供する。

【 0 1 3 5 】

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合タンパク質と薬学上許容される担体とを含んでなる医薬組成物を提供する。

【 0 1 3 6 】

50

本開示はまた、被験体において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の本明細書に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、前記被験体の癌が治療される工程を含んでなる方法を提供する。

【0137】

本開示はまた、哺乳類において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の本明細書に記載の抗原結合タンパク質投与することを含んでなる方法を提供する。

【0138】

本開示の方法の別の態様では、哺乳類はヒトである。

【0139】

本開示の方法の別の態様では、癌は乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫から選択される。

10

【0140】

一実施形態では、また、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫の治療において用いるための本明細書に記載の抗原結合タンパク質も提供される。

【0141】

本開示はまた、被験体において癌を治療する方法であって、a) 乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される癌を有する被験体を特定する工程；およびb) 治療上有効な量の本明細書に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の癌が治療される工程を含んでなる方法を提供する。

20

【0142】

本開示はまた、c) 前記癌が配列番号21のアミノ酸残基184～329を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる治療方法も提供する。このような判定は、未加工の癌細胞のアッセイ、またはこのような細胞の調製物、例えば、様々な異なる技術および試薬（例えば、配列番号21のアミノ酸残基184～329を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する抗原結合タンパク質、または配列番号21のアミノ酸残基184～329をコードする核酸配列に特異的な核酸プライマーもしくはプローブなど）による、溶解液もしくは免疫組織化学（IHC）標本によって行うことができる。このような判定は、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）をはじめとするフローサイトメトリー、ELISA、サザンブロット法、ノーザンブロット法または核酸マイクロアレイ分析の使用によって行ってもよい。このような判定は、適当な陽性対照および陰性対照と比較して、または事前に採取したデータセット（例えば、特定の細胞または組織種での配列番号21のアミノ酸残基184～329の平均発現）に基づいて行ってもよい。

30

【0143】

本開示はまた、タンパク質が配列番号21で示されるアミノ酸配列を含んでなる場合の治療方法を提供する。本開示の治療方法は、前記被験体の少なくとも1つの腫瘍細胞が配列番号21もしくはその一部、例えば、HER3のドメインIIもしくはドメインIIIをコードする遺伝子の増幅、または配列番号21もしくはその一部をコードするRNA転写物の増幅を有するかどうかを判定することをさらに含んでなり得る。

40

【0144】

本開示はまた、c) 前記癌が配列番号21のアミノ酸残基330～495を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる治療方法を提供する。このような判定は、無傷な癌細胞のアッセイ、またはこのような細胞の調製物、例えば、様々な異なる技術および試薬（例えば、配列番号21のアミノ酸残基330～495に特異的に結合する抗原結合タンパク質、または配列番号21のアミノ酸残基330～495をコードする核酸配列に特異的な核酸プライマーもしくはプローブなど）による、溶解液もしくは免疫組織化学（IHC）標本によって行うことができる。このような判定は、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）をはじめとするフローサイトメトリー、ELISA、

50

サザンブロット法、ノーザンブロット法または核酸マイクロアレイ分析の使用によって行ってもよい。このような判定は、適当な陽性対照および陰性対照と比較して、または事前に採取したデータセット（例えば、特定の細胞または組織種での配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 の平均発現）に基づいて行ってもよい。

【0145】

本開示はまた、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される病態の治療のための薬剤の製造における、抗原結合タンパク質などの本明細書に記載の物質の使用を提供する。

【0146】

本開示はまた、脳腫瘍（神経膠腫）、膠芽腫、パナヤン - ゾナナ (Bannayan-Zonana) 症候群、カウデン病、レルミット - デュクロ (Lhermitte-Duclos) 病、乳癌、炎症性乳癌、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、脳室上衣細胞腫、髄芽細胞腫、結腸癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌、肝臓癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肉腫、骨肉腫、骨巨細胞腫、甲状腺癌、リンパ芽球性 T 細胞白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性好中球性白血病、急性リンパ芽球性 T 細胞白血病、形質細胞腫、免疫芽球性大細胞白血病、マントル細胞白血病、多発性骨髄腫巨核芽球性白血病、多発性骨髄腫、急性巨核球性白血病、前骨髄球性白血病、赤白血病、悪性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、リンパ芽球性 T 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、神経芽腫、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、中皮腫、食道癌、唾液腺癌、肝細胞癌、胃癌、鼻咽頭癌、頬粘膜癌、口腔癌、GIST（消化管間質腫瘍）および精巣癌から選択される癌を治療する、またはその重篤度を軽減する方法に関する。

10

20

【0147】

本開示の別の態様は、配列番号 21 のアミノ酸残基 184 ~ 329 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0148】

本開示の別の態様は、配列番号 21 のアミノ酸残基 330 ~ 495 を含んでなるペプチド鎖ドメインに特異的に結合する抗原結合タンパク質である。

【0149】

本開示はまた、HER3 に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法であって、
a) 本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、-1, 6-フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT8 遺伝子が不活性化されている）；および b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより抗原結合タンパク質が生産される方法を提供する。抗原結合タンパク質のこのような生産方法は、例えば、BioWa, Inc. (Princeton, NJ) から入手可能なポテリジェント（商標）技術システムを用いて行うことができ、この場合、FUT8 遺伝子の機能的コピーを欠く CHO K1 S V 細胞が、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) が増強された（機能的 FUT8 遺伝子を有する細胞において産生される同じモノクローナル抗体に比べて増強されている）モノクローナル抗体を産生する。ポテリジェント（商標）技術システムの態様は、US 7,214,775、US 6,946,292、WO 00/61,739 および WO 02/31,240 に記載されており、これらは総て引用することにより本明細書の一部とされる。当業者ならば、他の適当なシステムも認識することができるであろう。さらに、組換え宿主細胞により発現された抗原結合タンパク質の回収方法も当技術分野で周知であり、親和性に基づくクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびサイズ排除に基づくクロマトグラフィーが含まれる。

30

40

【0150】

本開示の抗原結合タンパク質は、抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) としても提供してもよい。本抗原結合タンパク質はプロテアーゼ切断が可能なペプチドリンカーを介して化学療法薬とコンジュゲートさせてもよい。オーリスタチンはこのような化学療法薬の一

50

例である。好適なオーリスタチンの例としては、モノメチルオーリスタチンE (MMAE) およびモノメチルオーリスタチンF (MMAF) が挙げられる。他の好適な化学療法薬も本明細書に記載されている。当業者ならば、他の好適な化学療法薬を認識することができるであろう。コンジュゲートはまた、反応性基から生じる化学結合を介して化学療法薬と抗原結合タンパク質を架橋させることによって作製してもよい。

【0151】

本開示はまた、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法を提供し、ここで、組換え宿主細胞はCHO K1SV細胞である。

【0152】

本開示はまた、開示された抗原結合タンパク質の生産方法によって生産された、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質も提供する。

【0153】

本開示はまた、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法であって、
a) 本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程(該発現ベクターはIgG1 Fcドメインアミノ酸残基とIgG3 Fcドメインアミノ酸残基の双方を有するキメラFcドメインをコードするFc核酸配列を含んでなる)；およびb) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより抗原結合タンパク質が生産される方法を提供する。このような抗原結合タンパク質の生産方法は、例えば、BioWa, Inc. (Princeton, NJ) および協和発酵工業株式会社(現、協和発酵キリン株式会社)から入手可能なコンプリジェント(COMPLEGENT)(商標)技術システムを用いて行うことができ、この場合、IgG1 Fcドメインアミノ酸残基とIgG3 Fcドメインアミノ酸残基の双方を有するキメラFcドメインをコードするFc核酸配列が抗体重鎖に融合されている発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞が発現されて、補体依存性細胞傷害性(CDC)が増強された(このようなキメラFcドメインを欠いた、それ以外の点では同じモノクローナル抗体に比べて増強されている)抗原結合タンパク質が産生される。コンプリジェント(商標)技術システムの態様は、WO2007011041およびUS20070148165記載されており、これらはそれぞれ引用することにより本明細書の一部とされる。本開示の方法において、CDC活性はまた、IgG鎖のFc領域に配列特異的突然変異を導入することによっても増強することができる。当業者ならば、他の好適な化学療法薬を認識することができるであろう。

【0154】

本開示はまた、Fc核酸配列が配列番号40で示される核酸配列および配列番号42で示される核酸配列からなる群から選択される核酸にインフレームで融合されている、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法を提供する。このような抗原結合タンパク質の生産方法は、例えば、BioWa, Inc. (Princeton, NJ) から入手可能なアクリタマブ(商標)技術システムをポテリジェント(商標)およびコンプリジェント(商標)技術システムと併用することにより行い、ADC活性およびCDC活性の双方が増強された(キメラFcドメインを欠いた、それ以外の点では同じモノクローナル抗体に比べて増強されている)抗原結合タンパク質を産生することができる。

【0155】

本開示はまた、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法であって、
a) 本明細書に記載の単離された核酸を含有する発現ベクターを含有する組換え宿主細胞を培養する工程(該発現ベクターはIgG1 Fcドメインアミノ酸残基とIgG3 Fcドメインアミノ酸残基の双方を有するキメラFcドメインをコードするFc核酸配列をさらに含んでなり、かつ、該組換え宿主細胞では、-1, 6-フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が不活性化されている)；およびb) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより、機能的FUT8遺伝子を有する細胞において抗原結合タンパク質が生産される方法を提供する。

【0156】

10

20

30

40

50

本開示はまた、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質の生産方法であって、Fc核酸配列が配列番号40で示される核酸配列および配列番号42で示される核酸配列からなる群から選択される核酸とインフレームで融合されている方法を提供する。

【0157】

本開示はまた、被験体において前癌状態を治療する方法であって、治療上有効な量の本明細書に記載の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の前癌状態が治療される工程を含んでなる方法を提供する。

【0158】

本開示はまた、被験体において前癌状態を治療する方法であって、a)前癌状態を有する被験体を特定する工程；およびb)治療上有効な量の本開示の抗原結合タンパク質を前記被験体に投与し、それにより、被験体の前癌状態が治療される工程を含んでなる方法を提供する。

10

【0159】

本開示はまた、被験体において前癌状態を治療する方法であって、c)前記癌が配列番号21のアミノ酸残基184～329を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる方法を提供する。

【0160】

本開示はまた、被験体において前癌状態を治療する方法であって、タンパク質が配列番号21で示されるアミノ酸配列を含んでなる方法を提供する。

【0161】

20

本開示はまた、被験体において前癌状態を治療する方法であって、c)前記癌が配列番号21のアミノ酸残基330～495を含んでなるタンパク質を発現することを判定する工程をさらに含んでなる方法を提供する。

【0162】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号7で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

30

【0163】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号23で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号24で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号25で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号27で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号28で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号29で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

【0164】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号31で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号32で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号33で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号35で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号36で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号37で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

40

【0165】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号45で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号46で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号47で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号49で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号50で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号51で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる

50

抗原結合タンパク質である。

【0166】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号14で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号15で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号16で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

【0167】

本開示の別の態様は、HER3受容体に特異的に結合し、かつ、配列番号10で示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を有するCDRH2、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するCDRH3、配列番号18で示されるアミノ酸配列を有するCDRL1、配列番号19で示されるアミノ酸配列を有するCDRL2、および配列番号20で示されるアミノ酸配列を有するCDRL3を含んでなる抗原結合タンパク質である。

10

【0168】

本開示はまた、医療に用いるための本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【0169】

本開示はまた、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫の治療に用いるための、本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

20

【0170】

開示される、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質は、抗体、例えば、モノクローナル抗体であり得る。いくつかのこのような抗体例が本明細書に記載され、マウス型の15D5、1D9および22A5モノクローナル抗体、ならびにヒト化型の15D5および1D9モノクローナル抗体が含まれる。エピトープマッピングアプローチは、15D5モノクローナル抗体がHER3のドメインIIに結合し、リガンドにより誘導される、HER3と他の受容体（例えば、表1のものなど）の間の受容体の二量体形成を阻害または妨害できることを示す。これらには、限定されるものではないが、HER2と他のHERファミリー受容体、c-METと他のチロシンキナーゼまたは細胞表面受容体が含まれる。HER3の、これらの受容体との相互作用能の阻害または妨害の結果は、受容体により媒介される細胞シグナル伝達プロセスまたはHER3依存性である経路の阻害または低減である。

30

【0171】

エピトープマッピングはまた、1D9モノクローナル抗体がHER3のドメインIIIに結合し、HER3リガンドの結合およびヘテロ二量体の形成を阻害することを示す。

【0172】

開示される、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質は、HER3受容体（Erbb3としても知られる）（配列番号21）に結合してこれを中和し、かつ、HER3受容体との結合に関して、配列番号1または9の重鎖可変領域配列と配列番号5、13または17の軽鎖可変領域配列とを含んでなる参照抗体と競合し得る。HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質、例えば、マウスおよびヒト化15D5モノクローナル抗体は、HER3受容体のドメインII（配列番号21の残基184～329）に結合し得るが、ドメインI（配列番号21の残基20～183）、III（配列番号21のアミノ酸残基330～495）またはIV（HER3受容体（配列番号21）の配列番号21のアミノ酸残基496～643）には結合しない。HER3受容体のドメインIIは、受容体二量体の形成に重要なインターフェースであり、従って、本明細書に記載の2つの抗原結合タンパク質は候補となる二量体形成阻害剤である。HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質、例えば、マウスおよびヒト化1D9抗体もまた、ドメインIIIに結合してリガンドとHER3受容体との結合を妨げる。開示される、HER3に特異的に結合する抗原結合タンパク質はまた、本明細書に記載のマウスまたはヒト化15D5、1D9ま

40

50

たは 2 2 A 5 モノクローナル抗体と競合し得る。

【 0 1 7 3 】

本開示の抗原結合タンパク質、またはこれらを含んでなる医薬組成物はまた、HER3 発現などのいくつかの因子に基づく、癌などの過増殖性障害またはHER3 関連障害に罹患している被験体の治療方法にも使用可能である。このような腫瘍または癌は、限定されるものではないが、乳癌、卵巣癌、消化管癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、胃癌、子宮内膜癌、肺癌、腎臓癌、頭頸部癌、神経膠腫、黒色腫および非黒色腫皮膚癌ならびに他の皮膚癌、ならびにHER3 を発現するまたは過剰発現する他の癌の群から選択され得る。本抗原結合タンパク質はまた、HER2 / HER3 ヘテロ二量体形成を阻害するAG1478 - トラスツズマブの組合せまたはペルツズマブなどの、EGFR 標的療法に応答性のあるHER3 陽性癌を検出するために使用することもできる。例えば、Lee-Hoeflich et al., 68 Cancer. Res. 5875 (2008) および Emlet et al., 94 Br. J. Cancer 1144 (2006) 参照。さらに、本開示の利益は、1) 抗HER2 mAb 耐性患者、2) 抗HER2 mAb 不適格患者、3) 抗HER1 (EGFR) mAb 耐性または不適格患者、および4) チロシンキナーゼ (小分子) 耐性腫瘍を有する患者、を含む群に属する人々によって引き出される。本開示の抗原結合タンパク質は、単剤療法において単独で使用することもできるし、または該薬剤を本明細書のどこかに明示されている他の薬剤とともに投与する組み合わせ療法アプローチで使用することもできる。本開示は、被験体における癌性腫瘍の阻害もしくは退縮、患者の生存の延長、腫瘍進行までの時間の延長または患者の生活の質の増進をもたらし得る方法を提供し、このような方法は、治療上有効な量の抗原結合タンパク質を単独で、または本明細書で定義される他の特定の薬剤と組み合わせて投与する工程を含んでなる。

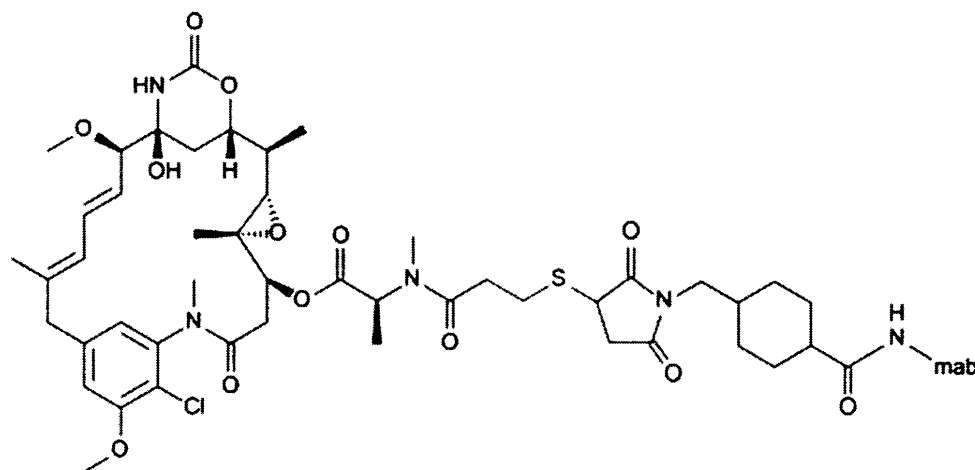
10

20

【 0 1 7 4 】

トラスツズマブエムタンシンは、トラスツズマブ - DM1 またはトラスツズマブ - MCC - DM1 (T - DM1 と略) と呼ばれ、細胞毒素メルタンシン (DM1) と連結された抗体トラスツズマブ (ハーセプチン (商標)) からなる抗体 - 薬物コンジュゲートである。トラスツズマブエムタンシンは構造：

【 化 1 】



30

40

を有する。

【 0 1 7 5 】

本開示の別の実施形態は、哺乳類において癌を治療する方法であって、治療上有効な量の本開示の抗原結合タンパク質を本明細書に記載の少なくとも1種類の他の薬剤とともに投与することを含んでなる方法である。このような薬剤は例えば本開示の59 ~ 78 頁に記載されている。

【 0 1 7 6 】

別の実施形態では、少なくとも1種類の他の薬剤は、トラスツズマブ、ペルツズマブお

50

よび T - D M 1 からなる群から選択される。

【 0 1 7 7 】

本開示の抗原結合タンパク質は、限定されるものではないが、乳癌、卵巣癌、消化管癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、胃癌、子宮内膜癌、肺癌、腎臓癌、頭頸部癌、神経膠腫、黒色腫および非黒色腫皮膚癌、ならびに H E R 3 を発現するまたは過剰発現する他の癌から選択される腫瘍に罹患している被験体を治療するためにも使用可能である。

【 0 1 7 8 】

本開示の抗原結合タンパク質は、乳癌、卵巣癌、消化管癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、胃癌、子宮内膜癌、肺癌、腎臓癌、頭頸部癌、神経膠腫、黒色腫および非黒色腫皮膚癌、ならびに H E R 3 を発現するまたは過剰発現する他の癌の治療において使用することもできる。

10

【 0 1 7 9 】

本抗原結合タンパク質は H E R 3 受容体と結合してこれを中和し、かつ、H E R 3 受容体との結合に関して、配列番号 1 または 9 の重鎖可変領域配列と配列番号 5、13 または 17 の軽鎖可変領域配列とを含んでなる参照抗体と競合し得る。

【 0 1 8 0 】

あるいは、本抗原結合タンパク質は H E R 3 受容体に結合してこれを中和し、かつ、H E R 3 受容体との結合に関して、配列番号 1 または 9 の重鎖可変領域配列と配列番号 5、13 または 17 の軽鎖可変領域配列とを含んでなる参照抗体と競合し得る。いくつかの実施形態では、本抗原結合タンパク質は H E R 2 受容体には結合しない。

20

【 0 1 8 1 】

前記参照抗体は、下記の重鎖と軽鎖の組合せ：(1) マウス 15 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0 ; マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 1 および 5 を含んでなる) ; (2) マウス 22 A 5 抗体 (M 5 . 2 2 A 5 . 1 G 6 . 1 C 1 0 ; マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 9、13 および 17 を含んでなる) ; (3) ヒト化 15 D 5 抗体 (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 22 および 26 を含んでなる) ; (4) ヒト化 1 D 9 抗体 (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 30 および 34 を含んでなる) ; (5) マウス 1 D 9 抗体 (マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 44 および 48 を含んでなる) ; (6) ヒト化 1 D 9 R R (ヒト化 1 D 9 __ E 抗体とも呼ばれる ; ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 30 および 57 を含んでなる) を含んでなり得る。第 2 の抗体であるマウス 22 A 5 抗体は、2 つの軽鎖可変ドメイン (配列番号 13 および 17) を有し、従って、異なる重鎖と軽鎖の組合せが形成される。参照抗体はまた、下記の表 17 に記載されている抗体を含んでなってもよい。

30

【 0 1 8 2 】

抗原結合タンパク質と参照抗体との競合は、競合 E L I S A によって判定することができる。H E R 3 の中和に関する競合は、例えば E L I S A、F M A T または B I A C O R E (商標) で判定される H E R 3 との結合に関する競合 ; ニューレグリンリガンド 1 およびニューレグリン 2 リガンドに対する H E R 3 の阻害に関する競合 ; および A 2 0 4 細胞系アッセイにおいてルシフェラーゼの発現をもたらす細胞シグナル伝達の阻害に関する競合のうちのいずれか 1 つまたは組合せによって判定することができる。競合する抗原結合タンパク質は、同じエピトープ、重複するエピトープ、または参照抗体が結合するエピトープに近接したエピトープに結合し得る。

40

【 0 1 8 3 】

本抗原結合タンパク質は、H E R 3 ペプチドフラグメントまたは人工ペプチド配列には有意に結合することができない。本抗原結合タンパク質は、H E R 3 ペプチドフラグメントまたは人工ペプチド配列には、それぞれ抗原結合タンパク質 : ペプチドが 1 : 1 ~ 1 : 10 の比率では結合することができない。

【 0 1 8 4 】

抗原結合タンパク質と H E R 3 受容体ペプチドフラグメントまたは人工ペプチド配列との結合の有無は、E L I S A または還元条件を用いる S D S P A G E によって判定する

50

ことができる。例えば、抗原結合タンパク質と直鎖全長HER3受容体配列との結合の有無は、還元的SDS PAGEによって判定することができる。

【0185】

本開示はまた、HER3受容体に結合してこれを中和し、かつ、配列番号4、15もしくは20のCDRH3、またはその変異体CDRを含んでなる抗原結合タンパク質を提供する。

【0186】

本抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号2、10もしくは31）、CDRH2（配列番号3、11もしくは32）、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）、CDRL1（配列番号6、14、18もしくは35）、CDRL2（配列番号7、15、19もしくは36）、およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）；またはその変異体から選択される1以上のCDR、または総てのCDRを任意の組合せでさらに含んでなり得る。

10

【0187】

例えば、本抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）およびCDRH1（配列番号2、10もしくは31）またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）およびCDRH2（配列番号3、11もしくは32）またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号2、10もしくは31）、CDRH2（配列番号3、11もしくは32）、およびCDRH3（配列番号4、12もしくは33）またはその変異体を含んでなり得る。

20

【0188】

本抗原結合タンパク質は、CDRL1（配列番号6、14、18もしくは35）およびCDRL2（配列番号7、15、19もしくは36）またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、CDRL2（配列番号7、15、19もしくは36）およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、CDRL1（配列番号6、14、18もしくは35）、CDRL2（配列番号7、15、19もしくは36）、およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）またはその変異体を含んでなり得る。

30

【0189】

本抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）、CDRH2（配列番号3、11もしくは32）、およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）、CDRH2（配列番号3、11もしくは32）、CDRL2（配列番号7、15、19もしくは36）、およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）またはその変異体を含んでなり得る。

40

【0190】

本抗原結合タンパク質は、CDRH1（配列番号2、10もしくは31）、CDRH2（配列番号3、11もしくは32）、CDRH3（配列番号4、12もしくは33）、CDRL1（配列番号6、14、18もしくは35）、CDRL2（配列番号7、15、19もしくは36）およびCDRL3（配列番号8、16、20もしくは37）またはその変異体を含んでなり得る。

【0191】

本開示はまた、HER3受容体に結合してこれを中和する抗原結合タンパク質を提供し、ここで、該、抗原結合タンパク質は、配列番号1、9もしくは30の可変ドメイン配列の対応するCDRH3または変異体CDRH3を含んでなるキメラまたはヒト化抗体である。

【0192】

50

該キメラまたはヒト化抗原結合タンパク質は、配列番号 1、配列番号 9、配列番号 30 の可変ドメイン配列から選択される対応する C D R またはその変異体 C D R のうち 1 以上または総てをさらに含んでなり得る。

【0193】

例えば、本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3 および対応する C D R H 1 またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3 および対応する C D R H 2 またはその変異体を含んでなり得る。あるいは、本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 1、対応する C D R H 2、および対応する C D R H 3；またはその変異体を含んでなり得る。

【0194】

本抗原結合タンパク質は、対応する C D R L 1 および対応する C D R L 2 またはその変異体を含んでなり得る。さらに、抗原結合タンパク質は、対応する C D R L 2 および対応する C D R L 3 またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質はまた、対応する C D R L 1、対応する C D R L 2 および対応する C D R L 3 またはその変異体を含んでなり得る。

【0195】

本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3 および対応する C D R L 3 またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3、対応する C D R H 2 および対応する C D R L 3 またはその変異体を含んでなり得る。あるいは、本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 3、対応する C D R H 2、対応する C D R L 2 および対応する C D R L 3 またはその変異体を含んでなり得る。

【0196】

本抗原結合タンパク質は、対応する C D R H 1、対応する C D R H 2、対応する C D R H 3、対応する C D R L 1、対応する C D R L 2 および対応する C D R L 3 またはその変異体を含んでなり得る。

【0197】

これらの対応する C D R は、K a b a t (1 9 8 7)、C h o t h i a (1 9 8 9)、A b M または c o n t a c t 法を参照して定義することができる。これらの各方法の 1 つの定義を表 3 に示すが、これを配列番号 1、9 または 30 の参照重鎖可変ドメインおよび配列番号 5、13、17 または 35 の参照軽鎖可変ドメインに当てはめて対応する C D R を決定することができる。

【0198】

例えば、本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 3 および結合単位 C D R H 1、またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 3 および結合単位 C D R H 2、またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 1、結合単位 C D R H 2、および結合単位 C D R H 3、またはその変異体を含んでなり得る。

【0199】

本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R L 1 および結合単位 C D R L 2、またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R L 2 および結合単位 C D R L 3、またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R L 1、結合単位 C D R L 2、および結合単位 C D R L 3、またはその変異体を含んでなり得る。

【0200】

本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 3 および結合単位 C D R L 3、またはその変異体を含んでなり得る。あるいは、本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 3、結合単位 C D R H 2、および結合単位 C D R L 3、またはその変異体を含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 3、結合単位 C D R H 2、結合単位 C D R L 2、および結合単位 C D R L 3、またはその変異体を含んでなり得る。

【0201】

10

20

30

40

50

本抗原結合タンパク質は、結合単位 C D R H 1、結合単位 C D R H 2、結合単位 C D R H 3、結合単位 C D R L 1、結合単位 C D R L 2、および結合単位 C D R L 3、またはその変異体を含んでなり得る。

【0202】

C D R 変異体または変異体結合単位は、少なくとも 1 つのアミノ酸が改変されたアミノ酸配列を含み、該改変はアミノ酸配列の化学的変更またはまたは一部の変更（例えば、アミノ酸 10 個以内）であってもよく、この改変は変異体に非改変配列の生物学的特徴を保持させることができる。例えば、変異体は、H E R 3 に結合してこれを中和する機能的変異体である。C D R アミノ酸配列の部分的変更は、1 ～ 数個のアミノ酸の欠失もしくは置換、または 1 ～ 数個のアミノ酸の付加もしくは挿入、またはその組合せ（例えば、アミノ酸 10 個以内）によるものであってよい。C D R 変異体または結合単位変異体は、そのアミノ酸配列に 1、2、3、4、5 もしくは 6 個のアミノ酸置換、付加または欠失を任意の組合せで含み得る。C D R 変異体または結合単位変異体は、そのアミノ酸配列に 1、2 もしくは 3 個のアミノ酸置換、挿入または欠失を任意の組合せで含み得る。アミノ酸残基における置換は、保存的置換、例えば、ある疎水性アミノ酸の別の疎水性アミノ酸での置換であってよい。例えば、ロイシンをバリンまたはイソロイシンで置換することができる。

10

【0203】

記載の C D R、対応する C D R、変異体 C D R、結合単位または変異体結合単位を含んでなる抗原結合タンパク質は、H E R 3 との結合に関して、E D 5 0 により示した場合、本明細書に記載の参照抗体が示す効力の 10 倍以内または 5 倍以内の効力を示し得る。E D 5 0 により示される、H E R 3 との結合効力は、E L I S A アッセイによって測定することができる。

20

【0204】

本抗原結合タンパク質は、アミノ酸位 54 においてアスパラギン（N）からアスパラギン酸（D）またはグルタミン（Q）への置換を有しても有さなくてもよい。本抗原結合タンパク質変異体は、アミノ酸位 91 におけるシステイン（C）からセリン（S）への置換を有しても有さなくてもよい。

【0205】

本明細書に記載の C D R、対応する C D R、変異体 C D R または結合単位の 1 以上が、ヒトフレームワーク上に、例えば、ヒト化またはキメラ可変ドメインとして存在してもよい。

30

【0206】

ヒト化重鎖可変ドメインは、配列番号 1 および 9 のヒト可変ドメイン配列と、そのフレームワーク領域において 75 % 以上、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、95 % 以上、98 % 以上、99 % 以上または 100 % の同一性を有するアクセプター抗体フレームワーク内に、配列表に記載されている C D R、対応する C D R、結合単位またはその変異体を含んでなり得る。ヒト化軽鎖可変ドメインは、75 % 以上、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、95 % 以上、98 % 以上、99 % 以上または 100 % の同一性を有するアクセプター抗体フレームワーク内に、配列番号 6、7、8、14、15、16、18、19 または 20 に挙げられている C D R、対応する C D R、結合単位またはその変異体を含んでなり得る。

40

【0207】

抗原結合タンパク質可変重鎖鎖は、28 位にセリン（S）アミノ酸残基および / または 105 位にトレオニン（T）アミノ酸残基を有してよい。抗原結合タンパク質可変軽鎖は、16 位にアルギニン（R）アミノ酸残基および / または 71 位にチロシン（Y）アミノ酸残基および / または 100 位にアラニン（A）アミノ酸残基を有してよい。例えば、本抗原結合タンパク質は、可変重鎖の 28 位にセリン（S）および可変軽鎖の 71 位にチロシン（Y）を含んでなり得る。

【0208】

本開示はまた、H E R 3 に結合してこれを中和し、かつ、下記の重鎖および軽鎖可変領

50

域の組合せ：(1) マウス 15D5 抗体 (M5 . 15D5 . 2A1 . 1H10 ; マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 1 および 5 を含んでなる) ; (2) マウス 22A5 抗体 (M5 . 22A5 . 1G6 . 1 C10 ; マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 9、13 および 17 を含んでなる) ; (3) ヒト化 15D5 抗体 (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 22 および 26 を含んでなる) ; (4) ヒト化 1D9 抗体 (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 30 および 34 を含んでなる) ; (5) マウス 1D9 抗体 (マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 44 および 48 を含んでなる) ; (6) ヒト化 1D9 RR (ヒト化 1D9 __ E 抗体とも呼ばれる ; ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 30 および 57 を含んでなる) のうちいずれか 1 つを含んでなる抗原結合タンパク質を提供する。

【0209】

10

これらの重鎖可変領域のいずれを好適なヒト定常領域と組み合わせてもよい。これらの軽鎖可変領域のいずれを好適な定常領域と組み合わせてもよい。

【0210】

上記のような抗原結合タンパク質、例えば、化学修飾および/または 1 以上のアミノ酸残基の挿入、欠失もしくは置換により配列が部分的に変化しているか、あるいは上記の配列のいずれかと 75 % 以上、80 % 以上、85 % 以上、90 % 以上、95 % 以上、98 % 以上または 99 % 以上の同一性を有する変異体は、HER3 との結合に関して、ED50 により示した場合、(1) M5 . 15D5 . 2A1 . 1H10 (マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 1 および 5 を含んでなる) ; (2) M5 __ 22A5 . 1G6 . 1 C10 (マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 9、13 および 17 を含んでなる) ; (3) ヒト化 15D5 (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 22 および 26 を含んでなる) ; (4) ヒト化 1D9 (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 30 および 34 を含んでなる) ; (5) マウス 1D9 (マウスモノクローナル抗体 ; 配列番号 44 および 48 を含んでなる) ; (6) ヒト化 1D9 __ E (ヒト化モノクローナル抗体 ; 配列番号 30 および 57 を含んでなる) が示す効力の 10 倍以内または 5 倍以内の効力を示し得る。ED50 により示される、HER3 との結合効力は、ELISA アッセイによって測定することができる。

20

【0211】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、HER3 受容体のペプチドフラグメントには結合することができない。HER3 受容体のペプチドフラグメントは、HER3 配列の 14 個までのアミノ酸からなる任意のフラグメントであり得る。HER3 のペプチドフラグメントは直鎖であり得る。HER3 のペプチドフラグメントは、全長配列をはじめ、HER3 受容体配列の任意のフラグメントであり得、その配列は直鎖である。

30

【0212】

抗原結合タンパク質と HER3 ペプチドフラグメントまたは人工ペプチド配列との結合の有無は、ELISA または還元条件を用いる SDS PAGE によって判定することができる。例えば、抗原結合タンパク質と直鎖全長 HER3 配列との結合の有無は、還元的 (すなわち変性) SDS PAGE によって判定することができる。

【0213】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質が結合する HER3 受容体のエピトープは、配座エピトープまたは不連続エピトープであり得る。本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、HER3 受容体上の直鎖エピトープには結合することができない。例えば、本抗原結合タンパク質は、HER3 受容体の還元型または変性サンプルには結合することができない。配座エピトープまたは不連続エピトープは、HER3 受容体結合部位と同一であっても、類似していても、または重複していてもよい。このエピトープは、HER3 受容体がその成熟型で、また、別の受容体分子との二量体の一部として存在する場合に接近を受け得る。エピトープはまた、HER3 受容体がその成熟型で、また、上記のような他の HER3 受容体結合分子との四量体の一部として存在する場合にも接近を受け得る。エピトープは、2 つの HER3 受容体ポリペプチドに分布していてもよい。このタイプの不連続エピトープは、各 HER3 受容体分子由来の配列を含んでなり得る。これらの配列は、二量体の 3 次および 4 次構造上、エピトープを形成して抗原結合タンパク質が結合するのに互い

40

50

に十分近接することができる。配座エピトープおよび／または不連続エピトープは、例えば C L I P S (商 標) (P e p s c a n S y s t e m s) などの公知の方法によって同定され得る。

【 0 2 1 4 】

本抗原結合タンパク質は、ヒトまたはマウス動物モデルにおいて少なくとも 6 時間、少なくとも 1 日、少なくとも 2 日、少なくとも 3 日、少なくとも 4 日、少なくとも 5 日、少なくとも 7 日または少なくとも 9 日の *in vivo* 半減期を持ち得る。

【 0 2 1 5 】

抗体の F c エフェクター部分に対する突然変異性の変化を用いて、F c R n と抗体の間の相互作用の親和性を変化させ、抗体のターンオーバーを調整することができる。この抗体の半減期は *in vivo* で延長させることができる。最大用量および最大投与頻度は *in vivo* における I C 5 0 をより長い時間維持する結果として達成され得るので、これは患者集団にとって有益となる。

10

【 0 2 1 6 】

本抗原結合タンパク質が結合する H E R 3 受容体ポリペプチドは、組換えポリペプチドであってもよい。H E R 3 受容体は溶液中にあって、または固相表面に結合されていてもよい。例えば、H E R 3 受容体は、磁性ビーズなどのビーズに結合されていてもよい。さらに、H E R 3 受容体はビオチン化されていてもよい。H E R 3 受容体とコンジュゲートされたビオチン分子を用い、ビオチンストレプトアビジンを固相表面にカップリングさせることにより、固相表面に H E R 3 を固定化することができる。

20

【 0 2 1 7 】

本抗原結合タンパク質は、ラット、マウス、霊長類（例えば、カニクイザル、旧世界ザルまたは大型類人猿）またはヒトに由来し得る。本抗原結合タンパク質は、ヒト化またはキメラ抗体であり得る。

【 0 2 1 8 】

本抗原結合タンパク質は、定常領域を含んでなり得、これはいずれのアイソタイプまたはサブクラスのものでよい。該定常領域は、I g G アイソタイプ、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 またはその変異体であり得る。本抗原結合タンパク質の定常領域は、I g G 1 であり得る。

【 0 2 1 9 】

本抗原結合タンパク質は、その抗体が増強したエフェクター機能 / A D C C および / または補体活性化を有するように突然変異した定常ドメインから選択される 1 以上の改変を含んでなり得る。好適な改変の例は、Shields, et al., J. Biol. Chem. (2001) 276:6591-6604、Lazar, et al., PNAS (2006) 103:4005-4010、ならびに U S 6 7 3 7 0 5 6、W O 2 0 0 4 0 6 3 3 5 1 および W O 2 0 0 4 0 2 9 2 0 7 に記載されている。

30

【 0 2 2 0 】

本抗原結合タンパク質は、本抗原結合タンパク質が増強されたエフェクター機能 / A D C C および / または補体活性化を有するようにグリコシル化特性が変更された定常ドメインを含んでなり得る。グリコシル化特性が変更された抗原結合タンパク質を生産するための好適な方法論の例は、W O 2 0 0 3 / 0 1 1 8 7 8、W O 2 0 0 6 / 0 1 4 6 7 9、および E P 1 2 2 9 1 2 5 に記載されている。

40

【 0 2 2 1 】

本開示はまた、本明細書に記載の抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。該核酸分子は、重鎖可変または全長配列と軽鎖可変または全長配列の双方をコードする配列を含んでなり得る。あるいは、本明細書に記載の抗原結合タンパク質をコードする核酸分子は、重鎖可変もしくは全長配列、または軽鎖可変もしくは全長配列をコードする配列を含んでなり得る。

【 0 2 2 2 】

本開示はまた、本明細書に記載の核酸分子を含んでなる発現ベクターを提供する。また、本明細書に記載の発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞も提供される。

50

【0223】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、好適な宿主細胞で生産することができる。本明細書に記載の抗原結合タンパク質の生産方法は、本明細書に記載の宿主細胞を培養する工程、およびおよび前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり得る。組換え形質転換された宿主細胞、トランスフェクトされた宿主細胞または形質導入された宿主細胞は、少なくとも1つの発現カセットを含んでなり得、該発現カセットは、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の重鎖をコードするポリヌクレオチドを含んでなり、かつ、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の軽鎖をコードするポリヌクレオチドをさらに含んでなる。あるいは、組換え形質転換された宿主細胞、トランスフェクトされた宿主細胞または形質導入された宿主細胞は、少なくとも1つの発現カセットを含んでなり得、第1の発現カセットは、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の重鎖をコードするポリヌクレオチドを含んでなり、かつ、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含んでなる第2のカセットをさらに含んでなる。安定に形質転換された宿主細胞は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の重鎖および/または軽鎖をコードする1以上の発現カセットを含んでなるベクターを含んでなり得る。例えば、このような宿主細胞は、軽鎖をコードする第1のベクターと重鎖をコードする第2のベクターとを含んでなり得る。

10

【0224】

宿主細胞は、真核宿主細胞、例えば、哺乳類宿主細胞であり得る。このような細胞系統の例としては、CHOまたはNS0が挙げられる。宿主細胞は、培養培地、例えば、血清不含培養培地中で培養され得る。本抗原結合タンパク質は、宿主細胞により培養培地中へ分泌されてもよい。本抗原結合タンパク質は、前記抗原結合タンパク質含有培養培地に対して少なくとも95%以上（例えば、98%以上）まで精製することができる。種々の培地組成および周囲条件で細胞を培養する方法は、当業者に周知である。

20

【0225】

本抗原結合タンパク質と薬学上許容される担体とを含んでなる医薬組成物が提供され得る。該医薬組成物を使用説明書とともに含んでなるパーツキットが提供され得る。便宜上、該キットは所定量の試薬を使用説明書とともに含んでなり得る。

【0226】

抗体構造

30

完全抗体

ほとんどの脊椎動物種の抗体の軽鎖は、その定常領域のアミノ酸配列に基づいて および と呼ばれる2つのタイプのうちの1つに割り付けることができる。それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、ヒト抗体はIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMの5つの異なるクラスに割り付けることができる。IgGおよびIgAはさらにサブクラスIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4、ならびにIgA1およびIgA2に細分することができる。少なくともIgG2a、IgG2bを有するマウスおよびラットには種変異体が存在する。

【0227】

可変領域の保存性の高い部分はフレームワーク領域（FR）と呼ばれる。完全な重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、3つのCDRが連結した4つのFRを含んでなる。各鎖のこれらのCDRは、これらのFR領域によってともに近接して保持され、他の鎖のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。

40

【0228】

定常領域は抗体と抗原の結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）、Fc 受容体との結合を介した食作用、新生児型Fc受容体（FcRn）を介した半減期/クリアランス速度、および補体カスケードのC1q成分を介した補体依存性細胞傷害性における関与などの種々のエフェクター機能を示す。

【0229】

ヒトIgG2定常領域は、古典的経路による補体活性化能、または抗体依存性細胞傷害

50

性媒介能を本質的に欠くことが報告されている。IgG 4 定常領域は、古典的経路による補体活性化能、および抗体依存性細胞傷害性媒介能（微弱に過ぎない）を欠くことが報告されている。これらのエフェクター機能を本質的に欠く抗体は、「非溶解性」抗体と呼ばれることがある。

【0230】

ヒト抗体

ヒト抗体は、当業者に公知のいくつかの方法によって作製することができる。ヒト抗体は、ヒト骨髓腫またはマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞系統を用いたハイブリドーマ法によって作出できる。Kozbor (1984) J. Immunol 133, 3001, and Brodeur, MONOCLONAL ANTI BODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS, 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987) 参照。別法としては、ファージライブラリーまたはトランスジェニックマウスの使用があり、双方ともヒト可変領域レパートリーを用いる (Winter (1994) Annu. Rev. Immunol 12: 433-455; Green (1999) J. Immunol. Methods 231: 11-23 参照)。

10

【0231】

現在、マウス免疫グロブリン遺伝子座がヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントで置換されている数系統のトランスジェニックマウスが利用可能である (Tomizuka (2000) PNAS 97: 722-727; Fishwild (1996) Nature Biotechnol. 14: 845-851; Mendez (1997) Nature Genetics, 15: 146-156 参照)。抗原刺激すると、このようなマウスはヒト抗体のレパートリーを産生することができ、それから目的の抗体を選択することができる。

20

【0232】

ファージディスプレイ技術は、ヒト抗原結合タンパク質（およびそのフラグメント）を作製するために使用することができる (McCafferty (1990) Nature 348: 552-553 and Griffiths, et al., EMBO 13: 3245-3260 (1994) 参照)。

【0233】

親和性成熟の技術 (Marks Bio/technol (1992) 10: 779-783) は、結合親和性の改善のために使用することができ、この場合、ヒト一次抗体の親和性が、そのH鎖およびL鎖可変領域を天然に存在する変異体で順次置換し、結合親和性の改善に基づいて選択することによって改善される。現在では、「エピトープ刷り込み (epitope imprinting)」などのこの技術の変法も使用可能である。例えば、WO 93 / 06213; Waterhouse (1993) Nucl. Acids Res. 21: 2265-2266 参照。

30

【0234】

キメラ抗体およびヒト化抗体

キメラ抗体は一般に組換えDNA法を用いて作製される。抗体をコードするDNA（例えば、cDNA）を単離し、従来の手順（例えば、抗体のH鎖およびL鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブの使用による）を用いて配列決定を行う。ハイブリドーマ細胞がこのようなDNAの典型的な供給源として役立つ。単離されれば、このDNAを発現ベクターに入れ、その後、この発現ベクターを、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌、COS細胞、CHO細胞または骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトし、前記抗体の合成を得る。このDNAを、ヒトL鎖およびH鎖のコード配列で対応する非ヒト（例えば、マウス）H鎖およびL鎖定常領域を置換することによって改変することができる。例えば、Morrison (1984) PNAS 81: 6851 参照。

40

【0235】

免疫原性の大幅な低減は、ヒトのフレームワーク（「アクセプターフレームワーク」）および定常領域に非ヒト（例えば、マウス）抗体（「ドナー」抗体）のCDRだけをグラフトしてヒト化抗体を作製することによって達成することができる (Jones, et al. (1986) Nature 321: 522-525; および Verhoeven, et al. (1988) Science 239: 1534-1536)。しかしながら、CDRグラフト法はそれ自体、抗原 - 結合特性の完全な保持をもたらすことはできず、有意な抗原 - 結合親和性を回復させるべき場合には、ドナー抗体のいくつかのフレームワーク残基（「逆突然変異」と呼ばれることがある）をヒト化分子において保

50

存する必要があるという場合が頻繁に見られる (Queen, et al. (1989) PNAS 86: 10,029-10,033; Co, et al. (1991) Nature 351: 501-502参照)。この場合、ヒトフレームワーク (F R) を提供するために、データベースから非ヒトドナー抗体と最大の配列相同性を示すヒト可変領域が選択される。このヒト F R の選択は、ヒトコンセンサスまたは個々のヒト抗体のいずれかから行うことができる。必要であれば、C D R 立体配座を保存するために、ドナー抗体の重要な残基をヒトアクセプターフレームワークに置換導入することができる。抗体のコンピューターモデリングを用いて、このような構造上重要な残基を同定する助けとすることができる。W O 9 9 / 4 8 5 2 3 参照。

【 0 2 3 6 】

あるいは、ヒト化は、「ベニアリング」のプロセスによって達成することもできる。独特なヒトおよびマウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域の統計分析によれば、露出した残基の正確なパターンがヒト抗体とマウス抗体で異なり、ほとんどの個々の表面の位置が少数の異なる残基に強い優先性を持つことが明らかになった (Padlan, et al. (1991) Mol. Immunol. 28: 489-498; および Pedersen, et al. (1994) J. Mol. Biol. 235: 959-973参照)。従って、非ヒト F v の免疫原性は、そのフレームワーク領域において、ヒト抗体に通常見られるものとは異なる露出残基を置換することによって低減することができる。タンパク質の抗原性は表面アクセシビリティと相関している可能性があるので、マウス可変領域をヒト免疫系から「見えないようにする」には表面残基の置換で十分である (Mark, et al. (1994) in Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113: The pharmacology of Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, 105-134参照)。このヒト化手順は、抗体の表面だけが変更され、支持部分の残基はそのままであることから、「ベニアリング」と呼ばれる。さらなる変更アプローチとしては、W O 0 4 / 0 0 6 9 5 5 に記載されているもの、および細菌発現系を用い、配列がヒト生殖細胞系に近い抗体を作製する o H U M A N E E R I N G (商標) (K a l o b i o s) の手順 (Alfenito-M Advancing Protein Therapeutics January 2007, San Diego, California) が挙げられる。

