

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6234548号
(P6234548)

(45) 発行日 平成29年11月22日 (2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日 (2017.11.2)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02
A 6 1 P 5/18 (2006.01)	A 6 1 P 5/18

請求項の数 8 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-508909 (P2016-508909)	(73) 特許権者	515286542
(86) (22) 出願日	平成26年5月14日 (2014.5.14)		アブクロン・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2016-518368 (P2016-518368A)		A B C L O N I N C.
(43) 公表日	平成28年6月23日 (2016.6.23)		大韓民国152-779ソウル、クログ、
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/004317		デジタルロ285番、エイス・ツイン・タ
(87) 国際公開番号	W02014/185704		ワー1、スウィート1401、スウィート
(87) 国際公開日	平成26年11月20日 (2014.11.20)		1304
審査請求日	平成27年10月15日 (2015.10.15)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	10-2013-0055912		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成25年5月16日 (2013.5.16)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 松谷 道子
前置審査		(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER 2 に特異的に結合できる抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号 1 の相補性決定領域 (CDR) H 1、配列番号 2 の C D R H 2 および配列番号 3 の C D R H 3 を含む、重鎖可変領域；ならびに、配列番号 4 の C D R L 1、配列番号 5 の C D R L 2 および配列番号 6 の C D R L 3 を含む、軽鎖可変領域；

(i i) 配列番号 1 の C D R H 1、配列番号 2 の C D R H 2 および配列番号 3 の C D R H 3 を含む、重鎖可変領域；ならびに、配列番号 4 の C D R L 1、配列番号 5 の C D R L 2 および配列番号 2 1 8 の C D R L 3 を含む、軽鎖可変領域；

(i i i) 配列番号 1 の C D R H 1、配列番号 2 の C D R H 2 および配列番号 3 の C D R H 3 を含む、重鎖可変領域；ならびに、配列番号 4 の C D R L 1、配列番号 5 の C D R L 2 および配列番号 2 3 9 の C D R L 3 を含む、軽鎖可変領域；または、

(i v) 配列番号 1 の C D R H 1、配列番号 2 の C D R H 2 および配列番号 3 の C D R H 3 を含む、重鎖可変領域；ならびに、配列番号 4 の C D R L 1、配列番号 5 の C D R L 2 および配列番号 8 8 の C D R L 3 を含む、軽鎖可変領域

を含む、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (HER 2) に対する抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

(a) 薬学的に有効量の請求項 1 に記載の HER 2 に対する抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに (b) 薬学的に許容される担体を含む、癌の予防または処置のための医薬組成物。

【請求項 3】

組成物がトラスズマブをさらに含む、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

癌が、乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、気管支腫瘍、鼻咽頭癌、喉頭癌、膵臓癌、膀胱癌、結腸直腸癌、結腸癌、子宮頸癌、脳腫瘍、前立腺癌、骨腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌、甲状腺癌、副甲状腺癌または輸尿管癌である、請求項 2 または 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

癌が、乳癌または胃癌である、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

(a) 薬学的に有効量の請求項 1 に記載の H E R 2 に対する抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに (b) 薬学的に許容される担体を含む、アポトーシスを誘導するための医薬組成物。

10

【請求項 7】

医薬組成物が、癌、過形成、ケロイド、クッシング症候群、原発性アルドステロン症、紅板症、真性赤血球増加症、白板症、肥厚性癬痕、扁平苔癬、黒子症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、再狭窄または狭窄である過増殖性疾患の予防または処置のためにアポトーシスを誘導する、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の H E R 2 に対する抗体またはその抗体結合フラグメントを含む、癌を診断するためのキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、2011年11月1日から2014年10月1日までの間、助成金番号1415118385にて韓国産業技術振興院(KIAT)の支援を受け、KIATの国際協力支援チームの管理のもとに、AbClon社によって、国際協力技術開発事業および革新的なエピトープ発見のプラットフォーム技術に基づくグローバル抗体新薬開発との標題の基に行われたものである。

【0002】

30

本出願は、韓国特許庁に2013年5月16日に出願された韓国特許出願第10-2013-0055912号に基づく優先権を主張し、その開示内容は引用により本明細書中に包含される。

本発明は、H E R 2 (ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2) 関連疾患、特に癌を予防または処置するための H E R 2 抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

H E R 2 / n e u (E r b B 2) 遺伝子は、E G F R (上皮細胞増殖因子受容体) ファミリーメンバーの1つである、185 k D a の膜貫通糖タンパク質をコードする。H E R 2 タンパク質は、620 アミノ酸残基を有する細胞外ドメイン、23 アミノ酸残基を有する膜貫通ドメインおよび490 アミノ酸残基を有するチロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインからなる (Akiyama T, et al., Science, 232(4758):1644-1646(1986))。

40

【0004】

加えて、種々の特性を有する H E R 2 抗体が、多数の論文に報告されている。Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937 (1991); McKenzie et al., Oncogene 4:543-548 (1989); Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369 (1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990); Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991); Bacus et al., Cancer Research 52:2580-2589 (1992); Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408 (1993); W094/00136; Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-