【 0 2 3 7 】

二重特異性抗原結合タンパク質

二重特異性抗原結合タンパク質は、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原結合タンパク質である。このような抗原結合タンパク質を作製する方法は当技術分野で公知である。従来、二重特異性抗原結合タンパク質の組換え生産は、2つの免疫グロブリンH鎖-L鎖対の同時発現に基づき、この2つのH鎖が異なる結合特異性を有する。Millstein, et al. (1983) Nature 305: 537-539; W O 9 3 / 0 8 8 2 9 ; および Traunecker, et al. (1991) EMBO 10: 3655-3659参照。H鎖およびL鎖のランダムな組み合わせのために、10通りの異なる抗体構造の潜在的混合物が生産され、そのうち1つだけが所望の結合特異性を有する。別のアプローチとしては、所望の結合特異性を有する可変ドメインを、ヒンジ領域の少なくとも一部、C H 2 領域およびC H 3 領域を含んでなる重鎖定常領域に融合させることを含む。軽鎖結合に必要な部位を含むC H 1 領域は、これらの融合物の少なくとも1つに存在していればよい。これらの融合物をコードするD N A および所望によりL鎖は、別々の発現ベクターに挿入され、その後、好適な宿主生物に同時にトランスフェクトされる。しかしながら、2つまたは3つ総ての鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することもできる。1つのアプローチでは、二重特異性抗体は、一方のアームの第1の結合特異性を有するH鎖と他方のアームの第2の結合特異性を与えるH-L鎖対から構成される。W O 9 4 / 0 4 6 9 0 ; Suresh, et al. (1986) Methods in Enzymology 121: 210も参照。

【 0 2 3 8 】

抗原結合フラグメント

定常領域を欠いたフラグメントは、古典的経路による補体活性化能、または抗体依存性細胞傷害性媒介能を欠く。従来、このようなフラグメントは、例えばババイン消化 (例えば、W O 9 4 / 2 9 3 4 8 参照) などの完全抗体のタンパク質分解消化によって作製されるが、組換え形質転換宿主細胞から直接作製することもできる。S c F v の作製について

は、Bird, et al. (1988) Science 242: 423-426を参照。さらに、抗原結合フラグメントは、下記のような種々の操作技術を用いて作製することができる。

【 0 2 3 9 】

F vフラグメントは、F a bフラグメントよりも、それらの2つの鎖の相互作用エネルギーが小さいと思われる。このV_HドメインとV_Lドメインの会合を安定化させるために、それらはペプチド(Bird, et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston, et al. (1988) PNAS 85(16): 5879-5883)、ジスルフィド架橋(Glockshuber, et al. (1990) Biochemistry 29: 1362-1367)および「ノブ・イン・ホール(knob in hole)」突然変異(Zhu, et al. (1997) Protein Sci., 6: 781-788)と結びつけられている。S c F vフラグメントは、当業者に周知の方法によって作製することができる(Whitlow, et al. (1991) Methods Companion Methods Enzymol, 2: 97-105およびHuston, et al. (1993) Int. Rev. Immunol 10: 195-217参照)。S c F vは、大腸菌または真核細胞などの細菌細胞において作製することができる。S c F vの1つ欠点は、産物が一価であることであり、このため多価結合力による高い結合力がなくなり、半減期が短い。これらの問題を克服する試みとして、化学的カップリング(Adams, et al. (1993) Can. Res 53: 4026-4034;およびMcCartney, et al. (1995) Protein Eng. 8: 301-314)によるか、または不対合C末端システイン残基を含有するS c F vの自発的部位特異的二量体形成(Kipriyanov, et al. (1995) Cell. Biophys 26: 187-204参照)による、付加的C末端システインを含有するS c F vからの二価(S c F v')₂の作製がある。あるいは、S c F vは、ペプチドリinkerを3~12残基に短縮して「ダイアボディ」を形成させることにより、多量体の形成を余儀なくさせることもできる(Holliger, et al. (1993) PNAS 90: 6444-6448参照)。リンカーをなおさらに短縮すれば、S c F v三量体(「トリアボディ」、Kortt, et al. (1997) Protein Eng 10: 423-433)および四量体(「テトラボディ」、Le Gall, et al. (1999) FEBS Lett, 453: 164-168参照)を形成させることができる。二価S c F v分子の構築は、タンパク質二量体形成モチーフと遺伝子融合による「ミニ抗体」(Pack, et al. (1992) Biochemistry 31: 1579-1584参照)および「ミニボディ」(Hu, et al. (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061参照)の形成によって達成することもできる。S c F v - S c - F vタンデム((S c F V)₂)も、2つのS c F v単位を第3のペプチドリinkerによって連結することによって作製することができる(Kurucz, et al. (1995) J. Immunol. 154: 4576-4582参照)。二重特異性ダイアボディーは、ある抗体のV_Hドメインが短いリンカーによって別の抗体のV_Lドメインに連結されたものからなる2つの一本鎖融合産物の、非共有結合的会合によって作製することができる(Kipriyanov, et al. (1998) Int. J. Can 77: 763-772参照)。このような二重特異性ダイアボディーの安定性は、ジスルフィド架橋または前記「ノブ・イン・ホール」突然変異の導入によるか、または一本鎖ダイアボディー(S c D b)(2つのハイブリッドS c F vフラグメントがペプチドリinkerによって連結されている)の形成(Kontermann, et al. (1999) J. Immunol. Methods 226:179-188参照)によって増強することができる。四価二重特異性分子は、例えば、S c F vフラグメントをIg G分子のCH3ドメインに、またはヒンジ領域を介してF a bフラグメントに融合させることによって得ることができる(Coloma, et al. (1997) Nature Biotechnol. 15: 159-163参照)。あるいは、四価二重特異性分子は、二重特異性一本鎖ダイアボディーの融合によって作出されている(Alt, et al. (1999) FEBS Lett 454: 90-94参照)。また、より小さな四価二重特異性分子も、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフを含有するリンカーを用いたS c F v - S c F vタンデム(D i B i ミニ抗体、Muller, et al. (1998) FEBS Lett 432: 45-49参照)か、または4つの抗体可変ドメイン(V_HおよびV_L)を、分子内対合を妨げる配向で含んでなる一本鎖分子(タンデムダイアボディー、Kipriyanov, et al. (1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56参照)のいずれかの二量体形成によって形成することができる。二重特異性F(a b')₂フラグメントは、F a b'フラグメントの化学カップリングによるか、またはロイシンジッパーを介したヘテロ二量体形成(Shalaby, et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 217-225;およびKostelny, et al. (1992), J. Immunol. 148: 1547-1553参照)によって作出することができる。また、単離

10

20

30

40

50

された V_H ドメインおよび V_L ドメイン (Domantis plc) も利用可能である。US 6, 248, 516; US 6, 291, 158; および US 6, 172, 197 参照。

【0240】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の都合のよい架橋法を用いて形成された2つの共有結合抗体から構成される。例えば、US 4, 676, 980 参照。

【0241】

その他の改変

本開示の抗原結合タンパク質はまた、それらのエフェクター機能を増強する、または変化させるその他の改変も含んでなり得る。抗体のFc領域と種々のFc受容体(FcR)の間の相互作用は、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、補体の固定、食作用および抗体の半減期/クリアランスを含む抗体のエフェクター機能を媒介すると考えられている。抗体のFc領域に対する種々の改変は、所望の特性に応じて行うことができる。例えば、Fc領域における、そうでなければ溶解性抗体を非溶解性とする特定の突然変異は、EP 0 629 240 および EP 0 307 434 に詳説され、またはサルベージ受容体結合エピートープを抗体に組み込んで血清半減期を延長することもできる。US 5, 739, 277 参照。ヒトFc受容体としては、FcR(I)、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIa および新生児型FcRnが含まれる。Shields, et al. (2001) J. Biol. Chem 276: 6591-6604は、IgG1残基の共通セットが総てのFcRの結合に關与するが、FcRIIおよびFcRIIIはこの共通セットの範囲外の異なる部位を利用していることを示した。IgG1残基のある群、すなわち、Pro-238、Asp-265、Asp-270、Asn-297 および Pro-239は、アラニンに変更されると、総てのFcRに対する結合を低下させた。総てがIgG CH2ドメイン内にある、CH1とCH2をつなぐヒンジ付近にクラスターを形成している。FcRIは結合のためにIgG1残基の共通セットだけを利用するが、FcRIIおよびFcRIIIはこの共通セットに加えて異なる残基と相互作用する。いくつかの残基を変更すると、FcRIIに対する結合だけ(例えば、Arg-292)、またはFcRIIIに対する結合だけ(例えば、Glu-293)が低減された。いくつかの変異体はFcRIIまたはFcRIIIに対して改善された結合を示したが、他の受容体に対する結合には影響を及ぼさなかった(例えば、Ser-267AlaはFcRIIに対する結合を改善したが、FcRIIIに対する結合は影響を受けなかった)。他の変異体はFcRIIまたはFcRIIIに対する結合の改善を示したが、他の受容体に対する結合は低下した(例えば、Ser-298AlaはFcRIIIに対する結合を改善したが、FcRIIに対する結合が低下した)。FcRIIIaでは、最も良く結合するIgG1変異体には、Ser-298、Glu-333 および Lys-334におけるアラニン置換が組み合わせられていた。新生児型FcRn受容体は、抗体クリアランスと組織間の経細胞輸送の双方に關与していると考えられている(Junghans (1997) Immunol. Res 16: 29-57; および Ghetie, et al. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18: 739-766 参照)。ヒトFcRnと直接相互作用することが判明しているヒトIgG1残基としては、Ile 253、Ser 254、Lys 288、Thr 307、Gln 311、Asn 434 および His 435 がある。この節に記載されているいずれの位置における置換も、血清半減期を延長させ、かつ/または抗体のエフェクター特性を変化させることができる。

【0242】

他の改変としては、抗体のグリコシル化変異体がある。定常領域の保存された位置における抗体のグリコシル化は、抗体機能、特に、上記のものなどのエフェクター機能に著しい効果を持つことが知られている。例えば、Boyd, et al. (1996) Mol. Immunol. 32: 1311-1318 参照。1以上の糖鎖部分が付加、置換、欠失または改変されている、抗体またはその抗原結合フラグメントのグリコシル化変異体が企図される。アスパラギン-X-セリンまたはアスパラギン-X-トレオニンモチーフの導入により、糖鎖部分の酵素的付加の

ための、可能性のある部位が作出され、従って、抗体のグリコシル化を操作するために使用することができる。Raju, et al. (2001) Biochemistry 40: 8868-8876では、TNFR - IgG イムノアドヘシンの末端シアル化は、 α 1,4 - ガラクトシルトランスフェラーゼおよび/または α 2,3 シアリルトランスフェラーゼを用いた再ガラクトシル化および/または再シアル化のプロセスによって増強された。末端シアル化の増強は、免疫グロブリンの半減期を延長すると考えられる。抗体は、ほとんどの糖タンパク質と同様に、一般に糖型の混合物として生産される。この混合物は、抗体が真核生物、特に哺乳類細胞で生産された場合に特に明らかである。定義された糖型を作製するために種々の方法が開発されている。Zhang, et al. (2004) Science 303: 371; Sears, et al. (2001) Science 291: 2344; Wacker, et al. (2002) Science 298: 1790; Davis, et al. (2002) Chem. Rev. 102: 579; Hang, et al. (2001) Acc. Chem. Res 34: 727 参照。

10

【0243】

本明細書に記載される抗体（例えば、IgG アイソタイプ、例えば、IgG1）は、定義された数（例えば、7 以下、例えば、5 以下、例えば、2 つまたは 1 つ）の糖型を含んでなり得る。

【0244】

これらの抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンなどの非タンパク質性ポリマーと結合させることができる。タンパク質と PEG のコンジュゲーションは、タンパク質の半減期の延長ならびにタンパク質の抗原性および免疫原性の低減のために確立された技術である。種々の分子量およびスタイル（直鎖型または分岐型）でのペグ化の使用が、完全抗体ならびに Fab' フラグメントを用いて検討されてきた。Koumenis et al., (2000) Int. J. Pharmaceut. 198: 83-95 参照。

20

【0245】

生産方法

抗原結合タンパク質は、ヤギ（Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Methods 231: 147-157 参照）、ニワトリ（Morrow (2000) Genet. Eng. News 20: 1-55 参照）、マウス（Pollock, et al. 参照）または植物（Doran (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11: 199-204; Ma (1998) Nat. Med. 4: 601-606; Baez, et al. (2000) BioPharm 13: 50-54; Stoger, et al. (2000) Plant Mol. Biol. 42: 583-590 参照）などのトランスジェニック生物で生産することができる。

30

【0246】

抗原結合タンパク質はまた、化学合成によって生産することもできる。しかしながら、抗原結合タンパク質は一般に、当業者の周知の組換え細胞培養技術を用いて生産される。本抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを単離し、さらなるクローニング（増幅）または発現のためにプラスミドなどの複製可能なベクターに挿入する。1 つの発現系として、特に宿主細胞が CHO または NS0 である場合には、グルタミン酸シンセターゼ系（Lonza Biologics により販売されているものなど）がある。本抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、容易に単離され、従来法（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ）を用いて配列決定される。使用可能なベクターとしては、プラスミド、ウイルス、ファージ、トランスポゾン、そのプラスミドが一般に用いられるミニ染色体が挙げられる。一般に、このようなベクターは、発現を助けるために本抗原結合タンパク質ポリヌクレオチドに機能的に連結されたシグナル配列、複製起点、1 以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーターおよび転写終結配列をさらに含む。軽鎖および重鎖をコードするポリヌクレオチドは、別個のベクターに挿入し、例えば、形質転換、トランスフェクション、エレクトロポレーションもしくは形質導入によって同じ宿主細胞に同時にもしくは順次導入してもよいし、または、場合により、重鎖と軽鎖の双方を、前記の導入の前に同じベクターに挿入することもできる。

40

【0247】

コドンの最適化は、宿主細胞により産生されるタンパク質の総レベルが、コドンが最適

50

化された遺伝子でトランスフェクトした場合に、野生型配列でトランスフェクトした場合のレベルに比べて高くなるようにするために使用することができる。いくつかの方法が公開されている (Nakamura, et al. (1996) Nucleic Acids Research 24: 214-215; W 0 9 8 / 3 4 6 4 0 ; W 0 9 7 / 1 1 0 8 6)。遺伝コードの冗長性のために、本明細書に開示されているもの (特に、所与の宿主細胞における発現のためにコドンが最適化されたもの) とは別のポリヌクレオチドも本明細書に記載の抗原結合タンパク質をコードする場合がある。本抗原結合タンパク質のコドン使用頻度は、転写物および / または産物の収量を高めるよう宿主細胞のコドンバイアスを適合させるために改変することができる (例えば、Hoekema, et al., (1987), Mol Cell Biol 7(8): 2914-24参照)。コドンの選択は、発現に用いる宿主細胞との好適な適合性に基づき得る。

10

【 0 2 4 8 】

シグナル配列

抗原結合タンパク質は、成熟タンパク質の N 末端に特異的切断部位を有する異種シグナル配列を有する融合タンパク質として産生させることができる。このシグナル配列は宿主細胞によって認識され、かつ、プロセッシングされるべきである。原核生物宿主細胞の場合、シグナル配列は、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼまたは熱安定性腸毒素 I リーダーであり得る。酵母分泌の場合、シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダーまたは産生ホスファターゼリーダーであり得る。例えば、W 0 9 0 / 1 3 6 4 6 参照。哺乳類細胞系では、単純ヘルペス g D シグナルなどのウイルス分泌リーダーであってよく、天然免疫グロブリンシグナル配列が好適であり得る。一般に、シグナル配列は、本抗原結合タンパク質をコードする DNA とリーディングフレーム内で連結される。

20

【 0 2 4 9 】

複製起点

複製起点は当技術分野で周知であり、グラム陰性菌には p B R 3 2 2、ほとんどの酵母には 2 μ プラスミド、ほとんどの哺乳類細胞には S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V または B P V などの種々のウイルス起源のものが好適である。一般に、複製起点成分は哺乳類発現ベクターには必要ないが、S V 4 0 が初期プロモーターを含むことから、これを用い得る。

30

【 0 2 5 0 】

選択マーカー

典型的な選択遺伝子は、抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するか、または (b) 栄養要求性 (auxiotrophic) 欠陥を補足するか、もしくは複合培地において利用できない栄養素を供給するか、または (c) 両者の組合せを提供するタンパク質をコードする。選択スキームは宿主細胞の増殖を阻止することを含み得る。本抗原結合タンパク質をコードする遺伝子での形質転換に成功した細胞は、例えば、同時に送達された選択マーカーにより付与される薬物耐性のために生残する。一例として D H F R 選択マーカーがあり、この場合、形質転換体をメトトレキサートの存在下で培養する。細胞を漸増量のメトトレキサートの存在下で培養し、目的の外因性遺伝子のコピー数を増幅させる。この D H F R 選択では、C H O 細胞が特に有用な細胞系統である。さらなる例として、グルタメートシンセターゼ発現系 (L o n z a B i o l o g i c s) である。酵母に用いられ選択遺伝子の一例として、t r p 1 遺伝子がある。Stinchcomb, et al. (1979) Nature 282: 38参照。

40

【 0 2 5 1 】

プロモーター

抗原結合タンパク質の発現に好適なプロモーターを、抗原結合タンパク質をコードする DNA / ポリヌクレオチドに機能的に連結する。原核宿主のプロモーターとしては、p h o A プロモーター、- ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリ性ホスファターゼ、トリプトファンおよびハイブリッドプロモーター (T a c など) が挙げられる。酵母細胞での発現に好適なプロモーターとしては、3 - ホスホグリセリン酸キナーゼま

50

たは他の解糖系酵素、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース 6 リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセリン酸ムターゼおよびグルコキナーゼが挙げられる。誘導型酵母プロモーターとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソチトクロム C、酸性ホスファターゼ、メタロチオネインおよび窒素代謝またはマルトース / ガラクトース利用を担う酵素が挙げられる。

【0252】

哺乳類細胞系での発現のためのプロモーターとしては、ウイルスプロモーター、例えば、ポリオーマ、鶏痘およびアデノウイルス（例えば、アデノウイルス 2）、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス（特に、前初期遺伝子プロモーター）、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、アクチン、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーターおよび初期または後期シミアンウイルス 40 が挙げられる。もちろん、プロモーターの選択は発現に用いる宿主細胞との好適な適合性に基づく。第 1 のプラスミドは、RSV および / または SV 40 および / または CMV プロモーター、軽鎖可変領域（V_L）、

C 領域をネオマイシンおよびアンピシリン耐性選択マーカーをともにコードする DNA を含んでなり得、第 2 のプラスミドは、RSV または SV 40 プロモーター、重鎖可変領域（V_H）をコードする DNA、1 定常領域、DHFR およびアンピシリン耐性マーカーをコードする DNA を含む。

【0253】

エンハンサーエレメント

適当であれば、例えば高等真核生物における発現のために、ベクター中のプロモーターエレメントに機能的に連結されたエンハンサーエレメントを使用することができる。哺乳類エンハンサー配列としては、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、フェトプロテインおよびインスリン由来のエンハンサーエレメントが挙げられる。あるいは、真核生物細胞ウイルス由来のエンハンサーエレメント、例えば SV 40 エンハンサー（bp 100 ~ 270）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、バキュロウイルスエンハンサーまたはマウス IgG 2 a 遺伝子座を用いてもよい（WO 04 / 009823 参照）。該エンハンサーはプロモーターの上流部位のベクターに位置してよい。あるいは、エンハンサーは、例えば、非翻訳領域内、またはポリアデニル化シグナルの下流など、どこに存在してもよい。エンハンサーの選択および配置は、発現に用いる宿主細胞との好適な適合性に基づき得る。

【0254】

ポリアデニル化 / 終結

真核生物系では、ポリアデニル化シグナルは、本抗原結合タンパク質をコードする DNA / ポリヌクレオチドに機能的に連結されている。このようなシグナルは一般に、オープンリーディングフレームの 3' に配置される。哺乳類系では、限定されない例として、成長ホルモン、延長因子 - 1 およびウイルス（例えば、SV 40）遺伝子またはレトロウイルスの長い末端反復配列に由来するシグナルが挙げられる。酵母系では、ポリアデニル化 (polydenylation) / 終結シグナルの限定されない例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) およびアルコールデヒドロゲナーゼ 1 (ADH) 遺伝子に由来するものが挙げられる。原核生物系では、ポリアデニル化シグナルは一般に必要なく、代わりに、より短く、より良く定義されたターミネーター配列を利用するのが通常である。ポリアデニル化 / 終結配列の選択は、発現に用いる宿主細胞との好適な適合性に基づき得る。

【0255】

その他の方法 / 増収のためのエレメント

上記に加え、増収のために使用可能な他の特徴として、クロマチン再構成エレメント、イントロンおよび宿主細胞特異的コドン改変が挙げられる。

【0256】

宿主細胞

抗原結合タンパク質をコードするベクターのクローニングまたは発現のために好適な宿

10

20

30

40

50

主細胞は、原核生物、酵母または高等真核生物の細胞である。好適な原核細胞としては、真正細菌、例えば腸内細菌科(enterobacteriaceae)、例えばエシェリキア属(*Escherichia*)、例えば大腸菌(*E. coli*) (例えば、ATCC 31, 446; 31, 537; 27, 325)、腸内細菌属(*enterobacter*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ・プロテウス(*Klebsiella Proteus*)、サルモネラ菌属(*Salmonella*)、例えばマウスチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、セラチア属(*Serratia*)、例えばセラチア・マルセスカンス(*Serratia marcescans*)および赤痢菌属(*Shigella*)、ならびにバチルス属(*Bacilli*)、例えば枯草菌(*B. subtilis*)およびバチルス・リケニホルミス(*B. licheniformis*) (DD 266710 参照)、シュードモナス属(*Pseudomonas*)、例えば緑膿菌(*P. aeruginosa*)およびストレプトミセス属(*Streptomyces*) が挙げられる。酵母宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス(*Kluyveromyces*) (例えば、ATCC 16, 045; 12, 424; 24, 178; 56, 500)、ヤロウィア属(*yarrowia*) (EP 402, 226)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) (EP 183070、Peng, et al. (2004) J. Biotechnol. 108: 185-192も参照)、カンジダ(*Candida*)、トリコデルマ・リージア(*Trichoderma reesia*) (EP 244234)、ペニシリン(*Penicillin*)、トリボクラジウム(*Tolypocladium*)およびアスペルギルス(*Aspergillus*) 宿主、例えば、A. ニデュランス(*A. nidulans*)およびA. ニガー(*A. niger*)も企図される。

10

【0257】

高等真核宿主細胞としては、哺乳類細胞、例えば、COS-1 (ATCC 番号 CRL 1650)、COS-7 (ATCC CRL 1651)、ヒト真核腎細胞系統293、ベビーハムスター腎細胞(BHK) (ATCC CRL 1632)、BHK570 (ATCC 番号: CRL 10314)、293 (ATCC 番号 CRL 1573)、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO (例えば、CHO-K1、ATCC 番号: CCL 61、DHFR-CHO細胞系統、例えばDG44 (Urlaub, et al. (1986) Somatic Cell Mol. Genet. 12: 555-556参照)、特に、懸濁培養に適したCHO細胞系統、マウスセルトリ細胞、サル腎細胞、アフリカミドリサル腎細胞(ATCC CRL-1587)、HELA細胞、イヌ腎細胞(ATCC CCL 34)、ヒト肺細胞(ATCC CRL 75)、Hep G2および骨髄腫またはリンパ腫細胞、例えばNS0 (米国特許第5807715号参照)、Sp2/0、Y0が挙げられる。

20

30

【0258】

このような宿主細胞はまた、抗原結合タンパク質の品質、機能および/または収量を改善するためにさらに操作または適合させることができる。限定されない例として、特異的修飾(例えば、グリコシル化)酵素およびタンパク質折り畳みシャペロンの発現が挙げられる。

【0259】

細胞培養法

抗原結合タンパク質をコードするベクターで形質転換された宿主細胞は、当業者に公知の任意の方法で培養することができる。宿主細胞をスピナーフラスコ、回転瓶または中空繊維系で培養してもよいが、大規模生産の場合、特に懸濁培養の場合には、攪拌式タンクリアクターで培養すればよい。攪拌式タンクは、例えばスパージャー、バッフルまたは低断裂インペラーを用いた曝気に適合させることができる。気泡塔およびエアリフトリアクターの場合、空気または酸素の気泡による直接曝気を用いてもよい。宿主細胞を血清不含培地で培養する場合、該培地にブルロニックF-68などの細胞保護剤を添加し、曝気工程の結果としての細胞の損傷を防止する助けとする。宿主細胞の特性に応じて、足場依存性細胞系統のための増殖支持体としてマイクロ担体を用いてもよいし、細胞を懸濁培養に適合させてもよい(これが典型的である)。宿主細胞、特に無脊椎動物宿主細胞の培養には、種々の操作方法、流加式、リピートバッチ式プロセス(Drapeau, et al. (1994) Cytotechnology 15: 103-109参照)、拡張式バッチプロセスまたは灌流培養を利用して、組換え形質転換された哺乳類宿主細胞はウシ胎児血清(FCS)などの血清含有

40

50

培地で培養してもよいが、このような宿主細胞はKeen, et al. (1995) Cytotechnology 17: 153-163に開示されているものなどの合成血清不含培地、またはProCHO-CDMもしくはUltraCHO(商標)(Cambrex NJ, USA)などの市販の培地で、必要に応じてグルコースなどのエネルギー源および組換えインスリンなどの合成増殖因子を添加して培養される。宿主細胞を血清不含培養するには、これらの細胞が血清不含条件での増殖に順応していることが必要な場合がある。1つの順応方法は、このような宿主細胞を血清含有培地で培養し、培養培地の80%を血清不含培地と繰り返し交換して、宿主細胞に血清不含条件に順応することを学習させることである(例えば、Scharfenberg, et al. (1995), Animal Cell Technology: Developments towards the 21st century (Beuvery, et al. 編, 619-623, Kluwer Academic publishers参照)。

10

【0260】

培地に分泌される抗原結合タンパク質を回収し、種々の技術を用いて精製し、意図する使用に適した精製度を得ることができる。例えば、ヒト患者を治療するための抗原結合タンパク質の使用には、一般に、(未精製培養培地と比較して)少なくとも95%の純度、より一般には98%または99%より大きな純度が必要である。培養培地からの細胞残渣は一般に、遠心分離とその後の、例え精密濾過、限外濾過および/または深層濾過を用いた上清の清澄化工程を用いて除去される。透析、ならびにゲル電気泳動、ならびにヒドロキシアパタイト(HA)、アフィニティークロマトグラフィー(所望によりポリヒスチジンなどのアフィニータグ化システムを含む)および/または疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC、米国特許第5429746号参照)などのクロマトグラフィー技術といった種々の他の方法が利用可能である。抗体は、種々の清澄化工程の後に、Aタンパク質またはGタンパク質アフィニティークロマトグラフィーを用いて捕捉することができる。その後、イオン交換クロマトグラフィーおよび/またはHAクロマトグラフィー、陰イオンもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ除外クロマトグラフィー、および硫酸アンモニウム沈降などのさらなるクロマトグラフィー工程を行うことができる。また、種々のウイルス除去工程(例えば、DV-20フィルターを用いるナノ濾過)も利用可能である。これらの種々の工程の後に、少なくとも75mg/ml以上、または100mg/ml以上の本抗原結合タンパク質を含んでなる精製(例えば、モノクローナル)調製物が得られる。このような調製物は、実質的には、抗原結合タンパク質の凝集形態を実質的に含まない。

20

30

【0261】

細菌系を抗原結合フラグメントの発現のために用いてもよい。このようなフラグメントは細胞内の周辺質内に局在させることもできるし、または細胞外に分泌させることもできる。不溶性タンパク質を抽出し、当業者に公知の方法(Sanchez, et al. (1999) J. Biotechnol. 72: 13-20;およびCupit, et al. (1999) Lett Appl Microbiol 29: 273-277参照)に従って、再折り畳みにより活性なタンパク質を形成させることができる。

【0262】

脱アミド化は、アミド官能基が除去される化学反応である。生化学では、この反応は、アミノ酸のアスパラギンおよびグルタミンのアミド含有側鎖に傷害を与えるので、タンパク質の分解において重要である。脱アミド化反応は、タンパク質の有効寿命を制限することができる因子の1つであると考えられ、治療用タンパク質の製造中に最もよく起こる翻訳後修飾の1つでもある。例えば、組換えヒトDNアーゼおよび組換え可溶性CD4ではin vitroまたはin vivo生物活性の低下または喪失が報告されているが、他の組換えタンパク質は影響を受けないと思われる。本明細書に記載の抗原結合タンパク質のHER3との結合能は、de脱アミド化を誘導するストレス条件下では影響を受けないものと思われる。よって、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の生物活性、およびそれらの有効寿命が脱アミド化によって影響を受けるとは考えにくい。

40

【0263】

医薬組成物

本明細書に記載の抗原結合タンパク質の精製調製物を、本明細書に記載のヒト疾患、障

50

害および症状の治療に用いる医薬組成物に配合してもよい。「疾患」、「障害」および「病態」という用語は本明細書では互換的に使用される。該医薬組成物は、HER3受容体が疾患に関与する場合、またはHER3受容体活性の中和が有益となる場合に、疾患の治療に使用することができる。治療上有効な量の明細書に記載の抗原結合タンパク質を含んでなる医薬組成物は、HER3受容体の中和に応答する疾患の治療に使用することができる。

【0264】

該医薬製剤は、抗原結合タンパク質を薬学上許容される担体と組み合わせて含んでなり得る。本抗原結合タンパク質は、単独で投与しても医薬組成物の一部として投与してもよい。

10

【0265】

一般に、このような組成物は、許容される製薬実務によって既知かつ要求される薬学上許容される担体を含んでなる。例えば、REMINGTONS PHARMACEUTICAL SCIENCES, 第16版 (1980) Mack Publishing Co. 参照。このような担体の例としては、所望により好適なバッファーで5~8の範囲内のpHに緩衝された生理食塩水、リンゲル液またはブドウ糖液などの無菌担体が挙げられる。

【0266】

医薬組成物は、注射または持続注入（例えば、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内または門脈内）により投与され得る。このような医薬組成物は目に見える粒状物質を含まないのが好適である。医薬組成物は1mg~10gの間の抗原結合タンパク質、例えば、5mg~1gの間の抗原結合タンパク質を含んでなり得る。あるいは、該組成物は、5mg~500mgの間、例えば、5mg~50mgの間の抗原結合タンパク質を含んでなり得る。

20

【0267】

このような医薬組成物の調製方法は当業者に周知である。医薬組成物は、単位投与形に1mg~10gの間の抗原結合タンパク質を、場合により使用説明書とともに含んでなり得る。医薬組成物は、当業者に周知または自明の方法に従って、投与前に再組成するために凍結乾燥（フリーズドライ）してもよい。抗体がIgG1アイソタイプを有する場合、このアイソタイプの抗体の銅媒介性分解の程度を軽減するために、医薬組成物にクエン酸塩（例えば、クエン酸ナトリウム）またはEDTAまたはヒスチジンなどの銅のキレート剤を加えてもよい。EP0612251参照。医薬組成物はまた、アルギニン塩基などの可溶化剤、ポリソルベート80などの界面活性剤/抗凝集剤、およびバイアルヘッドスペースの酸素を置換するための窒素などの不活性ガスを含んでもよい。

30

【0268】

本抗原結合タンパク質を投与するための有効量および治療計画は一般に、経験的に決定され、患者の年齢、体重および健康状態、ならびに治療される疾患または障害などの因子に依存すると考えられる。このような因子は担当医の裁量の範囲内である。適切な用量を選択する指針は例えばSmith, et al. (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New Yorkに見出すことができる。

【0269】

被験体に投与される抗原結合タンパク質の用量は一般に1μg/kg~150mg/kgの間、0.1mg/kg~100mg/kgの間、0.5mg/kg~50mg/kgの間、1~25mg/kgの間または1~10mg/kg（被験体体重）の間である。例えば、用量は10mg/kg、30mg/kgまたは60mg/kgであり得る。用量はまた、10mg/kg~110mg/kg、15mg/kg~25mg/kgまたは15mg/kg~100mg/kgであり得る。本抗原結合タンパク質は、例えば、非経口、皮下、静脈内または筋肉内投与され得る。用量はこれらの用量範囲の任意の個々の部分範囲であってもよい。

40

【0270】

所望により、治療組成物の有効一日用量は、1日のうち適当な間隔で2回、3回、4回

50

、5回、6回またはそれを越える分割用量として個別に、所望により単位投与形で投与してもよい。

【0271】

用量の投与は、2～24時間、例えば2～12時間または2～6時間にわたる緩慢な持続的注入によってもよい。このような投与は毒性副作用の軽減をもたらし得る。

【0272】

用量の投与は必要に応じて1回以上、例えば、1日3回、毎日1回、2日毎に1回、1週間毎に1回、2週間毎に1回、1か月毎に1回、3か月毎に1回、6か月毎に1回、または12か月毎に1回繰り返してよい。本抗原結合タンパク質は、維持療法により、例えば、1週間毎に1回、6ヶ月間以上の期間、投与してもよい。本抗原結合タンパク質は、間欠療法により、例えば、3～6か月の期間投与し、その後、3～6か月間は投与せず、その後、再び3～6ヶ月間抗原結合タンパク質を投与するなどの周期で投与してもよい。

10

【0273】

例えば、用量は、14日または28日毎に1回、各投与日に複数回の部分用量の形態で皮下に投与することができる。

【0274】

用量は、抗HER3抗原結合タンパク質を標的とする抗イディオタイプ抗体を用い、生体サンプルにおいて、投与後の循環抗HER3抗原結合タンパク質の量を測定することによって決定または調節することができる。本抗原結合タンパク質は、被験体においてHER3活性をダウンレギュレートするのに効果的な量および期間で投与することができる。

20

【0275】

本抗原結合タンパク質は、特定の部位への標的療法に関してこのようにして被験体に投与することができる。例えば、本抗原結合タンパク質は、筋肉、例えば、骨格筋に局所注射することができる。

【0276】

本抗原結合タンパク質は、1以上の他の治療上有効な薬剤、例えば、他の受容体チロシンキナーゼ（限定されるものではないが、他のHERファミリーメンバーなど）、c-Met、GF-1Rの抗体もしくは小分子阻害剤、受容体リガンド（血管内皮増殖因子（VEGF）など）、細胞傷害性薬剤（ドキソルビシン、シスプラチンまたはカルボプラチンなど）、サイトカインまたは抗悪性腫瘍薬と併用することができる。後者の例としては、限定されるものではないが、抗体または免疫調節タンパク質、小分子阻害剤、または化学療法薬（有糸分裂阻害剤、キナーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、インターカレート抗生物質、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、抗生存剤、生物反応修飾物質、抗ホルモン剤、例えば、抗アンドロゲン剤および抗血管新生剤の群から選択される）が挙げられる。抗新生物因子が放射線である場合、治療は内部源（近接照射療法BT）または外部源（外部照射療法EBRT）のいずれかを用いて行うことができる。本開示の抗体は、本明細書またはその全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされるWO2007/077028に記載されるように、化学結合、疎水性相互作用、静電的相互作用などを含む任意のタイプの機構によって化学療法薬または放射性同位元素にコンジュゲートさせることができる。

30

40

【0277】

本開示の抗体は、本明細書に記載の疾患の治療において他の治療上有効な薬剤と併用することができる。このような組合せはHER3受容体が疾患に関与する場合、またはHER3受容体の中和が有益となる場合の疾患の治療に用いることができる。

【0278】

本抗原結合タンパク質が他の治療上有効な薬剤と併用される場合、個々の成分は一緒にまたは別個に、逐次にまたは同時に、別個のまたは組み合わせた医薬処方物で、都合のよい任意の経路で投与することができる。別個にまたは逐次に投与される場合、本抗原結合タンパク質と治療上有効な薬剤は任意の順序で投与することができる。

【0279】

50

上記でいう組合せは、上記で定義される組合せを所望により薬学上許容される担体または賦形剤とともに含んでなる単一の医薬処方物の形態で用いるために提供され得るものである。このような薬学上許容される担体または賦形剤は当技術分野で周知であり、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされるWO 2007 / 077028に開示されているものが含まれる。さらに、その中に確認される他のいずれの参考文献も、引用することによりその全開示が本開示の一部とされる。

【0280】

同じ処方物中に組み合わせる場合には、当然のことながら、これらの成分は安定でかつ、互いに、また、その処方物の他の成分と適合しなければならず、投与向けに処方されてよい。別個に処方する場合には、それらは任意の便宜な処方物で、例えば、当技術分野で抗原結合タンパク質に関して知られているような様式で提供され得る。

10

【0281】

同じ疾患に対して有効な第2の治療薬と組み合わせる場合、各成分の用量は、その本抗原結合タンパク質が単独で用いられる場合の用量とは異なり得る。適当な用量は当業者ならば容易に認識できる。

【0282】

本抗原結合タンパク質と治療上有効な薬剤は相乗作用を示し得る。言い換えれば、本抗原結合タンパク質と治療上有効な薬剤を併用投与すると、本明細書に記載の疾患、障害または病態に対して各単独の作用の総和よりも大きな作用を示す。

【0283】

本明細書において「有効量」とは、例えば研究者または臨床医が求めている組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する薬物または医薬剤の量を意味する。医薬剤は2つ以上の生物学的または医学的応答を誘発する場合もある。さらに、「治療上有効な量」とは、そのような量を受容していない対応する被験体に比べて、限定されるものではないが、疾患、障害もしくは副作用の治療、予防もしくは改善、または疾患もしくは障害の進行速度の緩徐化をもたらす任意の量を意味する。この用語はまた、その範囲内に、通常の生理学的機能を増進するのに有効な量、ならびに患者において第2の医薬剤の治療効果を増進または補助する生理学的機能をもたらすに有効な量も含む。

20

【0284】

本明細書において「癌」、「新生物」および「腫瘍」は互換的に用いられ、単数形でも複数形でも、宿主生物に対して病的となる悪性転換を受けた細胞を意味する。原発性癌細胞（すなわち、悪性転換部位の近傍から得られる細胞）は、十分確立された技術、特に、組織検査によって非癌性細胞から容易に識別することができる。本明細書において癌細胞の定義には、原発性癌細胞だけではなく、始原癌細胞に由来するいずれの細胞も含む。これには転移性癌細胞、ならびに癌細胞に由来するin vitro培養物および細胞系統が含まれる。通常固形腫瘍として顕在化するタイプの癌に関して、「臨床上検知可能な」腫瘍とは、例えばCATスキャン、MR撮像法、X線、超音波もしくは触診などの手法により腫瘍塊に基づいて検出可能なもの、および/または患者から得られるサンプルにおける1以上の癌特異的抗原の発現のために検知可能なものである。腫瘍は造血系腫瘍、例えば血液細胞の腫瘍（液性腫瘍を意味する）であってもよい。このような腫瘍に基づく臨床病態の具体例としては、慢性骨髄球性白血病または急性骨髄球性白血病などの白血病；多発性骨髄腫などの骨髄腫；リンパ腫などが挙げられる。

30

40

【0285】

本明細書において「治療すること」およびその文法的変形は、治療的療法を意味する。特定の病態に関して、治療するとは、（1）その病態の1以上の生物学的顕在化の状態を改善すること、（2）（a）その病態に至る、もしくはその病態の一因となる生物学的カスケードの1以上の点、または（b）その病態の1以上の生物学的顕在化を妨げること、（3）その病態またはその治療に関連する1以上の症状、効果もしくは副作用を緩和すること、（4）その病態もしくはその病態の1以上の生物学的顕在化の進行を緩徐化すること、または（5）その病態の1以上の生物学的顕在化の発生を回避することを意味する。

50

予防的療法も意図される療法である。当業者ならば、「回避」が絶対的な用語ではないことが分かるであろう。医学では、「回避」は、病態もしくはその生物学的顕在化の確率もしくは重篤度を実質的に引き下げるため、またはそのような病態またはその生物学的顕在化の発生を遅延させるための薬物の予防的投与を意味するものと理解される。予防的療法は、例えば、被験体が癌を発症するリスクが高いと考えられる場合、例えば、被験体が癌の強い家族歴を有する場合、または被験体が発癌物質に曝されていた場合に適当である。

【0286】

本開示の方法では、抗原結合タンパク質は「併用投与」することができ、これは、本明細書に記載の抗原結合タンパク質と、化学療法および放射線療法を含めた、癌の治療に有用であることが知られているさらなる1種または複数の有効成分との同時投与または任意の様式の個別逐次投与のいずれかを意味する。本明細書においてさらなる1種または複数の有効成分とは、癌または関節炎の治療を必要とする患者に投与した際に有利な特性が知られている、または示す任意の化合物または治療薬を含む。好ましくは、投与が同時でなければ、これらの化合物は互いに近接した時間に投与される。さらに、これらの化合物が同じ投与形で投与されるならば問題はなく、例えば、ある化合物を局所投与し、別の化合物を経口投与してもよい。

【0287】

一般に、治療対象の感受性腫瘍に対して活性を持つ任意の抗新生物薬を本開示の癌の治療において併用投与してもよい。このような薬剤の例は、Cancer Principles and Practice of Oncology, V.T. Devita and S. Hellman(編), 第6版(February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishersに見出すことができる。当業者ならば、薬物の特定の特徴および関連する癌に基づいて、薬物のどの組合せが有用であることを認識することができるであろう。本開示において有用な典型的な抗新生物薬としては、限定されるものではないが、ジテルベノイドおよびピンカアルカロイドなどの抗微小管剤；プラチナ錯体；ナイトロジェンマスタード、オキサアザホスホリン、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素およびトリアゼンなどのアルキル化剤；アントラサイクリン、アクチノマイシンおよびブレオマイシンなどの抗生物質；エピポドフィロトキシンなどのトポイソメラーゼII阻害剤；プリンおよびピリミジン類似体、ならびに葉酸拮抗化合物などの代謝拮抗物質；カンブトテシンなどのトポイソメラーゼI阻害剤；ホルモンおよびホルモン類似体；シグナル伝達経路阻害剤；非受容体チロシンキナーゼ血管新生阻害剤；免疫治療薬；アポトーシス誘導薬；および細胞周期シグナル伝達阻害剤が挙げられる。

【0288】

本開示の抗原結合タンパク質と併用するため、または併用投与される、さらなる1種または複数の有効成分（抗新生物薬）は、化学療法薬である。組成物中で、または治療方法における併用投与により本開示の抗原結合タンパク質と組み合わせることができるこのような化学療法薬およびその他のカテゴリーの治療薬を以下に記載する。

【0289】

抗微小管剤または抗有糸分裂剤は、細胞周期のM基または有糸分裂基における腫瘍細胞の微小管に対して活性な細胞周期特異的薬剤である。抗微小管剤の例としては、限定されるものではないが、ジテルベノイドおよびピンカアルカロイドが挙げられる。

【0290】

天然源に由来するジテルベノイドは、細胞周期のG₂/M基において働く細胞周期特異的抗癌剤である。ジテルベノイドは微小管の α -チューブリンサブユニットと結合することにより、このタンパク質を安定化させると考えられている。そして、このタンパク質の解離が阻害され、有糸分裂が中断され、細胞死に至ると思われる。ジテルベノイドの例としては、限定されるものではないが、パクリタキセルおよびその類似体ドセタキセルが挙げられる。

【0291】

パクリタキセル、すなわち、(2R, 3S) - N - ベンゾイル - 3 - フェニルイソセリンとの5, 20 - エポキシ - 1, 2, 4, 7, 10, 13 - ヘキサ - ヒドロキ

10

20

30

40

50

シタクス - 11 - エン - 9 - オン 4 , 10 - ジアセテート 2 - ベンゾエート 13 - エステルは、タイヘイヨウイチイ(Taxus brevifolia)の木から単離された天然ジテルペン産物であり、注射溶液タキソール(TAXOL) (商標)として市販されている。パクリタキセルは、テルペン類のタキサンファミリーのメンバーである。パクリタキセルは1971年にWani et al.(J. Am. Chem. Soc., 93:2325. 1971)により初めて単離され、化学的方法およびX線結晶学的方法によってその構造が同定された。その活性の1つの機構は、パクリタキセルの、チューブリンと結合して、それにより癌細胞の増殖を阻害する能力に関連する。Schiff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1561-1565 (1980); Schiff et al., Nature, 277:665-667 (1979); Kumar, J. Biol. Chem, 256: 10435-10441 (1981)。数種のパクリタキセル誘導体の合成および抗癌活性に関する総説としては、D. G. I. Kingston et al., Studies in Organic Chemistry vol. 26, "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P.W. Le Quesne編, (Elsevier, Amsterdam, 1986) pp 219-235を参照。

【0292】

パクリタキセルは、米国では、難治性卵巣癌の治療(Markman et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intern. Med., 111:273, 1989)における臨床使用および乳癌治療に関して(Holmes et al., J. Nat. Cancer Inst., 83:1797, 1991)が承認されている。パクリタキセルは皮膚の新生物(Einzig et. al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46)および頭頸部癌(Forastiere et. al., Sem. Oncol., 20:56, 1990)の治療にも可能性のある候補である。この化合物はまた、多嚢胞性腎疾患(Woo et. al., Nature, 368:750. 1994)、肺癌およびマラリアの治療にも可能性を示す。パクリタキセルによる患者の処置は、閾値濃度(50 nM)(Kearns, C.M. et. al., Seminars in Oncology, 3(6) p.16-23, 1995)を上回る投与期間と関連して、骨髄抑制をもたらす(multiple cell lineages, Ignoff, R.J. et. al, Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998)。

【0293】

ドセタキセル、すなわち、5 - 20 - エポキシ - 1 , 2 , 4 , 7 , 10 , 13 - ヘキサヒドロキシタクス - 11 - エン - 9 - オン 4 - アセテート 2 - ベンゾエートとの(2R, 3S) - N - カルボキシ - 3 - フェニルイソセリン, N - tert - ブチルエステル, 13 - エステル三水和物は、注射溶液としてのタキソテル(TAXOTERE) (商標)として市販されている。ドセタキセルは、乳癌治療に指示される。ドセタキセルは、パクリタキセル(q.v.)の半合成誘導体であり、ヨーロッパイチイの木の新葉から抽出される天然前駆体10 - デアセチル - バッカチンIIIを用いて製造される。ドセタキセルの用量制限毒性は、好中球減少である。

【0294】

ビンカルカロイドは、ツルニチニチソウ植物に由来する細胞周期特異的抗新生物剤である。ビンカルカロイドは、チューブリンに特異的に結合することにより細胞周期のM期(有糸分裂期)に作用する。結果的に、結合されたチューブリン分子は、重合して微小管となることができない。有糸分裂が分裂中期で中断され、細胞死に至ると考えられている。ビンカルカロイドの例としては、限定されるものではないが、ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビノレルビンが挙げられる。

【0295】

ビンブラスチン、すなわち、硫酸ビンカロイコブラスチンは、注射溶液としてのVELBAN (商標)として市販されている。ビンブラスチンは様々な固形腫瘍の第二選択療法としての適用の可能性を持つが、主として精巣癌、およびホジキン病を含む様々なリンパ腫、ならびにリンパ球性および組織球性リンパ腫の治療において指示される。骨髄抑制が、ビンブラスチンの用量制限副作用である。

【0296】

ビンクリスチン、すなわち、ビンカロイコブラスチン, 22 - オキソ - 硫酸塩は、注射溶液としてのオンコビン(ONCOVIN) (商標)として市販されている。ビンクリスチンは、

急性白血病の治療に指示され、ホジキンおよび非ホジキン悪性リンパ腫に対する治療計画での使用も見出せる。脱毛および神経作用がビンクリスチンの最も一般的な副作用であり、また、程度は低い、骨髄抑制および消化管粘膜炎症作用も生じる。

【0297】

酒石酸ビンORELBINの注射溶液（ナBELBIN (NAVELBINE)（商標））として市販されているビンORELBIN、すなわち、3', 4'-ジDEヒドロ-4'-DEオキシ-C'-ノルBINカLOイコプラスチン[$R - (R^*, R^*) - 2, 3$ -ジヒドロキシブタンジオエート（1:2）（塩）]は、半合成BINカアルカロイドである。ビンORELBINは、様々な固形腫瘍、特に非小細胞肺癌、進行性乳癌およびホルモン不応性前立腺癌の治療において、単剤として、またはシスプラチンなどの他の化学療法薬と組み合わせて指示される。骨髄抑制がビンORELBINの最も一般的な用量制限副作用である。

10

【0298】

白金錯体は、非細胞周期特異的抗癌剤であり、DNAとの相互作用性がある。この白金錯体は腫瘍細胞に侵入し、アクア化を受け、DNAと鎖内および鎖間の架橋を形成して、腫瘍に有害な生物学的作用を引き起こす。白金錯体の例としては、限定されるものではないが、シスプラチンおよびカルボプラチンが挙げられる。

【0299】

シスプラチン、シス-ジアンミンジクロロ白金は、注射溶液としてのプラチノール (PLATINOL)（商標）として市販されている。シスプラチンは、主に転移性精巣癌および卵巣癌および進行性膀胱癌の治療において指示される。シスプラチンの主な用量制限副作用は腎毒性（水分補給と利尿により管理可能）および内耳神経毒性である。

20

【0300】

カルボプラチン、すなわち、白金，ジアミン[1, 1-シクロブタン-ジカルボキシレート（2-）-O, O']は、注射溶液としてのパラプラチン (PARAPLATIN)（商標）として市販されている。カルボプラチンは、主に進行性卵巣癌の第一選択治療および第二選択治療において指示される。骨髄抑制が、カルボプラチンの用量制限毒性である。

【0301】

アルキル化剤は、非細胞周期特異的抗癌剤であり、強力な求電子物質である。一般に、アルキル化剤は、アルキル化によって、ホスフェート、アミノ、スルフヒドリル、ヒドロキシル、カルボキシルおよびイミダゾール基などのDNA分子の求核部分を介してDNAと共有結合を形成する。このようなアルキル化は核酸機能を破壊し、細胞死に至らせる。アルキル化剤の例としては、限定されるものではないが、シクロホスファミド、メルファランおよびクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード類；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル類；カルムスチンなどのニトロソ尿素類；ならびにダカルバジンなどのトリアゼン類が挙げられる。

30

【0302】

シクロホスファミド、すなわち、2-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]テトラヒドロ-2H-1, 3, 2-オキサザホスホリン2-オキシド-水和物は、注射溶液または錠剤としてのシトキサン (CYTOXAN)（商標）として市販されている。シクロホスファミドは、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫および白血病の治療において、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて指示される。脱毛、悪心、嘔吐および白血球減少が、シクロホスファミドの最も一般的な用量制限副作用である。

40

【0303】

メルファラン、すなわち、4-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-L-フェニアラニンは、注射溶液または錠剤としてのアルケラン (ALKERAN)（商標）として市販されている。メルファランは、多発性骨髄腫および卵巣の切除不能上皮癌の待期療法として指示される。骨髄抑制が、メルファランの最も一般的な用量制限副作用である。

【0304】

クロラムブシル、すなわち、4-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]ベンゼンブタン酸は、リユーケラン (LEUKERAN)（商標）錠剤として市販されている。クロラムブシルは、

50

慢性リンパ性白血病、ならびに悪性リンパ腫（リンパ肉腫、巨大濾胞性リンパ腫およびホジキン病など）の待期療法として指示される。骨髄抑制が、クロラムブシルの最も一般的な用量制限副作用である。

【0305】

ブスルファン、すなわち、1, 4 - ブタンジオールジメタンスルホネートは、ミレラン (MYLERAN) (商標) 錠剤として市販されている。ブスルファンは、慢性骨髄性白血病の待期療法として指示される。骨髄抑制が、ブスルファンの用量制限副作用である。

【0306】

カルムスチン、すなわち、1, 3 - [ビス(2 - クロロエチル) - 1 - ニトロソ]尿素は、凍結乾燥品の単一バイアルとしての B i C N U (商標) として市販されている。カルムスチンは、脳腫瘍、多発性骨髄腫、ホジキン病および非ホジキンリンパ腫の待期療法として、単剤で、または他の薬剤との組み合わせで指示される。遅発性骨髄抑制が、カルムスチンの最も一般的な用量制限副作用である。

10

【0307】

ダカルバジン、すなわち、5 - (3, 3 - ジメチル - 1 - トリアゼノ) - イミダゾール - 4 - カルボキサミドは、単一バイアル品としての D T I C - D o m e (商標) として市販されている。ダカルバジンは、転移性悪性黒色腫の治療に、また、ホジキン病の第二選択治療として他の薬剤と組み合わせで指示される。悪心、嘔吐および食欲不振が、ダカルバジンの最も一般的な用量制限副作用である。

20

【0308】

抗生抗新生物剤は、DNA と結合または相互作用する、非細胞周期特異的薬剤である。一般に、その作用により、安定な DNA 複合体または鎖の破損をもたらし、その核酸の正常な機能を破壊し、細胞死をもたらす。抗生抗新生物剤の例としては、限定されるものではないが、ダクチノマイシンなどのアクチノマイシン類；ダウノルビシンおよびドキソルビシンなどのアントラサイクリン類 (anthracyclins)；ならびにブレオマイシン類が挙げられる。

【0309】

ダクチノマイシンは、アクチノマイシン D としても知られ、注射形態としてのコスメゲン (COSMEGEN) (商標) として市販されている。ダクチノマイシンは、ウィルス腫瘍および横紋筋肉腫の治療に指示される。悪心、嘔吐および食欲不振が、ダクチノマイシンの最も一般的な用量制限副作用である。

30

【0310】

ダウノルビシン、すなわち、(8S - シス -) - 8 - アセチル - 10 - [(3 - アミノ - 2, 3, 6 - トリデオキシ - L - リキソ - ヘキソピラノシル) オキシ] - 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 6, 8, 11 - トリヒドロキシ - 1 - メトキシ - 5, 12 ナフタセンジオン塩酸塩は、リポソーム注射形態としてのダウノキシム (DAUNOXOME) (商標) として、または注射形態としてのセルビジン (CERUBIDINE) (商標) として市販されている。ダウノルビシンは、急性非リンパ性白血病および進行性 HIV 関連カポジ肉腫の治療において緩解誘導のために指示される。骨髄抑制が、ダウノルビシンの最も一般的な用量制限副作用である。

40

【0311】

ドキソルビシン、すなわち、(8S, 10S) - 10 - [(3 - アミノ - 2, 3, 6 - トリデオキシ - L - リキソ - ヘキソピラノシル) オキシ] - 8 - グリコイル, 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 6, 8, 11 - トリヒドロキシ - 1 - メトキシ - 5, 12 ナフタセンジオン塩酸塩は、注射形態としてのルベックス (RUBEX) (商標) またはアドリアマイシン R D F (ADRIAMYCIN RDF) (商標) として市販されている。ドキソルビシンは、主に急性リンパ芽球性白血病および急性骨髄芽球性白血病の治療に指示されるが、いくつかの固形腫瘍およびリンパ腫の治療においても有用な成分である。骨髄抑制が、ドキソルビシンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0312】

50

ブレオマイシン、すなわち、放線菌(*Streptomyces verticillus*)株から単離される細胞傷害性グリコペプチド抗生物質の混合物は、ブレノキサン(BLENOXANE)(商標)として市販されている。ブレオマイシンは、扁平上皮癌、リンパ腫および精巣癌の待期療法として、単剤で、または他の薬剤と組み合わせて指示される。肺および皮膚毒性が、ブレオマイシンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0313】

トポイソメラーゼⅡ阻害剤としては、限定されるものではないが、エピドフィロトキシンが挙げられる。

【0314】

エピドフィロトキシンは、マンドレーク植物に由来する細胞周期特異的抗腫瘍剤である。エピドフィロトキシンは、一般に、トポイソメラーゼⅡおよびDNAと三元複合体を形成してDNA鎖の破損を引き起こすことにより、細胞周期のS期およびG₂期の細胞に影響を及ぼす。これらの鎖の破損が蓄積し、細胞死に至る。エピドフィロトキシンの例としては、限定されるものではないが、エトポシドおよびテニポシドが挙げられる。

10

【0315】

エトポシド、すなわち、4'-デメチル-エピドフィロトキシン9[4,6-0-(R)-エチリデン-D-グルコピラノシド]は、注射溶液またはカプセル剤としてのVepesid(商標)として市販されており、一般にVP-16として知られる。エトポシドは、精巣癌および非小細胞肺癌の治療において、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて指示される。骨髄抑制が、エトポシドの最も一般的な副作用である。白血球減少の発生率が、血小板減少よりも重篤となる傾向がある。

20

【0316】

テニポシド、すなわち、4'-デメチル-エピドフィロトキシン9[4,6-0-(R)-テニリデン-D-グルコピラノシド]は、注射溶液としてのブモン(VUMON)(商標)として市販されており、一般にVM-26として知られる。テニポシドは、小児急性白血病の治療において、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて指示される。骨髄抑制が、テニポシドの最も一般的な用量制限副作用である。テニポシドは、白血球減少と血小板減少の両方を誘発し得る。

【0317】

代謝拮抗新生物剤は、DNA合成を阻害するか、またはプリンもしくはピリミジン塩基の合成を阻害し、それによりDNA合成を制限することによって、細胞周期のS期(DNA合成期)に作用する細胞周期特異的抗新生物剤である。結果として、S期が進行せず、細胞死に至る。代謝拮抗抗新生物剤の例としては、限定されるものではないが、フルオロウラシル、メトトレキサート、シタラビン、メルカプトプリン(mecaptopurine)、チオグアニンおよびゲムシタピンが挙げられる。

30

【0318】

5-フルオロウラシル、すなわち、5-フルオロ-2,4-(1H,3H)ピリミジンジオンは、フルオロウラシルとして市販されている。5-フルオロウラシルの投与はチミジル酸合成の阻害をもたらす、RNAおよびDNAの双方に組み込まれる。その結果、一般に細胞死に至る。5-フルオロウラシルは、乳癌、結腸癌、直腸癌、胃癌および膵臓癌の治療において、単剤として、または他の化学療法薬との組み合わせて指示される。骨髄抑制および粘膜炎が、5-フルオロウラシルの用量制限副作用である。他のフルオロピリミジン類似体として、5-フルオロデオキシウリジン(フロキシウリジン)および5-フルオロデオキシウリジン-リン酸が挙げられる。

40

【0319】

シタラビン、すなわち、4-アミノ-1-D-アラビノフラノシル-2(1H)-ピリミジンは、サイトサル-U(CYTOSAR-U)(商標)として市販されており、一般にAra-Cとして知られる。シタラビンは、成長中のDNA鎖の末端にシタラビンを組み込むことでDNA鎖の伸長を阻害することにより、S期に細胞周期特異性を示すと考えられている。シタラビンは、急性白血病の治療において、単剤として、または他の化学療法

50

薬と組み合わせて指示される。他のシチジン類似体としては、5 - アザシチジンおよび 2', 2' - ジフルオロデキシシチジン (ゲムシタビン) が挙げられる。シタラビンは、白血球減少、血小板減少および粘膜炎を誘発する。

【0320】

メルカプトプリン、すなわち、1, 7 - ジヒドロ - 6 H - プリン - 6 - チオンー水和物は、プリネトール(PURINETHOL) (商標) として市販されている。メルカプトプリンは、詳細は未だ不明の機構により DNA 合成を阻害することで、S 期に細胞周期特異性を示す。メルカプトプリンは、急性白血病の治療において、単剤として、または、他の化学療法薬と組み合わせて指示される。骨髄抑制および消化管粘膜炎が、高用量のメルカプトプリンの予想される副作用である。有用なメルカプトプリン類似体として、アザチオプリンがある。

10

【0321】

チオグアニン、すなわち、2 - アミノ - 1, 7 - ジヒドロ - 6 H - プリン - 6 - チオンは、タブロイド(TABLOID) (商標) として市販されている。チオグアニンは、未だ不明の機構により DNA 合成を阻害することで、S 期に細胞周期特異性を示す。チオグアニンは、急性白血病の治療において、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて指示される。白血球減少、血小板減少および貧血を含む骨髄抑制が、チオグアニン投与の最も一般的な用量制限副作用である。しかしながら、消化管副作用が生じ、用量制限となる場合がある。他のプリン類似体として、ペントスタチン、エリスロヒドロキシノニルアデニン、リン酸フルダラビンおよびクラドリビンが挙げられる。

20

【0322】

ゲムシタビン、すなわち、2' - デオキシ - 2', 2' - ジフルオロシチジンー塩酸塩 (β - イソ型) は、ジェムザール(GEMZAR) (商標) として市販されている。ゲムシタビンは、G1 / S 期の境界で細胞の進行を阻止することで、S 期に細胞周期特異性を示す。ゲムシタビンは、局在型進行性非小細胞肺癌の治療においてシスプラチンと組み合わせて、また、局所的な進行性膵臓癌の処置において単独で指示される。白血球減少、血小板減少および貧血を含む骨髄抑制が、ムシタビン投与の最も一般的な用量制限副作用である。

【0323】

メトトレキサート、すなわち、N - [4 [[(2, 4 - ジアミノ - 6 - プテリジニル) メチル] メチルアミノ] ベンゾイル] - L - グルタミン酸は、メトトレキサートナトリウムとして市販されている。メトトレキサートは、プリンヌクレオチドおよびチミジル酸の合成に必要とされるジヒドロ葉酸 (dihydrofolic acid) レダクターゼの阻害を通じ、DNA 合成、修復および / または複製を阻害することにより S 期に細胞周期特異性を示す。メトトレキサートは、絨毛癌、髄膜白血病、非ホジキンリンパ腫、ならびに乳房、頭部、頸部、卵巣および膀胱の癌腫の治療において、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて指示される。骨髄抑制 (白血球減少、血小板減少および貧血) および粘膜炎が、メトトレキサート投与の予想される副作用である。

30

【0324】

カンプトテシンおよびカンプトテシン誘導体を含むカンプトテシン類は、トポイソメラーゼ I 阻害剤として入手可能であるか、または開発中である。カンプトテシン細胞傷害活性は、そのトポイソメラーゼ I 阻害活性に関連があると考えられている。カンプトテシンの例としては、限定されるものではないが、イリノテカン、トポテカン、および下記の 7 - (4 - メチルピペラジノ - メチレン) - 10, 11 - エチレンジオキシ - 20 - カンプトテシンの様々な光学形態が挙げられる。

40

【0325】

イリノテカン HCl、すなわち、(4 S) - 4, 11 - ジエチル - 4 - ヒドロキシ - 9 - [(4 - ピペリジノピペリジノ) カルボニルオキシ] - 1 H - ピラノ [3', 4', 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 3, 14 (4 H, 12 H) - ジオン塩酸塩は、注射溶液カンプトサル(CAMPTOSAR) (商標) として市販されている。

【0326】

50

イリノテカン、その活性代謝産物 SN-38 とともに、トポイソメラーゼ I-DNA 複合体と結合する、カンプトテシン誘導体である。この細胞傷害性は、トポイソメラーゼ I-DNA:イリノテカン(irintecan)または SN-38 三元複合体と複製酵素との相互作用により生じる回復不能な二本鎖破損の結果として生じると考えられる。イリノテカンは、結腸または直腸の転移癌の治療において指示される。イリノテカン HCl の用量制限副作用は、好中球減少を含む骨髄抑制および下痢を含む GI 作用である。

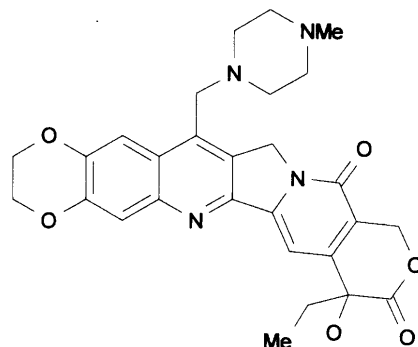
【0327】

トポテカン HCl、すなわち、(S)-10-[(ジメチルアミノ)メチル]-4-エチル-4,9-ジヒドロキシ-1H-ピラノ[3',4',6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-3,14-(4H,12H)-ジオン-塩酸塩は、注射溶液ハイカムチン(HYCAMTIN) (商標)として市販されている。トポテカンは、トポイソメラーゼ I-DNA 複合体と結合するカンプトテシン誘導体であり、DNA 分子のねじれ歪みに応じてトポイソメラーゼ I により生じる一本鎖破損の再連結を抑制する。トポテカンは、卵巣癌および小細胞肺癌の転移癌の第二選択治療として指示される。トポテカン HCl の用量制限副作用は、骨髄抑制、主として好中球減少である。

【0328】

また、現在開発中の下式 A:

【化2】



の、化学名「7-(4-メチルピペラジノ-メチレン)-10,11-エチレンジオキシ-20(R,S)-カンプトテシン(ラセミ混合物)または「7-(4-メチルピペラジノ-メチレン)-10,11-エチレンジオキシ-20(R)カンプトテシン(R鏡像異性体)または「7-(4-メチルピペラジノ-メチレン)-10,11-エチレンジオキシ-20(S)-カンプトテシン(S鏡像異性体)」で知られるラセミ混合物(R,S)型ならびにRおよびS鏡像異性体を含むカンプトテシン誘導体も着目される。このような化合物ならびに関連化合物は、製造方法を含め、米国特許第6,063,923号;同第5,342,947号;同第5,559,235号;同第5,491,237号および1997年11月24日に出願された係属中の米国特許出願第08/977217号に記載されている。

【0329】

ホルモンおよびホルモン類似体は、ホルモンと癌の増殖および/または増殖の欠如との間に関係がある癌を治療するのに有用な化合物である。癌治療で有用なホルモンおよびホルモン類似体の例としては、限定されるものではないが、小児の悪性リンパ腫および急性白血病の治療に有用なプレドニゾンおよびプレドニゾロンなどの副腎皮質ステロイド;アミノグルテチミドおよび他のアロマターゼ阻害剤、例えば、副腎皮質癌およびエストロゲン受容体を含むホルモン依存性乳癌の治療に有用なアナストロゾール、レトロゾール、ボラゾール(vorazole)およびエクセメスタン;プロゲステリン(progestrin)、例えば、ホルモン依存性乳癌および子宮内膜癌の治療に有用な酢酸メゲストロール;エストロゲン、アンドロゲン、および抗アンドロゲン作用薬、例えば、前立腺癌および良性の前立腺肥大の治療に有用なフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、酢酸シプロテロンおよび5-レダクターゼ、例えば、フィナステリドおよびデュタステライド;抗エストロゲン作用薬、

例えば、ホルモン依存性乳癌および他の感受性癌の治療に有用なタモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロキシフェン、ヨードキシフェン、ならびに選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERMS)、例えば米国特許第5,681,835号、同第5,877,219号および同第6,207,716号に記載のもの；ならびに前立腺癌の治療のための黄体形成ホルモン (LH) および / または卵胞刺激ホルモン (FSH) の放出を刺激するゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) およびその類似体、例えば、LHRH促進薬および拮抗薬、例えば酢酸ゴセレリンおよびロイプロリド (luprolide) が挙げられる。

【0330】

シグナル伝達経路阻害剤は、細胞内変化を引き起こす化学的プロセスを遮断または阻害する阻害剤である。本明細書において、この変化は細胞増殖または分化である。本発明に有用なシグナル伝達阻害剤としては、受容体チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、SH2 / SH3ドメイン遮断剤、セリン / トレオニンキナーゼ、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) - 3キナーゼ、ミオイノシトールシグナル伝達、およびRas癌遺伝子の阻害剤が含まれる。

【0331】

いくつかのタンパク質チロシンキナーゼは、細胞増殖の調節に関与する様々なタンパク質の特定のチロシル残基のリン酸化を触媒する。このようなタンパク質チロシンキナーゼは、大きくは受容体または非受容体型キナーゼとして分類することができる。

【0332】

受容体チロシンキナーゼは、細胞外リガンド結合ドメイン、トランスメンブランダンドメインおよびチロシンキナーゼドメインを有するトランスメンブランタンパク質である。受容体チロシンキナーゼは細胞増殖の調節に関与し、一般に増殖因子受容体と呼ばれている。例えば過剰発現または突然変異による、これら多くのキナーゼの不適切または制御を欠いた活性化、すなわち異常なキナーゼ増殖因子受容体活性は、制御を欠いた細胞増殖をもたらすことが示されている。従って、このようなキナーゼの異常な活性は、悪性組織増殖と関連づけられている。結果として、このようなキナーゼの阻害剤は、癌治療法を提供し得る。増殖因子受容体としては、例えば、上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR)、血小板由来増殖因子受容体 (PDGFR)、erbB2、erbB4、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR)、免疫グロブリン様ドメインおよび上皮細胞増殖因子相同ドメインを含むチロシンキナーゼ (TIE-2)、インスリン増殖因子 - I (IGFI) 受容体、マクロファージコロニー刺激因子 (cfms)、BTK、ckit、cmet、線維芽細胞増殖因子 (FGF) 受容体、Trk受容体 (TrkA、TrkBおよびTrkC)、エフリン (eph) 受容体ならびにRET癌原遺伝子が挙げられる。増殖受容体のいくつかの阻害剤が開発中であり、リガンド拮抗剤、抗体、チロシンキナーゼ阻害剤およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。増殖因子受容体および増殖因子受容体機能を阻害する薬剤は、例えば、Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, No. 2(1997年2月); およびLofts, F. J. et al, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, Workman, Paul and Kerr, David編, CRC press 1994, Londonに記載されている。

【0333】

増殖因子受容体キナーゼでないチロシンキナーゼは、非受容体型チロシンキナーゼと呼ばれる。抗癌剤の標的または潜在的標的となる、本発明で用いられる非受容体型チロシンキナーゼには、cSrc、Lck、Fyn、Yes、Jak、cAbl、FAK (接着斑キナーゼ)、ブルトン型チロシンキナーゼ、およびBcr-Ablが挙げられる。このような非受容体型キナーゼおよび非受容体型チロシンキナーゼ機能を阻害する薬剤は、Sinh, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8 (5): 465-80; およびBolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404に記載されている。

【0334】

S H 2 / S H 3 ドメイン遮断剤は、P I 3 - K p 8 5 サブユニット、S r c ファミリーキナーゼ、アダプター分子 (S h c 、 C r k 、 N c k 、 G r b 2) 、および R a s - G A P を含む様々な酵素またはアダプタータンパク質における S H 2 または S H 3 ドメイン結合を乱す薬剤である。抗癌剤の標的としての S H 2 / S H 3 ドメインは、Smithgall, T .E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32に述べられている。

【 0 3 3 5 】

セリン/トレオニンキナーゼの阻害剤としては、R a f キナーゼ (r a f k) 、マイトジェンまたは細胞外調節キナーゼ (Mitogen or Extracellular Regulated Kinase) (M E K) 、および細胞外調節キナーゼ (E R K) の遮断剤も含む M A P キナーゼカスケード遮断剤 ; ならびに P K C (、 、 、 、 μ 、 、 、) の遮断剤を含むタンパク質キナーゼ C ファミリーメンバー遮断剤が挙げられる。I k B キナーゼファミリー (I K K a 、 I K K b) 、P K B ファミリーキナーゼ、a k t キナーゼファミリーメンバーおよび T G F 受容体キナーゼ。このようなセリン/トレオニンキナーゼおよびそれらの阻害剤は、Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P, Samani, A., and Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A., and Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27, Lackey, K. et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; 米国特許第 6 , 2 6 8 , 3 9 1 号 ; および Martinez-lacaci, L. et al, Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52に記載されている。

【 0 3 3 6 】

P I 3 - キナーゼ、A T M 、D N A - P K および K u の遮断剤を含むホスファチジルイノシトール - 3 キナーゼファミリーメンバーの阻害剤もまた本発明において有用であり得る。このようなキナーゼは、Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29 (7):935-8; および Zhong, H. et al, Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545に記載されている。

【 0 3 3 7 】

また、本発明では、ホスホリパーゼ C 遮断剤およびミオイノシトール類似体などのミオイノシトールシグナル伝達阻害剤も着目される。このようなシグナル伝達阻害剤は、Powis, G., and Kozikowski A., (1994) New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, Paul Workman and David Kerr 編, CRC press 1994, Londonに記載されている。

【 0 3 3 8 】

シグナル伝達経路阻害剤のもう 1 つの群が、R a s 癌遺伝子の阻害剤である。このような阻害剤には、ファルネシルトランスフェラーゼ、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼおよび C A A X プロテアーゼの阻害剤、ならびにアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムおよび免疫療法が含まれる。このような阻害剤は、野生型突然変異体 r a s を含む細胞において r a s の活性化を遮断し、それにより抗増殖薬として作用することが示されている。R a s 癌遺伝子の阻害は、Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4) 292-8; Ashby, M.N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99-102; および BioChim. Biophys. Acta, (1989) 1423(3):19-30に記載されている。

【 0 3 3 9 】

受容体キナーゼリガンド結合に対する抗体拮抗剤もまた、シグナル伝達阻害剤として機能し得る。この群のシグナル伝達経路阻害剤は、受容体チロシンキナーゼの細胞外リガンド結合ドメインに対するヒト化抗体の使用を含む。例えば、I m c l o n e C 2 2 5 E G F R 特異的抗体 (Green, M.C. et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4), 269-286参照) ; ハーセプチン (Herceptin) (商標) e r b B 2 抗体 (Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Re

ceptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183参照); ならびに 2 C B V E G F R 2 特異的抗体 (Brekken, R.A. et al, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124参照) が挙げられる。

【0340】

非受容体型キナーゼ血管新生阻害剤もまた、本発明において有用であり得る。血管新生関連 V E G F R および T I E 2 の阻害剤は、シグナル伝達阻害剤について上述されている (両受容体とも、受容体チロシンキナーゼである)。e r b B 2 および E G F R の阻害剤が血管新生、主に V E G F 発現を阻害することが示されているので、血管新生は e r b B 2 / E G F R シグナル伝達と関連する。従って、非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤は、本開示の化合物と併用することができる。例えば、V E G F R (受容体チロシンキナーゼ) を認識しないがリガンドとは結合する抗 V E G F 抗体; 血管新生を阻害するインテグリン ($\alpha_v \beta_3$) の小分子阻害剤; エンドスタチンおよびアンギオスタチン (非 R T K) もまた、開示されている化合物との組合せにおいて有用であることが分かるであろう (Bruns CJ et al (2000), Cancer Res., 60: 2926-2935; Schreiber AB, Winkler ME および Derynck R. (1986), Science, 232: 1250-1253; Yen L et al. (2000), Oncogene 19: 3460-3469参照)。

【0341】

免疫療法計画に用いられる薬剤もまた、本開示の抗原結合化合物との組合せにおいて有用であり得る。免疫応答を生じさせるには、多くの免疫学的戦略が存在する。これらの戦略は一般に腫瘍ワクチン接種の範囲にある。免疫学的アプローチの有効性は、小分子阻害剤を用いたシグナル伝達経路の阻害を組み合わせることで大幅に増強され得る。e r b B 2 / E G F R に対する免疫学的 / 腫瘍ワクチンアプローチに関する考察は、Reilly R T et al. (2000), Cancer Res. 60: 3569-3576; および Chen Y, Hu D, Eling DJ, Robbins J, and Kipps TJ. (1998), Cancer Res. 58: 1965-1971に見出せる。

【0342】

アポトーシス誘導療法で用いられる薬剤 (例えば、b c l - 2 アンチセンスオリゴヌクレオチド) もまた、本発明の組合せにおいて使用可能である。B c l - 2 ファミリータンパク質のメンバーは、アポトーシスを遮断する。従って、b c l - 2 のアップレギュレーションは、化学療法耐性と関連づけられている。研究によれば、上皮細胞増殖因子 (E G F) が b c l - 2 ファミリーの抗アポトーシスメンバー (すなわち、m c l - 1) を刺激することが示された。従って、腫瘍において b c l - 2 の発現をダウンレギュレートするように設計された戦略は臨床的利益が実証され、現在第 I I / I I I 相試験にある (すなわち、ジェンタの G 3 1 3 9 b c l - 2 アンチセンスオリゴヌクレオチド)。b c l - 2 に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド戦略を用いるこのようなアポトーシス誘導戦略は、Water JS et al. (2000), J. Clin. Oncol. 18: 1812-1823; および Kitada S et al. (1994), Antisense Res. Dev. 4: 71-79に述べられている。

【0343】

細胞周期シグナル伝達阻害剤は、細胞周期の制御に関与する分子を阻害する。サイクリン依存性キナーゼ (C D K) と呼ばれるタンパク質キナーゼファミリー、およびそれらのサイクリンと呼ばれるタンパク質ファミリーとの相互作用は、真核生物の細胞周期の進行を制御する。細胞周期の正常な進行には、異なるサイクリン / C D K 複合体の同調的活性化および不活性化が必要である。細胞周期シグナル伝達のいくつかの阻害剤が開発中である。例えば、C D K 2、C D K 4 および C D K 6 を含むサイクリン依存性キナーゼ、およびそれらの阻害剤の例は、例えば Rosania et al, Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(2):215-230に記載されている。さらに、p 2 1 W A F 1 / C I P 1 は、サイクリン依存性キナーゼ (C d k) の強力かつ万能の阻害剤として記載されている (Ball et al., Progress in Cell Cycle Res., 3: 125 (1997))。p 2 1 W A F 1 / C I P 1 の発現を誘導することが知られている化合物は細胞増殖の抑制に関連づけられ、腫瘍抑制活性を有し (Richon et al., Proc. Nat Acad. Sci. U.S.A. 97(18): 10014-10019 (2000))、細胞周期シグ

ナル伝達阻害剤として含められる。ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害剤は、p 21 W A F 1 / C I P 1 の転写活性化に関連づけられ (Vigushin et al., Anticancer Drugs, 13(1): 1-13 (Jan 2002))、本明細書で用いられる好適な細胞周期シグナル伝達阻害剤である。

【0344】

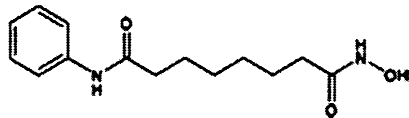
このようなH D A C阻害剤の例としては、以下のものが含まれる。

【0345】

1. ポリノスタット (その薬学上許容される塩を含む)。Marks et al., Nature Biotechnology 25, 84 to 90 (2007); Stenger, Community Oncology 4, 384-386 (2007)。ポリノスタットは以下の化学構造および名称を有する。

10

【化3】



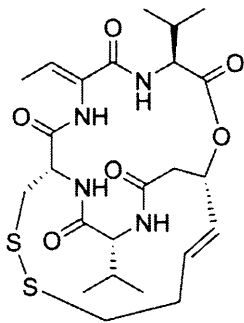
- N - ヒドロキシ - N' - フェニル - オクタンジアミド

【0346】

2. ロミデプシン (その薬学上許容される塩を含む)。Vinodhkumar et al., Biomedicine & Pharmacotherapy 62 (2008) 85-93。ロミデプシンは以下の化学構造および名称を有する。

20

【化4】



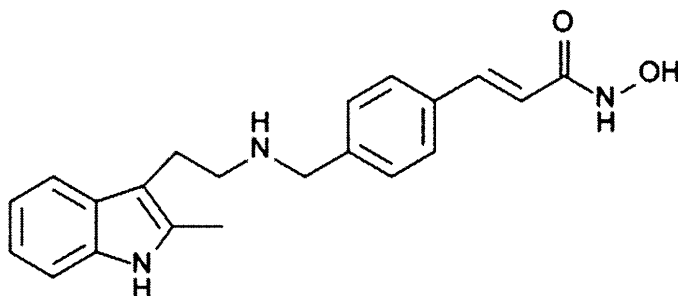
30

- (1S, 4S, 7Z, 10S, 16E, 21R) - 7 - エチリデン - 4, 21 - ジ (プロパン - 2 - イル) - 2 - オキサ - 12, 13 - ジチア - 5, 8, 20, 23 - テトラアザビシクロ [8.7.6] トリコス - 16 - エン - 3, 6, 9, 19, 22 - ペントン

【0347】

3. パノビスタット (その薬学上許容される塩を含む)。Drugs of the Future 32(4): 315-322 (2007)。パノビスタットは以下の化学構造および名称を有する。

【化5】



40

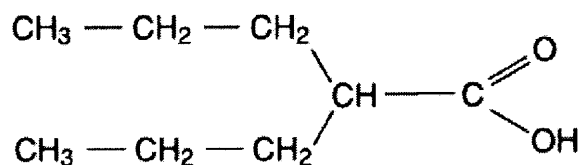
- (2E) - N - ヒドロキシ - 3 - [4 - ({ [2 - (2 - メチル - 1H - インドール - 3 - イル) エチル] アミノ } メチル) フェニル] アクリルアミド

50

【 0 3 4 8 】

4 . パルプロ酸 (その薬学上許容される塩を含む) 。 Gottlicher, et al., EMBO J. 20(24): 6969-6978 (2001)。パルプロ酸は以下の化学構造および名称を有する。

【 化 6 】



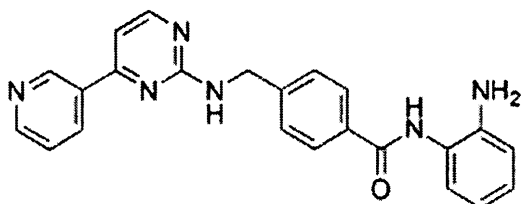
10

2 - プロピルペンタン酸

【 0 3 4 9 】

5 . モセチノスタット (M G C D 0 1 0 3) (その薬学上許容される塩を含む) 。 Balasubramanian et al., Cancer Letters 280: 211-221 (2009)。モセチノスタットは以下の化学構造および名称を有する。

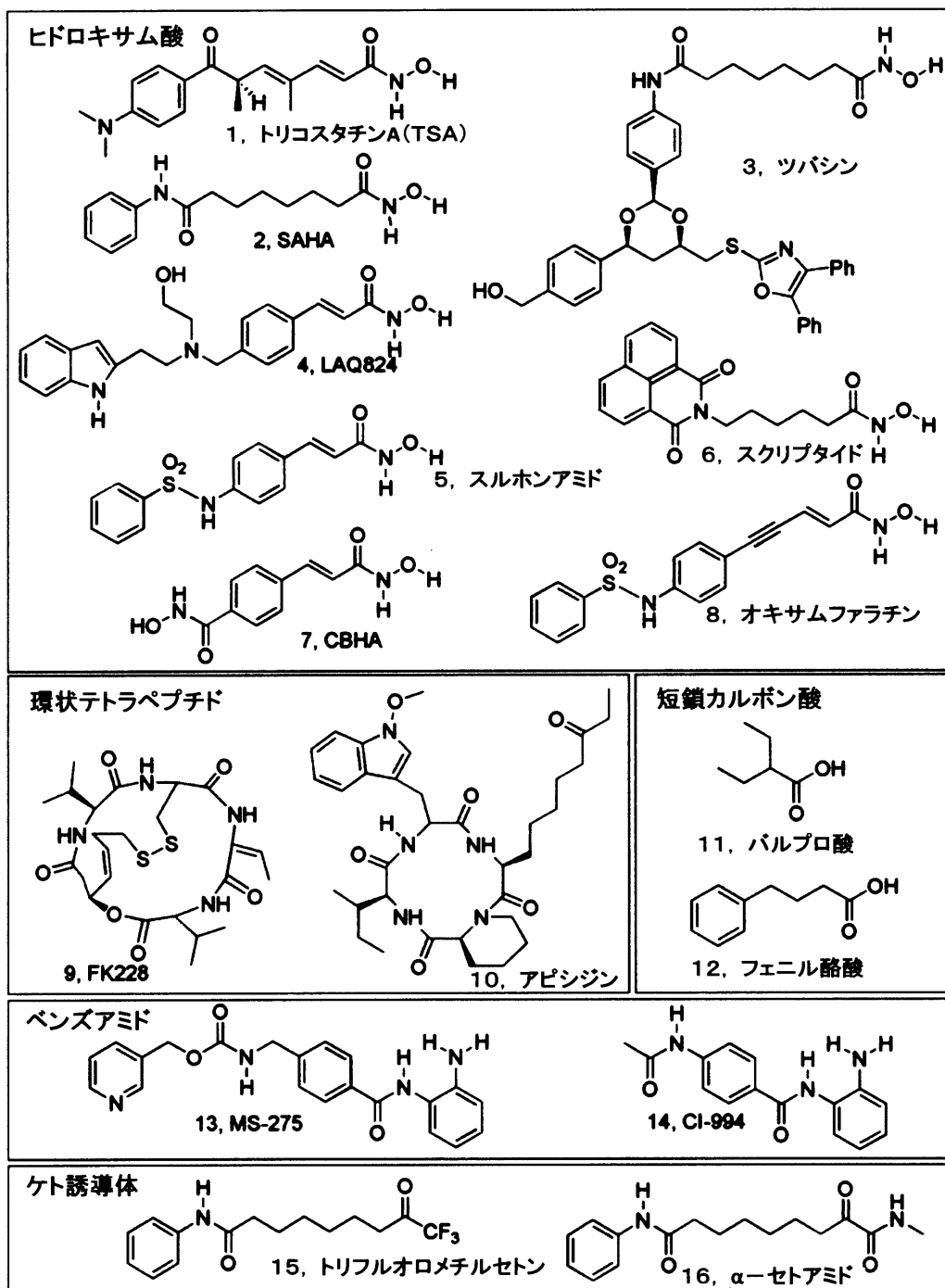
【 化 7 】



20

N - (2 - アミノフェニル) - 4 - [[(4 - ピリジン - 3 - イルピリミジン - 2 - イル) アミノ] メチル] ベンズアミド

【化 8】



【0350】

このようなHDA C阻害剤のさらなる例はBertrand European Journal of Medicinal Chemistry 45, (2010) 2095-2116に含まれ、特に、以下に示されるようなその中の表3の化合物である。

【0351】

本開示の癌治療法はまた、本開示の抗原結合タンパク質および/またはその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物もしくはプロドラッグと、抗微小管剤、白金錯体、アルキル化剤、抗生物質、トポイソメラーゼII阻害剤、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼI阻害剤、ホルモンおよびホルモン類似体、シグナル伝達経路阻害剤、非受容体型チロシンキナーゼ血管新生阻害剤、免疫治療薬、アポトーシス誘導薬および細胞周期シグナル伝達阻害剤からなる群から選択される少なくとも1種類の抗新生物剤との併用投与を含む。本開示の抗原結合タンパク質は、例えば、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部

とされる国際出願第 P C T / J P 2 0 0 5 / 0 1 1 0 8 2 号 (国際出願日 2 0 0 5 年 6 月 1 0 日) ; 国際公開第 W O 2 0 0 5 / 1 2 1 1 4 2 号 (国際公開日 2 0 0 5 年 1 2 月 2 2 日) に開示および特許請求されている、N - { 3 - [3 - シクロプロピル - 5 - (2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニルアミノ) - 6 , 8 - ジメチ (dimethy) - 2 , 4 , 7 - トリオキソ - 3 , 4 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 2 H - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 1 - イル] フェニル } アセトアミド、またはその薬学上許容される塩もしくは溶媒和物 (ジメチルスルホキシド溶媒和物を含む) などの M E K 阻害剤と併用することができる。N - { 3 - [3 - シクロプロピル - 5 - (2 - フルオロ - 4 - ヨード - フェニルアミノ) - 6 , 8 - ジメチ (dimethy) - 2 , 4 , 7 - トリオキソ - 3 , 4 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 2 H - ピリド [4 , 3 - d] ピリミジン - 1 - イル] フェニル } アセトアミドは、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる米国特許出願第 U S 2 0 0 6 / 0 0 1 4 7 6 8 号 (2 0 0 6 年 1 月 1 9 日 公開) に記載されているように製造することができる。本開示の抗原結合タンパク質は、例えば、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる国際出願第 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号 (国際出願日 2 0 0 9 年 5 月 4 日) 開示および特許請求されている、N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドまたはその薬学上許容される塩などの B - R a f 阻害剤と併用することができる。N - { 3 - [5 - (2 - アミノ - 4 - ピリミジニル) - 2 - (1 , 1 - ジメチルエチル) - 1 , 3 - チアゾール - 4 - イル] - 2 - フルオロフェニル } - 2 , 6 - ジフルオロベンゼンスルホンアミドは、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 9 / 0 4 2 6 8 2 号に記載されているように製造することができる。本開示の抗原結合タンパク質は、例えば、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる国際出願第 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 5 3 2 6 9 号 (国際出願日 2 0 0 8 年 2 月 7 日) ; 国際公開第 W O 2 0 0 8 / 0 9 8 1 0 4 号 (国際公開日 2 0 0 8 年 8 月 1 4 日) に開示および特許請求されている、N - { (1 S) - 2 - アミノ - 1 - [(3 , 4 - ジフルオロフェニル) メチル] エチル } - 5 - クロロ - 4 - (4 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) - 2 - フランカルボキサミドまたはその薬学上許容される塩などの A k t 阻害剤と併用することができる。N - { (1 S) - 2 - アミノ - 1 - [(3 , 4 - ジフルオロフェニル) メチル] エチル } - 5 - クロロ - 4 - (4 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) - 2 - フランカルボキサミドは、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 5 3 2 6 9 号に記載されているように製造することができる。本開示の抗原結合タンパク質はまた、例えば、その全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる国際出願第 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 5 3 2 6 9 号 (国際出願日 2 0 0 8 年 2 月 7 日) ; 国際公開第 W O 2 0 0 8 / 0 9 8 1 0 4 (国際公開日 2 0 0 8 年 8 月 1 4 日) に開示および特許請求されている、N - { (1 S) - 2 - アミノ - 1 - [(3 - フルオロフェニル) メチル] エチル } - 5 - クロロ - 4 - (4 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) - 2 - チオフェンカルボキサミドまたはその薬学上許容される塩などの A k t 阻害剤と併用することもできる。N - { (1 S) - 2 - アミノ - 1 - [(3 - フルオロフェニル) メチル] エチル } - 5 - クロロ - 4 - (4 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) - 2 - チオフェンカルボキサミドは実施例 9 6 の化合物であり、国際出願第 P C T / U S 2 0 0 8 / 0 5 3 2 6 9 号に記載されているように製造することができる。N - { (1 S) - 2 - アミノ - 1 - [(3 - フルオロフェニル) メチル] エチル } - 5 - クロロ - 4 - (4 - クロロ - 1 - メチル - 1 H - ピラゾール - 5 - イル) - 2 - チオフェンカルボキサミドは、塩酸塩の形態である。この塩形態は、当業者ならば、国際出願第 P C T / U S 2 0 1 0 / 0 2 2 3 2 3 号 (国際出願日 2 0 1 0 年 1 月 2 8 日) の記載から製造することができる。

【 0 3 5 2 】

パゾパニブは、本開示の抗原結合タンパク質と併用投与が可能な別の組成物である。ボトリエント (VOTRIENT) (商標) として市販されているパゾパニブは、チロシンキナーゼ阻害剤 (T K I) である。パゾパニブは、塩酸塩として提供され、化学名は 5 - [[4 - [

10

20

30

40

50

(2 , 3 - ジメチル - 2 H - インダゾール - 6 - イル) メチルアミノ] - 2 - ピリミジニル] アミノ] - 2 - メチルベンゼンスルホンアミド塩酸塩である。パゾパニブ (Pazopanib) は、進行性腎細胞癌を有する患者の治療に承認されている。

【 0 3 5 3 】

リツキシマブは、本開示の抗原結合タンパク質と併用投与が可能な別の組成物である。リツキシマブは、リツキサン (RITUXAN) (商標) およびマブセラ (MABTHERA) (商標) として販売されているキメラモノクローナル抗体である。リツキシマブは、B 細胞上の CD 20 に結合し、細胞アポトーシスを引き起こす。リツキシマブは静脈投与され、関節リウマチおよび B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療に承認されている。

【 0 3 5 4 】

オフアツムマブは、本開示の抗原結合タンパク質と併用投与が可能な別の組成物である。オフアツムマブは、アルゼラ (ARZERRA) (商標) として販売されている完全ヒトモノクローナル抗体である。オフアツムマブは、B 細胞上の CD 20 に結合し、フルダラビン (フルダラ (Fludara)) およびアレムツズマブ (キャンパス (Campath)) での治療に不応の成人における慢性リンパ球性白血病 (C L L ; 白血球の癌の一種) の治療に用いられる。

【 0 3 5 5 】

m T O R 阻害剤も、本開示の抗原結合タンパク質と併用投与が可能である。m T O R 阻害剤としては、限定されるものではないが、ラパマイシンおよびラパログ、R A D 0 0 1 またはエベロリムス (Afinitor) 、C C I - 7 7 9 またはテムシロリムス、A P 2 3 5 7 3、A Z D 8 0 5 5、W Y E - 3 5 4、W Y E - 6 0 0、W Y E - 6 8 7 および P p 1 2 1 が挙げられる。

【 0 3 5 6 】

ベキサロテンは、本開示の抗原結合タンパク質と併用投与が可能な別の組成物である。ベキサロテンは、ターグレチン (Targretin) (商標) として販売され、レチノイド X 受容体 (R X R) を選択的に活性化するレチノイドのサブクラスのメンバーである。これらのレチノイド受容体は、レチノイン酸受容体 (R A R) とは異なる生物活性を有する。化学名は 4 - [1 - (5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロ - 3 , 5 , 5 , 8 , 8 - ペンタメチル - 2 - ナフタレニル) エテニル] 安息香酸である。ベキサロテンは、少なくとも 1 つの他の薬剤で疾患が上手く治療できない患者において皮膚 T 細胞リンパ腫 (C T C L、皮膚癌の一種) を治療するために用いられる。

【 0 3 5 7 】

ソラフェニブは、本開示の抗原結合タンパク質と併用投与が可能な別の組成物である。ソラフェニブは、ネクサバル (Nexavar) (商標) として市販され、マルチキナーゼ阻害剤と呼ばれる薬剤の一種である。その化学名は 4 - [4 - [[4 - クロロ - 3 - (トリフルオロメチル) フェニル] カルバモイルアミノ] フェノキシ] - N - メチル - ピリジン - 2 - カルボキサミドである。ソラフェニブは、進行性腎細胞癌 (腎臓において発症する癌の一種) を治療するために用いられる。ソラフェニブはまた、切除不能な肝細胞癌 (手術で処置できない肝臓癌の一種) を治療するために用いられる。

【 0 3 5 8 】

本開示は、癌を治療する方法を提供する。開示されている方法で処置される癌は、脳腫瘍 (神経膠腫)、膠芽腫、星状細胞腫、多形性膠芽腫、バナヤン - ゾナナ (Bannayan-Zona na) 症候群、カウデン病、レルミット - デュクロス (Lhermitte-Duclos) 病、乳癌、炎症性乳癌、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、脳室上衣細胞腫、髄芽細胞腫、結腸癌、頭頸部癌、腎臓癌、肺癌、肝臓癌、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、肉腫、骨肉腫、骨巨細胞腫、甲状腺癌、リンパ芽球性 T 細胞白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性好中球性白血病、急性リンパ芽球性 T 細胞白血病、形質細胞腫、免疫芽球性大細胞白血病、マントル細胞白血病、巨核芽球性白血病、多発性骨髄腫、急性巨核球性白血病、前骨髄球性白血病、および赤白血病、悪性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、リンパ芽球性 T 細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、神経芽腫、膀胱癌、尿

10

20

30

40

50

路上皮癌、肺癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、中皮腫、食道癌、唾液腺癌、肝細胞癌、胃癌、鼻咽頭癌、頬粘膜癌、口腔癌、GIST（消化管間質腫瘍）および精巣癌から選択することができる。

【0359】

本開示の方法において前癌状態は、子宮頸上皮内新生物、意義不明単クローン性ガンマグロブリン血症(monoclonal gammopathy of unknown significance) (MGUS)、骨髓異形成症候群、再生不良性貧血、子宮頸病変、皮膚斑（前黒色腫）、前立腺上皮内(intraepithelial)（腺管内）新生物（PIN）、非浸潤性乳管癌（DCIS）、結腸ポリープおよび重症の肝炎または肝硬変であり得る。

【0360】

本医薬組成物は、他の薬剤、所望により使用説明書を伴う本抗原結合タンパク質のパーツキットを含んでなり得る。好都合には、該キットは所定量の試薬を使用説明書とともに含んでなり得る。

【0361】

「個体」、「被験体」および「患者」は本明細書では互換的に用いられる。被験体は一般にヒトである。被験体はまた、マウス、ラットまたは霊長類（例えば、マーモセットまたはサル）などの哺乳類であってもよい。被験体は非ヒト動物であり得る。また、本抗原結合タンパク質には獣医学的用途もある。治療される被験体は、農用動物、例えば、乳牛または非去勢牛(bull)、ヒツジ、ブタ、去勢牛(ox)、ヤギもしくはウマであってもよく、またはイヌもしくはネコなどの飼育動物であってもよい。動物はいずれの年齢であってもよく、または成熟した成体動物であってもよい。被験体がマウス、ラットまたは霊長類などの実験動物である場合、これらの動物には、乳癌、卵巣癌、前立腺癌または膀胱癌に関連する疾患または病態を誘発する処置を施すことができる。

【0362】

処置は治療的、予防的または抑制的であり得る。被験体はそれを必要とする被験体である。処置を必要とする被験体には、将来特定の医学的疾患を発症する可能性のある個体の他、すでにその疾患に罹患している個体を含み得る。

【0363】

よって、本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、予防的または回避的処置に使用することができる。この場合、本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、その疾患の1以上の態様または症状の発症を回避するまたは遅延させるために個体に投与される。被験体は無症候の場合もある。被験体はその疾患に対して遺伝的素因を持つ場合もある。予防上有効な量の本抗原結合タンパク質をこのような個体に投与する。予防上有効な量は、本明細書に記載の疾患の1以上の態様または症状の発症を回避するまたは遅延させる量である。

【0364】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質はまた、療法に使用することができる。本明細書において「療法」とは、疾患の少なくとも1つの態様または症状の緩和、軽減または回避を包含する。例えば、本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、本明細書に記載の疾患の1以上の態様または症状を改善または軽減するために使用することができる。

【0365】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、治療的、予防的または回避的処置に有効な量で用いられる。本明細書に記載の抗原結合タンパク質の治療上有効な量は、疾患の1以上の態様または症状を改善または軽減するのに有効な量である。本明細書に記載の抗原結合タンパク質はまた、本明細書に記載の疾患を治療、回避または治癒するために使用することができる。

【0366】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は被験体の健康に全般的に有益な効果を持ち、例えば、被験体の予想寿命を引き延ばすことができる。

【0367】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、実行可能な処置となるために完全な治癒をも

10

20

30

40

50

たらしたり、またはその疾患の総ての症状または病状発現を根絶したりする必要はない。関連の分野で認識されているように、治療薬として使用される薬物は、所与の病態の重篤度を軽減し得るが、有用な治療薬とみなされるためにその疾患の総ての病状発現を無効にする必要はない。同様に、予防的に投与される処置も、実行可能な予防薬となるために、疾患の発症の予防上、完全に有効である必要はない。単に、疾患の影響を軽減すること（例えば、その症状の数もしくは重篤度を軽減するか、または別の処置の有効性を高めるか、または別の有益な効果を作り出すことによる）または患者において疾患が起こるもしくは悪化する確率を引き下げること（例えば、疾患の発症を遅延させることによる）で十分である。

【 0 3 6 8 】

障害、疾患または病態には、乳癌、卵巣癌、前立腺癌および膀胱癌が含まれる。該疾患は高レベルの H E R 3 に関連し得る。本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、H E R 3 のレベルおよび / または H E R 3 の活性を調整するために使用することができる。

【 0 3 6 9 】

診断的使用方法

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、in vitro または in vivo において診断目的で生体サンプル中の H E R 3 を検出するために使用することができる。例えば、マウスまたはヒト化 1 5 D 5 モノクローナル抗体などの抗 H E R 3 抗原結合タンパク質は、培養細胞、組織または血清において H E R 3 を検出するために使用することができる。組織はヒトまたは動物身体から最初に取り出したもの（例えば、生検）であってもよい。E L I S A 、ウエスタンブロット、免疫組織化学または免疫沈降をはじめとする従来のイムノアッセイを使用することができる。

【 0 3 7 0 】

H E R 3 の存在またはレベルを疾患と相関させることにより、当業者は関連の疾患を診断することができる。さらに、被験体において高レベルの H E R 3 が検出されれば、本明細書に記載の抗原結合タンパク質での処置に応答する患者集団であるという指標となり得る。本明細書に記載の抗原結合タンパク質で処置された被験体において、H E R 3 レベル、機能またはシグナル伝達能の低下が検出されれば、腫瘍サイズの低減という生物学的効果の指標となり得る。

【 0 3 7 1 】

本抗原結合タンパク質は、1 以上の抗原結合タンパク質、検出可能な標識および該キットの使用説明書を含んでなる診断キットで提供することができる。好都合には、該キットは所定量の試薬を使用説明書とともに含んでなり得る。

【 0 3 7 2 】

遺伝子療法

本明細書に記載の抗原結合タンパク質をコードする核酸分子を、それを必要とする被験体に投与することができる。該核酸分子は、適当な足場またはドメイン内の C D R 、可変ドメインまたは全長抗体を発現し得る。該核酸分子は、ヒトまたは動物細胞内での発現を可能とするベクター内に含まれていてよい。該核酸分子またはベクターは、薬学上許容される賦形剤および / または上述のような 1 以上の治療上有効な薬剤とともに投与するために処方することができる。

【 0 3 7 3 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 0 0 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 を有する重鎖配列と、配列番号 1 0 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 2 3 8 を有する軽鎖配列とを含んでなる抗原結合タンパク質である。

【 0 3 7 4 】

本開示はまた、フコシル化グリカンを含んでなる本明細書に記載の抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 3 7 5 】

本開示はまた、フコシル化グリカンが G 0 、 G 2 、 G 0 F 、 G 2 F 、 G 1 、 M a n 5 、

10

20

30

40

50

G 1 F および G 1 F ' からなる群から選択される、本明細書に記載の抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 3 7 6 】

本開示はまた、非フコシル化グリカンを含んでなる本明細書に記載の抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 3 7 7 】

本開示はまた、非フコシル化グリカンが G 0 、 G 2 、 G 1 および M a n 5 からなる群から選択される、本明細書に記載の抗原結合タンパク質を提供する。

【 0 3 7 8 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 0 2 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 を有する重鎖配列と、配列番号 1 0 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 2 3 8 を有する軽鎖配列とを含んでなる抗原結合タンパク質である。

【 0 3 7 9 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 0 0 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 をコードする単離された核酸である。

【 0 3 8 0 】

本開示はまた、配列番号 1 0 1 で示される核酸配列を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 3 8 1 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 0 4 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 2 3 8 をコードする単離された核酸である。

【 0 3 8 2 】

本開示はまた、配列番号 1 0 5 で示される核酸配列を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 3 8 3 】

本開示の別の態様は、配列番号 1 0 2 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基 2 0 ~ 4 6 6 をコードする単離された核酸である。

【 0 3 8 4 】

本開示はまた、配列番号 1 0 3 で示される核酸配列を含んでなる単離された核酸を提供する。

【 0 3 8 5 】

本開示はまた、 - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が存在する、本明細書に記載の組換え宿主細胞を提供する。

【 0 3 8 6 】

本開示はまた、C H O K 1 細胞である本明細書に記載の組換え宿主細胞を提供する。C H O K 1 とは、親 C H O K 1 細胞およびこの親細胞系統に由来する任意の細胞系統の細胞（例えば、遺伝子工学、クローン選択などによる）を含む。

【 0 3 8 7 】

本開示はまた、 - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が不活性化されている、本明細書に記載の組換え宿主細胞を提供する。

【 0 3 8 8 】

本開示はまた、a) 本明細書に記載の抗体重鎖をコードする単離された核酸を含んでなり、かつ、本明細書に記載の抗体軽鎖をコードする単離された核酸含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、 - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする F U T 8 遺伝子が活性状態である）；および b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより本抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法も提供する。

【 0 3 8 9 】

本開示はまた、a) 本明細書に記載の抗体重鎖をコードする単離された核酸を含んでなり、かつ、本明細書に記載の抗体軽鎖をコードする単離された核酸含んでなる発現ベクター

10

20

30

40

50

ーを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程（ここで、該組換え宿主細胞では、 α - 1, 6 - フコシルトランスフェラーゼをコードする FUT8 遺伝子が不活性化されている）；および b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程を含んでなり、それにより本抗原結合タンパク質が生産される、抗原結合タンパク質の生産方法も提供する。

【0390】

本開示はまた、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌、皮膚癌、胃癌および黒色腫からなる群から選択される病態の治療において用いるための本明細書に記載の抗原結合タンパク質を提供する。

【実施例】

【0391】

実施例 1

1. 概要

マウス 1D9 抗体 (M5.1D9.1F5)、マウス 15D5 抗体 (M5.15D5.2A1.1H10)、キメラ 1D9 抗体およびキメラ 15D5 抗体に対して、全長ヒト HER3 細胞外ドメイン (ECD) またはそのサブドメインとの結合に関する BIACORE (商標) 分析を行った。

【0392】

2. 緒論

本実施例の目的は、マウス 1D9 抗体、マウス 15D5 抗体、キメラ 1D9 抗体およびキメラ 15D5 抗体の親和性を測定することであった。

【0393】

3. 方法

3.1. 実験プロトコール

分析は、新しい各チップの調製前にシステムチェックで試験して合格した BIACORE (商標) 2000 装置 (SN# 33-0901-2420 GE Healthcare) を用いて行った。分析は総て、25 で HBS-EP (GE Healthcare BR-1006-69/5mM HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.005% 界面活性剤 P20、pH 7.4) を実行バッファーとして用いて行った。マウスモノクローナル抗体は、第一級アミン化学法 (NHS/EDC で活性化) (GE Healthcare アミンカップリングキット BR-1000-50) によって BIACORE (商標) CM5 チップ (GE Healthcare BR-1000-14) に共有結合させたウサギ抗マウス (RAM) IgG (GE Healthcare BR-1008-38) を用いて分析した。キメラおよびヒト化競合因子モノクローナル抗体は、同様に結合させた抗ヒト Fc 特異的モノクローナル (GE Healthcare BR-1008-39) を用いて分析した。各チップはまた、捕捉試薬抗体が結合されて参照表面でも調製した。動態解析のために、分析物の濃度を変えて複数サイクルの実行に関するセンサーグラムを取得した。1 サイクルは、表面にモノクローナルを捕捉させ、バッファーを流して短時間安定化させた後、所定濃度の分析物 (ECD またはサブドメインタンパク質) を結合させることからなる。表面に結合させるために分析物を注入すると (3~4 分)、曲線の関連部分が得られる。その後バッファーのみを流すと (3~4 分)、解離データが記録できる。その後、このサイクルが終了し、捕捉キットに供給されている再生溶液 (抗ヒト捕捉用の RAM および 3M MgCl₂ の弱酸性溶液) を注入すると、捕捉された抗体 / 分析物が除去されるが、次のサイクルの別のモノクローナルの捕捉を行うこの捕捉抗体の能力には有意な影響を与えない。

【0394】

親和性分析の一般法は次の通りである。まず、チップを調製し、数種類のモノクローナル抗体濃度について捕捉された共鳴単位 (RU) を調べた。その後、動態サイクル、すなわち、モノクローナル抗体をおよそ 100 RU のレベルまで捕捉させ、分析物タンパク質を結合させた後に解離させ、共有結合したタンパク質以外の総てのものを除去するように表面を再生させるということを行った。RAM チップは、捕捉キットに供給されている 1

10

20

30

40

50

0.0 mM グリシン pH 1.7 で再生し、抗ヒトチップは、捕捉キットに供給されている 3 M MgCl₂ で再生した。これらの一連のサイクルを 6 種類の異なる濃度の分析物タンパク質（通常、256 nM、128 nM、64 nM、32 nM、16 nM および 8 nM）で行う。分析物タンパク質の前に数回のバッファーサイクルを行ってサイクルの一貫性を確認し、実験によっては、バッファーサイクルを「二重参照 [.]」として用いる。用いた分析物は、ヒト全長 HER3 細胞外ドメイン（ECD）、ヒト HER3 の細胞外部分の各サブドメイン（D1、D2、D3、D4）または組合せ HER3 ドメインタンパク質（D1 - 2 および D2 - 3）であった。総てのヒト HER3 ECD 分析物を発現させ、標準的な技術を用いて調製した。

【0395】

動態実験サイクルでは、mock 結合表面を参照とし、バッファーの人為要素を排除するために実行した特異的抗体 - 分析物 RU データから差し引いた。いくつかの実行では、動態曲線セットの各濃度に関して分析物を含有するサイクルデータからバッファーのみのサイクルを差し引くことによって二重参照を設定した。得られた曲線データに対し、BIA EVALUATION（商標）ソフトウェア（v. 3.2）を用い、1:1 ラングミュア (Langmuir) モデルへのグローバルフィッティングを行う。

【0396】

3.2. 薬物および材料

本実施例で用いた試薬の一覧の一部は次の通りである。

マウス 1D9 抗体 (4.77 mg/ml)

マウス 15D5 抗体 (4.23 mg/ml)

キメラ 1D9 抗体

キメラ 15D5 抗体

抗体は総て、リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.0 で処方および調製した。

【0397】

4. 結果

各相互作用に関してセンサーグラムを作製した。これらを用い、BIA EVALUATION（商標）ソフトウェアを用いた動態評価を行った。実行パラメーターおよび動態パラメーター（総 KD を含む）を下記の表 5 および表 6 に示す。

【0398】

【表 5】

表 5 マウス 1D9 抗体 (m1D9) およびキメラ 1D9 抗体 (Ch1D9) の親和性

抗体	分析物	k_a (1/M)	k_d (1/Ms)	KD (nM)
m1D9	ECD	3.55×10^5	2.90×10^{-4}	0.82
m1D9	ドメイン 3	2.54×10^6	9.70×10^{-4}	0.38
m1D9	ドメイン 2-3	8.93×10^5	4.21×10^{-4}	0.47
ch1D9	ECD	7.40×10^5	8.11×10^{-4}	1.10
ch1D9	ドメイン 3	4.58×10^6	9.06×10^{-4}	0.20
ECD = 全長ヒト HER3 細胞外ドメイン				
ドメイン # = ヒト HER3 細胞外ドメイン				

【0399】

【表 6】

表6 マウス15D5抗体 (m15D5) およびキメラ15D5抗体 (Ch15D5) の親和性

抗体	分析物	k_a (1/M)	k_d (1/Ms)	KD (nM)
m15D5	ECD	4.12×10^4	9.57×10^{-5}	2.32
m15D5	ドメイン 2	1.76×10^6	1.30×10^{-4}	0.07
m15D5	ドメイン 1-2	3.45×10^5	5.85×10^{-5}	0.17
m15D5	ドメイン 2-3	1.40×10^6	8.16×10^{-5}	0.06
ch15D5	ECD	6.79×10^4	5.89×10^{-5}	0.87
ch15D5	ドメイン 2	3.82×10^6	6.78×10^{-5}	0.02
ECD = 全長ヒト HER3 細胞外ドメイン				
ドメイン # = ヒト HER3 細胞外ドメイン				

10

20

【0400】

5. 考察

モノクローナルマウス1D9抗体およびマウス15D5抗体はヒトHER3細胞外ドメインに対して作製されたものである。マウス1D9抗体は、全長ヒトHER3 ECDおよびヒトHER3 ECDのサブドメイン3に結合する。マウス15D5抗体は、全長ヒトHER3 ECDおよびヒトHER3 ECDのサブドメイン2に結合する。

【0401】

全長ヒトHER3 ECDおよび選択ヒトHER3 ECDサブドメインとの相互作用に関して、総ての抗体のナノモルおよびナノモル未満の親和性が確認された。

【0402】

マウス1D9抗体およびマウス15D5抗体の双方で同様の総親和性(KD)が見られ、マウス1D9抗体はより早い結合速度(k_a)および解離速度(k_d)を持っている。イムノアッセイおよび競合的免疫組織化学(immunocytochemistry)により、マウス15D5抗体は、ヒトHER3 ECDのサブドメイン2、1-2および2-3に結合するが、サブドメイン1、3または4には結合しないことが示された。BIAcore(商標)分析は、これらのHER3 ECD部分(すなわち、ヒトHER3 ECDのサブドメイン2、1-2および2-3)の親和性が、全長ヒトHER3 ECD(サブドメイン1-4)よりも増強されていることを示す。この効果は、サブドメイン2を含有する3種類のヒトHER3 ECDタンパク質構築物(D2、D1-2およびD2-3)の総てで見られ、特定の理論に縛られることを望むものではないが、これは小さいサブドメインタンパク質にあるドメイン2内のエピトープの方がアクセシビリティが大きいためではないかと考えられる。さらに、特定の理論に縛られることを望むものではないが、構造上の問題が、マウス15D5抗体がHER3受容体の開放立体配座により大きな親和性を有する可能性を高くすると考えられる。この開放立体配座は、この受容体がヘレグリンリガンドと結合している時の状態であることが示されている。キメラ15D5抗体およびキメラ1D9抗体は、親マウス1D9抗体およびマウス15D5抗体と同等の親和性を保持している。

30

40

【0403】

実施例 2

X線結晶解析をin silicoモデリングと組み合わせて、マウス1D9抗体およびその変異体の結合面を推定した。また、これらの解析により、マウス1D9抗体で見られた機能

50

の中和への機構的洞察も得られ、合理的抗体成熟の助けとなった。ヒトHER3 ECDのドメインIIIと結合したマウス1D9抗体由来Fabを含んでなる複合体の高分解能(3.0)構造が確定された。このため、ヒトHER3 ECDのドメインIIIおよびマウス1D9抗体をCHO細胞で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーならびにサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。マウス1D9抗体のFabフラグメントは、標準的方法を用いてパパイン切断により作製した。ヒトHER3 ECDのドメインIIIと結合したマウス1D9抗体由来Fabを含んでなる複合体は、1:1.2モル比のマウス1D9抗体由来FabとヒトHER3 ECDのドメインIIIを混合することによって作製した。次に、このタンパク質混合物を濃縮し、ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて結晶化した。アルゴンヌ国立研究所の先端光子源施設でX線回折データを取得した。回折データは、HKL2000ソフトウェア(HKL Research, Inc.)を用いて指数付けとスケーリングを行った。構造はX-PLORプログラムにおける分子置換により決定した。作成された最初の分子置換解に対し、次に、CNSにおける分子動力的精密化とWINGOOプログラムによる再構築を複数回行った。次に、ヒトHER3 ECDのドメインIIIと結合したマウス1D9由来Fabを含んでなる複合体の原子座標ファイルを作成し、得られた構造を解析した。

10

【0404】

この解析から、ヒトHER3 ECDドメインIIIのドメインIII上のエピトープは、配列番号21のアミノ酸残基20~643を含んでなるフラグメントに見出せる配列番号66のIle346、Asn350、Gly351、Asp352、Pro353、Trp354、His355、Lys356、Ile357、Pro358およびAla359を含んでなることが分かった。表7参照。相互作用残基間の接触は表7および図5に記載されている。

20

【0405】

【表 7】

表7 ヒトHER3 ECDのドメインIIIとマウス1D9軽鎖可変領域およびマウス1D9重鎖可変領域とのアミノ酸接触

エピトープ	
ヒトHER3 ECDのドメインIII (配列番号 66; 共結晶化フラグメント) におけるアミノ酸接触 (角括弧内は接触しているパラトープ残基)	
Ile346 (VL CDR3 His98 (93))	
Asn350 [VL フレームワーク 1 Asp1 (1); VL CDR3 Val99 (94); VL CDR3 Pro100 (95); VH CDR2 His59 (58)]	10
Gly351 [VL CDR3 Val99 (94); VH CDR2 His59 (58)]	
Asp352 [VL CDR1 His31 (27D); VL CDR3 Ser97 (92); VL CDR3 Val99 (94); VH CDR2 Tyr57 (56); VH CDR2 His59 (58)]	
Pro353 [VL CDR3 Val99 (94); VL CDR3 Trp101 (96); VH CDR1 Trp33 (33); VH CDR2 Val50 (50); VH CDR2 Tyr57 (56); VH CDR2 His59 (58); VH CDR3 Ala101 (97)]	20
Trp354 [VL CDR1 His31 (27D); VL CDR1 Tyr37 (32); VL CDR3 Gly96 (91); VL CDR3 Trp101 (96); VH CDR3 Leu100 (96); VH CDR3 Ala101 (97); VH CDR3 Gly102 (98); VH CDR3 Thr103 (99)]	
His355 [VL CDR1 His31 (27D), VH CDR1 Ser32 (27E)]	
Lys356 [VH CDR1 Trp33 (33); VH CDR2 Asp52 (52); VH CDR2 Asp55 (54); VH CDR2 Tyr57 (56)]	
Ile357 [VH CDR2 Tyr57 (56); VH CDR2 His59 (58)]	30
Pro358 [VH CDR2 Tyr57 (56); VH CDR2 His59 (58)]	
Ala359 [VH CDR2 His59 (58)]	
パラトープ	
マウス 1D9 (1D9. 1F5) 抗体 VH ドメイン (配列番号 44) および VL ドメイン (配列番号 48) におけるアミノ酸接触 (括弧内は Kabat 定義の符番)	
VL フレームワーク 1: Asp1 (1)	
VL CDR1: His31 (27D), Ser32 (27E), Tyr37 (32)	
VL CDR3: Gly96 (91), Ser97 (92), His98 (93), Val99 (94), Pro100 (95), Trp101 (96)	40
VH CDR1: Trp33 (33)	
VH CDR2: Val50 (50), Asp52 (52), Asp55 (54), Tyr57 (56), His59 (58)	
VH CDR3: Leu100 (96), Ala101 (97), Gly102 (98), Thr103 (99)	

【0406】

特定の理論に縛られることを望むものではないが、この高分解能結晶構造に基づけば、マウス1D9抗体FabフラグメントはヒトHER3 ECDのドメインIIIと排他的に結合し、HER3 ECDの開放立体配座内に存在するヘレグリン結合部位と部分的に

重複するエピトープを覆っていると考えられる。特定の理論に縛られることを望むものではないが、このマウス 1 D 9 抗体 F a b は、閉鎖立体配座にある場合の H E R 3 E C D と結合して、その受容体に二量体形成に必要な拡張型の立体配座を立体的に採らせないようにすることができる。マウス 1 D 9 抗体 F a b は、1 つには、ヒト H E R 3 E C D のドメイン 1 に二量体形成に必要な立体配座を採らせないようにすることにより、その効果をもたらすと考えられる。さらに、特定の理論に縛られることを望むものではないが、ここに記載される構造的効果は、マウス 1 D 9 抗体およびその変異体によりもたらされる H E R 3 活性の強力な阻害に寄与すると考えられる。

【 0 4 0 7 】

実施例 3

開放立体配座にある H E R 3 E C D と結合したマウス 1 5 D 5 抗体の相互作用のコンピュータ構造モデリングを、R o s e t t a D o c k ソフトウェア (R o s e t t a C o m m o n s . o r g) を実行した。このソフトウェアに採用されているアルゴリズムの第 1 段階では、剛体モンテカルロ検索 (rigid-body Monte Carlo search)、ならびに残基スケール相互作用ポテンシャル (residue-scale interaction potentials) を用いた抗体表面に対する抗原の平行移動と回転を行う。アライメントスコアにより、抗原を抗体の C D R ループに割り当てる。この低分解能検索の後に、主鎖依存性回転異性体パッキングアルゴリズムを用いて、タンパク質主鎖に明示的側鎖が付加される。その後、モンテカルロおよび最小化法により、側鎖の立体配座と剛体の位置を同時に最適化することによって、ドッキング立体配座空間の小領域において局所的最小値のセットを効率的に抽出する。この検索手順を種々のランダムな出発配向から繰り返して 10^5 通りの構造を作り出し、次に、これらをファンデルワールス相互作用、陰溶媒和モデルおよび配向依存性水素結合ポテンシャルによって支配されるエネルギー関数を用いてランク付けする。スコアカットオフを通過した上から 1 0 0 0 のデコイを保持した。側鎖予測の分解能を高めるために、非結合型の回転異性体立体配座を回転異性体ライブラリーに含め、側鎖ねじれ角上の勾配に基づく最小化を用いた。この高分解能検索の終了時に最もスコアのよい 2 0 0 のデコイを、階層的クラスタリングアルゴリズムを用いたペアワイズ平方根偏差 (r m s d) に基づいてクラスター化する。2 . 5 クラスタリング閾値内の構造をセットと呼び、そのセット内の最もスコアの小さいデコイがクラスターを表す。

【 0 4 0 8 】

結果として得られた、ヒト H E R 3 E C D と結合したマウス 1 5 D 5 抗体のモデルは、この抗体が開放立体配座にある H E R 3 E C D と結合し、二量体形成アーム付近に立体障害を作り出すことを予測する。特定の理論に縛られることを望むものではないが、これはマウス 1 5 D 5 抗体が H E R 3 の二量体形成を遮断することを示唆する。

【 0 4 0 9 】

実施例 4

1 . 概要

分子生物学的技術を用い、マウス 1 D 9 抗体およびマウス 1 5 D 5 抗体の一連のヒト化 R R 変異体を作製し、発現させた。次に、これらの抗体に、全長ヒト H E R 3 細胞外ドメイン (E C D) との結合に関する B I A C O R E (商標) 分析を行った。

【 0 4 1 0 】

2 . 緒論

本実施の目的は、マウス 1 D 9 および 1 5 D 5 抗体のヒト化変異体の親和性を測定することであった。

【 0 4 1 1 】

3 . 方法

3 . 1 . 実験プロトコール

3 . 2 . B I A C O R E (商標) 分析

標準的な分子生物学的技術を用いて作製し、発現させたマウス 1 D 9 抗体およびマウス 1 5 D 5 抗体のヒト化変異体の結合親和性を測定するために B I A C O R E (商標) 分析

を用いた。ヒト化変異体は、1 D 9 H 6 L 2 R R 抗体（配列番号 3 0 および配列番号 5 7 を含んでなる）、1 D 9 H 0 L 7 R R 抗体（配列番号 6 7 および配列番号 8 5 を含んでなる）、1 D 9 H 2 L 2 R R 抗体（配列番号 7 1 および配列番号 5 7 を含んでなる）、1 D 9 H 6 L 6 R R 抗体（配列番号 3 8 および配列番号 8 3 を含んでなる）、1 D 9 H 6 L 3 R R 抗体（配列番号 3 0 および配列番号 7 7 を含んでなる）、1 D 9 H 3 L 6 R R 抗体（配列番号 7 3 および配列番号 8 3 を含んでなる）、1 D 9 H 0 L 9 R R 抗体（配列番号 6 7 および配列番号 8 7 を含んでなる）、1 D 9 H 2 L 6 R R 抗体（配列番号 7 1 および配列番号 8 3 を含んでなる）、1 D 9 H 6 L 4 R R 抗体（配列番号 3 0 および配列番号 7 9 を含んでなる）、1 D 9 H 6 L 5 R R 抗体（配列番号 3 0 および配列番号 8 1 を含んでなる）、1 D 9 H 6 L 0 R R 抗体（配列番号 3 0 および配列番号 7 5 を含んでなる）、1 D 9 H 3 L 2 R R 抗体（配列番号 7 3 および配列番号 5 7 を含んでなる）、1 D 9 H 6 L 9 R R 抗体（配列番号 3 0 および配列番号 8 7 を含んでなる）、1 5 D 5 H 1 L 3 抗体（配列番号 9 0 および配列番号 9 8 を含んでなる）、1 5 D 5 H 2 L 2 抗体（配列番号 9 2 および配列番号 9 6 を含んでなる）、1 5 D 5 H 1 L 1 抗体（配列番号 9 0 および配列番号 2 6 を含んでなる）、1 5 D 5 H 3 L 1 抗体（配列番号 9 4 および配列番号 2 6 を含んでなる）、1 5 D 5 H 2 L 1 抗体（配列番号 9 2 および配列番号 2 6 を含んでなる）ならびに 1 5 D 5 H 3 L 3 抗体（配列番号 9 4 および配列番号 9 8 を含んでなる）であった。キメラ 1 5 D 5 抗体（c h 1 5 D 5）もまた分析した。

10

20

【0 4 1 2】

これらの抗体の結合動態を B I A C O R E（商標）3 0 0 0 を用いて評価した。供給されているカップリングバッファー（9 0 0 0 R U）を用いて固定化抗ヒト I g G（F c 特異的）B I A C O R E（商標）（G E H e a l t h c a r e カタログ番号 B R - 1 0 0 8 - 3 9）モノクローナル抗体をコンジュゲートした C M 5 バイオセンサーチップに抗体を捕捉させた。全長ヒト H E R 3 E C D 濃縮液を流速 3 0 μ l / 分で 1 2 0 秒間注入した。バイオセンサーチップは実施例 1 に記載のように再生した。B I A C O R E（商標）評価ソフトウェアを用い、1 : 1 ラングミュア (Langmuir) モデルへのデータのグローバルフィッティングにより、動態を測定した。分析操作はランニングバッファーとして H B S - E P を用い、2 5 で行った。

30

【0 4 1 3】

B I A C O R E（商標）分析法の基本工程の概略を以下に示す。

- 1) 抗ヒト F c 抗体の固定化（9 0 0 0 - 1 0 0 0 R U；2 5 μ g / m l、酢酸ナトリウムバッファー、p H 5 . 0 を使用）；
- 2) 目的抗体の捕捉（4 0 0 n g / m l）；
- 3) 分析物の捕捉抗体への結合（例えば、H E R E C D 5 1 2 n M ~ 1 6 n M）；
- 4) 分析物の解離（例えば、バッファー使用）；
- 5) B I A c o r e 動態測定サイクル工程：バッファー、5 1 2 n M H E R 3 E C D、2 5 6 n M H E R 3 E C D、1 2 8 n M H E R 3 E C D、6 4 n M H E R 3 E C D、3 2 n M H E R 3 E C D および 1 6 n M H E R 3 E C D。バッファーサイクルおよび二重参照は実施例 1 に記載のように行った；および
- 5) B I A C O R E（商標）最適化バッファーによるバイオセンサーチップの再生。

40

【0 4 1 4】

4 . 結果および考察

下記の表 8 および表 9 は得られたデータを示し、親分子に対して作製された総てのヒト化抗体のうち、ヒト化 1 D 9 R R 抗体（H 6 L 2）およびヒト化 1 5 D 5 抗体（H 4 L 1）が全長ヒト H E R 3 E C D に対して最も高い親和性を有すると思われることを示す。

【0 4 1 5】

【表 8】

表 8 ヒト化 1D9 RR 変異体抗体の親和性

抗体	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
ヒト化 1D9 RR 抗体 (H6L2)	ヒト HER3 ECD	4.3×10^5	$1.7 \times 10^{-3} \text{e-}3$	3.96×10^{-9}
1D9 H0L7 RR	ヒト HER3 ECD	3.27×10^4	1.95×10^{-3}	5.95×10^{-8}
1D9 H2L2 RR	ヒト HER3 ECD	3.31×10^5	4.44×10^{-3}	$1.34 \times 10^{-8} \text{e-}8$
1D9 H6L6 RR	ヒト HER3 ECD	6.94×10^5	4.87×10^{-3}	7.02×10^{-9}
1D9 H6L3 RR	ヒト HER3 ECD	7.73×10^5	3.02×10^{-3}	3.91×10^{-9}
1D9 H3L6 RR	ヒト HER3 ECD	3.04×10^4	2.92×10^{-3}	9.58×10^{-8}
1D9 H0L9 RR	ヒト HER3 ECD	3.77×10^5	0.0144	3.81×10^{-8}
1D9 H10L6 RR	ヒト HER3 ECD	3.77×10^5	7.93×10^{-3}	2.1×10^{-8}
1D9 H2 L6 RR	ヒト HER3 ECD	4.96×10^5	2.25×10^{-3}	4.54×10^{-9}
1D9 H6 L4 RR	ヒト HER3 ECD	5.19×10^5	4.1×10^{-3}	7.89×10^{-9}
1D9 H 6L5 RR	ヒト HER3 ECD	5.4×10^5	3.71×10^{-3}	6.87×10^{-9}
1D9 H 6L0 RR	ヒト HER3 ECD	4.87×10^5	3.66×10^{-3}	7.51×10^{-9}
1D9 H3L2 RR	ヒト HER3 ECD	5.33×10^4	3.16×10^{-3}	5.94×10^{-8}
1D9 H6 L9 RR	ヒト HER3 ECD	6.65×10^5	2.23×10^{-3}	3.35×10^{-9}

10

20

30

【 0 4 1 6 】

【表 9】

表 9 ヒト化 15D5 変異体抗体の親和性

抗体	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
キメラ 15D5 抗体 (ch15D5)	ヒト HER3 ECD	4.4×10^4	1.4×10^{-4}	3.19×10^{-9}
ヒト化 15D5 抗体 (H4L1)	ヒト HER3 ECD	7.49×10^4	1.96×10^{-4}	2.62×10^{-9}
15D5 H1L3	ヒト HER3 ECD	3.44×10^4	3.45×10^{-4}	1×10^{-8}
15D5 H 2L2	ヒト HER3 ECD	3.17×10^5	4.07×10^{-3}	1.28×10^{-8}
15D5 H1 L1	ヒト HER3 ECD	3.71×10^4	2.67×10^{-4}	7.19×10^{-9}
15D5 H 3L1	ヒト HER3 ECD	4.05×10^4	1.71×10^{-4}	4.21×10^{-9}
15D5 H 2L1	ヒト HER3 ECD	4.19×10^4	3.65×10^{-4}	8.7×10^{-9}
15D5 H 3L3	ヒト HER3 ECD	4.21×10^4	3.67×10^{-4}	8.72×10^{-9}
15D5 H 4L3	ヒト HER3 ECD	3.79×10^4	9.35×10^{-4}	2.47×10^{-8}

10

20

【0417】

実施例 5

1. 概要

分子生物学的技術を用い、ヒト化 1D9 抗体、ヒト化 1D9 Fc 障害抗体、ヒト化 1D9 アクリタマブ (ACCRETAMAB) (商標) 抗体およびヒト化 1D9 ポテリジェント (POTELLI GENT) (商標) 抗体を作製し、発現させた。次に、これらの抗体に、以下に示すように、全長ヒト HER3 細胞外ドメイン (ECD)、全長ラット HER3 細胞外ドメイン (ECD) および全長カニクイザル HER3 細胞外ドメイン (ECD) との結合に関する B I A C O R E (商標) 分析を行った。

30

【0418】

2. 緒論

本実施の目的は、ヒト化 1D9 抗体、ヒト化 1D9 Fc 障害抗体、ヒト化 1D9 アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化 1D9 ポテリジェント (商標) 抗体の親和性を測定することであった。

【0419】

3. 方法

3.1. 実験プロトコール

3.2. B I A C O R E (商標) 分析

ヒト化 1D9 抗体、ヒト化 1D9 Fc 障害抗体、ヒト化 1D9 アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化 1D9 ポテリジェント (商標) 抗体の結合親和性を測定するために B I A C O R E (商標) 分析を用いた。

【0420】

約 1300 共鳴単位 (RU) のレベルまで第一級アミンを結合させることによって A タンパク質を CM5 チップに固定化した後、このチップにヒト化抗体を捕捉させた。総ての抗体を同等のレベル (100 ~ 200 RU) で捕捉させた。次に、以下に示すように、全

40

50

長ヒトHER3 ECDをこのチップに50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nMおよび1.5625 nMで流した。あるいは、全長ラットHER3 ECDまたは全長カニクイザルECDをこのチップに10 nM、5 nM、2.5 nM、1.25 nM、0.625 nMおよび0.3125 nMで流した。バッファーのみの注入を用いて、実施例1に示すように結合曲線の二重参照とした。この表面の再生は、10 mM グリシンバッファーpH 1.5を用いて行った。BIA CORE (商標) 評価ソフトウェアを用い、この結合データを1:1モデルに当てはめた。操作は、BIA CORE (商標) T3000にて、ランニングバッファーとしてHBS - EPを用い、25で行った。
【0421】

4. 結果および考察

下記の表10および表11は、以下に示すように、ヒト化1D9抗体、ヒト化1D9 Fc 障害抗体、ヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体の、全長ヒトHER3 細胞外ドメイン (ECD)、全長ラットHER3 細胞外ドメイン (ECD) および全長カニクイザルHER3 細胞外ドメイン (ECD) に対する結合に関して得られたデータを示す。

【0422】

【表10】

表10 ヒト化1D9抗体、ヒト化1D9 Fc 障害抗体、ヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体の親和性

抗体	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
ヒト化1D9抗体	ヒトHER3 ECD	4.1×10^5	1.84×10^{-3}	4.5×10^{-9}
ヒト化1D9 Fc 障害抗体	ヒトHER3 ECD	2.71×10^5	1.22×10^{-3}	4.49×10^{-9}
ヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体	ヒトHER3 ECD	1.13×10^6	2.33×10^{-3}	2.06×10^{-9}
ヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体	ヒトHER3 ECD	1.11×10^6	2.23×10^{-3}	2.01×10^{-9}
ヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体	Rat HER3 ECD	3.26×10^5	1.1×10^{-3}	3.37×10^{-9}

【0423】

【表11】

表11 ヒト化1D9 H6L2 Fc 障害抗体の、全長ヒトHER3 ECD、全長ラットHER3 ECDおよび全長カニクイザルHER3 ECDに対する親和性

抗体	分析物	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
ヒト化1D9 Fc 障害抗体	ヒトHER3 ECD	2.71×10^5	1.22×10^{-3}	4.49×10^{-9}
ヒト化1D9 Fc 障害抗体	カニクイザルHER3 ECD	1.09×10^6	1.89×10^{-3}	1.73×10^{-9}
ヒト化1D9 Fc 障害抗体	Rat HER3 ECD	3.26×10^5	1.1×10^{-3}	3.37×10^{-9}

【0424】

ヒト化 1 D 9 抗体、ヒト化 1 D 9 F c 障害抗体、ヒト化 1 D 9 アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化 1 D 9 ポテリジェント (商標) の特性決定によると、全長ヒト H E R 3 E C D への特異的結合が示される。交差種相同性推定に基づけば、ラット H E R 3 E C D のドメイン I I I およびカニクイザル H E R 3 E C D のドメイン I I I は、ヒト化 1 D 9 抗体およびその変異体が結合するドメイン I I I ヒト H E R 3 E C D エピトープと約 9 5 % 相同である。これは機能的交差反応の強い可能性を示唆する。このことと一致して、ヒト化 1 D 9 F c 障害抗体は、B I A C O R E (商標) 分析により評価した場合に、全長カニクイザル H E R 3 E C D および全長ラット H E R 3 E C D と匹敵するレベルで交差反応することが見出された。上記の表 1 0 および表 1 1 参照。

【 0 4 2 5 】

実施例 6

1 . 概要

本実施例は、1 D 9 抗体 (例えば、マウス 1 D 9 抗体およびそのヒト化変異体) および 1 5 D 5 抗体 (例えば、マウス 1 5 D 5 抗体およびそのヒト化変異体) の、ヘレグリンにより誘導される H E R 3 のリン酸化を阻害し、下流 A K T シグナル伝達を低下させ、ヘテロ二量体形成阻害剤として、活性化された E G F R が H E R 3 とヘテロ二量体を形成しないように働き、ヘレグリンにより誘導される E G F R - H E R 3 、 H E R 2 - H E R 3 ならびに H E R 4 - H E R 3 ヘテロ二量体形成を妨げ、およびそれに続く H E R 3 リン酸化を妨げる能力を証明する。

【 0 4 2 6 】

2 . 緒論

1 D 9 抗体 (例えば、マウス 1 D 9 抗体およびそのヒト化変異体) および 1 5 D 5 抗体 (例えば、マウス 1 5 D 5 抗体およびそのヒト化変異体) の、ヘレグリンにより誘導される H E R 3 のリン酸化を阻害し、下流 A K T シグナル伝達を低下させ、ヘテロ二量体形成阻害剤として、活性化された E G F R が H E R 3 とヘテロ二量体を形成しないように働き、ヘレグリンにより誘導される E G F R - H E R 3 、 H E R 2 - H E R 3 ならびに H E R 4 - H E R 3 ヘテロ二量体形成を妨げ、およびそれに続く H E R 3 リン酸化を妨げる能力を調べた。

【 0 4 2 7 】

3 . 方法

3 . 1 . 実験の予備事項

これらの試験に用いたモデルは、内務省によって制定された動物管理の U K スタンダードに準拠する。

【 0 4 2 8 】

3 . 2 . 実験プロトコール

3 . 2 . 1 癌細胞系統における、ヘレグリンにより誘導される H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 m A b による阻害

集密度およそ 8 0 % の B x P C 3 、 C H L - 1 、 N 8 7 、 S K - B R - 3 、 B T - 4 7 4 または M C F - 7 細胞を、トリプシンを用いて採取し、1 0 % F B S / 培地で洗浄し、1 0 % F B S / 培地に $3 \sim 5 \times 10^5$ 細胞 / m l で再懸濁させた。1 0 0 μ l / ウェルを 9 6 ウェル組織培養処理済み平底プレートに播種し、3 7 $^{\circ}$ C 、 5 % C O ₂ 雰囲気中で一晩インキュベートした。翌日、培地を吸引し、血清不含培地と交換し、一晩インキュベートして血清飢餓状態とした。次に、血清不含培地で m A b 原液を調製し、半対数連続希釈液を作製した。8 点濃度曲線を得るために 1 0 μ l の m A b 原液を 9 6 ウェル細胞プレートに 2 反復で加え、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。次に、1 0 μ l の H R G 1 を加えて終濃度 3 0 または 1 0 0 n g / m l とし、1 5 分間インキュベートした。培地を吸引し、ホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤を含有する低温の溶解バッファーに細胞を溶解させ、氷上で 3 0 分間揺動した。溶解液はすぐに使用したか、または - 8 0 $^{\circ}$ C で冷凍し、その後、氷上で解凍してヒトホスホ - E r b B 3 E L I S A (R & D S y s t e m s カタログ番号 D Y C 1 7 6 9) に用いた。E L I S A は製造者のプロトコールに従

10

20

30

40

50

って行った。データ分析は、GRAPH PAD (商標) PRISM (商標) ソフトウェアを用いて行った。

【0429】

3.2.2 癌細胞系統における、ヘレグリンにより誘導されるAktリン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害

集密度およそ80%のBxPC3、CHL-1、N87、SK-BR-3またはBT-474細胞を、トリプシンを用いて採取し、10%FBS/培地で洗浄し、10%FBS/培地に $3 \sim 5 \times 10^5$ 細胞/mlで再懸濁させた。100 μ l/ウェルを96ウェル組織培養処理済み平底プレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂雰囲気中で一晚インキュベートした。翌日、培地を吸引し、血清不含培地と交換し、一晚インキュベートして血清飢餓状態とした。翌日、血清不含培地でmAb原液を調製し、半対数連続希釈液を作製した。8点濃度曲線を得るために10 μ lのmAb原液を96ウェル細胞プレートに2反復で加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次に、10 μ lのHRG-1を加えて終濃度30または100ng/mlとし、15分間インキュベートした。培地を吸引し、ホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤を含有する低温の溶解バッファーに細胞を溶解させ、氷上で30分間揺動した。溶解液はすぐに使用したか、または-80 $^{\circ}$ Cで冷凍し、その後、氷上で解凍してヒト/マウス/ラットホスホ-Akt (S473) チンパンジー特異的ELISA (R&D Systems カタログ番号DYC887B) に用いた。ELISAは製造者のプロトコールに従って行った。データ分析は、GRAPH PAD (商標) PRISM (商標) を用いて行った。

【0430】

3.2.3 SK-BR-3乳癌細胞における、上皮細胞増殖因子またはベータセルリンにより誘導されるHER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害

SK-BR-3細胞を、ヘレグリンの代わりに上皮細胞増殖因子(EGF)またはベータセルリンのいずれかを活性化リガンドとしてこと以外は、本実施例の第3.2.1節(上記)に、ヒトホスホ-ErbB3 ELISA R&D Systems カタログ番号DYC1769での使用に関して記載されているようにアッセイした。

【0431】

3.2.4 HERファミリー受容体BACMAM (商標) を形質導入したCHO細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびHER3受容体リン酸化の阻害

ヘレグリン-1刺激後のEGFR、HER2およびHER4によるHER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbにより媒介される阻害を調べるために、PerkinElmer ALPHALISA (商標) アッセイ技術を用いてヘテロ二量体形成アッセイを開発した。試薬はPerkinElmerプロトコールに従って調製した。簡単に述べると、ホスホ-チロシン特異的マウスmAb (P-Tyr-100 Cell Signaling Technology カタログ番号9411 PBS単独処方物) をALPHALISA (商標) アクセプタービーズ (PerkinElmer カタログ番号6772002) とコンジュゲートさせた。1mgのアクセプタービーズを100 μ gの抗体と48時間コンジュゲートさせることにより、10:1結合重量比を用いた。抗体100 μ g当たり7.6 μ lの2mg/ml CHROMALINK (商標) ビオチン354 (Sulfo NHS、SolulinK カタログ番号B-1007-105) を用いることにより、30:1モル比のビオチン:抗体を用いて、市販の抗ヒトHER3抗体 (R&D Systems MAB3481) をビオチン化した。次に、96ウェルプレートにて、 3×10^5 細胞/mlのチャイニーズハムスター卵巢細胞にEGFR+HER3、HER2+HER3およびHER4+HER3の特異的BACMAM (商標) 対で一晩形質導入することにより、抗HER3 mAbを評価した。翌日、抗HER3 mAbを加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。その後、ヘレグリン-1を加えて終濃度100ng/mlとし、プレートを30分間インキュベートした。次に、培地を吸引し、ホスファターゼおよびプロテアーゼ阻害剤を含有する低温の溶解バッファーに細胞を溶解させた

。溶解液を氷上で30分間揺動し、すぐに使用したか、または-80℃で冷凍し、氷上で解凍してALPHALISA(商標)アッセイを行った。次に、2.5μlの溶解液を、384ウェルプレート中の、10μlの2.5nMビオチン化抗HERB3抗体(R&D Systems MAB3481)に加え、室温で1時間インキュベートした。その後、5μl/ウェルの50μg/mlホスホ-チロシン特異的マウスmAb(P-Tyr-100 Cell Signaling Technology カタログ番号9411)を加え、暗所で振盪しながら1時間インキュベートした。12.5μl/ウェルの80μg/mlストレプトアビジンコーティングドナービーズ(PerkinElmer カタログ番号6760002)調製物を加え、さらに30分間インキュベートした。ENVISION(商標)2103マルチラベルプレートリーダーでプレートを読み取り、GRAPHPAD(商標)PRISM(商標)を用いてデータ分析を行った。

10

【0432】

3.3. 薬物および材料

ヒト化1D9ポテリジェント(商標)抗体(12.68mg/ml)

ヒト化1D9アクリタマブ(商標)抗体(7.45mg/ml)

ヒト化1D9抗体(1.88mg/ml)

ヒト化1D9 Fc障害抗体(3.713mg/ml)

マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5; 4.77mg/ml)

マウス15D5抗体(3.19mg/ml)

マウスIgG1アイソタイプ対照抗体(R&D Systems 500μg/ml カタログ番号MAB002)

20

マウスIgG2bアイソタイプ対照(R&D Systems 500μg/ml カタログ番号MAB004)

ヒト抗マラリアmAb(ヒトアイソタイプ対照; 5.74mg/ml)

ヘレグリン-1(HRG-1; 1.88mg/ml)

3.4. データ分析

本実施例で示されるデータは総て、最低2回の実験からの平均値を表す。抗体値を陽性対照ヘレグリン処置細胞値で割り、100を掛けて「ヘレグリン対照ホスホHER3に対する%」または「ヘレグリン対照ホスホAKT[.]に対する%」を計算した。上皮細胞増殖因子またはベータセルリン処置SK-BR-3細胞の場合には、上皮細胞増殖因子またはベータセルリン陽性対照処置細胞値を比較に用いた。個々の実験からのデータの平均をとり、GRAPHPAD(商標)PRISM(商標)分析ソフトウェアを用いてIC50値を計算した。

30

【0433】

4. 結果

4.2.1 癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるHER3受容体リン酸化の、抗HER3抗体による阻害

抗HER3 1D9および15D5抗体は、BxPC3(図1)、CHL-1(図2)、N87(図3)、SK-BR-3(図4)、BT-474(図5)、およびMCF-7(図6)癌細胞において、ヘレグリンにより誘導されるHER3リン酸化を阻害した。ヒト化1D9ポテリジェント(商標)抗体およびヒト化アクリタマブ(商標)抗体を含め、総ての1D9抗体構築物が、表12に示されるように、2.5~40.6ng/mlの範囲のIC50値で強い阻害を示した。

40

【0434】

【表 1 2】

表 1 2 ヘレグリンにより誘導されるヒトHER3 受容体リン酸化の、抗HER3 抗による阻害

ホスホ-HER3 ALPHALISA (商標) ELISA IC50 値 (ng/ml)						
抗体	細胞					
	BxPC3	CHL-1	N87	SK-BR-3	BT-474	MCF7
ヒト化 1D9 ポテリジ ェント (商標) 抗体	5.6	28.2	17.5	3.4	n/a	n/a
ヒト化 1D9 アクリタ マブ (商標) 抗体	2.6	31.1	9.4	2.5	n/a	n/a
ヒト化 1D9 抗体	11.6	36.5	21.8	3.6	n/a	n/a
ヒト化 1D9 Fc 障害 抗体	10.7	39.9	29.7	4.4	n/a	n/a
マウス 1D9 抗体	6.8	40.6	20.4	3.2	22.3	10.4
マウス 15D5 抗体	54.1	138.2	53.3	19.1	119.8	59.26

10

20

【0 4 3 5】

4 . 2 . 2 癌細胞における、ヘレグリンにより誘導される A k t リン酸化の、抗 H E R 3 m A b による阻害

抗 H E R 3 1 D 9 抗体および 1 5 D 5 抗体は、B x P C 3 (図 7)、C H L - 1 (図 8)、N 8 7 (図 9)、および S K - B R - 3 (図 1 0) 癌細胞において、ヘレグリンにより誘導される A K T リン酸化を低減した。A K T リン酸化のほとんどの強い阻害は B x P C 3 細胞で見られ、その場合、ヒト化 1 D 9 アクリタマブ (商標) 抗体は、ヘレグリンにより誘導されるホスホ - A K T 形成を 2 . 6 n g / m l の I C 5 0 値で阻害した (表 1 3)。

30

【0 4 3 6】

【表 1 3】

表 1 3 B x P C 3 乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導される A K T リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害

<u>ヘレグリンにより誘導される AKT リン酸化の、抗 HER3 抗体による阻害</u>	
<u>ホスホ-AKT ELISA IC50 値 (ng/ml)</u>	
<u>抗体</u>	<u>細胞</u>
	<u>BxPC3</u>
ヒト化 1D9 ポテリジェント (商標) 抗体	22.8
ヒト化 1D9 アクリタマブ (商標) 抗体	10.8
ヒト化 1D9 抗体	24.4
ヒト化 1D9 Fc 障害抗体	31.6
マウス 1D9 抗体	15.1
マウス 15D5 抗体	60.5

10

20

【 0 4 3 7】

4 . 2 . 3 S K - B R - 3 乳癌細胞における、上皮細胞増殖因子およびベータセルリンにより誘導される H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 m A b による阻害

抗 H E R 3 1 D 9 抗体および 1 5 D 5 抗体は、S K - B R - 3 乳癌細胞における、上皮細胞増殖因子およびベータセルリンの双方により誘導される H E R 3 リン酸化を阻害した。1 D 9 マウス構築物は、リガンドに誘導される H E R 3 受容体リン酸化を、活性化リガンドの使用とは無関係に、およそ 3 n g / m l の I C 5 0 値で阻害した (表 1 4)。

30

【 0 4 3 8】

【表 1 4】

表 1 4 S K - B R - 3 乳癌細胞における、上皮細胞増殖因子 (E G F)、ベータセルリン (B T C) および、ヘレグリンにより誘導されるヒト H E R 3 受容体リン酸化の、抗 H E R 3 抗体による阻害

<u>抗体</u>	<u>ホスホ-HER3 ALPHALISA (商標) ELISA IC50 値 (ng/ml)</u>		
	<u>上皮細胞増殖因子</u>	<u>ベータセルリン</u>	<u>ヘレグリン</u>
マウス 1D9 抗体	3.0	3.6	3.2
マウス 15D5 抗体	23.3	36.8	19.1

40

【 0 4 3 9】

4 . 2 . 4 H E R 3 と E G F R、H E R 2 または H E R 4 を組み合わせた B A C M A M (商標) を形質導入した C H O 細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成および H E R 3 受容体リン酸化の阻害

抗 H E R 3 1 D 9 抗体および 1 5 D 5 抗体は、示されるように、ヒト H E R 3 受容体と E G F R、H E R 2 または H E R 4 受容体とを同時形質導入した C H O 細胞において、ヘレグリンにより誘導される H E R 3 リン酸化を阻害した。これらの抗体は、ヘレグリン

50

により誘導される、EGFR-HER3、HER2-HER3またはHER4-HER3ヘテロ二量体の形成を阻害することができた。IC50値を表15に示す。

【0440】

【表15】

表15 ヘレグリンにより誘導されるヒトHER3受容体リン酸化の、抗HER3抗体による阻害

抗体	ホスホ-HER3 ALPHALISA (商標) ELISA IC50 値 (ng/ml)		
	CHO EGFR+HER3	CHO HER2+HER3	CHO HER4 + HER3
マウス 1D9 抗体	43.5	141.7	129.6
マウス 15D5 抗体	102.8	342.9	140.7

10

【0441】

5. 考察

HER3受容体チロシンキナーゼはヒト上皮細胞増殖因子受容体ファミリーに属し、このファミリーはまたEGFR(HER1)、HER2およびHER4も含む。HER3は、ヘレグリンリガンドに結合するが、本質的にキナーゼ不活性型(kinase dead)である。HER3は、その細胞内C末端ドメインにおいてチロシン残基のトランスリン酸化を可能とするためには、他のファミリーメンバーと二量体を形成しなければならない。続いて、活性化され、リン酸化されたHER3受容体から生じる下流シグナル伝達には、PI3K/AKT生存経路が含まれる。

20

【0442】

本実施例のデータは、抗HER3 1D9抗体および15D5抗体が、ヘレグリンにより誘導されるHER3受容体リン酸化を阻害することができることを示す。ヘレグリン刺激の前に癌細胞系統を1D9抗体で処置すると、ヘレグリンにより誘導されるHER3リン酸化の完全な阻害がもたらされた。図16は、種々の1D9抗体の、種々の癌細胞系統のHER3リン酸化阻害に関するIC50値を示す。下流のAKTリン酸化も、1D9抗体および15D5抗体処置により低減された。従って、1D9抗体および15D5抗体は、ヘレグリンにより誘導されるHER3リン酸化を阻害し、下流のAKTシグナル伝達を低下させる。

30

【0443】

上皮細胞増殖因子およびベータセルリンはEGFRのリガンドであり、EGFR-HER3ヘテロ二量体の形成を誘導することができる。SK-BR-3乳癌細胞は、これらのEGFRリガンドのいずれかで処置した場合、HER3リン酸化の誘導を示した。SK-BR-3細胞を1D9抗体または15D5抗体(antibodies)で処置すると、上皮細胞増殖因子またはベータセルリンにより誘導されるHER3リン酸化が阻害された(図11および図12)。このことは、これらの抗体がヘテロ二量体形成阻害剤として働き、活性化されたEGFRがHER3と二量体を形成しないようにすることができることを示唆する。

40

【0444】

1D9抗体および15D5抗体は、EGFR-HER3またはHER2-HER3またはHER4-HER3ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成を特異的に阻害した。CHO細胞に、HER3と、ヘテロ二量体形成時にHER3をトランスでリン酸化することができる他のファミリーメンバーの1つだけを形質導入した。EGFRまたはHER2またはHER4が二量体形成パートナーとして用いられたかどうかにかかわらず、1D9抗体および15D5抗体は、ヘレグリンにより誘導されるHER3リン酸化を阻害した(図13、図14および図15)。このことは、1D9抗体および15D5抗体が、ヘレグリンにより誘導される、これらの他のファミリーメンバーとのヘテロ二量体形成を妨げ

50

、HER3のリン酸化を妨げることを示唆する。

【0445】

実施例7

1. 概要

いくつかのin vitroアッセイで抗ヒトHER3抗体の特性決定を行った。これらには、これらのmAbの、全長HER3 ECDおよび特定のHER3ドメインとの結合に関するアッセイ、これらのmAbの腫瘍細胞との結合に関するアッセイ、増殖アッセイ、浸潤アッセイ、インターナリゼーションアッセイ、およびこれらのmAbの交差種特異性（マウスおよびカニクイザル）に関するアッセイが含まれた。マウス1D9抗体、ヒト化1D9抗体、ヒト化1D9ポテリジェント（商標）抗体およびヒト化アクリタマブ（商標）抗体を評価した。結果は、抗ヒトHER3 1D9抗体のマウス構築物およびヒト化構築物は双方とも、ヒトHER3 ECD全長を認識し、そのHER3 ECDのドメイン3に特異的に結合することを示した。これらのmAbは、ヘレグリンにより誘導される腫瘍細胞の増殖を用量依存的に阻害する。これらのmAbはまた、ヘレグリンにより誘導される腫瘍細胞の浸潤を阻害する。1D9抗体は、腫瘍細胞へのHER3受容体のインターナリゼーションを誘導する。これらのmAbはまた、マウスHER3と交差反応する。

【0446】

2. 緒論

本実施例では、抗ヒトHER3抗体に対して行ったin vitro特性決定をまとめる。本実施例は、マウス1D9抗体、ヒト化1D9ポテリジェント（商標）抗体およびヒト化アクリタマブ（商標）抗体に関するデータを含む。下記のアッセイ、すなわち、全長ヒトHER3 ECDおよびドメイン結合、腫瘍細胞に対する結合、増殖、浸潤、インターナリゼーション、および交差特異性（マウス）から得られた結果を詳細に記載する。

【0447】

3. 方法

3.1 HER3全長ECDおよびドメイン結合アッセイ

目的：これらのアッセイの目的は、ヒト化1D9ポテリジェント（商標）抗体およびヒト化1D9アクリタマブ（商標）抗体が全長HER3細胞外ドメインに結合することを確認することであった。これらのアッセイのもう1つの目的は、これらのmAbがまたHER3ドメインIIIに特異的に結合することを確認することであった。

【0448】

HER3細胞外ドメイン（ECD）に対する抗HER3抗体の検出のために解離増強ラントニド蛍光イムノアッセイ（DEL FIA）を用いた。DEL FIA手順は次の通りであった：白色Maxisorp 96ウェルプレート（Nunc #437796）を0.1M炭酸バッファーpH9.5中、4で一晩、100μl/ウェルの1μg/ml HER-3 ECD全長またはHER3ドメインI、II、IIIおよびIVでコーティングした。これらのプレートをTBS中のカゼイン（Thermo Scientific #37532 ロット番号JD121074）でブロッキングした。無希釈ハイブリドーマ上清またはPerkin Elmer #4002-0010アッセイバッファーで10μg/ml（または100μg/ml）～0.01μg/mlに希釈した精製抗HER3抗体または最低3種類の希釈率のPK血清サンプル（100μl/ウェル）をプレートに加えた。これらのサンプルをプレートシェーカー上に室温で2時間、または4で一晩インキュベートした。100μl/ウェルの抗マウスEu抗体（PE DEL FIA #AD-0124 ロット326-949-A、1:1000=50ng/mlで使用）またはEu標識抗ヒトIgG二次抗体（Wallac #1244-330 50μg/ml、精製抗体には1:4,000希釈またはPK試験には1:2,000希釈で使用）を用い、室温で1時間インキュベートした。各抗体インキュベーション工程の後、このプレートをBIO TEK（商標）プレート洗浄機にて、0.05%ツイーン-20（Perkin Elmer #4010-0010）を含むトリスバッファーで4回洗浄した。100μl/ウェルのDEL FIA増強溶液（Perkin Elmer 1244

- 105) を室温で5分間加えた。その後、このプレートをVICTOR (商標) 1420 プレートリーダーにて、ユウロピウム時間分解蛍光測定法 (TRF) プロトコルを用いて読み取った。抗体結合を1ウェル当たりのユウロピウム総数として記録した。

【0449】

結果：図17は、マウス1D9抗体 (M5 . 1D9 . 1F5) の、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIの双方に対する特異的結合を示す。図18は、マウス15D5抗体 (M5 . 15D5 . 2A1 . 1H10) の、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIの双方に対する特異的結合を示す。図19は、ヒト化1D9ポテリジェント (商標) 抗体の、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIに対する特異的結合を示す。図20は、ヒト化1D9アクリタマブ (商標) 抗体の、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIに対する特異的結合を示す。図21は、ヒト化1D9抗体の、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIに対する特異的結合を示す。図17、図18、図19、図20および図21参照。

10

【0450】

結論：マウス1D9抗体 (M5 . 1D9 . 1F5) は、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIの双方に特異的に結合する。マウス15D5抗体 (M5 . 15D5 . 2A1 . 1H10) は、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIの双方に特異的に結合する。ヒト化1D9ポテリジェント (商標) 抗体は、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIに特異的に結合する。ヒト化1D9アクリタマブ (商標) 抗体は、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIに特異的に結合する。ヒト化1D9抗体は、全長HER3 ECDおよびHER3ドメインIIIに特異的に結合する。図17、図18、図19、図20および図21参照。

20

【0451】

3.2 抗ヒトHER3抗体はフローサイトメトリーアッセイにおいてヒト癌細胞系統に結合する

目的：HER3陽性細胞系統であることが知られているヒト癌細胞系統に対する抗ヒトHER3抗体の結合特性を決定すること。

【0452】

試薬：

FACSバッファー：PBS、0.2%BSA、0.1%アジ化ナトリウム

30

抗体：マウス1D9抗体 (M5 . 1D9 . 1F5)

ヒト化1D9抗体

ヒト化1D9アクリタマブ (商標) 抗体

ヒト化1D9ポテリジェント (商標) 抗体

PEヤギ抗マウスIgG (H+L) - Caltag Laboratories
(M30004-4)

ヤギ抗ヒトIgG ALEXAFLUOR647 (商標) - Invitrogen
(A21445)

細胞系統：CHL1、BxPC3

方法：HER3受容体に関して予めスクリーニングした細胞系統由来の 5×10^6 細胞を、フローサイトメトリーチューブに加えた。用量応答濃度の各供試抗体を適当なチューブに加えた。細胞および抗体を氷上で30分間インキュベートした。細胞を1mlの染色バッファーで1回洗浄した後、適当な二次抗体を適当なチューブに加えた。細胞を暗所、氷上で再び30分間インキュベートした後、FACSバッファーで洗浄し、再懸濁させた。細胞をFACSCANTO (商標) フローサイトメーターで分析した。

40

【0453】

データ分析：BD Biosciencesにより開発されたFACSDIVA (商標) ソフトウェアを用いて分析を行った。前方散乱と側方散乱を用いて細胞集団にゲートを設定し、蛍光強度のヒストグラムを作成した。

【0454】

50

結果：各細胞系統に対する抗体結合のヒストグラムは、アイソタイプ対照抗体のヒストグラムから右へシフトすることにより、ヒト化抗HER3 mAbの特異的結合を示す。マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)は、MCF7ヒト乳癌細胞およびBxPC3ヒト膵臓腫瘍細胞で発現されるヒトHER3に結合する。図22参照。ヒト化1D9抗体、ヒト化1D9アクリタマブ(商標)抗体およびヒト化1D9ポテリジェント(商標)抗体は総て、CHL-1ヒト黒色腫細胞およびBxPC3ヒト膵臓腫瘍細胞上で発現されるヒトHER3に結合する。図23参照。

【0455】

結論：マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)は、MCF7ヒト乳癌細胞およびBxPC3ヒト膵臓腫瘍細胞により発現されるヒトHER3を認識した。図22参照。ヒト化1D9抗体、ヒト化1D9アクリタマブ(商標)抗体およびヒト化1D9ポテリジェント(商標)抗体は総て、CHL-1(黒色腫)およびBxPC3(膵臓)ヒト癌細胞系統上で発現されるヒトHER3を認識する。図23参照。

10

【0456】

3.3 ヘレグリンにより誘導される腫瘍細胞増殖の、M5.1D9による阻害、ヘレグリンにより誘導される細胞増殖の阻害

目的：MCF7またはBxPC3細胞システムのいずれかにおいて、任意の抗ヒトHER3抗体がヘレグリン-1により誘導される細胞増殖を阻害することができるかどうかを判定すること。

20

【0457】

試薬：

完全培地：RPMI、10%FBS、グルタミン

細胞系統：MCF7

BxPC3 - ATCC

抗体：マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)

マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)

マウス24H5抗体(M5.24H5.C2)

ヒト化1D9抗体

ヒト化1D9アクリタマブ(商標)抗体

ヒト化1D9ポテリジェント(商標)抗体

30

Cell Titer 96非放射性細胞増殖アッセイ(MTT) - Promega G4000

方法：MCF7またはBxPC3細胞システムのいずれか、それぞれ 1×10^3 または 1×10^4 細胞/ウェルを、平底96ウェルプレートの各ウェルの、10%血清を含有する完全培地中に加え、37℃で一晩インキュベートした。培地を除去して血清不含RPMIと交換した。スクリーニングする各抗体10 μ lを適当なウェルに4反復で加えた。抗体および細胞を37℃で1時間インキュベートした。30ng/mlのヘレグリン-1を各ウェルに加えた。ヒト化抗体実験では、p-HER3およびpAktアッセイで用いる条件に対する比較対照として100ng/mlヘレグリンを用いた。これらのプレートを37℃で72時間インキュベートした。PromegaによるMTTキットを用いて増殖を測定し、これらのプレートをENVISION(商標)2103マルチラベルリーダーで分析し、マイクロソフトエクセル(商標)でデータを分析した。データを、抗体濃度に対するヘレグリンにより誘導される増殖のパーセンテージとしてグラフ化した。

40

【0458】

結果：MCF7細胞では、ヘレグリン-1に応答した良好な増殖誘導が見られた(およそ40%)。しかしながら、BxPC3細胞での応答は限られたものであった(およそ10%)。マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)およびマウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)は双方とも、ヘレグリン-1により誘導されるMCF7細胞の増殖を阻害した。マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)およびマウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)は実際に、BxPC3増殖を細胞単独の

50

レベルより低く阻害した。ヒト化 1 D 9 アクリタマブ (商標) 抗体は、B x P C 3 細胞において、マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) と同等の阻害効力 (protency) を示した。図 2 4、図 2 5 および図 2 6 参照。

【 0 4 5 9 】

結論：マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) およびマウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) は、M C F 7 および B x P C 3 細胞増殖阻害能が匹敵するものであった。図 2 4 および図 2 5。ヒト化 1 D 9 アクリタマブ (商標) 抗体は、B x P C 3 腫瘍細胞の増殖を阻害する。図 2 6 参照。

【 0 4 6 0 】

3 . 4 腫瘍細胞浸潤の阻害

目的：本試験の目的は、任意の抗ヒト H E R 3 抗体がヘレグリン刺激後に腫瘍細胞浸潤を阻害することができるかどうかを判定することであった。

【 0 4 6 1 】

方法：H E R ファミリー発現に関して事前に特性決定を行ったヒト腫瘍細胞系統を浸潤アッセイに用いた。B X P C 3 細胞は H E R - 2 と、程度は低いが H E R 3 の双方を発現することが示された。B X P C 3 細胞浸潤に対する H E R 3 抗体の効果は、T r e v i g e n C U L T R E X (商標) 細胞浸潤アッセイ (カタログ番号 3 4 5 5 - 0 9 6 - K) を用いて判定した。簡単に述べると、B X P C 3 細胞を集密度 6 0 % まで増殖させ、一晚、血清飢餓状態とした後、V E R S E N E (商標) キレート剤 (E D T A) およびトリプシンを用いて培養フラスコから取り出した。細胞をクエンチバッファー (R P M I + 2 % B S A) で洗浄し、トリパンブルー色素排除を用いて生存率を決定し、アッセイに用いるために、細胞を F B S または B S A 含有 R P M I 培地に 1 0 0 万細胞 / m l で懸濁させた。抗体を細胞とともに 3 7 °C で 1 時間インキュベートした後、浸潤プレートの上のウェル列に加えた。下のウェル列には R P M I 培地 + 1 0 % 熱不活性化されていない F B S を入れた。しかしながら、下の一列のウェルにはランダムな移動を考慮するために F B S 不含の R P M I を入れた。移動した細胞をカルセイン - a m で標識し、下のチャンバーを V I C T O R (商標) I V プレートリーダーで読み取った。蛍光 (R F U) は、移動した細胞の量を表す。各抗体の R F U をアイソタイプ対照抗体の R F U で割り、1 0 0 を掛けて「対照浸潤 %」値を得た。

【 0 4 6 2 】

結果：マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5)、キメラ 1 D 9 抗体およびキメラ 1 5 D 5 抗体は総て、B X P C 3 細胞の浸潤を 4 0 % 阻害した。マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) は細胞浸潤を 3 0 % 阻害した。マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) は、腫瘍細胞浸潤を 2 0 % 阻害した。図 2 7 参照。

【 0 4 6 3 】

結論：マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5)、キメラ 1 D 9 抗体およびキメラ 1 5 D 5 抗体は、腫瘍細胞浸潤を阻害した。図 2 7 参照。

【 0 4 6 4 】

3 . 5 マウス 1 D 9 抗体のヒト腫瘍細胞への結合は H E R 3 受容体のインターナリゼーションをひき起こす

目的：任意の抗ヒト H E R 3 抗体が結合時に H E R 3 受容体のインターナリゼーションを引き起こすかどうかを判定すること。

【 0 4 6 5 】

試薬：

染色バッファー：P B S、0 . 2 % B S A、0 . 1 % アジ化ナトリウム

抗体：I g G 1 対照 - R & D S y s t e m s M A B 0 0 2

I g G 2 b 対照 - R & D S y s t e m s M A B 0 0 4

マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) - (3 . 1 9 m g / m l)

H z 1 0 - (9 . 8 2 m g / m l)

10

20

30

40

50

ヒト化 1 D 9 抗体 - (1 . 8 8 m g / m l)

二次抗体：

P E ヤギ抗マウス I g G (H + L) - C a l t a g L a b o r a t o r i e s
M 3 0 0 0 4 - 4

ヤギ抗ヒト I g G A L E X A F L U O R 6 4 7 (商 標) - I n v i t r o g e n
A 2 1 4 4 5

方法：100 μ l の 5×10^6 細胞 / m l を、10 μ g の抗 H E R 3 抗体が入ったフローサイトメトリチューブに加えた。各抗体を2反復で加えた。各抗体の1本のチューブを氷上でインキュベートし、他のチューブは37 でインキュベートした。2時間後、これらの細胞を1 m l の染色バッファーで洗浄し、P E 標識ヤギ抗マウス二次抗体で30分間、対比染色を行った。1 m l の染色バッファーでさらに洗浄した後、これらの細胞をF A C S C A N T O (商 標) サイトメーターで分析した。データ分析は、B D B i o s c i e n c e s により開発されたF A C S D I V A (商 標) ソフトウェアを用いて行った。前方散乱と側方散乱を用いて細胞集団にゲートを設定し、蛍光強度のヒストグラムを作成した。

10

【 0 4 6 6 】

結果：C H L - 1 細胞に対する H E R 3 受容体のインターナリゼーションに関して、マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) およびヒト化 1 D 9 抗体がスクリーニングされた。37 でインキュベートした後、これらの抗体は検出されなかったが、これはこの受容体が細胞表面には無かったことを示した。

20

【 0 4 6 7 】

結論：マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) およびヒト化 1 D 9 抗体は、H E R 3 受容体に結合した際にその受容体のインターナリゼーションを引き起こした。図 2 8 参照。

【 0 4 6 8 】

3 . 6 マウス 1 D 9 抗体はマウス腫瘍細胞上のマウス H E R 3 と交差反応する

目的：任意の抗ヒト H E R 3 抗体がマウス H E R 3 陽性細胞系統と交差反応するかどうかを判定すること。

【 0 4 6 9 】

試薬：

30

F A C S バッファー：P B S 、 0 . 2 % B S A 、 0 . 1 % アジ化ナトリウム

抗体：E G F R - B i o s c i e n c e 4 4 7 8 3 M

H E R 2 - B i o s c i e n c e A H O 1 0 1 1

H E R 3 - U p s t a t e 0 5 - 4 7 1

マウス 1 5 D 5 抗体

マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5)

マウス 2 4 H 5 抗体 (M 5 . 2 4 H 5 . C 2)

細胞系統：B 1 6

B 1 6 F 1 0

Z E N O N (商 標) 標識キット：

40

マウス I g G 1 P E - I n v i t r o g e n Z 2 5 0 2 1

マウス I g G 1 A P C - I n v i t r o g e n Z 2 5 0 5 1

マウス I g G 2 b A P C - I n v i t r o g e n Z 2 5 1 5 1

方法：市販の抗ヒト E G F R および H E R 2 抗体を準備した。供給者によりヒト H E R 3 を認識することが示されている市販の H E R 3 抗体を準備した。マウス 1 5 D 5 抗体、マウス 1 D 9 抗体 (M 5 . 1 D 9 . 1 F 5) 、マウス 2 4 H 5 抗体 (M 5 . 2 4 H 5 . C 2) 抗体もまた準備した。これらの抗体を、Z E N O N (商 標) 標識キット (I n v i t r o g e n) を用いて P E または A P C のいずれかで標識した。 5×10^6 の B 1 6 または B 1 6 F 1 0 マウス黒色腫細胞を、標識抗 H E R 3 抗体が入ったフローサイトメトリチューブに加えた。細胞および抗体を暗所、氷上で30分間インキュベートし、F A C S

50

バッファーで洗浄し、再懸濁させた。次に、細胞をFACS CANTO (商標) フローサイトメーターで分析した。データ分析は、BD Biosciencesにより開発されたFACS DIVA (商標) ソフトウェアを用いて分析した。前方散乱と側方散乱を用いて細胞集団にゲートを設定し、蛍光強度のヒストグラムを作成した。

【0470】

結果：市販のEGFR、HER2およびHER3抗体はマウス細胞表面のこれらの受容体を認識しなかった(データは示されていない)。マウス15D5抗体、マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)、およびマウス24H5抗体(M5.24H5.C2)は総て、B16およびB16F10細胞表面のHER3を認識した。図29参照。

【0471】

結論：マウス15D5抗体、マウス1D9抗体(M5.1D9.1F5)、およびマウス24H5抗体(M5.24H5.C2)は、マウスHER3と交差反応する。図29参照。

【0472】

実施例 8

1. 概要

ヒト癌のマウスモデルは、新しい抗癌薬のin vivo活性を実証するために前臨床状況で鋭意用いられている。本試験では、ヒト臨床試験に適用可能なさらなる開発のための取り組みを確立し、リード候補の優先順位を決定するために、マウス同一遺伝子型肺病巣形成モデルおよび数種のヒト異種移植モデルでマウス抗HER3モノクローナル抗体(mAb)を評価した。

【0473】

C57BL/6マウスにB16F10黒色腫細胞の単回のi.v.注射を行い、抗HER3 mAb処置を伴うまたは伴わない肺における肺病巣形成を評価した。B16F10注射の3日後に50mg/kg(i.p.)および7日後と11日後に25mg/kg(i.p.)のマウス1D9抗体を投与したところ、試験の終了時、すなわち、B16F10注射の20日後に肺重量の有意な低下($p < 0.001$)が起こった。マウス15D5抗体はまた、肺において腫瘍細胞の病巣形成を阻害したが($p < 0.05$)、25および50mg/kg(i.p.)といった低用量計画の方が、50/25mg/kgの用量計画に比べて活性が高かった。マウス1D9 mAbおよび15D5 mAbは双方とも、続いて異種移植モデルでヒト腫瘍に対する活性を評価した。

【0474】

マウス抗HER3 mAbは、CB-17 SCIDマウスに移植した進行性HER3+ヒト異種移植片の成長を遅延させた。週に2回、0.5~100mg/kg(i.p.)のマウス1D9抗体またはマウス15D5抗体で処置したところ、CHL-1黒色腫瘍増殖に用量依存的かつ統計学的に有意な低下が起こった(5mg/kgで $p < 0.001$)。CB-17 SCIDマウスにおける皮下移植後のBxPC3膵臓腫瘍増殖にも同様の活性が見られた(5mg/kgで $p < 0.001$)。

【0475】

1D9抗体および15D5抗体は、CHL-1黒色腫異種移植モデルにおいて、5~50mg/kgの範囲の用量で、有意かつ用量依存的な抗腫瘍活性を保持していた($p < 0.001$)。さらに、ヒト化1D9 RR抗体およびヒト化1D9 RRアクリタマブ(商標)抗体は、5、25および50mg/kgの用量で有意かつ同等に強い活性を持っていた($p < 0.001$)。

【0476】

皮下および同所BxPC3異種移植モデルでは、50mg/kgのキメラ1D9抗体またはヒト化15D5抗体は、試験終了まで腫瘍増殖の有意な阻害を生じたが($p < 0.001$)、50mg/kgのヒト化1D9 RR抗体は皮下BxPC3モデルにおける腫瘍増殖に対して、有意ではあるが($p < 0.001$)、一時的な効果を示した。増殖阻害の持続時間の違いは試験間の変動(すなわち、移植されるBxPC3フラグメントの特徴)

10

20

30

40

50

によるものであると思われるが、やはり、遺伝的に操作された m A b の腫瘍増殖に対する有効性が示された。

【 0 4 7 7 】

最後に、N C I - N 8 7 胃モデルにおけるヒト化 1 D 9 R R 抗体、ヒト化 1 D 9 アクリタマブ（商標）抗体、およびヒト化 1 D 9 ボテリジェント（商標）抗体の評価は、C H L - 1 黒色腫異種移植片に対して増強された m A b の活性を示した。

【 0 4 7 8 】

2 . 緒論

本試験では、マウス親またはヒト化 H E R 3 モノクローナル抗体の、進行性 H E R 3 + ヒト異種移植片、すなわち、C H L - 1 黒色腫、B x P C 3 膵臓腫瘍、および N C I - N 8 7 胃腫瘍に対する抗腫瘍活性を評価した。マウス親抗 H E R 3 m A b の活性を評価するために、マウス B 1 6 F 1 0 黒色腫細胞を用いた同一遺伝子型肺病巣形成モデルを予備評価に含めた。

【 0 4 7 9 】

3 . 方法

3 . 1 . 実験の予備事項

これらの試験に用いたモデルは、内務省によって制定された動物管理の U K スタンダードに準拠する。

【 0 4 8 0 】

ヒト異種移植腫瘍モデル試験は、6 ~ 8 週齢、体重およそ 1 5 ~ 2 0 グラムの雌 C B - 1 7 S C I D マウス (T a c o n i c 、 I n d i a n a 、 I N) で行った。マウスは試験開始時には 1 0 ~ 1 2 週齢であった。同一遺伝子型肺病巣形成モデル試験は、6 ~ 8 週齢、体重およそ 1 5 ~ 2 0 g の C 5 7 B 1 雌マウスで行った。

【 0 4 8 1 】

マウス (B 1 6 F 1 0) 、およびヒト (B x P C 3 、 N C I N 8 7 および C H L - 1) 腫瘍細胞系統は細胞リポジトリから入手した。

【 0 4 8 2 】

3 . 2 . 実験プロトコール

3 . 2 . 1 . マウス B 1 6 F 1 0 黒色腫同一遺伝子型モデル

C 5 7 B 1 / 6 雌マウスに 2×10^5 の B 1 6 F 1 0 細胞を i . v . 注射した。マウス抗 H E R 3 抗体またはアイソタイプ対照を腫瘍細胞注射の 3 日後に 5 0 または 2 5 m g / k g で i . p . 投与し、その後、7 日後と 1 1 日後に 2 5 または 5 m g / k g で i . p . 投与した。注射 3 日後にジェムザール（商標）(N D C 0 0 0 2 - 7 5 0 2 - 0 1 ; ゲムシタピン) を i . v . 投与した。2 0 日目に動物を安楽死させ、肺を摘出して湿重を測定した。

【 0 4 8 3 】

3 . 2 . 2 . ヒト C H L - 1 黒色腫異種移植モデル

マトリゲル (M A T R I G E L) （商標）中、C H L - 1 細胞 ($5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$) を、C B - 1 7 S C I D マウスの大腿に皮下 (s . c .) 注射した。腫瘍異種移植片が平均体積 $80 \sim 120 \text{ mm}^3$ に達したところで、マウスを治療群 (各群マウス $n = 6$ 個体) に無作為化し、抗 H E R 3 m A b またはアイソタイプ対照を投与した。0 . 5 ~ 1 0 0 m g / k g の用量を週に 2 回 i . p . 投与した。ビヒクル処置マウスを腫瘍増殖の対照群として用いた。

【 0 4 8 4 】

毎週、腫瘍の幅 (W) および長さ (L) を手動カリパスで測定し、下式 : $V = 1 / 2 (L \times W^2)$ を用いて腫瘍体積 (V) を計算した。アイソタイプ対照の平均腫瘍体積が 1 0 0 0 mm^3 を越えた際に試験を終了した。

【 0 4 8 5 】

3 . 2 . 3 . ヒト B x P C 3 膵臓異種移植モデル : 皮下および同所移植

B x P C 3 細胞 (5×10^6 / マウス) を、ドナーとする C B - 1 7 S C I D マウス

10

20

30

40

50

に s . c . 投与した。腫瘍が $800 \sim 1000 \text{ mm}^3$ の体積に達した際に B x P C 3 担癌ドナーマウスを安楽死させ、その後、腫瘍を摘出し、 3 mm^3 の腫瘍断片に分けた。新しく摘出した B x P C 3 腫瘍断片をレシピエントマウス的大腿に s . c . 移植した。同所モデルでは、断片をレシピエントマウスの脾臓に外科的に移植した。

【0486】

レシピエントマウスの腫瘍異種移植片が平均体積 $80 \sim 120 \text{ mm}^3$ に達したところで、マウスを治療群（各群マウス $n = 6$ 個体）に無作為化し、抗 H E R 3 m A b またはアイソタイプ対照で処置した。 $0.5 \sim 100 \text{ mg/kg}$ の用量を週に 2 回 i . p . 投与（皮下移植モデル）または i . v . 投与（同所移植モデル）した。ビヒクル処置マウスを腫瘍増殖の対照群として用いた。

10

【0487】

腫瘍体積を上記のように毎週、手動カリパスで測定した。同所モデルでは、腫瘍を超音波で測定し、V I S U A L S O N I C S V E V O（商標）770 画像解析システムを用いて体積を求めた。

【0488】

3.2.4. ヒト N C I - N 87 胃異種移植モデル

N C I - N 87 細胞をドナーマウスの大腿に約 1×10^6 細胞/動物で移植した。ドナーマウスから腫瘍断片を採取し、10～12 週齢のレシピエントマウス的大腿に s . c . 移植した。腫瘍異種移植片が平均体積 $50 \sim 80 \text{ mm}^3$ に達した際、または断片移植の 29 日後に、マウス抗 H E R 3 m A b による処置を開始した。腫瘍異種移植片が平均体積 $80 \sim 100^3 \text{ mm}$ に達した際、または移植の 15 日後に、遺伝的に操作した抗 H E R 3 m A b による処置を開始した。

20

【0489】

腫瘍体積は上記のように手動カリパスで測定した。

【0490】

3.3. 薬物および材料

本試験に用いた抗 H E R 3 抗体およびアイソタイプ対照を下表に示す。また、本明細書に含まれる略称も示す。抗体は総て、投与用に、リン酸緩衝生理食塩水 p H 7 . 0 で処方および調製した。

【0491】

30

【表 16】

表 16

抗 HER3 mAb (別称;アイソタイプ)	実施例 8 および他の選択 実施例での呼称
マウス 1D9 抗体 (M5. 1D9. 1F5; IgG2b)	m1D9
マウス 15D5 抗体 (M5. 15D5. 2A1; IgG1)	m15D5
キメラ 1D9 抗体 (IgG1)	Ch1D9
ヒト化 15D5 抗体 (IgG1)	h15D5
ヒト化 1D9 RR 抗体 (H6L2; IgG1)	h1D9 RR wt
ヒト化 1D9 RR ポテリジェント (商標) 抗 体 (H6L2; IgG1)	h1D9 RR ポテリジェント
ヒト化 1D9 RR アクリタマブ (商 標) (H6L2; IgG1)	H1D9 RR アクリタマブ
アイソタイプ対照	
マウス IgG1; MOPC21	N/A
マウス IgG1; TIB-9	N/A
マウス IgG2b; 6x His	N/A
ヒト IgG1; α -マラリア	N/A
ヒト IgG1; α -因子 X	N/A

10

20

30

【0492】

3.4. データ分析

対照群および処置群に関して、群平均値および平均値の標準誤差を求めた。データをグラフ化し、ヒト異種移植モデルではボンフェローニ事後検定を用いた二元配置 ANOVA、またはマウス同一遺伝子型モデルではダネットの事後検定を用いた一元配置 ANOVA を用いて分析した (GRAPH PAD (商標) PRISM (商標) ソフトウェア v. 5)

40

【0493】

4. 結果

4.1. マウス抗 HER3 mAb の in vivo 有効性

マウス 1D9 抗体およびマウス 15D5 抗体を、腫瘍細胞増殖に対する有効性を証明するためにマウス同一遺伝子型モデルおよび数種のヒト異種移植モデルで評価した。

【0494】

4.1.1. マウス B16F10 黒色腫同一遺伝子型モデル

抗 HER3 マウス 1D9 抗体による処置は、C57BL/6 マウスの肺における B16F10 腫瘍病巣形成を低下させた。50/25 mg/kg 群は、アイソタイプ対照群に

50

比べて肺重量の有意な低下を示した ($p < 0.01$) (図30)。また、マウス15D5抗体による処置も、25/5mg/kg群で、アイソタイプ対照に比べて、肺における腫瘍病巣形成の低下を示した ($p < 0.05$; 図31)。

【0495】

4.1.2. ヒトCHL-1 黒色腫異種移植モデル

抗HER3マウス1D9抗体またはマウス15D5抗体を5~100mg/kg i.p.の範囲の用量で週に2回投与したCB-17 SCIDマウスは、それらの個々のアイソタイプ対照群に比べて、ヒトCHL-1腫瘍増殖に用量依存的かつ統計学的に有意な低下を示した ($p < 0.001$) (図32および図33)。

【0496】

4.1.3. ヒトBxPC3 膵臓異種移植モデル

マウス1D9抗体を0.5~50mg/kg i.p.の用量で週に2回投与したCB-17 SCIDマウスは、アイソタイプ対照群に比べて、BxPC3腫瘍増殖に有意な低下を示した (5mg/kgで $p < 0.001$) (図36)。同様に、マウス15D5抗体による処置も、5~50mg/kg群で、アイソタイプ対照群に比べてBxPC3腫瘍増殖の低下をもたらした ($p < 0.001$) (図35)。

【0497】

4.1.4. ヒトNCI-N87 胃異種移植モデル

マウス1D9抗体を75または100mg/kg i.p.の用量で週に2回投与したCB-17 SCIDマウスは、ビヒクル対照群に比べて、腫瘍体積に有意な低下を示した ($p < 0.001$) (図36)。NCI-N87腫瘍増殖に対する、ビヒクルおよびアイソタイプ対照群に比べてのマウス15D5抗体の効果を図37に示す。

【0498】

4.2. キメラおよびヒト化抗HER3 mAbのin vivo有効性

ヒト化15D5抗体、キメラ1D9抗体、およびヒト化1D9 RR抗体を作製し、評価した。種々のin vitroおよびin vivoモデルにおけるヒト化1D9 RR抗体の活性に基づき、さらなる操作を用いて、IgG1 mAb (ヒト化1D9 RRアクリタマブ (商標) 抗体) またはCDCのみ (ヒト化1D9 RRポテリジェント (商標) 抗体) の抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) および補体依存性細胞傷害性 (CDC) 属性を増強した。以下にヒト異種移植モデルにおける種々の抗体の活性をまとめる。

【0499】

4.2.1. ヒトCHL-1 異種移植モデル

キメラ1D9抗体を5~50mg/kg i.p.で週に2回投与したCB-17 SCIDマウスは、アイソタイプ対照群に比べて、CHL-1腫瘍増殖に用量依存的低下を示した。移植24日後の25および50mg/kg群における低下は統計学的に有意であり ($p < 0.05$)、移植27日後には、総ての処置群で有意な低下が見られた ($p < 0.001$) (図38)。同様の所見がヒト化15D5抗体処置群でも見られた (図39)。

【0500】

ヒト化H1D9 RR抗体、ヒト化H1D9 RRアクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化H1D9 RRポテリジェント (商標) 抗体を、CHL-1異種移植モデルにおいて5~50mg/kgの用量で評価した。ヒト化H1D9 RR抗体、ヒト化H1D9 RRアクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化H1D9 RRポテリジェント (商標) 抗体は、同等の活性特性を示した。総ての用量レベルで、移植29日後から34日後の試験終結まで、腫瘍増殖に有意な低下が見られた ($p < 0.001$) (図40、図41および図42)。

【0501】

4.2.2. ヒトBxPC3 異種移植モデル (皮下および同所移植片)

皮下BxPC3移植後、ch1D9を0.5~50mg/kg i.p.で週に2回投与したCB-17 SCIDマウスは、50mg/kg群 ($p < 0.001$) および50

10

20

30

40

50

よび 0.5 mg/kg 群 ($p < 0.01$) において 33 日目から腫瘍増殖に統計学的に有意な、用量依存的低下を示した。50 mg/kg 群では 36 日目まで有意に低い腫瘍体積を維持した ($p < 0.001$) (図 43)。0.5 ~ 50 mg/kg の h15D5 による処置は、移植 33 日後および 36 日後に検出可能な 50 mg/kg 群に腫瘍増殖遅延をもたらした ($p < 0.01$) (図 44)。0.5 ~ 50 mg/kg のヒト化 1D9 RR 抗体で週に 2 回処置した後に、B x PC3 腫瘍増殖に見られた低下の特徴を図 45 に示す。

【0502】

キメラ 1D9 抗体およびヒト化 15D5 抗体を、皮下移植よりも臨床転帰の予測性が高いと考えられる B x PC3 の外科的同所移植モデルで評価した。週に 2 回、i.v. 経路にて 50 mg/kg のキメラ 1D9 抗体またはヒト化 15D5 抗体で処置したところ、移植 5 週間後から 7 週間後にアイソタイプ対照に比べて有意な腫瘍増殖の遅延が生じた ($p < 0.01$) (図 46)。

10

【0503】

4.2.3. ヒトNCI-N87 胃異種移植モデル

ヒト化 H1D9 RR 抗体、ヒト化 H1D9 RR アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化 H1D9 RR ポテリジェント (商標) 抗体の抗腫瘍活性をヒトNCI-N87 胃モデルで評価した。CB-17 SCID マウスに週に 2 回、50 mg/kg i.p. を投与した。50 mg/kg で投与したヒト化 H1D9 RR アクリタマブ (商標) 抗体は腫瘍体積の低下をもたらした、移植 44 日後に統計的有意性に達した ($p < 0.05$) (図 47)。

20

【0504】

5. 考察

ヒト癌のマウスモデルは、新しい抗癌薬の in vivo 活性を実証するために前臨床状況で鋭意用いられている。本試験では、ヒト臨床試験に適用可能なさらなる開発のための取り組みを確立し、リード候補の優先順位を決定するために、マウス同一遺伝子型肺病巣形成モデルおよび数種のヒト異種移植モデルでマウス抗HER3モノクローナルmAbを評価した。

【0505】

マウス抗HER3 mAb は、C57BL/6 マウスの肺においてマウス B16F10 腫瘍細胞病巣形成に有意な低下をもたらした。マウス 1D9 抗体の有効用量計画は 50 / 25 mg/kg、i.p. であったが、マウス 15D5 抗体では 25 / 5 mg/kg、i.p. 計画の方が高用量レベルに比べて有効性が大きかった。両マウス抗HER3 mAb とも、続いて異種移植モデルでヒト腫瘍に対する活性を評価した。

30

【0506】

マウス抗HER3 mAb は、進行性HER3 + ヒト異種移植片において定着腫瘍の増殖を遅延させた。CHL-1 黒色腫細胞移植後に 5 mg/kg を越える用量のマウス 1D9 抗体またはマウス 15D5 抗体で週に 2 回処置すると、腫瘍増殖に有意かつ用量依存的な低下が生じた。皮下 B x PC3 脾臓異種移植モデルでも同様の活性が見られた。

【0507】

1D9 抗体および 15D5 抗体は、CHL-1 黒色腫異種移植モデルにおいて、5 mg/kg 以上で用量依存的抗腫瘍活性を保持した。さらに、5 mg/kg でのヒト化 1D9 RR 抗体またはヒト化 1D9 RR アクリタマブ (商標) 抗体による処置は、25 mg/kg 以上の用量に比べて、腫瘍増殖の遅延をもたらした。

40

【0508】

皮下および同所 B x PC3 異種移植モデルにおいて、50 mg/kg のキメラ 1D9 抗体またはヒト化 15D5 抗体は、試験の終了まで有意な腫瘍増殖阻害を引き起こしたが、20 mg/kg のヒト化 1D9 RR 抗体は、皮下 B x PC3 モデルにおいて腫瘍増殖に有意な効果を示した。腫瘍増殖に対するこれらの抗体の有効性が実証された。

【0509】

最後に、NCI-N87 胃モデルにおいてヒト化 1D9 RR 抗体、ヒト化 1D9 R

50

R アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化 1 D 9 R R ボテリジェント (商標) 抗体を評価したところ、CHL - 1 黒色腫異種移植片に対する活性に比べて m A b 活性が増強される場合があることが示された。

【 0 5 1 0 】

6 . 結論

0 . 5 ~ 1 0 0 m g / k g の範囲の濃度で週に 2 回投与されるマウス親および / またはヒト化 H E R 3 モノクローナル抗体による療法は、CHL - 1 黒色腫モデルおよび B x P C 3 膵臓ヒト異種移植モデルにおいて、定着した H E R 3 + ヒト腫瘍の増殖を遅延させることができた。

【 0 5 1 1 】

実施例 9

1 . 概要

抗体依存性細胞傷害性 (A D C C) アッセイならびに補体媒介細胞傷害性 (C D C) アッセイの双方を用いて、野生型抗 H E R 3 抗体ならびにこれらの抗体の増強型の機能性を評価した。

【 0 5 1 2 】

本実施例は、前記抗体の野生型および増強型の機能性を評価するために用いた in-vitro アッセイを記載する。これらのアッセイでは、抗体の、その標的に結合し、その後、補体を付加する能力を評価するために種々の H E R 3 発現「標的」細胞を、または抗体の機能的 F c 領域を評価するために「エフェクター」細胞を用いた。

【 0 5 1 3 】

2 . 緒論

これらの実施例は、増強されていない「野生型」抗体よりも抗 H E R 3 の機能性 / 効力が増強された「増強型抗体」を示す。

【 0 5 1 4 】

3 . 方法

3 . 1 . 実験の予備事項

3 . 2 . 実験プロトコール

3 . 2 . 1 抗体依存性細胞傷害性

精製されたヒト末梢血単核細胞を、これらの A D C C アッセイにおいてエフェクター細胞として特性決定した。簡単に述べると、ナトリウムヘパリンを用いて採取したヒト全血を、密度勾配分離遠沈管 (U N I - S E P M A X (商標) 、 A c c u r a t e S u r g i c a l a n d S c i e n t i f i c 製) を用いて精製した。その後、これらの精製末梢血単核細胞を洗浄し、フェノールレッド不含 R M P I 1 6 4 0 + 1 0 % F B S に再懸濁させた (1×10^7 細胞 / m l T : E 比 1 : 5 0) 。次に、H E R 3 受容体陽性細胞 (H E R 3 B A C M A M (商標) 形質導入 H E K 2 9 3 M S R I I または C H L - 1 細胞) にユウロピウムを添加して標的細胞として用いた。これらの形質導入細胞を高 H E R 3 発現細胞系統として用い、C H L - 1 細胞を低発現細胞系統として用いた。添加済み標的細胞をフェノールレッド不含 R M P I 1 6 4 0 + 1 0 % F B S に 8×10^5 細胞 / m l となるように再懸濁させた。

【 0 5 1 5 】

数種の抗 H E R 3 抗体 (2 5 μ l / ウェル) を 9 6 ウェル丸底プレートに添加した。その後、この抗体含有プレートに、ユウロピウムを添加した標的細胞 (2 5 μ l / ウェル) を加え、3 7 、 5 % C O ₂ にて 3 0 分間インキュベートした。この 3 0 分のインキュベーション後に、1 0 0 μ l / ウェルのエフェクター細胞をプレートに加え、さらに 2 時間インキュベーターに戻した。特異的細胞溶解の測定は、実験プレートから 2 5 μ l / ウェルの上清を取り出し、1 0 0 μ l / ウェルの D E L F I A (商標) 増強溶液が入った 9 6 ウェル m a x i s o r p プレートに移すことにより行った。室温で 5 分のインキュベーション後に、プレートを W a l l a c V I C T O R (商標) V プレートリーダーにて時間分解蛍光を用いて読み取った。溶解した標的細胞から周囲の上清中へ放出されたユウロピ

10

20

30

40

50

ウム（細胞細胞傷害性）を蛍光単位として測定した。値を特異的溶解％に変換し、G R A P H P A D（商標）P R I S M（商標）ソフトウェアを用い、抗体濃度に対する溶解％としてプロットした。特異的細胞傷害性％を計算するために用いた式は下記の通りである。
【数 1】

$$\%細胞傷害性 = \frac{(\text{実験放出}) - (\text{自発的放出}) \times 100}{(\text{最大放出}) - (\text{自発的放出})}$$

対照ウェル： 洗剤 T R I T O N X（商標）の 1 % 溶液を「最大放出」ウェルに加えて細胞死とそれに続くユウロピウム放出を誘導した。「自発的」ユウロピウム放出のレベルを測定するために、いくつかの付加的対照ウェルに標的細胞を入れ、エフェクター細胞は含まなかった。

【0516】

形質導入： 適当な B A C M A M（商標）ウイルス（ヒト H E R 3、カニクイザル H E R 3 または ラット H E R 3）を H E K 2 9 3 M S R I I 細胞に多重感染度（m o i）100（24 時間に 8 ~ 15 % ウイルス（v / v）に相当）で加えた。その後、形質導入細胞を組織培養フラスコから T r y p L E を用いて取り出し、数回洗浄し、ユウロピウムを添加し、A D C C アッセイにおいて標的細胞として用いた。

【0517】

サル血液： 密度勾配分離バッファー（フィコール（FICOLL）（商標））を、C a₂ および M g₂ 不含 P B S で 10 %（v / v）希釈した後、サル末梢血リンパ球（エフェクター細胞）に対して密度勾配遠心分離を行った。

【0518】

ヒト血液はこれらの試験に対し、既定方針に従って用いた。サル血液は、既定プロトコールの下で得た。これらの試験に用いたモデルは、動物管理の U S スタンダードに準拠する。

【0519】

3.2.2 補体依存性細胞傷害性

これらの実験は、h H E R 3 B A C M A M（商標）形質導入 H E K 2 9 3 M S R I I 細胞系統を標的として用いて行った。簡単に述べると、これらの細胞に、T 1 7 5 培養フラスコ中、37、5 % C O₂ にて約 21 時間形質導入を行った（m o i 100）。その後、フラスコから接着細胞を、T r y p L E を用いて取り出し、数回洗浄した後に、96 ウェルプレートに 1 × 10⁵ 細胞 / 50 μl / ウェルで播種した。すぐに 25 μl / ウェルの抗ヒト H E R 3 m A b を加え、37、5 % C O₂ にて 30 分間インキュベートした。このインキュベーション後、カルピオケム（商標）製のウサギ補体 20 μl / ウェル（最終 20 %）を実験プレートに加え、37、5 % C O₂ にてさらに 2 時間インキュベートした。細胞生存率の評価は、マルチチャンネルピペットを用いて穏やかに混合しながら各ウェルに 100 μl の細胞 T I T E R - G L O（商標）を加えることによって行った。その後、このプレートの発光シグナルを W a l l a c V I C T O R（商標）V プレートリーダーで読み取った（生細胞はシグナルの増強を示す）。

【0520】

3.3 薬物および材料

ヒト H E R 3 B A C M A M（商標）

サル（カニクイザル）H E R 3 B A C M A M（商標）

フィコール（商標）G E H e a l t h c a r e # 17 - 1440 - 02

T R I T O N X - 100（商標）S i g m a # T9284

分離チューブ A c c u r a t e S u r g i c a l & S c i e n t i f i c # U N - 10

ユウロピウム F l u k a # 207128

96 ウェル丸底プレート C o s t a r # 3799)

96 ウェル平底プレート Thermo Scientific #436110
ヒト化1D9 Fc 障害抗体
ヒト化1D9 抗体
ヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体
ヒト化1D9 1D9 ポテリジェント (商標) 抗体
補体カルビオケム (商標) #234400
細胞TITER GLO (商標) Promega #G7571
DELFIA (商標) 増強溶液 #4001-0010
3.4. データ分析

GRAPHPAD (商標) PRISM (商標) ソフトウェアを用いて、抗体濃度に対して特異的溶解をプロットし、EC50 値を計算した。

10

【0521】

4. 結果

4.1. ADCC アッセイ

ヒト化1D9 抗体 (HZ1D9 または H6L2 と表記される場合もある)、ヒト化1D9 Fc 障害抗体、ヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体およびヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体を評価したヒトPBL ADCC アッセイから得られた結果を図48 および図49 に示す。これらの結果は、標的細胞としてHER3 BACMAM (商標) 形質導入HEK293 細胞およびエフェクター細胞としてヒト末梢血リンパ球を用いて得られたものである (図48)。この設定実験を、同時に、標的細胞集団としてCHL-1 細胞 (同じヒトPBL エフェクター細胞を用いる) を用いても行った (図49)。これらの結果は明らかに、野生型 (非増強) 抗体に比べて増強抗体では効力の増大と最大溶解の増大の双方が得られたことを示した。

20

【0522】

ヒト化1D9 抗体 (HZ1D9 または H6L2 と表記される場合もある)、ヒト化1D9 Fc 障害抗体、ヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体およびヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体を評価したカニクイザルPBL (末梢血リンパ球) ADCC アッセイから得られた結果を図50 ~ 図53 に示す。これらの結果は、標的細胞としてHER3 BACMAM (商標) 形質導入HEK293 細胞およびエフェクター細胞としてカニクイザル末梢血リンパ球を用いて得られたものである (図50 および図51)。この設定実験を、同時に、標的細胞集団としてCHL-1 細胞 (同じカニクイザルPBL エフェクター細胞を用いる) を用いても行った (図52 および図53)。これらの結果は明らかに、野生型 (非増強) 抗体に比べて増強抗体では効力の増大と最大溶解の増大の双方が得られたことを示した。

30

【0523】

4.2. CDC アッセイ

図54 に示される結果は、ヒトHER3 形質導入HEK293 標的細胞およびウサギ補体を用いたCDC アッセイから得られたものである。これらの結果は、ヒト化1D9 抗体 (HZ1D9 または H6L2 と表記される場合もある)、およびヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体がそれぞれ同レベルの補体媒介標的細胞溶解をもたらしたことを示した。一方、ヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体は、補体媒介溶解に、これらの他の抗体で見られるものを越える、少なくとも10 倍の向上を示した。ヒト化1D9 Fc 障害抗体は、測定可能な補体媒介溶解を示さなかった。

40

【0524】

5. 考察

本明細書に示される結果は、ヒト化1D9 抗体の増強型 (例えば、ヒト化1D9 アクリタマブ (商標) 抗体およびヒト化1D9 ポテリジェント (商標) 抗体) が抗体依存性細胞傷害性アッセイならびに補体依存性細胞傷害性アッセイの双方で機能の向上を示したことを証明した。これは、高 (ADCC および CDC) および低 (ADCC) ヒトHER3 発現細胞系統ならびにカニクイザルHER3 発現細胞 (ADCC) の双方で証明された。

50

【0525】

ヒトエフェクター細胞データは、ADCC / CDC 反応性を確保するために選択基準を用いなかったことから、ヒト集団において見られる得るものとして適切である。個々のヒトドナー間では違い（特異的溶解の高低）が見られるが、「Fc 増強」抗体は、親野生型抗体よりも高い効力を一貫して示した。カニクイザルエフェクター細胞データにより、本発明者らは、毒性試験全般に用いられる実際のサルからのエフェクター細胞の特性決定を行うことができた。

【0526】

まとめると、ヒト化 1D9 アクリタマブ（商標）抗体およびヒト化 1D9 ポテリジェント（商標）抗体は双方とも、ADCC および ADCC / CDC 機能の改善（それぞれ）を示した。

10

【0527】

実施例 101. 概要

マウス 15D5 抗体（M5.15D5.2A1.1H10）は、ヒト HER3 受容体のドメイン II 細胞外領域に結合するマウス抗 HER3 抗体である。この抗体は、冷凍物およびホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）物双方の癌性ヒト組織と十分に結合することが免疫組織化学により示されている。

【0528】

2. 緒論

20

HER3 発現を評価するための比較診断薬として使用できるかどうか、マウス 15D5 抗体（M5.15D5.2A1.1H10）のバリデーションを行った。この比較診断薬は、抗 HER3 モノクローナル抗体療法から臨床利益を受け得る患者を特定する助けとして使用することができる。この比較 mAb を用いれば、腫瘍を、腫瘍組織の HER3 発現レベル、および / または HER3 受容体発現の強度に基づいてカテゴリーに分類することができる。

【0529】

本実施例では、マウス 15D5 抗体（M5.15D5.2A1.1H10）の特異性のバリデーションの助けとして使用される重要な実験のいくつかの概要を述べる。本実施例の実験では、マウス 15D5 抗体（M5.15D5.2A1.1H10）抗体の、HER3 および他の HER ファミリーメンバー（例えば、HER1、HER2 および HER4）に対する免疫反応性および特異性を調べる。本実施例では、冷凍組織およびホルマリン固定パラフィン包埋組織に対する免疫組織化学；4つの HER ファミリーメンバー（例えば、HER1、HER2、HER3 および HER4）の免疫細胞化学；免疫沈降；特異性を確認するための競合アッセイ；ならびに細胞溶解液および精製 HER3 細胞外ドメイン領域 ウェスタンブロット法から得られた結果を記載する。

30

【0530】

3. 方法3.1. 実験の予備事項3.2. 実験プロトコール

40

3.2.1. Her ファミリーメンバーのウェスタンブロット

HEK 293 MSRII 細胞に HER1、HER2、HER3 または HER4 BACMAM（商標）を、37、5% CO₂ にて 22 時間、多重感染度（moi）100 で形質導入した。各細胞系統をバーセン (versene) を用いて採取した後、トリパンブルー排除染色を用いて細胞計数を行った。これらの細胞懸濁液を 10 ml の PBS で洗浄した後、 3×10^7 細胞を回収し、1 ml の RIPA 溶解溶液（RIPA 溶解原液：10 ml 1× RIPA 溶解バッファー + mini halt プロテアーゼ阻害剤 1 錠）中に入れた。その後、この調製物を 2 分間ボルテックスにかけ、遠心分離し、上清（細胞溶解液）を 4 で保存した。

【0531】

50

これらの細胞溶解液をLDSサンプルバッファーおよび還元剤と合わせた後、10分間70℃に加熱した。室温まで冷却した後、これらの溶解液をQIASHREDDER（商標）中に入れ、2分間14,000rpmで回転させた。次に、これらの溶解液を4~12%勾配Bis-Trisゲルの各レーンにのせ、電気泳動によりタンパク質を分離した。分離されたタンパク質をニトロセルロースに転写した後、0.1%Tween-20を含有するブロッキング溶液とともに一晩インキュベートした。HER1、HER2、HER3またはHER4ファミリーメンバーのいずれかに対する一次抗体を室温で5時間添加した。その後、IRコンジュゲート二次抗体とともに1時間インキュベートした。次に、これらのプロットを、LI-COR（商標）ODYSSEY（商標）画像解析装置を用いて可視化した。

10

【0532】

3.2.2. マウス15D5抗体を用いた免疫沈降

3×10^7 細胞/mlの懸濁液から上記のようにして調製した200μlの溶解液を10μgのマウス15D5抗体（M5.15D5.2A1.1H10）と合わせ、回転装置上、4℃で一晩インキュベートした。次に、この抗原-抗体複合体を50μlの沈降不動A/Gタンパク質樹脂（100μl樹脂スラリー）と合わせ、回転装置上、室温で2時間、穏やかに混合しながらインキュベートした。免疫沈降物を、4℃で5分間、5,000rpm（ $\sim 1,000 \times g$ ）で遠心分離することにより回収した。その後、このペレットを1ml RIPAバッファーで4回洗浄した。洗浄したペレットを20μlの1xLDSローディングバッファー（100μlのRIPAバッファー、33μlのLDSサンプルバッファー（4x）、13.3μlの還元剤（10x））に再懸濁させ、サンプルを100℃で5分間煮沸した。これらのサンプルを氷上で放冷した後、5,000rpm（ $\sim 1,000 \times g$ ）で1分間遠心分離した。次に、これらのサンプルをゲル（0.4μg/レーンのHER3抗原、10μl/レーンのHERファミリーBACMAM（商標）形質導入HEK293 MSRII溶解液および20μl/レーンのCHL-1細胞溶解液）にのせ、200Vでおよそ50分間泳動させた。ゲルで分離されたタンパク質をニトロセルロースに転写した後、得られたプロットを市販の抗HER3一次mAb（R&D System MAB3482）、次いで、IRコンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体とともにインキュベートした。その後、これらのプロットを、LI-COR（商標）ODYSSEY（商標）画像解析装置を用いて可視化した。

20

30

【0533】

3.2.3. Herファミリーメンバーの免疫細胞化学

HEK293 MSRII細胞にHer3 BACMAM（商標）を、37℃、5%CO₂にて24時間、100moiで形質導入した。次に、TrypLEを用いて細胞を採取し、細胞を計数し、PBSを用いて洗浄した。その後、PBS中、 0.5×10^6 細胞/mlの懸濁液を調製し、この懸濁液100μlを、顕微鏡スライドを取り付けたサイトスピン漏斗に加えた。これらを500rpmで5分間回転させて、50,000細胞を含む細胞スポットを得た。スライドを生物実験用フード内で一晩乾燥させ、翌日、室温のアセトンで2分間固定した。2時間乾燥させた後、これらのスライドをサランラップで包み、免疫染色に用いるまで-20℃で保存した。

40

【0534】

6枚のスライドを-20℃の冷凍庫から取り出し、室温とし、風乾させた。乾燥したところで、各細胞スポットをPapペンでマークして、染色のために疎水性のバリアを形成した。スライドをTBST（Tris緩衝生理食塩水+0.05%TWEEN-20（商標））中に入れて10分間水和させ、タンパク質ブロッキング溶液に30分間入れた。1μg/mlのマウス15D5抗体（一次抗体として）をそのままスライドに室温で2時間適用した。スライドをTBSTで3回洗浄し、HRPコンジュゲート抗マウス二次抗体をそのまま室温で2時間適用した。スライドをTBSTを用いて各5分間3回洗浄した後、DAB基質を2分間加えた。その後、スライドを水で各5分間3回すすぎ、ヘマトキシリン中に2分間置いた。次に、スライドを水で各5分間3回洗浄し、スライドを十分乾燥さ

50

せた後、観察のためにカバーガラスをかけた。

【0535】

3.2.4. HER3の細胞外ドメインII領域を用いた競合アッセイ

HEK293 MSRII細胞にHER3 BACMAM（商標）を、37、5% CO₂にて24時間、100moiで形質導入した。このインキュベーション時間の後、TrypLEを用いて細胞を採取し、細胞計数を行った後、PBSを用いて細胞を洗浄した。これらの細胞をPBSに0.5×10⁶細胞/mlとなるように再懸濁させ、100μlを、顕微鏡スライドを取り付けたサイトスピン漏斗に加えた。これらを500rpmで5分間回転させて、50,000細胞を含む細胞スポットを得た。スライドを生物実験用フード内で一晚乾燥させ、翌日、室温のアセトンで2分間固定した。2時間乾燥させた後、これらのスライドをサラン（商標）ラップで包み、免疫染色に用いるまで-20で保存した。

10

【0536】

次に、2枚のスライドを冷凍庫から取り出し、室温まで温め、風乾させた。乾燥したところで、各細胞スポットをPapペンを用いて丸で囲み、染色のために疎水性のバリアを形成した。スライドをTBST（Tris緩衝生理食塩水+0.05%TWEEN-20（商標））中に入れて10分間水和させ、タンパク質ブロッキング溶液に30分間入れた。1μg/mlの一次抗体、または1:1モル比の一次抗体とヒトHER3ドメインIIをそのままスライドに室温で2時間適用した。スライドをTBSTで3回洗浄し、HRPコンジュゲート抗マウス二次抗体をそのまま室温で1時間適用した。スライドをTBSTを用いて各5分間3回洗浄した後、DAB基質を5分間加えた。その後、スライドを水で各5分間3回洗浄し、スライドを十分乾燥させた後、観察のためにカバーガラスをかけた。

20

【0537】

3.2.5. HER3細胞外ドメインのウエスタンブロット

HER3の4つの細胞外ドメインを、還元剤を含むLDS（ドデシル硫酸リチウム）サンプルバッファーと合わせ、10分間70に加熱した。室温まで冷却した後、溶解液を4~12%勾配Bis-Trisゲルの各レーンにのせ、電気泳動によりタンパク質を分離した。分離されたタンパク質をニトロセルロースに転写することによりブロッティングしてブロットを形成し、このブロットを0.1%Tween-20を含有するブロッキング溶液とともに一晚インキュベートした。次に、このブロットを希釈したマウス15D5抗体（M5.15D5.2A1.1H10）とともに室温で2時間インキュベートした。次に、このブロットをIRコンジュゲート二次抗体とともに1時間インキュベートした。その後、LI-COR（商標）ODYSSEY（商標）画像解析装置を用いてブロットを可視化した。

30

【0538】

3.2.6. 冷凍組織およびFFPE組織の免疫組織化学

ヒト乳癌組織（16943a1d、16945a1o、22687a1p、23110a1k）を、同じ摘出腫瘍からの冷凍サンプルおよびホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルの双方として保存した。

40

【0539】

HER3受容体発現の免疫組織化学的（IHC）評価のために、保存したヒト乳癌組織の切片を作製した。簡単に述べると、FFPE組織を6μmの切片とし、VARIESTA IN（商標）Gemini ES自動スライド染色装置を用い、十分なキシレン置換シリーズとアルコール段階を行うことにより、脱パラフィンと再水和を行った。種々の条件を比較するため、DECLONING CHAMBER（商標）を用いていくつかの抗原賦活（エピトープ賦活）法を適用した。Tris-0.05%TWEEN-20（商標）バッファーを用いた洗浄工程の後、組織をペルオキシダーゼブロックとともに5分間インキュベートし、その後、タンパク質ブロック溶液でブロッキングした。これらの組織切片に一次抗体を30~60分間適用した。洗浄する工程の後、二次抗体を30~60分間適

50

用した。さらなる洗浄工程の後、DAB（ジアミノベンジジン）とともに5分間インキュベートした後に特異的免疫反応性を可視化した。その後、組織切片を水ですすぎ、1分間ヘマトキシリンで対比染色を行った。モノクローナル抗体染色は、Dako Autostainer Systemを用いて行った。

【0540】

冷凍組織を顕微鏡スライド上で6ミクロンの切片とし、室温で2時間乾燥させた。その後、スライド上の切片組織を室温で2分間、アセトンで固定し、乾燥させた。Tris-0.05%TWEEN-20（商標）バッファーで洗浄した後、それらの組織をペルオキシダーゼブロックとともに5分間インキュベートし、タンパク質ブロック溶液を受容させた。FFPE組織に関して上記で概略を示したように染色を続けた。

10

【0541】

3.2.7. Multi-Tumor TMAの免疫組織化学的評価

標準的な手動または自動染色プロトコルを用いてスライドを染色した。腫瘍を切片化し、脱パラフィンを行った。切片を内因性のペルオキシダーゼおよび非特異的抗体結合ブロッキング溶液とともにインキュベートし、エピトープ賦活を行った後、一次抗体とともにインキュベートした。インキュベーションとインキュベーションの間には洗浄工程を行った。非特異的結合に対する標準的なブロッキング工程を行った。標準的な抗原賦活技術を行った。手動染色では、ABC（商標）HRPキット（Vector Laboratories, Inc.）を併用する二次ビオチン化抗体か、またはENVISION（商標）HRPコンジュゲートポリマーキット（Dako North America, Inc.）および製造者の説明書に一致するジアミノベンジジン基質反応産物のいずれかを用いて結合を可視化した。自動染色可視化では、OMNIMAP（商標）HRPポリマー化学（Ventana Medical Systems, Inc.）を用いて可視化を行った。適当であれば、標準的なヘマトキシリンまたはメチルグリーン核対比染色技術を用いて切片を対比染色した。

20

【0542】

3.3. 薬物および材料

HER1 BACMAM（商標）virons

ヒトHER2 BACMAM（商標）virons

ヒトHER3 BACMAM（商標）virons

30

ヒトHER4 BACMAM（商標）virons

LDSサンプルバッファー（Invitrogen NP0007）

QIASHREDDER（商標）（Qiagen 79656）

MINI-HALT（商標）プロテアーゼ阻害剤（Roche diagnostics 13535400）

ウエスタンブロックバッファー（Rockland MB-070）

ニトロセルロース膜（Invitrogen LC2000）

ウサギ抗ヒトErbb2（ヒトHER2）（Dako A0485）

マウス抗ヒトEGFR（ヒトHER1）Dako M3563クローンH11

ヤギ抗マウスIR-DYE800（商標）抗体（Rockland 610-131-121）

40

ヤギ抗ウサギIR-DYE680（商標）抗体（Li-Cor Odyssey 827-88367）

抗ヒトHER3モノクローナル抗体（R&D System MAB3482）

Tris緩衝生理食塩水（Dako #S1968）

ENVISION（商標）System-HRP DABキット（Dako #K4007）

マウス15D5抗体（M5.15D5.2A1.1H10）（3.19mg/ml）

ヒトHER3ドメインII（競合に使用）（1.66mg/ml）

タンパク質ブロック溶液（Dako X0909 ロット10037797）

50

THERMO SHANDON EZ DOUBLE CYTOFUNNEL (商標) (#A78710005)

VWR SUPERFROST PLUS (商標) #48311-703

TRYPLE (商標) Select (Gibco 12563-011)

RIPAバッファ (Sigma R0278)

Multi-tumor human Tissue Micro Array (TMA) Hu80357 (CAMB12-GSK-TMA-Origene)

4. 結果

4.1.1.

4つのHERファミリーメンバーを発現した細胞溶解液のウエスタンブロット法によれば、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)がヒトHER3を選択的に認識し、ヒトHER1、ヒトHER2およびヒトHER4に対する交差反応性はほとんどないか、全くないことが示された。HER2およびHER1の発現を確認し、また比較するために、HER2に対する市販の抗体(Dako)およびHER1に対する市販の抗体(Dako)をこれらの溶解液で試験した。これらの結果によれば、ヒトHER2およびヒトHER1はHEK293細胞で行われた形質導入によって発現されたことが確認された。これらの結果はまた、抗HER2抗体(Dako)とある程度の交差反応性を示した。

【0543】

4.1.2.

ヒトHER3を形質導入したHEK293細胞およびCHL-1細胞を用いた免疫沈降実験では、高および低HER3発現細胞系統を検討する機会が得られた。これらの実験では、免疫沈降物中のヒトHER3の検出のためにマウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)または市販の抗HER3抗体(R&D Systems)を用いた場合に、免疫反応性の類似のバンドパターンが示された。

【0544】

4.1.3.

マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)を用いたヒトHER1、ヒトHER2、ヒトHER3およびヒトHER4 BACMAM (商標) 形質導入細胞の免疫組織化学分析では、ヒトHER3に対する強い免疫反応性が示され、他のHERファミリーメンバーとの免疫反応性はほとんどないか、全くなかった。マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)はヒトHER3と優先的に結合する。

【0545】

4.1.4.

マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)またはマウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)を当モル濃度のヒトHER3ドメインII ECDと組み合わせて用いた場合の競合アッセイでは、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)の免疫反応性が、ヒトHER3のドメインIIとともにブレインキュベーションを行うことにより完全に遮断されたことを示した。これらの結果により、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)がヒトHER3受容体の細胞外ドメインII領域に特異的に結合することが確認される。

【0546】

4.1.5.

HER3細胞外ドメインのウエスタンブロット分析では、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)の、ヒトHER3のドメインIIに対する特異性、およびこの抗体にはヒトHER3のドメインI、IIIおよびIVとの免疫反応性がないことが示された。

【0547】

4.1.6.

冷凍物およびFFPE物の対応する癌性乳房組織(n=4)の免疫組織化学染色は、一

10

20

30

40

50

致する染色パターンを示した。FFPE組織の構造的保全性は冷凍サンプルよりも保存状態が良いが、膜染色のパターンはこれら2種類の保存法で同様であった。図6は、これらの冷凍および固定乳房組織に見られる膜染色の1枚の代表的な写真を示す。

【0548】

4. 1. 7.

腫瘍および代表的な正常組織を含むマルチ腫瘍アレイ(Hu80357)で、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)を用いてHER3の発現を評価した。示されている結腸、前立腺、乳房、子宮内膜、脳および皮膚腫瘍核の質的評価は総てヒトHER3の発現を示した。腎臓腫瘍1サンプルおよび肺癌1サンプルもヒトHER3の発現を示した。ヒトHER3の最も強い発現は黒色腫および前立腺腫瘍サンプルで見られた。黒色腫7サンプルおよび前立腺腫瘍7サンプルは、強いヒトHER3の発現を示した。乳癌8サンプルもヒトHER3の発現を示した。正常組織サンプルは、腫瘍サンプルよりも著しく低いシグナルを示したが、正常結腸3サンプルおよび正常乳房1サンプルはある程度のシグナルを示した。

【0549】

5. 考察および要約

本報告に記載されている実験は、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)の感受性および特異性を実証する。本明細書に記載されるように、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)は、まず、ハイブリドーマパネルから、予備ELISAスクリーニングに基づき、HER3の細胞外領域に対するその特異性に関して選択された。HER3のさらなる特異性の決定は、ウエスタンブロット法およびBACMAM(商標)形質導入細胞を用いた免疫細胞化学によって行った。これらの実験では、ヒトHER3形質導入細胞は特異的免疫反応性を示したが、他のヒトHERファミリーメンバーを発現する細胞は反応性がほとんどないことを示した。マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)を市販の抗体と組み合わせて免疫沈降アッセイでも用いたところ、HER3の特異的「プルダウン(pull-down)」を示した。さらに、ヒトHER3形質導入細胞のサイトスピン標本ならびにこれらの細胞冷凍標本に対して免疫細胞化学分析を行ったところ、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)がどのアッセイでもHER3を認識し、免疫組織化学アッセイにおいてHER3に結合できることが確認された。このマウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)のヒトHER3受容体への結合は、この抗体をヒトHER3の細胞外ドメインII領域とともにブレインキュベートすることによって遮断することができたが、これにより、HER3のこの領域に対するその特異性が確認される。

【0550】

ホルマリン固定されかつパラフィン処理された、同様のバキュロウイルス形質導入細胞に対するマウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)についても、さらなる免疫組織化学的プロトコルを開発したところ、細胞の調製法にかかわらず、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)の、IHCによるHER3検出能が示された。本実施例に記載される実験で、乳癌の冷凍サンプルとFFPEサンプルの対応する対でヒトHER3の免疫反応性を実証することにより、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)の挙動の、このクロスプラットフォームの一貫性が確認される。マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)により検出されるヒトHER3シグナルの存在量および相対的発現は、両検体調製法で同じであった。種々腫瘍タイプのパネルに対してマウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)を用いる免疫組織化学的標的バリデーション試験は発現の違いを示したが、特定の腫瘍タイプ(例えば、黒色腫、前立腺癌、乳癌)内では、HER3のパターンおよび相対的存在量に一貫性が見られた。さらに、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)は、種々のプロトコルおよび染色系においてHER3の検出に成功を収めた。これらの所見は、マウス15D5抗体(M5.15D5.2A1.1H10)が、プロトコルおよび検体の保存法に関わらず、腫瘍切片における免疫組織化学によりヒトHER3を一貫

して正確に検出できることを示している。

【 0 5 5 1 】

マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) はまた、種々のアッセイにおいて H E R 3 の細胞外ドメインを特異的に検出する。本実施例ではまた、マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) がこれらのアッセイにおいて変形形態であっても一貫して機能することも記載した。特に、マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) は、組織切片において免疫組織化学によりヒト H E R 3 を検出するのに高い程度の特異性および感受性を示した。さらに、マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) は、同じサンプルにおいて異なるアッセイを用いて同レベルのヒト H E R 3 を検出することができた (マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) シグナルとヒト H E R 3 の存在量の間に正比例を示す) 。本実施例に記載された結果を考え合わせると、マウス 1 5 D 5 抗体 (M 5 . 1 5 D 5 . 2 A 1 . 1 H 1 0) の性能、特異性および一貫性が実証され、ヒト H E R 3 診断アッセイ (例えば、I H C アッセイ) における抗体試薬としてのその適性が裏付けられる。

10

【 0 5 5 2 】

実施例 1 1

非公式配列表

以下の下線は、抗体の可変重鎖および可変軽鎖部分の C D R 配列、またはこれらの C D R 配列をコードする核酸配列を示す。例えば、配列番号 1 では、フレームワークおよび C D R は、示されている配列の近位アミノ末端部分から遠位カルボキシ末端部分の順に、プレーンテキストのフレームワーク 1、下線の C D R 1、プレーンテキストのフレームワーク 2、下線の C D R 2、プレーンテキストのフレームワーク 3、下線の C D R 3 およびプレーンテキストのフレームワーク 4 として表される。以下の斜体はシグナル配列を示す。1 文字アミノ酸コードの記号の右側のアスタリスクは、左側のアミノ酸残基が可能性のある N - グリコシル化部位であることを示す。この図式は例えば配列番号 5、9、13、17、22、26、30、34、38 ~ 43、44、48、57 などに用いられている。本明細書に開示される種々の抗体に関する詳細を示す表も提供する。下記表 1 7 参照。

20

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ V H

配列番号 1

30

【 化 9 】

SEQ ID NO: 1

EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQNNGKSLEWIGGINPNYGTTV
YNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLVSLTSEDSAVYYCARMTTIVPFDYWGQGTTTLTVSS

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ C D R H 1

配列番号 2

【 化 1 0 】

SEQ ID NO: 2

DYNMN

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ C D R H 2

配列番号 3

【 化 1 1 】

SEQ ID NO: 3

GINPNYGTTVYNQKFKG

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ C D R H 3

配列番号 4

40

【化 1 2】

SEQ ID NO: 4

MTTIVPFDY

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ V L

配列番号 5

【化 1 3】

SEQ ID NO: 5

DIQMTQTTFSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSTLHSGVPSR
FSGSGSGTDYFLTIRNLEEEDIATYFCQOQGYTLPWTFGGGTKLDIK

10

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ C D R L 1

配列番号 6

【化 1 4】

SEQ ID NO: 6

RASQDISNYLN

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ C D R L 2

配列番号 7

【化 1 5】

20

SEQ ID NO: 7

YTSTLHS

M 5 _ 1 5 D 5 _ 2 A 1 _ 1 H 1 0 _ C D R L 3

配列番号 8

【化 1 6】

SEQ ID NO: 8

QOQGYTLPWT

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ V H

配列番号 9

【化 1 7】

SEQ ID NO: 9

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGMHWLRQAPEKGLEWVAYITSGSSEIY
YVDTVKGRFTISRDNAKNTLCLQMTSLRSEDTAMYHCARGYGYREGYFDVWGTGTTVT
VSS

30

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R H 1

配列番号 10

【化 1 8】

40

SEQ ID NO: 10

DYGMH

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R H 2

配列番号 11

【化 1 9】

SEQ ID NO: 11

YITSGSSEIYYVDTVKG

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R H 3

50

配列番号 1 2

【化 2 0】

SEQ ID NO: 12

GYGYREGYFDV

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ V L _ L C 1

配列番号 1 3

【化 2 1】

SEQ ID NO: 13

DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNLWLLQRPQGSPKRLIYLLVSKLDS
GVPRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCWQGFHPQTFGGGTKLEIK

10

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R L 1 _ L C 1

配列番号 1 4

【化 2 2】

SEQ ID NO: 14

KSSQSLLDSDGKTYLN

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R L 2 _ L C 1

配列番号 1 5

【化 2 3】

SEQ ID NO: 15

LVSKLDS

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R L 3 _ L C 1

配列番号 1 6

【化 2 4】

SEQ ID NO: 16

WQGFHPQT

30

> M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ V L _ L C 2

配列番号 1 7

【化 2 5】

SEQ ID NO: 17

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRITSENVYSNLAWYQQKQGRSPQLLVYGATRLPDGVP
ARFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYCQLFWGIPITFGAGTKLELK

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R L 1 _ L C 2

配列番号 1 8

【化 2 6】

SEQ ID NO: 18

RTSENVYSNLA

40

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R L 2 _ L C 2

配列番号 1 9

【化 2 7】

SEQ ID NO: 19

GATRLPD

M 5 _ 2 2 A 5 _ 1 G 6 _ 1 C 1 0 _ C D R L 3 _ L C 2

50

配列番号 20

【化28】

SEQ ID NO: 20

QLFWGIPLT

ヒトHER3アミノ酸配列

配列番号 21

【化29】

SEQ ID NO: 21

MRANDALQVLGLLFSLARGSEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLYKLYERCEV
VMGNLEIVLTGHNADLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDGKFAI
FVMLNYNTNSSHARQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVK
DNGRSCPPCHEVCKGRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGPNNQCCHDECAGGCS
GPQDTCFACRHFNDSGACVPRCPQLVYNKLTFLQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFV
VDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTVDSNIDGFVNC
TKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVSFNL
TTIGGRSLYNRGSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHSLNWTKVLRG
PTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNF
LNGEPREFAHEAECFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGPCHVSSCPHGVL
GAKGPIYKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLTMAITVIAGLV
VIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRAMRRYLERGESIEPLDPSEKANKVLARIFKETELRKLK
VLGSGVFGTVHKGVWIPAGESIKIPVCIKVEDKSGRQSFQAVTDHMLAIGSLDHAHIVRL
LGLCPGSSLQLVTQYLPLGSLLDHVRQHRGALGPQLLLNWGVQIAKGMYYLEEHGMVH
RNLAARNVLLKSPSQVQVADFGVADLLPPDDKQLLYSEAKTPIKWMALESIHFGKYTHQ
SDVWSYGVTVWELMTFGAEPYAGLRLAEVPDLLEKGERLAQPQICTIDVYVMVMVKCW
MIDENIRPTFKELANEFTRMARDPPRYLVIKRESGPGIAPGPEPHGLTNKKLEEVELEPELD
LDLDLEAEEDNLATTTLSALSLPVGTLNRPRGSQSLLSPSSGYMPMNQGNLGESCQESA
VSGSSERCPRPVSLHPMPRGCLASESSEGHVGTGSEAELQEKVSMCRSRSRSPRPRGDSA
YHSQRHSLTTPVTPLSPGLEEEDVNGYVMPDTHLKGTPSSREGTLSSVGLSSVLGTEED
EDEEYEMNRRRRHSPPHPPRPSLEELGYEYMDVGSLSASLGSTQSCPLHPVPIMPTA
GTTDPDEDYEMNRQRDGGGPGGDYAAMGACPAEQGYEEMRAFGQPGHQAPHVHYA
RLKTLRSLEATDSAFDNPDYWHSRLFPKANAQRT

10

20

ヒト化__15D5__VHアミノ酸配列

30

ヒト化15D5 H4

配列番号 22

【化30】

SEQ ID NO: 22

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMNWVRQAPGQGLEWMGGINPNYGT
TVYNQKFKGKVTLTVDTISISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARMTTIVPFDYWGQGTTVTV
SS

ヒト化__15D5__CDRH1アミノ酸配列

配列番号 23

40

【化31】

SEQ ID NO: 23

DYNMN

ヒト化__15D5__CDRH2アミノ酸配列

配列番号 24

【化32】

SEQ ID NO: 24

GINPNYGTTVYNQKFKG

50

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ C D R H 3 アミノ酸配列
配列番号 2 5
【化 3 3】

SEQ ID NO: 25

MTTIVPFDY

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ V L アミノ酸配列
ヒト化 1 5 D 5 L 1
配列番号 2 6
【化 3 4】

10

SEQ ID NO: 26

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSR
FSGSGSGTDYFTISSLQPEDATYYCQQGYTLPTWTFGGGTKVEIKR

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ C D R L 1 アミノ酸配列
配列番号 2 7
【化 3 5】

SEQ ID NO: 27

RASQDISNYLN

20

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ C D R L 2 アミノ酸配列
配列番号 2 8
【化 3 6】

SEQ ID NO: 28

YTSTLHS

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ C D R L 3 アミノ酸配列
配列番号 2 9
【化 3 7】

SEQ ID NO: 29

QQGYTLPTW

30

ヒト化 __ 1 D 9 __ V H アミノ酸配列
配列番号 3 0
ヒト化 1 D 9 H 6
【化 3 8】

SEQ ID NO: 30

Humanized 1D9 H6

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWRQAPGGLEWMGVDPDSGY
SHYNQKFKGKVTLTVDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAGGLAGTLDYWGQGTITVTV
SS

40

ヒト化 __ 1 D 9 __ C D R H 1 アミノ酸配列
配列番号 3 1
【化 3 9】

SEQ ID NO: 31

SYWMH

ヒト化 __ 1 D 9 __ C D R H 2 アミノ酸配列
配列番号 3 2

50

【化 4 0】

SEQ ID NO: 32

VIDPSDGYSHYNQKFKG

ヒト化 __ 1 D 9 __ C D R H 3 アミノ酸配列

配列番号 3 3

【化 4 1】

SEQ ID NO: 33

GLAGTLDY

ヒト化 __ 1 D 9 __ V L アミノ酸配列

配列番号 3 4

ヒト化 1 D 9 L 2

【化 4 2】

SEQ ID NO: 34

Humanized 1D9 L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSSGNTYLQWFQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
GVPSRFGSGSGTDFLTITISLQPEDFAVYYCFQGSHPWTFGQGTKLEIKR

10

20

ヒト化 __ 1 D 9 __ C D R L 1 アミノ酸配列

配列番号 3 5

【化 4 3】

SEQ ID NO: 35

RSSQSIVHSSGNTYLQ

ヒト化 __ 1 D 9 __ C D R L 2 アミノ酸配列

配列番号 3 6

【化 4 4】

SEQ ID NO: 36

KVSNRFS

ヒト化 __ 1 D 9 __ C D R L 3 アミノ酸配列

配列番号 3 7

【化 4 5】

SEQ ID NO: 37

FQGSHPWT

マウス 1 5 D 5 __ V H 核酸配列

配列番号 3 8

【化 4 6】

SEQ ID NO: 38

GAGTTCCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAA
GATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTGAA
GCAGAACAACGGCAAGAGCCTGGAGTGGATCGGCGGCATCAACCCCAACTACGGCA
CCACCGTGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACCAGAGC
AGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGGTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTAC
TACTGCGCCAGGATGACCACCATCGTGCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACC
CTGACCGTGAGCAGC

マウス 1 5 D 5 __ V L 核酸配列

30

40

50

配列番号 39

【化 47】

SEQ ID NO: 39

GACATCCAGATGACCCAGACCACCTTCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACAGGGTG
ACCATCAGCTGCAGGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCAG
AAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACCAGCACCCCTGCACAGCGGC
GTGCCAGCAGGTTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACTTCCTGACCATCAGG
AACCTGGAGGAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCTACACCCTGCCC
TGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGACATCAAG

10

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ V H 核酸配列 (細胞)

ヒト化 1 5 D 5 H 4

配列番号 40

【化 48】

SEQ ID NO: 40

CAGGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGGGCCGAGGTGAAGAAACCCGGCGCTAGCGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTGAG
GCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGGCATCAACCCCAACTACGGCA
CCACCGTGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGTGACCCTGACCGTGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGGCTGAGGAGCGACGATACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCAGGATGACCACCATCGTGCCCTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCT
GTGACAGTGTCAAGC

20

ヒト化 __ 1 5 D 5 __ V L 核酸配列 (細胞)

ヒト化 1 5 D 5 L 1

配列番号 41

【化 49】

SEQ ID NO: 41

GACATCCAGATGACCCAGTCACCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGT
GACCATTAACCTGCAGGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCA
GAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCTCCACCCTGCACAGCGG
CGTGCCCTCTAGGTTCTCCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACCTTCACCATCAG
CAGCCTGCAGCCCGAGGACATCGCCACCTACTATTGCCAGCAGGGCTACACCCTCCC
CTGGACTTTCGGAGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGU

30

ヒト化 __ 1 D 9 __ V H 核酸配列 (細胞)

ヒト化 1 D 9 H 6

配列番号 42

【化 50】

SEQ ID NO: 42

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCCAAGCGACGGGT
ACAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGTCAACCCTGACCGTGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCAAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCGGAGGCCTGGCTGGCACCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACAGTG
ACCGTGAGCAGC

40

ヒト化 __ 1 D 9 __ V L 核酸配列 (細胞)

ヒト化 1 D 9 L 2

配列番号 43

【化 5 1】

SEQ ID NO: 43

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATTACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGCACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTtCCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGC
AACAGGTTcAGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTC
ACCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGG
GAAGCCACGTGCCCTGGACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

マウス__1D9__VHアミノ酸配列

配列番号 4 4

M5 . 1D9 . 1F5 VH

【化 5 2】

SEQ ID NO: 44

M5.1D9.1F5 VH

QVQLQQPGAELVRPGTSVKLSCKASGYTFTSSYWMHWVKQRPGQGLEWIGVIDPSDGYS
HYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAGGLAGTLDYWGQGTTLTVS
S

マウス__1D9__CDRH1アミノ酸配列

配列番号 4 5

【化 5 3】

SEQ ID NO: 45

SYWMH

マウス__1D9__CDRH2アミノ酸配列

配列番号 4 6

【化 5 4】

SEQ ID NO: 46

VIDPSDGYSHYNQKFKG

マウス__1D9__CDRH3アミノ酸配列

配列番号 4 7

【化 5 5】

SEQ ID NO: 47

GLAGTLDY

マウス__1D9__VLアミノ酸配列

配列番号 4 8

M5 . 1D9 . 1F5 VL

【化 5 6】

SEQ ID NO: 48

M5.1D9.1F5 VL

DVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSSGNTYLOWFLQKPGQSPKLLISKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGLYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIK

マウス__1D9__CDRL1アミノ酸配列

配列番号 4 9

10

20

30

40

【化 5 7】

SEQ ID NO: 49

RSSQSIVHSSGNTYLQ

マウス__1 D 9 __ C D R L 2 アミノ酸配列
配列番号 5 0

【化 5 8】

SEQ ID NO: 50

KVSNRFS

マウス__1 D 9 __ C D R L 3 アミノ酸配列
配列番号 5 1

【化 5 9】

SEQ ID NO: 51

FQGSHPWT

マウス__1 D 9 __ V H 核酸配列
配列番号 5 2

【化 6 0】

SEQ ID NO: 52

CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCCGGCGCCGAGCTGGTGAGGCCCGGCACCAGCGTGAA
GCTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAA
GCAGAGGCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGTGATCGACCCAGCGACGGCT
ACAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACACCAGC
AGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTA
CTACTGCGCCGGCGGCCTGGCCGGCACCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
GACCGTGAGCAGC

マウス__1 D 9 __ V L 核酸配列
配列番号 5 3

【化 6 1】

SEQ ID NO: 53

GACGTGCTGATGACCCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTGAGCCTGGGCGACCAGGCC
AGCATCAGCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCT
GCAGTGGTTCCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCAGCAAGGTGAG
CAACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTT
CACCTGAGGATCAGCAGGGTGAGGCCGAGGACCTGGGCCTGTACTACTGCTTCCA
GGGCAGCCACGTGCCCTGGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

マウス__2 2 A 5 __ V H 核酸配列
配列番号 5 4

【化 6 2】

SEQ ID NO: 54

GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGAAGCCCGGCGGCAGCCTGAA
GCTGAGCTGCGCCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCGACTACGGCATGCACTGGCTGAG
GCAGGCCCCCGAGAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCTACATCACCAGCGGCAGCAGCG
AGATCTACTACGTGGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCA
AGAACACCCTGTGCCTGCAGATGACCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCATGTACC
ACTGCGCCAGGGGCTACGGCTACAGGGAGGGCTACTTCGACGTGTGGGGCACCGGCA
CCACCGTGACCGTGAGCAGC

10

20

30

40

50

マウス__22A5__VL 核酸配列

配列番号 55

【化63】

SEQ ID NO: 55

GACGTGGTGATGACCCAGACCCCCCTGACCCTGAGCGTGACCATCGGCCAGCCCCGCC
AGCATCAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGGACAGCGACGGCAAGACCTACCT
GAACTGGCTGCTGCAGAGGCCCGGCCAGAGCCCCAAGAGGCTGATCTACCTGGTGAG
CAAGCTGGACAGCGGCGTGCCCGACAGGTTACCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACT
TCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGCTGGC
AGGGCACCCACTTCCCCCAGACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

10

マウス__22A5__VL 核酸配列

配列番号 56

【化64】

SEQ ID NO: 56

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCGCCAGCCTGAGCGTGAGCGTGGGCGAGACCGT
GACCATCACCTGCAGGACCAGCGAGAACGTGTACAGCAACCTGGCCTGGTACCAGCA
GAAGCAGGGCAGGAGCCCCAGCTGCTGGTGTACGGCGCCACCAGGCTGCCCCAGC
GCGTGCCCGCCAGGTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCCAGTACAGCCTGAAGATC
AACAGCCTGCAGAGCGAGGACTTCGGCACCTACTACTGCCAGCTGTTCTGGGGCATC
CCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAG

20

ヒト化__1D9__E__VL アミノ酸配列

配列番号 57

ヒト化 1D9 E L2

【化65】

SEQ ID NO: 57

Humanized 1D9 E L2

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIVHSSGNTYQLWFQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCFQGSHPWTFGQGTKLEIKRR

30

ヒト化__1D9__E__VL 核酸配列 (細胞)

配列番号 58

【化66】

SEQ ID NO: 58

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATTACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGCACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTCCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGC
AACAGGTTACAGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTC
ACCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGG
GAAGCCACGTGCCCTGGACTTTTGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGGCGT

40

マウス 15D5__VH 核酸配列 (細胞)

配列番号 59

【化 6 7】

SEQ ID NO: 59

GAGTTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAG
ATATCCTGCAAGGCCTCTGGTTACTCATTTACTGACTACAATATGAACTGGGTGAAAC
AGAACAATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGAATTAATCCTAACTATGGTACTA
CTGTTTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACCAATCTTCCA
GCACAGCCTACATGCAGCTCGTTAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTATTG
TGCAAGAATGACCACGATAGTTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC
AGTCTCCTCA

マウス 1 5 D 5 __ V L 核酸配列 (細胞)

10

配列番号 6 0

【化 6 8】

SEQ ID NO: 60

GATATCCAGATGACACAGACTACATTCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCA
CCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGA
AACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTATTACACATCAACATTACACTCAGGAG
TCCCATCAAGATTCAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTTTCTCACCATTAGGAA
CCTGGAGGAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTTATACGCTTCCGTGG
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGGACATCAAA

マウス __ 1 D 9 __ V H 核酸配列 (細胞)

20

配列番号 6 1

【化 6 9】

SEQ ID NO: 61

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAG
TTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTAAAGC
AGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATCGGAGTGATTGATCCTTCTGATGGTTATA
GTACTACAATCAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACTTTGACTGTAGACACATCCTCCA
GTACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTG
TGCAGGAGGCTTAGCTGGGACGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTCTCACAGT
CTCCTCA

30

マウス __ 1 D 9 __ V L 核酸配列 (細胞)

配列番号 6 2

【化 7 0】

SEQ ID NO: 62

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCT
CCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTTCTGGAAACACCTATTTACA
ATGGTTCCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTCCAAAGTTTCCAAC
CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACA
CTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTTTATTACTGCTTTCAAGGT
TCACATGTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGGAAATCAAA

40

マウス __ 2 2 A 5 __ V H 核酸配列 (細胞)

配列番号 6 3

【化 7 1】

SEQ ID NO: 63

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCCGGAGGGTCCCTGAA
ACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTGACTATGGAATGCACTGGCTTCGT
CAGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTTGCATACATTACTAGTGGCAGTAGTGAA
ATCTACTATGTAGACACAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAG
AACACCCTGTGCCTGCAAATGACCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATCAC
TGTGCAAGGGGCTACGGTTATAGAGAGGGGTACTTCGATGTCTGGGGCACAGGGACC
ACGGTCACCGTCTCCTCA

マウス__2 2 A 5 __V L 核酸配列 (細胞)

10

配列番号 6 4

【化 7 2】

SEQ ID NO: 64

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCT
CCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGA
ATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAA
ACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTAC
ACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGG
TACACATTTTCTCAGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

20

マウス__2 2 A 5 __V L 核酸配列 (細胞)

配列番号 6 5

【化 7 3】

SEQ ID NO: 65

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCA
CCATCACATGTGCAACAAGTGAGAATGTTTACAGTAATTTAGCATGGTATCAGCAGA
AACAGGGAAGATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGGTGCAACAAGGTTACCAGATGGTG
TGCCAGCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCAACA
GCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGACTTATTACTGTCAACTTTTTTGGGGTATCCCGCT
CACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

30

ヒトHER3細胞外ドメインw/oシグナル配列 (結晶構造に相当)

配列番号 6 6

【化 7 4】

SEQ ID NO: 66

SEVGNSQAVCPGTLNGLSVTGDENQYQTLTKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNA
DLSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVVRGTQVYDQKFAIFVMLNYNTN
SSHALRQLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCHMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGR
SCPPCHEVCKGRCWGPGEEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHDECAGGC
SGPQDQDTCFACRHFNDGACVPRCPQPLVYNKLTQLEPNPHTKYQYGGVCVAS
CPHNFVVDQTSVVRACPPDKMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQT
VDSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITGLNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLN
IQSWPPHMHNFVFSNLTTIGGRSLYNRGFSLLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIY
ISANRQLCYHHSLNWTKVLRGPTTEERLDIKHNRPRRDCVAEGKVCDPLCSSGGC
WGPQPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAEAEFCFSCHPECQPMEGTA
TCNGSGSDTCAQCAHFRDGPVCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPDVQNECRPCHENC
TQCGKGPQLQDCLGQTLVLIGKTHLT

40

ヒト化1D9 H0 VHアミノ酸配列

配列番号 6 7

【化 7 5】

SEQ ID NO: 67

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDPSDGY
SHYNQKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGLAGTLDYWGQGTITVTV
SS

ヒト化 1 D 9 H 0 V H 核酸配列

配列番号 6 8

【化 7 6】

SEQ ID NO: 68

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCAGCGACGGGT
ACAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCAAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCAGGGGCCTGGCTGGCACCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTG
ACCGTGAGCAGC

10

ヒト化 1 D 9 H 1 V H アミノ酸配列

配列番号 6 9

【化 7 7】

SEQ ID NO: 69

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDPSDGY
SHYNQKFKGRVTMTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGLAGTLDYWGQGTITVTV
SS

20

ヒト化 1 D 9 H 1 V H 核酸配列

配列番号 7 0

【化 7 8】

SEQ ID NO: 70

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCAGCGACGGGT
ACAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCATGACCGTGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCAAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCAGGGGCCTGGCTGGCACCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTG
ACCGTGAGCAGC

30

ヒト化 1 D 9 H 2 V H アミノ酸配列

配列番号 7 1

【化 7 9】

SEQ ID NO: 71

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGVIDPSDGY
SHYNQKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAGGLAGTLDYWGQGTITVTV
SS

40

ヒト化 1 D 9 H 2 V H 核酸配列

配列番号 7 2

【化 8 0】

SEQ ID NO: 72

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCAGCGACGGGT
ACAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCAAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCGGAGGCCTGGCTGGCACCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTG
ACCGTGAGCAGC

ヒト化 1 D 9 H 3 V H アミノ酸配列

配列番号 7 3

【化 8 1】

SEQ ID NO: 73

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWRQAPGQGLEWMGVDPDSDGY
SHYNQKFKGKVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGLAGTLDYWGQGTTVT
SS

ヒト化 1 D 9 H 3 V H 核酸配列

配列番号 7 4

【化 8 2】

SEQ ID NO: 74

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAG
GCAGGCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCAGCGACGGGT
ACAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGTCACCATGACCAGGGACACCAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTCAAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTAC
TATTGCGCCAGGGGCCTGGCTGGCACCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTG
ACCGTGAGCAGC

ヒト化 1 D 9 L 0 V L アミノ酸配列

配列番号 7 5

【化 8 3】

SEQ ID NO: 75

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSSGNTYLOWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFAVYYCFQGSHPWTFGQGTKLEIKR

ヒト化 1 D 9 L 0 V L 核酸配列

配列番号 7 6

【化 8 4】

SEQ ID NO: 76

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATTACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTACCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGC
AACAGGTTACGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTC
ACCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGG
GAAGCCACGTGCCCTGGACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

ヒト化 1 D 9 L 3 V L アミノ酸配列

配列番号 7 7

10

20

30

40

【化 8 5】

SEQ ID NO: 77

DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSSGNTYLQWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKR

ヒト化 1 D 9 L 3 V L 核酸配列

配列番号 7 8

【化 8 6】

SEQ ID NO: 78

GACGTGCAGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGT
GACCATACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCT
GCAGTGGTACCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGAG
CAACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTC
ACCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGG
GAAGCCACGTGCCCTGGACTTTTGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

10

ヒト化 1 D 9 L 4 V L アミノ酸配列

配列番号 7 9

【化 8 7】

SEQ ID NO: 79

DILMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSSGNTYLQWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKR

20

ヒト化 1 D 9 L 4 V L 核酸配列

配列番号 8 0

【化 8 8】

SEQ ID NO: 80

GACATCCTGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATTACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTACCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGC
AACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTC
ACCCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGG
GAAGCCACGTGCCCTGGACTTTTGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

30

ヒト化 1 D 9 L 5 V L アミノ酸配列

配列番号 8 1

【化 8 9】

SEQ ID NO: 81

DVLMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSSGNTYLQWFQQKPGKAPKLLISKVSNRFS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKR

40

ヒト化 1 D 9 L 5 V L 核酸配列

配列番号 8 2

【化 9 0】

SEQ ID NO: 82

GACGTGCTGATGACCCAGAGCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTG
ACCATTAACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTTCCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCAGCAAGGTGAGC
AACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTT
ACCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGG
GAAGCCACGTGCCCTGGACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

10

ヒト化 1 D 9 L 6 V L アミノ酸配列

配列番号 8 3

【化 9 1】

SEQ ID NO: 83

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSSGNTYLQWFQQRPGQSPRRLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKR

ヒト化 1 D 9 L 6 V L 核酸配列

配列番号 8 4

【化 9 2】

SEQ ID NO: 84

GACGTGGTGTGACACAGAGCCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACCCTGGGCCAGCCCCGCC
AGCATTAAGCTGCAGGAGCAGCCAGTCCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTTCCAGCAGAGGCCCCGGCCAGAGCCCCAGGAGGCTGATCTACAAGGTGAG
CAACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGCTCAGGCAGCGGCACCGACTT
CACCTCAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGCTTCCA
GGGGAGCCACGTGCCCTGGACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGG

20

ヒト化 1 D 9 L 7 V L アミノ酸配列

配列番号 8 5

【化 9 3】

SEQ ID NO: 85

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSSGNTYLQWFQQRPGQSPRRLISKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKR

30

ヒト化 1 D 9 L 7 V L 核酸配列

配列番号 8 6

【化 9 4】

SEQ ID NO: 86

GACGTGGTGTGACACAGAGCCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACCCTGGGCCAGCCCCGCC
AGCATTAAGCTGCAGGAGCAGCCAGTCCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTTCCAGCAGAGGCCCCGGCCAGAGCCCCAGGAGGCTGATCAGCAAGGTGAG
CAACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCGACAGATTCAGCGGCTCAGGCAGCGGCACCGACTT
CACCTCAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGCTTCCA
GGGGAGCCACGTGCCCTGGACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

40

ヒト化 1 D 9 L 9 V L アミノ酸配列

配列番号 8 7

【化 9 5】

SEQ ID NO: 87

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSSGNTYLQWFQQRPGQSPKLLISKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGQGTKLEIKR

50

ヒト化 1 D 9 L 9 V L 核酸配列

配列番号 8 9

【化 9 6】

SEQ ID NO: 89

GACGTGGTGATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACCCTGGGCCAGCCCGCC
AGCATTAGCTGCAGGAGCAGCCAGTCCATCGTGACAGCAGCGGCAACACCTACCTG
CAGTGGTTCCAGCAGAGGCCCCGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCAGCAAGGTGAG
CAACAGGTTACGCGGCGTGCCCCACAGATTCAGCGGCTCAGGCAGCGGCACCGACTT
CACCTCAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTCTACTACTGCTTCCA
GGGGAGCCACGTGCCCTGGACCTTTGGACAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGAGG

10

ヒト化 1 5 D 5 H 1 V H アミノ酸配列

配列番号 9 0

【化 9 7】

SEQ ID NO: 90

QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYNMNWVKQAPGQGLEWIGGINPNYGT
VYNQKFKGKATLTVDQSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARMTTIVPFDYWQGTTVTVS
S

ヒト化 1 5 D 5 H 1 V H 核酸配列

配列番号 9 1

【化 9 8】

SEQ ID NO: 91

CAGTTCCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCCCGGAGCCAGCGTCAA
AGTGAGCTGCAAGGCCTCCGGCTACAGCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTGAA
GCAGGCCCCCGGGCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGGCATCAATCCCAACTACGGCA
CCACCGTGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACCAGAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAACCTCAGCAGGCTGAGGAGCGACGATACCGCCGTGTAC
TACTGCGCTAGGATGACCACCATCGTGCCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACAACC
GTGACTGTGAGCAGC

30

ヒト化 1 5 D 5 H 2 V H アミノ酸配列

配列番号 9 2

【化 9 9】

SEQ ID NO: 92

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMNWVKQAPGQGLEWIGGINPNYGT
TVYNQKFKGKATLTVDQSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARMTTIVPFDYW
GQGTTVTVSS

ヒト化 1 5 D 5 H 2 V H 核酸配列

配列番号 9 3

【化 1 0 0】

SEQ ID NO: 93

CAGGTGCAGCTCGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAAAAGCCCCGGCGCTAGCGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTGAA
GCAGGCACCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGGCATCAACCCCAACTACGGCA
CTACCGTCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGATCAGAGCA
TCAGCACCGCCTACATGGAACCTGTCTAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACT
ATTGCGCCAGGATGACCACCATCGTGCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGAACCACAG
TCACCGTGAGCAGC

40

ヒト化 1 5 D 5 H 3 V H アミノ酸配列

50

配列番号 9 4

【化 1 0 1】

SEQ ID NO: 94

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMNWVRQAPGQGLEWMGGINPNYGT
TVYNQKFKGKATLTVDQSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARMTTIVPFDYWGQGTTVT
VSS

ヒト化 1 5 D 5 H 3 V H 核酸配列

配列番号 9 5

【化 1 0 2】

SEQ ID NO: 95

CAGGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAAAAGCCCGGCGCAAGCGTGAA
GGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCGACTACAACATGAACTGGGTGAG
GCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTCGAGTGGATGGGAGGCATCAACCCCAACTACGGCA
CCACCGTGTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGTGGACCAGAGC
ATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGAAGGAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTA
CTATTGCGCCAGGATGACCACCATCGTGCCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACAAC
CGTGACCGTGTCTAGC

ヒト化 1 5 D 5 L 2 V L アミノ酸配列

配列番号 9 6

【化 1 0 3】

SEQ ID NO: 96

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSR
FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTLPTFGQGTKLEIKR

ヒト化 1 5 D 5 L 2 V L 核酸配列

配列番号 9 7

【化 1 0 4】

SEQ ID NO: 97

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCTCAGTGGGCGATAGGGTG
ACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCAG
AAGCCCGGGAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCTCCACCCTGCACAGCGGC
GTGCCCTCAAGGTTCTCCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACACTCTGACCATCAGC
AGCCTCCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTATACCCTGCCC
TGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATTAAGAGG

ヒト化 1 5 D 5 L 3 V L アミノ酸配列

配列番号 9 8

【化 1 0 5】

SEQ ID NO: 98

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSTLHSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGYTLPTFGQGTKLEIKR

ヒト化 1 5 D 5 L 3 V L 核酸配列

配列番号 9 9

10

20

30

40

【化 1 0 6】

SEQ ID NO: 99

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGT
GACCATTACCTGCAGGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTACCAGCA
GAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACCTCCACTCTGCACAGCGG
CGTGCCCTCTAGGTTCTCCGGCTCAGGCAGCGGAACCGACTTCACCTGACCATCAG
CAGCCTCCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGGGCTATACCCTGCC
TTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAAGTGGAGATCAAGAGG

【 0 5 5 3】

ヒト化 1 D 9 H 6 全長重鎖アミノ酸配列 (F U T 8 遺伝子の機能的コピーを有する非ポ
テリジェント (商標) 系細胞においてヒト化 1 D 9 H 6 L 2 抗体を発現させるために使
用、また F U T 8 遺伝子の機能的コピーを欠くポテリジェント (商標) 系 C H O K 1 S V
細胞においてヒト化 1 D 9 H 6 L 2 ポテリジェント (商標) 抗体を発現させるために使
用)

配列番号 1 0 0

【化 1 0 7】

SEQ ID NO: 100

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA
PGQGLEWMGVIDPSDGYSHYNQKFKGKVTLTVDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCAG
GLAGTLDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 5 4】

ヒト化 1 D 9 H 6 全長重鎖核酸配列 (F U T 8 遺伝子の機能的コピーを有する非ポテリ
ジェント (商標) 系においてヒト化 1 D 9 H 6 L 2 抗体を発現させるために使用、また
F U T 8 遺伝子の機能的コピーを欠くポテリジェント (商標) 系 C H O K 1 S V 細胞にお
いてヒト化 1 D 9 H 6 L 2 ポテリジェント (商標) 抗体を発現させるために使用) 。 MG
WSCIIILFLVATATGVHSシグナル配列をコードする部分は削除可能である。

配列番号 1 0 1

10

20

30

【化 1 0 8】

SEQ ID NO: 101

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGTGTGCACAGCC
 AGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAAG
 GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGG
 CAGGCCCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCAGCGACGGGTA
 CAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGTCACCCTGACCGTGGACACCAGCAT
 CAGCACCGCCTACATGGAACCTCAGCAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTA
 TTGCGCCGGAGGCCTGGCTGGCACCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACACAGTGAC
 CGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCGCCAGCAGCAA
 GAGCACCGAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGA
 GCCAGTGACCGTGTCTTGGAAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCC
 AGCTGTCTTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGTTGACCGTGCCAG
 CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC
 CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCC
 CCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCTCTGTTCCCCCCCCAAGCC
 TAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
 GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC
 ACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTG
 TCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAG
 GTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC
 CAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAG
 AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCT
 GGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATG
 GCAGCAGGGCAACGTGTTTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTA
 CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

10

20

【0 5 5 5】

ヒト化 1 D 9 H 6 コンブリジェント (商標) (F U T 8 遺伝子の機能的コピーを有する
 非ポテリジェント (商標) 系においてヒト化 1 D 9 H 6 L 2 コンブリジェント (商標)
 抗体を発現させるために使用) またはアクリタマブ (商標) (F U T 8 遺伝子の機能的コ
 ピーを欠くポテリジェント (商標) 系 C H O K 1 S V 細胞において発現させる場合に、ヒ
 ト化 1 D 9 H 6 L 2 アクリタマブ (商標) 抗体を発現させるために使用) I g G 1 / I
 g G 3 アイソタイプキメラ全長重鎖アミノ酸配列

30

配列番号 1 0 2

【化 1 0 9】

SEQ ID NO: 102

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA
 PGQGLEWMGVVIDPSDGYSHYNQKFKGKVTLTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCAG
 GLAGTLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVQFKW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQFN*STFRVVSFLTTLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKTTTP
 MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

【0 5 5 6】

ヒト化 1 D 9 H 6 コンブリジェント (商標) (F U T 8 遺伝子の機能的コピーを有する
 非ポテリジェント (商標) 系においてヒト化 1 D 9 H 6 L 2 コンブリジェント (商標)
 抗体を発現させるために使用) またはアクリタマブ (商標) (F U T 8 遺伝子の機能的コ
 ピーを欠くポテリジェント (商標) 系 C H O K 1 S V 細胞において発現させる場合に、ヒ
 ト化 1 D 9 H 6 L 2 アクリタマブ (商標) 抗体を発現させるために使用) I g G 1 / I
 g G 3 アイソタイプキメラ全長重鎖核酸配列。MGWSCILFLVATATGVHSシグナル配列をコー

50

ドする部分は削除可能である。

配列番号 1 0 3

【化 1 1 0】

SEQ ID NO: 103

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGGTGTGCACAGCC
AGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCAGAGGTGAAGAAGCCCGGAGCCTCTGTGAAG
GTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAGG
CAGGCCCCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCGTGATCGACCCAGCGACGGGTA
CAGCCACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGTCAACCCTGACCGTGGACACCAGCAT
CAGCACCGCCTACATGGAAGTCAAGAGGCTGAGGAGCGACGACACCGCCGTGTACTA
TTGCGCCGGAGGCCTGGCTGGCACCCCTGGATTACTGGGGCCAGGGCACCACAGTGAC
CGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCAAGCGTGTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAA
GTCTACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAAGACTACTTCCCCGA
GCCCCGTCAACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCACTGACCAGCGGCGTGACACCTTTCC
CGCCGTGCTGCAGAGCTCAGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTC
TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTCAACCACAAGCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCC
CCTGTCCAGCTCCGGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTCTTCCCCCCCCAAGCC
CAAGGACACCCTGATGATCTCTAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGT
CAGCCACGAAGACCCCCGAGGTGCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGGGTGGAGGTGC
ACAACGCCAAGACTAAGCCCAGGGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTTCAGGGTGGTGA
GCGTCCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TGAGCAACAAGGCCCTGCCCCGCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAAACCAAGGC
CAGCCTAGGGAACCCCAGGTGTACACCTGCCCCCCTCCAGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTGAGCCTCACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATTGCCGTG
GAGTGGGAGTCAAGCGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCCCATGCT
CGATAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTG
GCAGCAGGGCAACATCTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGAAG

10

20

【0 5 5 7】

ヒト化 1 D 9 L 2 全長軽鎖アミノ酸配列 (ヒト化 1 D 9 H 6 L 2 抗体を生産するた
めに、F U T 8 遺伝子の機能的コピーを有する非ボテリジェント (商標) 系において配列番
号 1 0 0 と同時発現させるために使用、ヒト化 1 D 9 H 6 L 2 ボテリジェント (商標)
抗体を生産するために、F U T 8 遺伝子の機能的コピーを欠くボテリジェント (商標) 系
C H O K 1 S V 細胞において配列番号 1 0 0 と同時発現させるために使用、ヒト化 1 D 9
H 6 L 2 コンプリジェント (商標) 抗体を生産するために、F U T 8 遺伝子の機能的コ
ピーを有する非ボテリジェント (商標) 系において配列番号 1 0 2 と同時発現させるた
めに使用、またヒト化 1 D 9 H 6 L 2 アクリタマブ (商標) 抗体を生産するために、F U
T 8 遺伝子の機能的コピーを欠くボテリジェント (商標) 系において配列番号 1 0 2 と同
時発現させるために使用)

30

配列番号 1 0 4

【化 1 1 1】

SEQ ID NO: 104

40

MGWSCILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRSSQSIVHSSGNTYLQWFQQ
KPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCFQGSHPVWTFG
QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0 5 5 8】

ヒト化 1 D 9 L 2 全長軽鎖核酸配列 (ヒト化 1 D 9 H 6 L 2 抗体を生産するた
めに、F U T 8 遺伝子の機能的コピーを有する非ボテリジェント (商標) 系において配列番号 1
0 0 と同時発現させるために使用、ヒト化 1 D 9 H 6 L 2 ボテリジェント (商標) 抗体

50

を生産するために、FUT8遺伝子の機能的コピーを欠くポテリジェント（商標）系CHO K1SV細胞において配列番号100と同時発現させるために使用、ヒト化1D9 H6L2コンプリジェント（商標）抗体を生産するために、FUT8遺伝子の機能的コピーを有する非ポテリジェント（商標）系において配列番号102と同時発現させるために使用、またヒト化1D9 H6L2アクリタマブ（商標）抗体を生産するために、FUT8遺伝子の機能的コピーを欠くポテリジェント（商標）系において配列番号102と同時発現させるために使用）。MGWSCIIILFLVATATGVHSシグナル配列をコードする部分は削除可能である。

配列番号105

【化112】

10

SEQ ID NO: 105

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCG
ACATCCAGATGACCCAGAGCCCCCTCTAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGA
CCATTACCTGCAGGAGCAGCCAGAGCATCGTGCACAGCAGCGGCAACACCTACCTGC
AGTGGTTCCAGCAGAAACCCGGCAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACAAGGTGAGCA
ACAGGTTTCAGCGGCGTGCCCTCTCGCTTCTCAGGCAGCGGCTCCGGCACCGATTTTAC
CCTGACCATCAGCTCACTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGTCTACTACTGCTTCCAGGGA
AGCCACGTGCCCTGGACTTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGATCAAGCGTACGGTG
GCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGCACC
GCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG
AAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGA
CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTA
CGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGT
GACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

20

【0559】

【表 17】

表 17 抗体の詳細

抗体	会合した VH/VL 対の配列番号	詳細
マウス 1D9 抗体	配列番号 44 (VH) および 配列番号 48 (VL) を含んでなる	
マウス 15D5 抗体	配列番号 1 (VH) および 配列番号 5 (VH) を含んでなる	
キメラ 1D9 抗体	配列番号 44 (VH) および 配列番号 48 (VL) を含んでなる	ヒト IgG1 CH1-Fc ドメインに融合 されたマウス VH を含んでなる ヒト IgG1 CK ドメインに融合され たマウス VL を含んでなる
キメラ 15D5 抗体	配列番号 44 (VH) および 配列番号 48 (VL) を含んでなる	ヒト IgG1 CH1-Fc ドメインに融合 されたマウス VH を含んでなる ヒト IgG1 CK ドメインに融合され たマウス VL を含んでなる
ヒト化 1D9 抗体	FUT8+細胞で発現される 配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL) を含んでなる FUT8+細胞で発現される 配列番号 100 (VH) および 配列番号 104 (VL) を含んでなる	フコシル化グリカンが存在し得る G0、G2、G0F、G2F、G1、Man5、G1F および G1F' グリカンが、実施例 11 の配列番号 100 で示される重鎖 配列においてマークされた N'残基 上に存在し得る VH および VL シグナル配列が成熟 型抗体に存在しない
ヒト化 1D9 Fc 障 害抗体	配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL)	CDC/ADCC を媒介する能力のない 改変型 Fc ドメインに融合された

10

20

30

40

	を含んでなる	ヒト化 VH を含んでなる	
ヒト化 1D9 ポテ リジェント (商 標) 抗体	FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL) を含んでなる FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 100 (VH) および 配列番号 104 (VL) を含んでなる	フコシル化グリカンが存在しない G0、G2、G1 および Man5 グリカン が、実施例 11 の配列番号 100 で示 される重鎖配列においてマークさ れた N [*] 残基上に存在し得る VH および VL シグナル配列が成熟 型抗体に存在しない	10
ヒト化 1D9 コン プリジェント (商 標) 抗体	FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL) FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 102 (VH) および 配列番号 104 (VL)	フコシル化グリカンが存在し得る G0、G2、G0F、G2F、G1、Man5、G1F および G1F' グリカンが、実施例 11 の配列番号 102 で示される重鎖 配列においてマークされた N [*] 残基 上に存在し得る キメラ IgG1/IgG3 アイソタイプ Fc ドメインを含んでなる VH および VL シグナル配列が成熟 型抗体に存在しない	20 30
ヒト化 1D9 アク リタマブ (商標) 抗体	FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL) FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 102 (VH) および	フコシル化グリカンが存在する G0、G2、G1 および Man5 グリカン が、実施例 11 の配列番号 104 で示 される重鎖配列においてマークさ れた N [*] 残基上に存在し得る	40

	配列番号 104 (VL)	キメラ IgG1/IgG3 アイソタイプ Fc を含んでなる VH および VL シグナル配列が成熟 型抗体に存在しない	10
ヒト化 1D9 RR 抗 体	FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL) を含んでなる FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 100 (VH) および 配列番号 104 (VL) を含んでなる	フコシル化グリカンが存在し得る G0、G2、G0F、G2F、G1、Man5、G1F および G1F' グリカンが、実施例 11 の配列番号 100 で示される重鎖 配列においてマークされた N [*] 残基 上に存在し得る VH および VL シグナル配列が成熟 型抗体に存在しない VL 鎖のフレームワーク 4 の末端の EIK のカルボキシ末端側に付加的 な R アミノ酸残基が挿入	20 30
ヒト化 1D9 RR ポ テリジェント (商 標) 抗体	FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 30 (VH) および 配列番号 34 (VL) を含んでなるか ; または FUT8 ⁺ 細胞で発現される 配列番号 100 (VH) および 配列番号 104 (VL) を含んでなる	フコシル化グリカンが存在する G0、G2、G1 および Man5 グリカン が、実施例 11 の配列番号 100 で示 される重鎖配列においてマークさ れた N [*] 残基上に存在し得る VH および VL シグナル配列が成熟 型抗体に存在しない	40

		VL 鎖のフレームワーク 4 の末端の EIK のカルボキシ末端側に付加的な R アミノ酸残基が挿入	
ヒト化 1D9 RR コンプリジェント (商標) 抗体	FUT8 ⁺ 細胞で発現される配列番号 30 (VH) および配列番号 34 (VL) を含んでなるか ; または FUT8 ⁺ 細胞で発現される配列番号 102 (VH) および配列番号 104 (VL) を含んでなる	<p>フコシル化グリカンが存在し得る</p> <p>G0、G2、G0F、G2F、G1、Man5、G1F および G1F' グリカンが、実施例 11 の配列番号 102 で示される重鎖配列においてマークされた N[*]残基上に存在し得る</p> <p>キメラ IgG1/IgG3 アイソタイプ Fc ドメインを含んでなる</p> <p>VH および VL シグナル配列が成熟型抗体に存在しない</p> <p>VL 鎖のフレームワーク 4 の末端の EIK のカルボキシ末端側に付加的な R アミノ酸残基が挿入</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
ヒト化 1D9 RR アクリタマブ (商標) 抗体	FUT8 ⁻ 細胞で発現される配列番号 30 (VH) および配列番号 34 (VL) を含んでなるか ; または FUT8 ⁻ 細胞で発現される配列番号 102 (VH) および配列番号 104 (VL)	<p>フコシル化グリカンが存在する</p> <p>G0、G2、G1 および Man5 グリカンが、実施例 11 の配列番号 104 で示される重鎖配列においてマークされた N[*]残基上に存在し得る</p> <p>キメラ IgG1/IgG3 アイソタイプ Fc</p>	40

	<p>を含んでなる</p>	<p>を含んでなる</p> <p>VH および VL シグナル配列が成熟型抗体に存在しない</p> <p>VL 鎖のフレームワーク 4 の末端の EIK のカルボキシ末端側に付加的な R アミノ酸残基が挿入</p>	10
ヒト化 15D5 抗体	<p>配列番号 22 (VH) および配列番号 26 (VL) を含んでなる</p> <p>FUT8⁺細胞で発現され得る</p> <p>または</p> <p>FUT8⁻細胞で発現され得る</p>	<p>FUT8⁺細胞での発現時には、フコシル化グリカンが存在し得る</p> <p>FUT8⁺細胞での発現時には、G0、G2、G0F、G2F、G1、Man5、G1F および G1F' グリカンが N-グリコシル化部位に存在し得る</p> <p>または</p> <p>FUT8⁻細胞での発現時には、フコシル化グリカンが存在しない</p> <p>FUT8⁻細胞での発現時には、G0、G2、G1 および Man5 グリカンが N-グリコシル化部位に存在し得る</p> <p>また</p>	<p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>

		<p>いくつかの実施形態は、配列番号 22 で示される VH ドメインに融合された(例えば、この VH ドメインのカルボキシ末端で)、ヒト化 1D9 コンプリジェント(商標)抗体およびヒト化 1D9 アクリタマブ(商標)抗体におけるものと同じのキメラ IgG1/IgG3 アイソタイプFc を含んでなり得る</p>
--	--	---

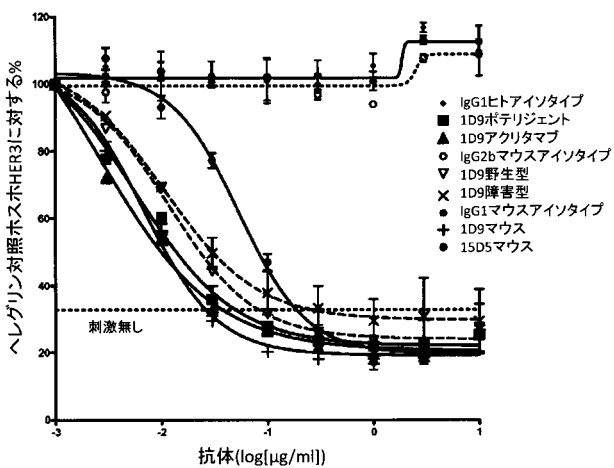
10

【 0 5 6 0 】

本発明はここに十分に記載されるが、当業者には、添付の特許請求の範囲の趣旨または範囲から逸脱することなくそれらに多くの変更および改変をなし得ることが自明である。

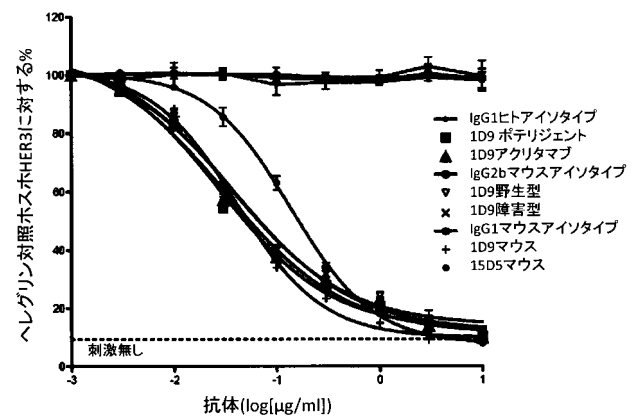
【 図 1 】

BxPC3膵臓癌細胞における、ヘレグリンにより誘導される HER3 受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



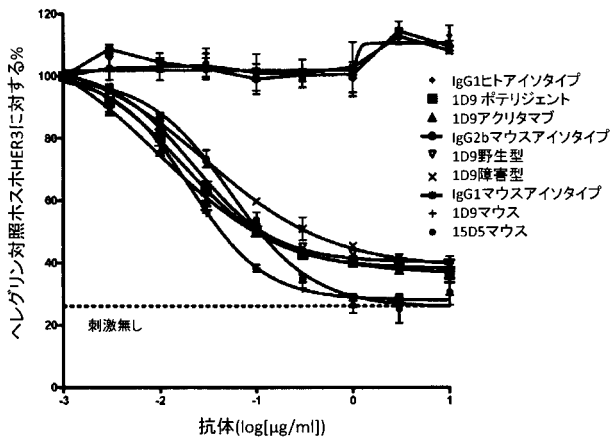
【 図 2 】

CHL-1黒色腫細胞における、ヘレグリンにより誘導される HER3 受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



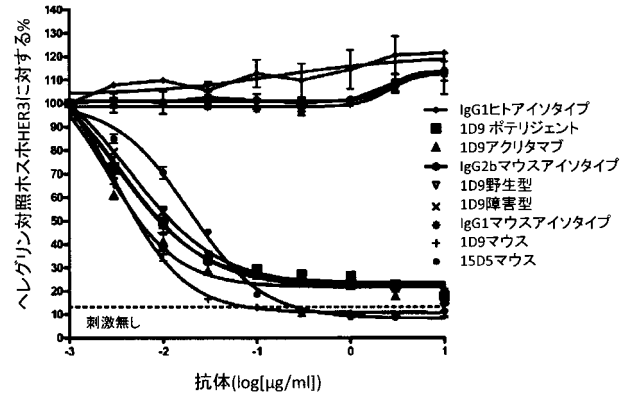
【図 3】

N87胃癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるHER3
受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



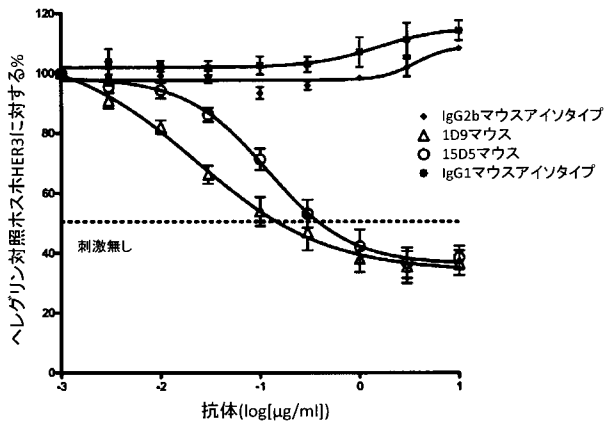
【図 4】

SK-BR-3乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導される
HER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



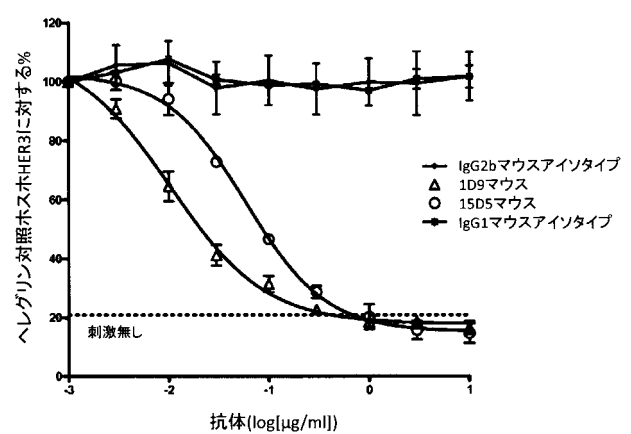
【図 5】

BT-474乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導される
HER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



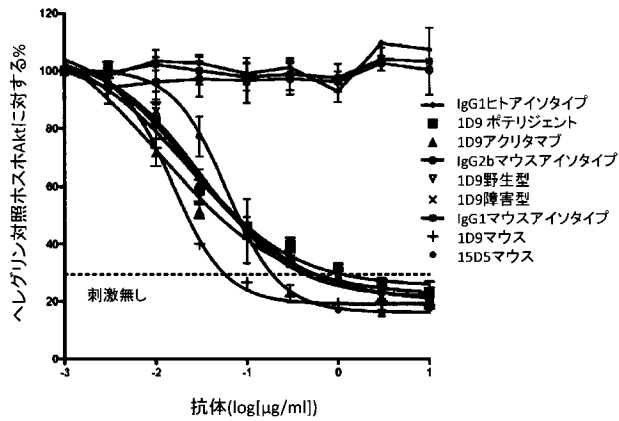
【図 6】

MCF-7乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導される
HER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



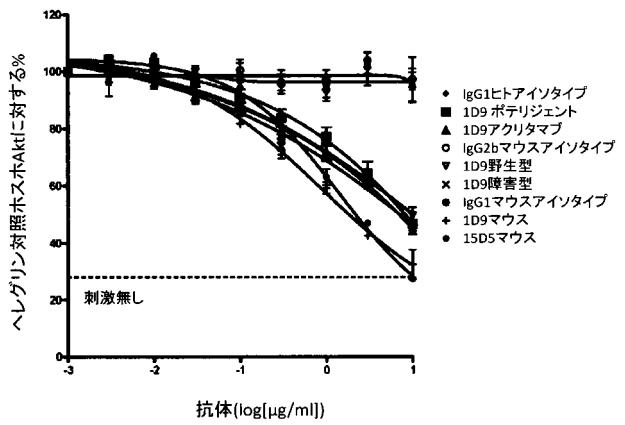
【 図 7 】

BxPC3膵臓癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるAktリン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



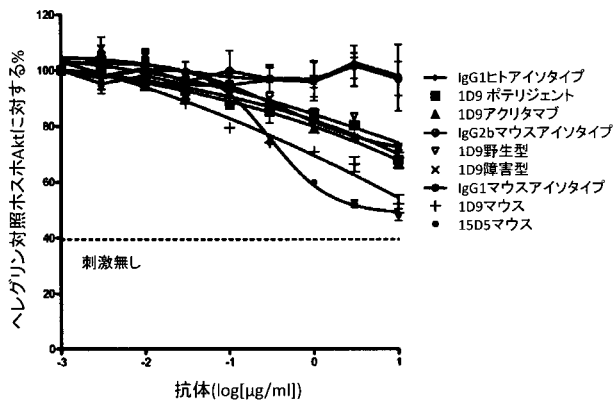
【 図 8 】

CHL-1黒色腫細胞における、ヘレグリンにより誘導されるAktリン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



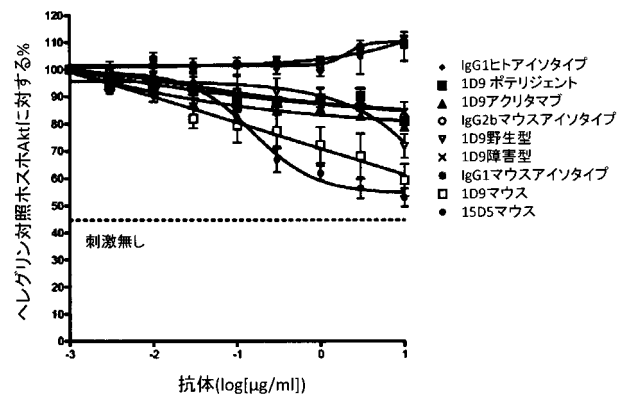
【 図 9 】

N87胃癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるAktリン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



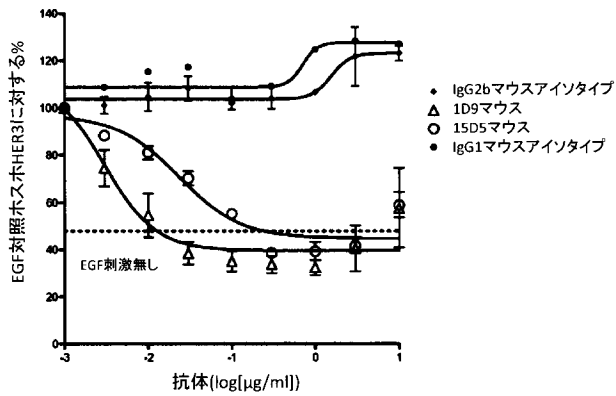
【 図 10 】

SK-BR-3乳癌細胞における、ヘレグリンにより誘導されるAktリン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



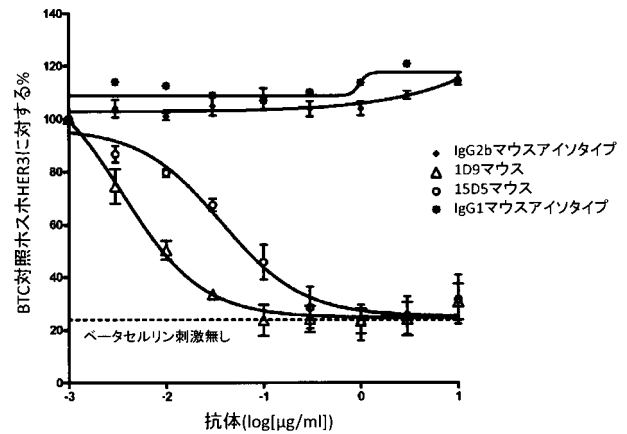
【図 1 1】

SK-BR-3乳癌細胞における、上皮細胞増殖因子により誘導されるHER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



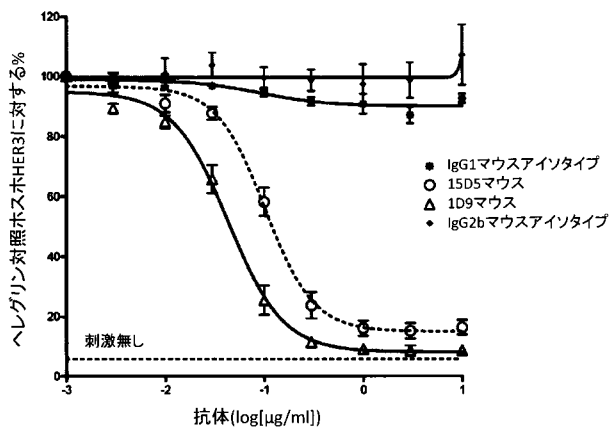
【図 1 2】

SK-BR-3乳癌細胞における、ベータセルリンにより誘導されるHER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害



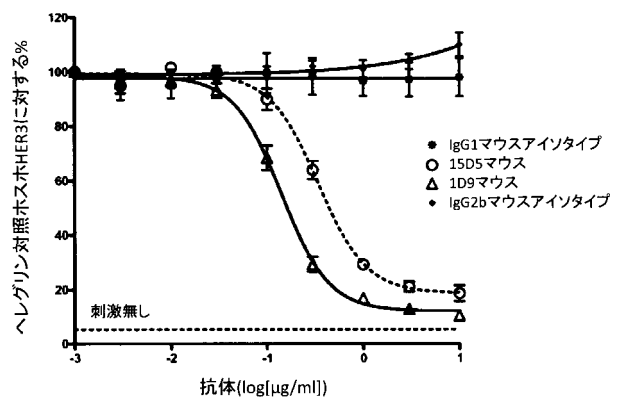
【図 1 3】

EGFRおよびHER3を形質導入したCHO細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびHER3リン酸化の阻害



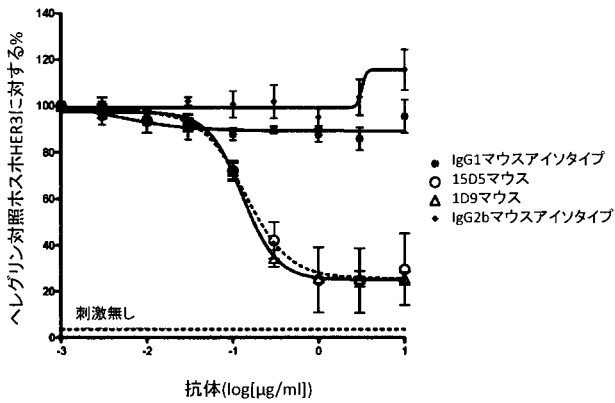
【図 1 4】

HER2およびHER3を形質導入したCHO細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびHER3リン酸化の阻害



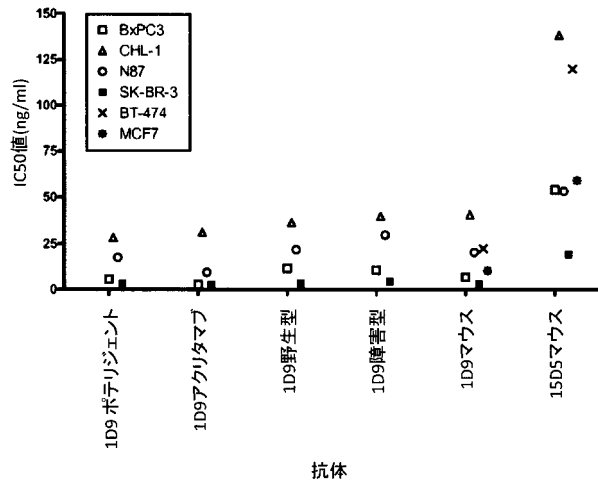
【 図 1 5 】

HER4およびHER3を形質導入したCHO細胞における、ヘレグリンにより誘導されるヘテロ二量体形成およびHER3リン酸化の阻害



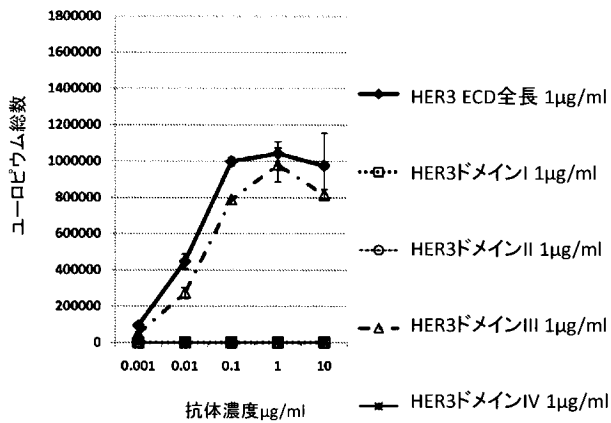
【 図 1 6 】

癌細胞系統における、ヘレグリンにより誘導されるHER3受容体リン酸化の、抗HER3 mAbによる阻害
ホスホ-HER3 ELISA IC50値



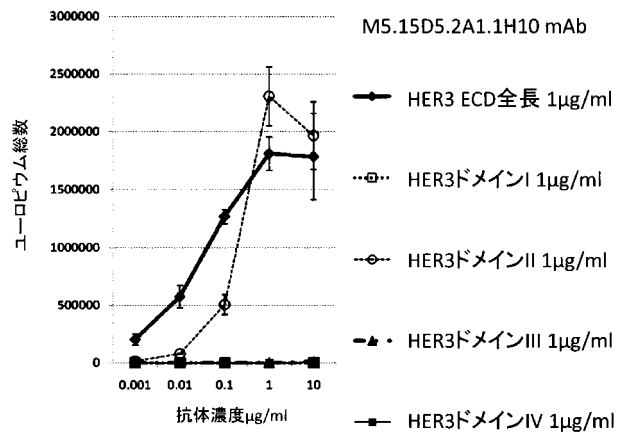
【 図 1 7 】

M5.1D9.1F5 mAb

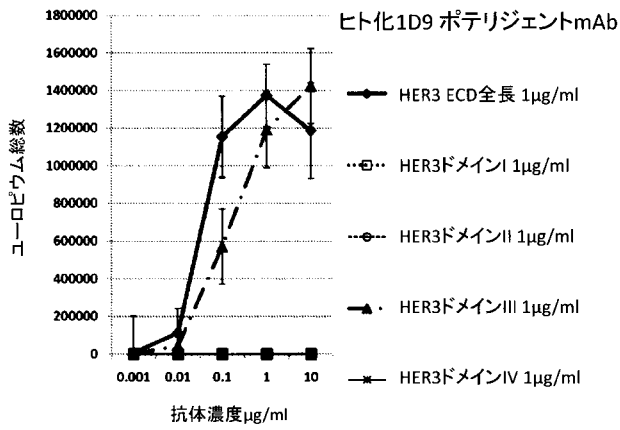


【 図 1 8 】

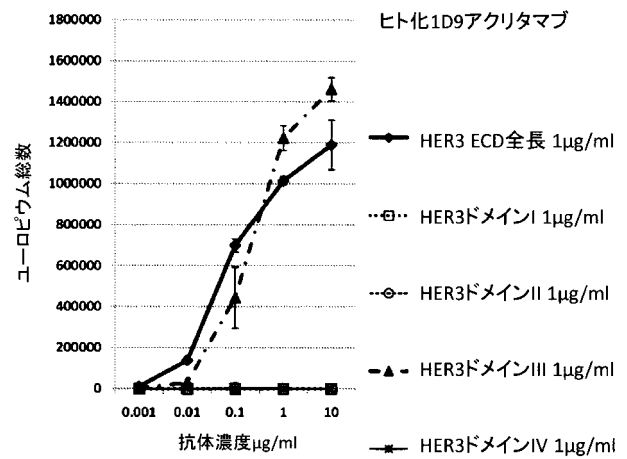
M5.15D5.2A1.1H10 mAb



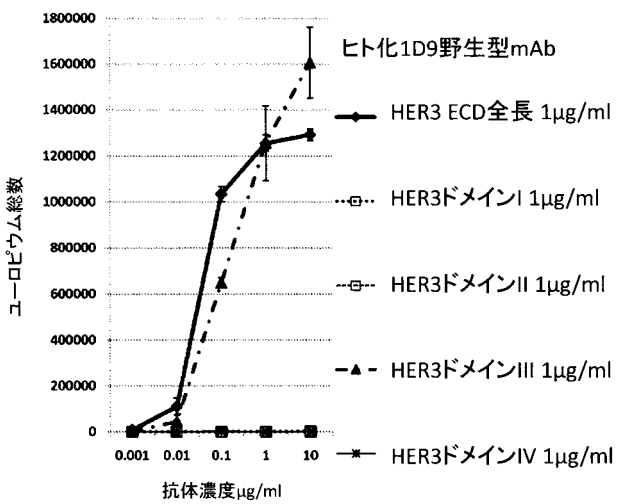
【 図 1 9 】



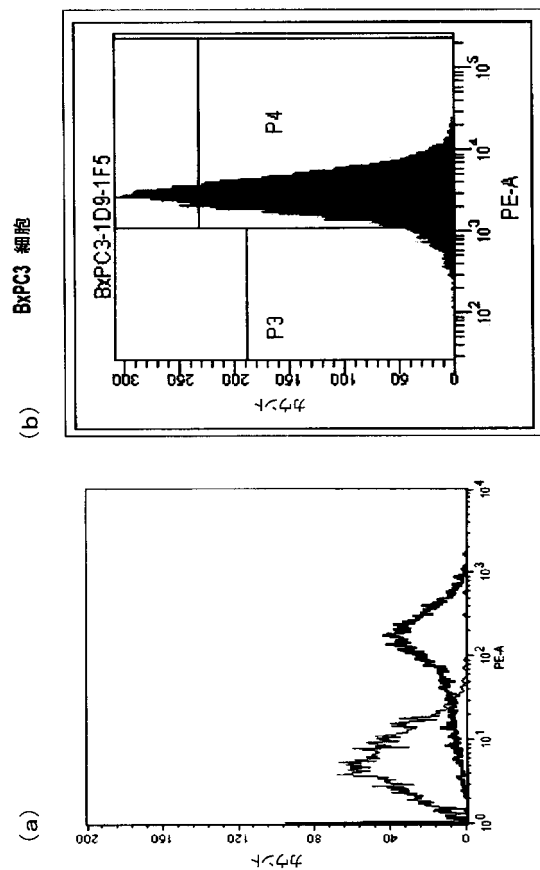
【 図 2 0 】



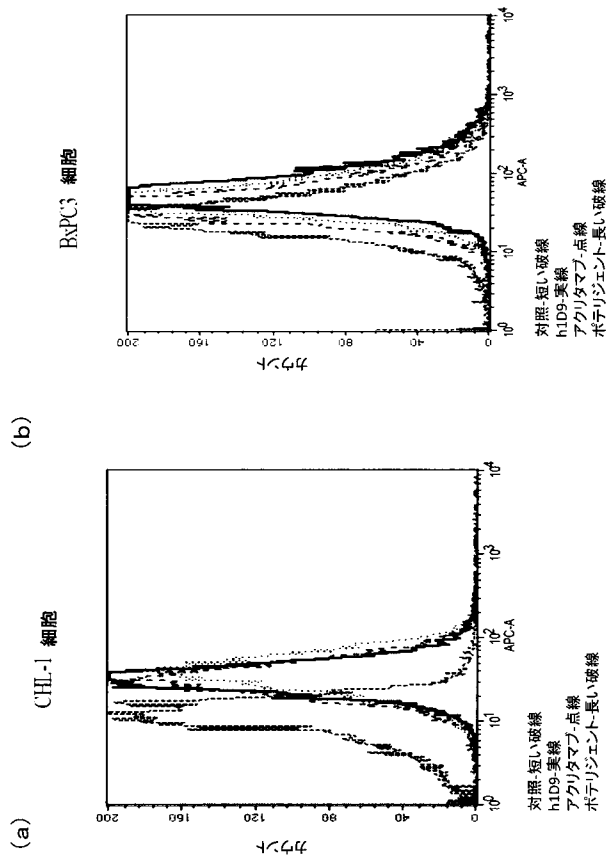
【 図 2 1 】



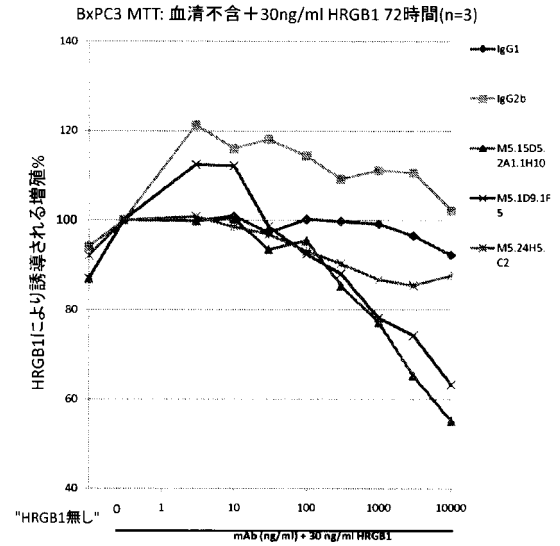
【 図 2 2 】



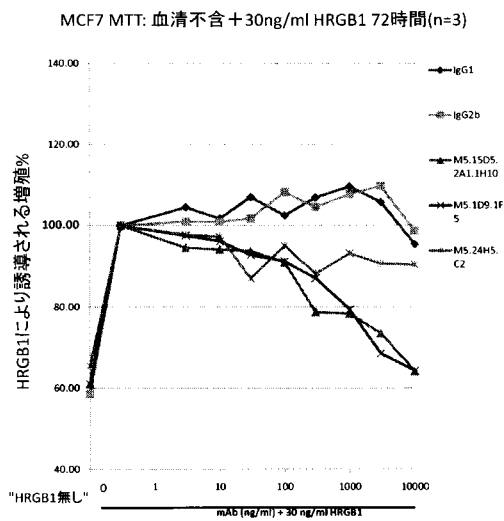
【図 2 3】



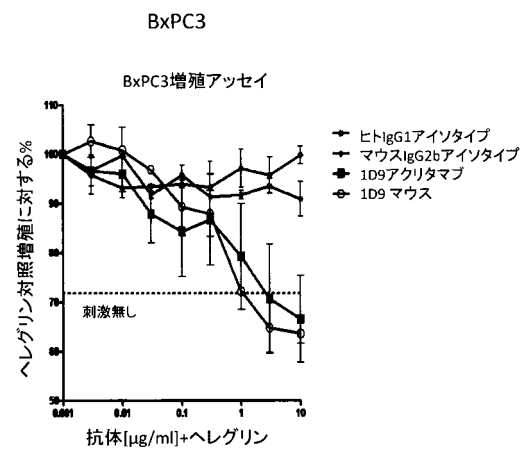
【図 2 4】



【図 2 5】

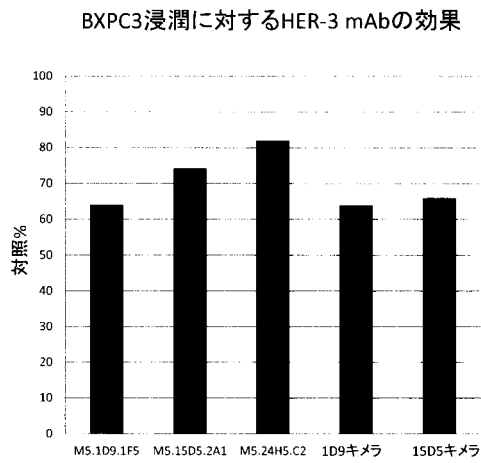


【図 2 6】

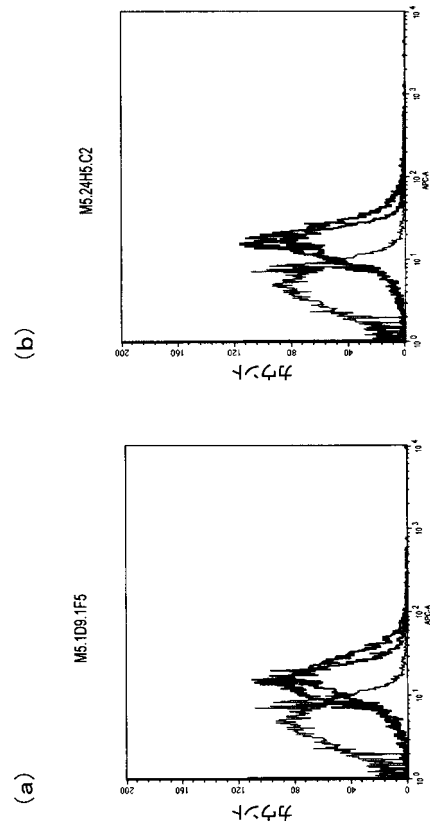


N19179-42の平均 48

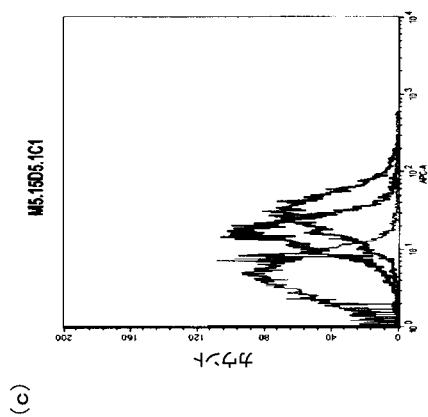
【図 27】



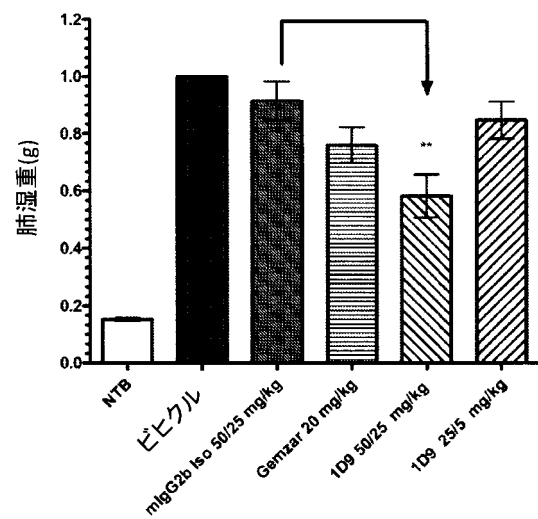
【図 29 a】



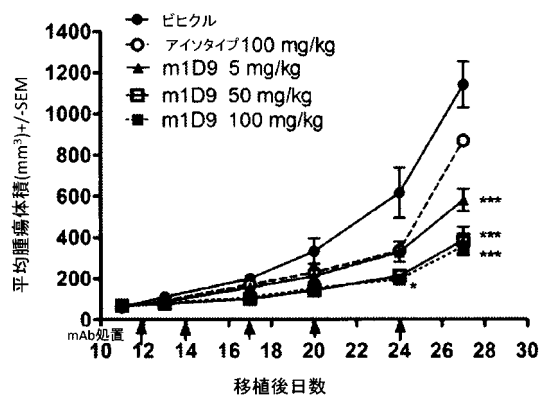
【図 29 b】



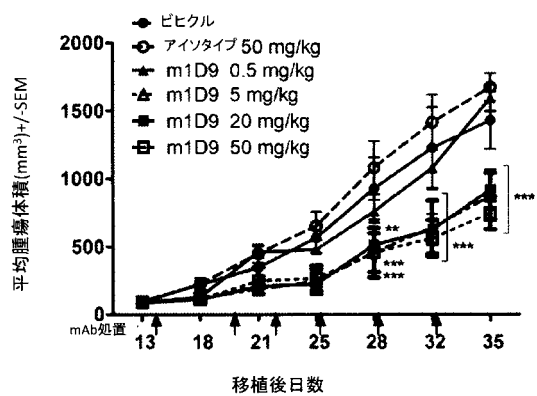
【図 30】



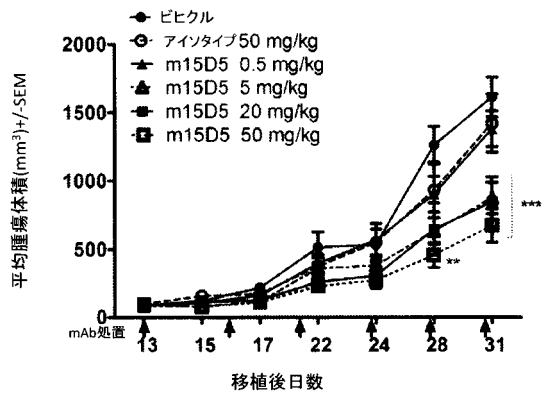
【 ㊦ 3 2 】



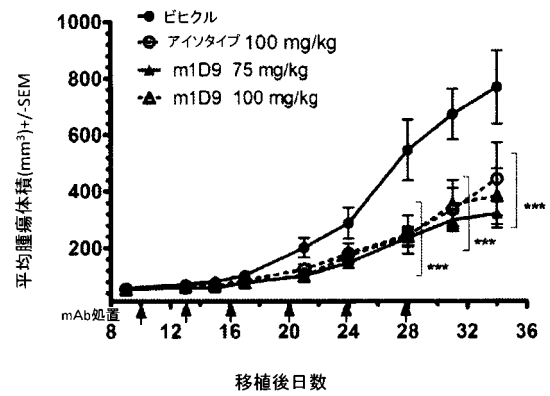
【 ㊦ 3 4 】



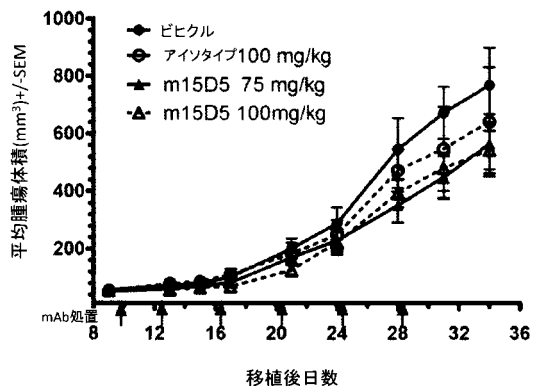
【図 3 5】



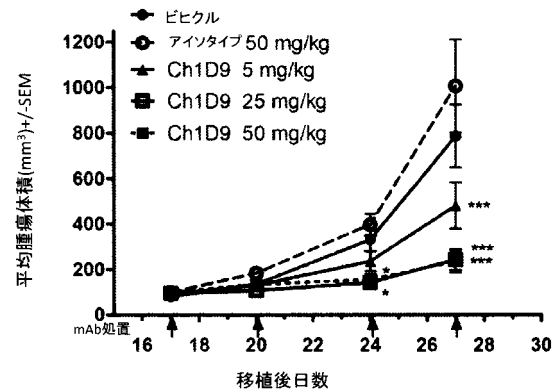
【図 3 6】



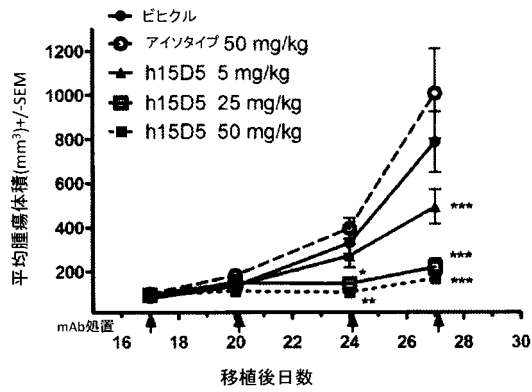
【図 3 7】



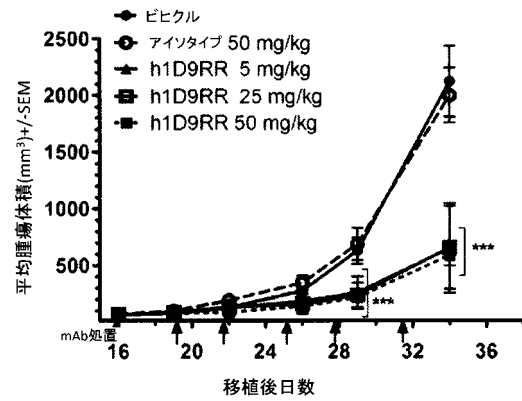
【図 3 8】



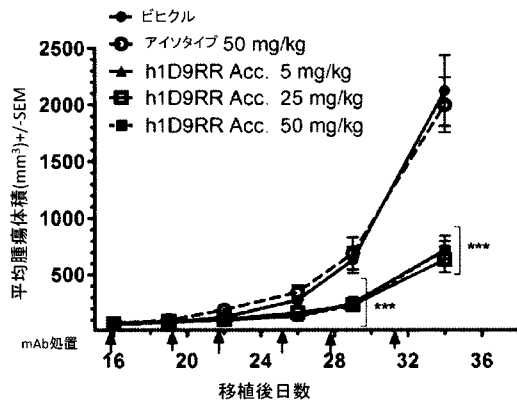
【図 39】



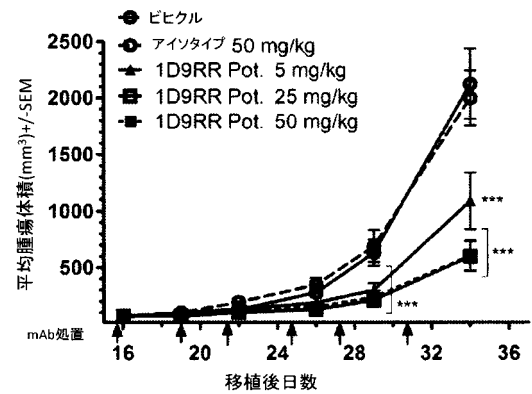
【図 40】



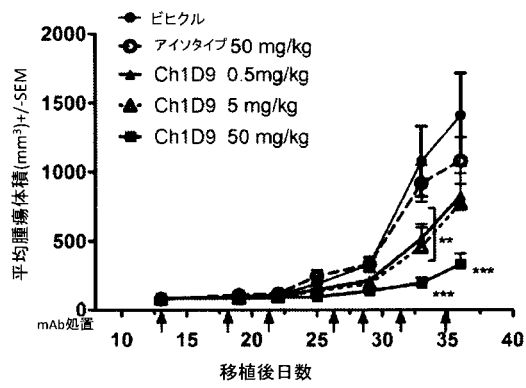
【図 41】



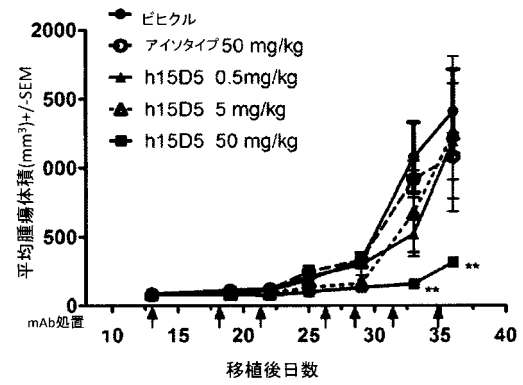
【図 42】



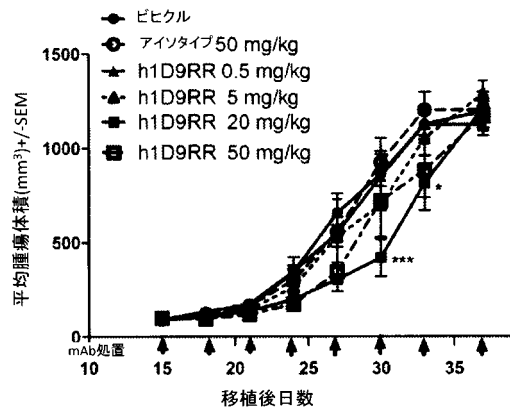
【図 4 3】



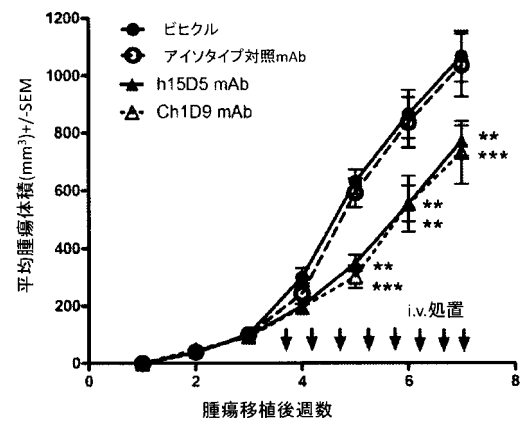
【図 4 4】



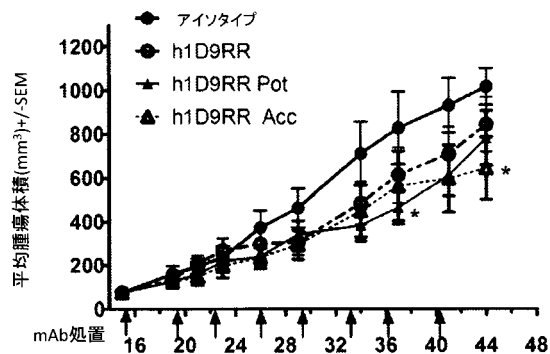
【図 4 5】



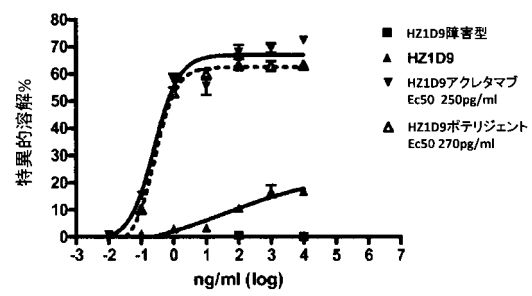
【図 4 6】



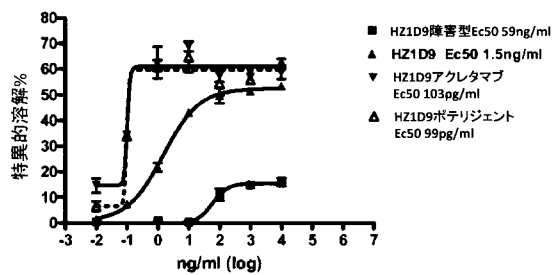
【図 47】



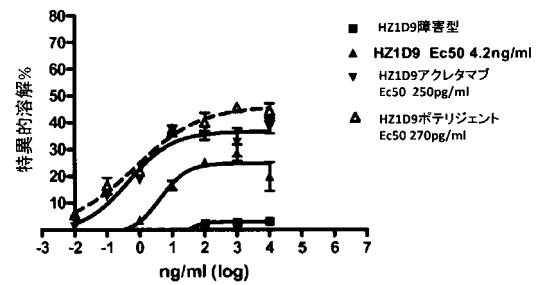
【図 49】



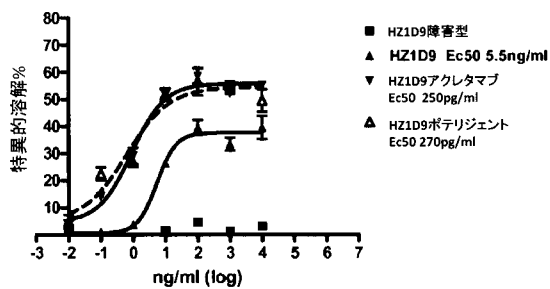
【図 48】



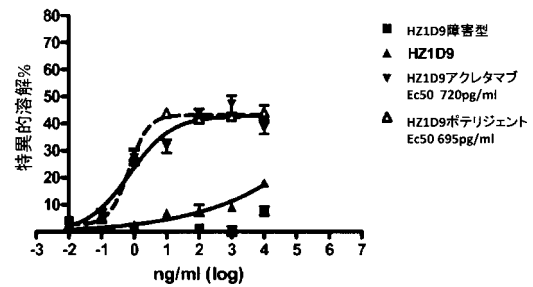
【図 50】



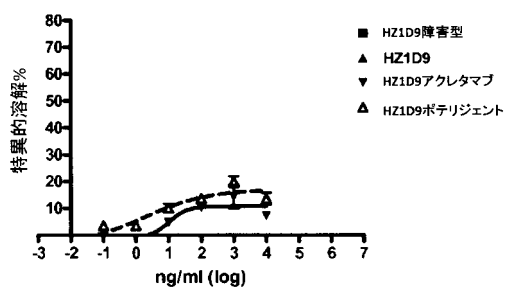
【図 51】



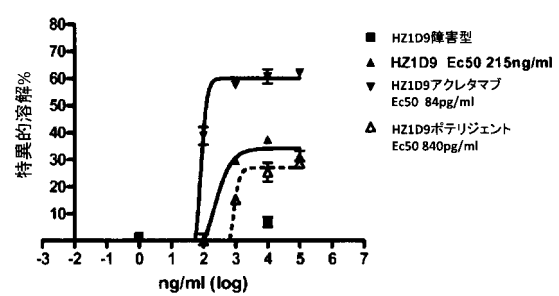
【図 53】



【図 52】



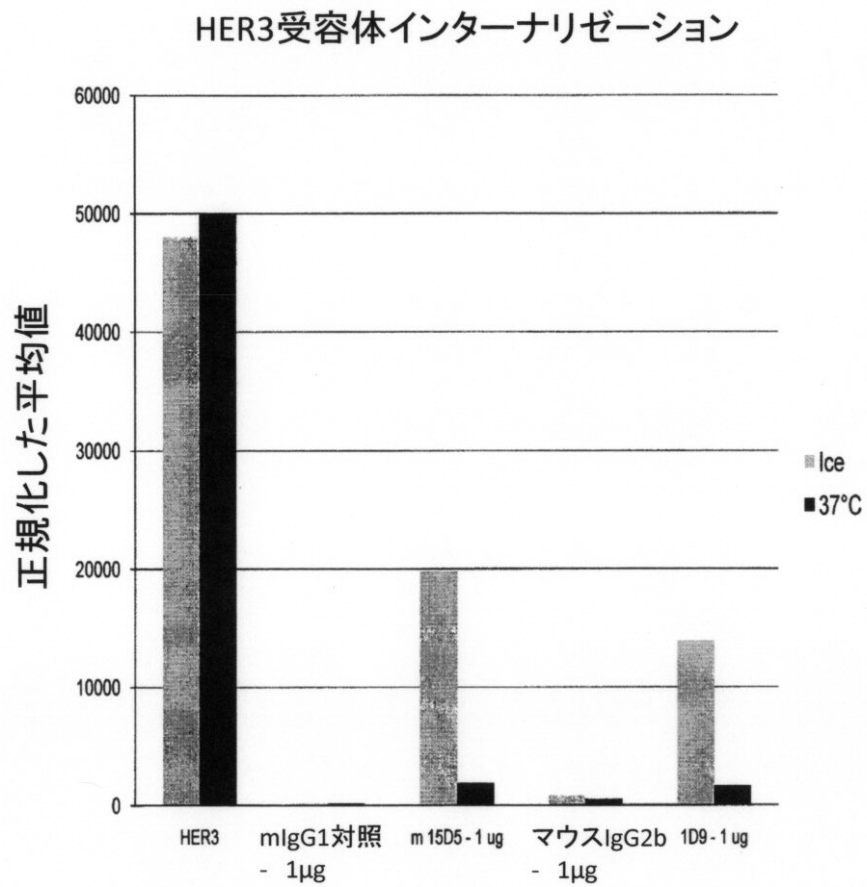
【図 54】



【図 55】



【 図 2 8 】



【 配 列 表 】

[2013544492000001.app](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/50322												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/18, C12P 21/08; C07H 21/00 (2011.01) USPC - 530/387.1; 530/387.7; 536/23.53 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) IPC(8) - C07K 16/18, C12P 21/08; C07H 21/00 (2011.01) USPC - 530/387.1; 530/387.7; 536/23.53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C07K 16/18, C12P 21/08; C07H 21/00 (2011.01), USPC - 530/387.1; 530/387.7; 536/23.53, 530/387.3, 530/388.1, 530/388.15, 424/130.1, 424/133.1, 424/141.1, 424/155.1: keyword search, as below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Thompson Innovation (core patent databases), Google Scholar – Search Terms: Her3, erbB3, receptor, antibody, binding protein, immunoglobulin, asp tyr asn met asn, dynmn, nucleic acid, polynucleotide, vector, humanized, chimeric, chimaeric, fused, fusion, heavy, CDR, CDR3														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category*</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — A</td> <td>US 2008/0269467 A1 (ALLAN et al.) 30 October 2008 (30.10.2008) para [0007]; [0017]; [0027]; SEQ ID NO: 11</td> <td>1, 2, 5, 6, 27 75</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0183631 A1 (ROTHER et al.) 22 July 2010 (22.07.2010) abstract; para [0005]; [0031]; [0054]</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2010/0074900 A1 (GHAYUR et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) abstract; para [0014]; [0316]; SEQ ID NOs: 86, 92, 96.</td> <td>75</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — A	US 2008/0269467 A1 (ALLAN et al.) 30 October 2008 (30.10.2008) para [0007]; [0017]; [0027]; SEQ ID NO: 11	1, 2, 5, 6, 27 75	A	US 2010/0183631 A1 (ROTHER et al.) 22 July 2010 (22.07.2010) abstract; para [0005]; [0031]; [0054]	75	A	US 2010/0074900 A1 (GHAYUR et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) abstract; para [0014]; [0316]; SEQ ID NOs: 86, 92, 96.	75
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X — A	US 2008/0269467 A1 (ALLAN et al.) 30 October 2008 (30.10.2008) para [0007]; [0017]; [0027]; SEQ ID NO: 11	1, 2, 5, 6, 27 75												
A	US 2010/0183631 A1 (ROTHER et al.) 22 July 2010 (22.07.2010) abstract; para [0005]; [0031]; [0054]	75												
A	US 2010/0074900 A1 (GHAYUR et al.) 25 March 2010 (25.03.2010) abstract; para [0014]; [0316]; SEQ ID NOs: 86, 92, 96.	75												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 17 March 2012 (17.03.2012)		Date of mailing of the international search report 27 MAR 2012												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/50322

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 86, 115-126, and 136-137
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-2, 5-6, 27, 75, drawn to an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to SEQ ID NO: 2 and its humanized equivalent as set forth in SEQ ID NO: 23.

---please see continuation on extra sheet---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-2, 5-6, 27, 75, limited to SEQ ID NOs: 2 and 23

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/50322

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group II+: Claims 1-8, 17-18, 21, 22, 27-31, 39, 40, 42-49, 53-55, 58-71, 76, 77, 84-85, drawn to an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to a sequence selected from any one of SEQ ID NOs: 3 and 4, and the humanized equivalents as set forth respectively in SEQ ID NOs: 24 and 25; or a light chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to a sequence selected from any one of SEQ ID NOs: 6, 7, and 8 and the humanized equivalents as set forth respectively in SEQ ID NOs: 27, 28, and 29; and also drawn to an isolated nucleic acid encoding the antigen binding protein, expression vectors, host cells, compositions, uses, and methods related to the antigen binding protein.

-Please note that claims 3-4, 7-8, and 76-77 will be searched only if all of SEQ ID NOs: 2, 3, 4, 6, 7, 8 or all of their humanized equivalents SEQ ID NOs: 23, 24, 25, 27, 28, 29 are elected for search.

-Please note that claims 17-20 and their dependent claims will be searched only if SEQ ID NO: 7 or 8 is elected for search.

-Please note that claims 21, 22 and their dependent claims will be searched only if SEQ ID NO: 4 (which represents a fragment of sequences SEQ ID NOs: 1 and 22) is elected for search. -Please note that claims 28, 29, 31, 40 and 41 will be searched only if the nucleic acid sequences listed therein are elected for search.

Group III+: Claims 9-16, 23, 24, 26, 32-38, 42-46, 50-53, 56-68, 72-74, 78-79, 84-85, 87-114, 127-135, drawn to an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to a sequence selected from any one of SEQ ID NOs: 45, 46, and 47 and the humanized equivalents as set forth in SEQ ID NOs: 31, 32, and 33 respectively, or a light chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to any one of SEQ ID NOs: 49, 50, and 51, and the humanized equivalents as set forth respectively in SEQ ID NOs: 35, 36, and 37; and also drawn to an isolated nucleic acid encoding the antigen binding protein, expression vectors, host cells, compositions, uses, and methods related to the antigen binding protein.

-Please note that claims 11-12, 15-16, and 78-79 will be searched only if all of SEQ ID NOs: 45, 46, 47, 49, 50, 51 or all of their humanized equivalents SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 35, 36, 37 are elected for search.

-Please note that claims 23 and 26 and their dependent claims will be searched only if SEQ ID NO:47 (which represents a fragment of SEQ ID NOs: 30 and 44) and SEQ ID NO: 50 (which represents a fragment of SEQ ID NOs: 48 and 57) are elected for search.

-Please note that claims 24 and its dependent claims will be searched only if SEQ ID NO:47 (which represents a fragment of SEQ ID NO:3) is elected for search.

-Please note that claims 33-34, 36, and 38 will be searched only if the nucleic acid sequences listed therein are elected for search.

-Please note that claims 87-91 and 92-96 will be searched only if SEQ ID NO:51 (which represents amino acids 113-121 of SEQ ID NOs:104) is elected for search and one of SEQ ID NO: 45 (which represents amino acids 50-54 of SEQ ID NOs:100 and 102) or SEQ ID NO:47 (which represents amino acids 118-125 of SEQ ID NOs: 100 and 102)

-Please note that claims 97-98, 101-102, and their dependent claims will be searched only if SEQ ID NO:45 or 47 are elected for search.

-Please note that claims 99-100 and their dependent claims will be searched only if SEQ ID NO:51 is elected for search

Group IV+: Claims 17-20, 39-46, 53, 68, 80, 81, 84-85, drawn to an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to SEQ ID NOs: 10, 11, and 12; or to a light chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to any one of SEQ ID NOs: 12, 18, 19, 20; and also drawn to an isolated nucleic acid encoding the antigen binding protein, expression vectors, host cells, compositions, uses, and methods related to the antigen binding protein.

-Please note that claims 19-20 will be searched only if all of SEQ ID NOs: 10,11, 12, 7, 8, 18, 19, 20 are elected for search.

-Please note that claims 80 and 81 will be searched only if all of the sequences listed therein are elected for search.

-Please note that claims 40 and 41 will be searched only if the nucleic acid sequences listed therein are elected for search.

Group V+: Claims 25, 45, 46, 53, 68, 82-85, drawn to an antigen binding protein comprising SEQ ID NOs: 9, 13, and 17; and compositions, uses, and methods related thereto.

The inventions listed as Groups I, II+, III+, IV+, and V+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of Groups I, II+, III+, IV+, and V+ is an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR and/or a light chain variable region having at least one CDR. This special technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 2008/0262203 A1 to Clegg et al. (published 23 October 2008, hereinafter "Clegg"). Clegg discloses an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR and a light chain variable region having at least one CDR (para [0048] - "a penta-specific antibody comprises heavy and light chain variable regions which comprise the CDR amino acid sequence"). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

A further special technical feature of Groups I and II+ are the antigen binding proteins set forth in claims 1 and 5. This special technical feature fails to provide a contribution over Clegg. Clegg teaches claim 1, namely, an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (para [0048] - "a penta-specific antibody comprises at least four CDR sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NOs: 19"; SEQ ID NO: 19 exhibits 100% identity with SEQ ID NO:2). Clegg also teaches claim 5, namely, an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region having at least one CDR with greater than 75% sequence identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO: 23 (para [0048] - "a penta-specific antibody comprises at least four CDR sequences selected from the group consisting of: SEQ ID NOs: 19"; SEQ ID NO: 19 exhibits 100% identity with SEQ ID NO:23; para [0200] - "humanized penta-specific antibody"). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

—please see continuation on extra sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/50322

Continuation of previous extra sheet

Additionally, a further special technical feature of each of the inventions listed as Groups I, II+, III+, IV+ and V+ is the specific antigen binding protein sequence recited therein. Significant structural similarities cannot readily be ascertained among each of the unique antigen binding protein amino acid sequences. Without significant structural similarities, the antigen binding protein sequences do not have a shared special technical feature. In the absence of a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another. If Applicant elects to have any of Groups II+, III+, IV+, or V+ searched, Applicant must specify the specific amino acid sequence(s) to be searched, and where applicable, the specific nucleic acid sequence(s) to be searched. Each unique sequence constitutes an inventive concept.

Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. With out a shared special technical feature, the inventions of Groups I, II+, III+, IV+ and V+ lack unity of invention.

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 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(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, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. サランラップ

- (74) 代理人 100126099
弁理士 反町 洋
- (74) 代理人 100137497
弁理士 大森 未知子
- (74) 代理人 100173185
弁理士 森田 裕
- (72) 発明者 ニール、ジェームズ、クラーク
イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード
- (72) 発明者 キョン、オー、ジョハンソン
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、パイルン、マウル、ハイマーケット、レーン、25
- (72) 発明者 ズデンカ、ルドミラ、ジョナク
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709
- (72) 発明者 アレクサンダー、エイチ・テイラー
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709
- (72) 発明者 クリストファー、ビー・ホプソン
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、1250
- (72) 発明者 スティーブン、エイチ・トゥルーリ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709
- (72) 発明者 ズデンカ、ハスコバ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709
- (72) 発明者 ジュディサン、エム・リー
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709
- (72) 発明者 ジョン、アール・ホワイ特
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709
- (72) 発明者 ユ、シュ
アメリカ合衆国ペンシルバニア州、キング、オブ、プルシア、スウェードランド、ロード、709

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA43 CA04 DA02 GA11
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90X AA90Y AA93Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 AA16 CC03 CC05 CC08 DD62 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74 GA22

GA26