50

2776 (1992); Hancock et al., Cancer Research. 51:4575-4580 (1991); Shawver et al., Cancer Res. 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992); U.S. Pat. No. 5,783,186; Kao et al., U.S. Publ. No. 2009/0285837 (2009); Ross et al., The Oncologist 8:307-325 (2003) および Klapper et al., Oncogene 14:2099-2109 (1997)。

【0005】

HER2抗体のうち、最も商業的に成功した抗体であるトラスツズマブ（ハーセプチン（商標）として市販、米国特許第5,821,337号）は、精力的に研究されてきた。Sapino, A., et al., Annals of Oncology (2007) 18: 1963-1968; Bussolati, G, et al., British Journal of Cancer (2005) 92, 1261-1267; および、Glazyrin A, et al., J Histology & Cytochemistry (2007) 55(1):25-33。

10

【0006】

トラスツズマブは商業的に成功しているにもかかわらず、この抗体は、HER2を過剰発現する乳癌患者のわずか15%のみに治療効果を示す。従って、トラスツズマブの有効性の程度または範囲を向上させるという状況において、併用療法により、トラスツズマブに非応答性または乏しい応答性の癌患者の予後を改善するための試みがなされてきた。

【0007】

例えば、米国特許出願公開第2011-0086004号は、トラスツズマブとIL-21を組み合わせた癌治療を開示している。米国特許出願公開第2012-0107270号は、トラスツズマブおよびIL-2と共役したテネイシン-Cを標的とする抗体の組み合わせを記載している。

20

【0008】

米国特許出願公開第2005-0101618号は、トラスツズマブおよびerbB2リガンドを用いる癌治療を開示している。ヨーロッパ特許出願公開第2134364号は、テロメラゼ阻害剤と組み合わせたトラスツズマブによる癌細胞増殖の阻害を開示している。WO2008/031531は、ペルツズマブとトラスツズマブの併用が癌の転移を抑制し得ることを記載している。

【0009】

本出願を通して、種々の特許および刊行物が引用され、引用文献が括弧内に示されている。これらの特許および刊行物の開示内容は、本発明および本発明の属する技術分野の技術水準をより完全に記載するために、引用により本明細書中に包含される。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】韓国特許出願第10-2013-0055912号

【特許文献2】米国特許第5,821,337号

【特許文献3】米国特許出願公開第2011-0086004号

【特許文献4】米国特許出願公開第2012-0107270号

【特許文献5】米国特許出願公開第2005-0101618号

【特許文献6】ヨーロッパ特許出願公開第2134364号

40

【特許文献7】国際公開番号WO2008/031531

【特許文献8】国際公開番号WO94/00136

【特許文献9】米国特許第5,783,186号

【特許文献10】米国特許出願公開番号2009/0285837

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Akiyama T, et al., Science, 232(4758):1644-1646(1986)

【非特許文献2】Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937 (1991)

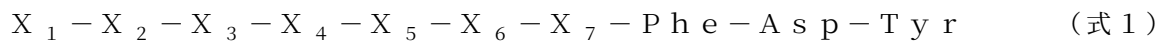
【非特許文献3】McKenzie et al., Oncogene 4:543-548 (1989)

【非特許文献4】Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369 (1991)

50

【非特許文献 5】Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362 (1990)	
【非特許文献 6】Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)	
【非特許文献 7】Bacus et al., Cancer Research 52:2580-2589 (1992)	
【非特許文献 8】Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408 (1993)	
【非特許文献 9】Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-2776 (1992)	
【非特許文献 10】Hancock et al., Cancer Research. 51:4575-4580 (1991)	
【非特許文献 11】Shawver et al., Cancer Res. 54:1367-1373 (1994)	
【非特許文献 12】Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765 (1994)	
【非特許文献 13】Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167 (1992)	
【非特許文献 14】Ross et al., The Oncologist 8:307-325 (2003)	10
【非特許文献 15】Klapper et al., Oncogene 14:2099-2109 (1997)	
【非特許文献 16】Sapino, A., et al., Annals of Oncology (2007) 18: 1963-1968	
【非特許文献 17】Bussolati, G, et al., British Journal of Cancer (2005) 92, 1261-1267	
【非特許文献 18】Glazyrin A, et al., J Histology & Cytochemistry (2007) 55(1): 25-33	
【発明の概要】	
【発明が解決しようとする課題】	
【0012】	
解決すべき技術的課題	20
本発明者らは、HER2 関連疾患、特に癌（より具体的には、乳癌および胃癌）を予防または処置し得る抗体を開発するために鋭意研究を行った。特に、本発明者らは、単剤としてのトラスツズマブ治療に伴う抗癌効果の限界を克服することができる、トラスツズマブと併用する抗体を開発するために鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、それ自体が顕著な抗癌効果を有し、癌（特に、乳癌および胃癌、より具体的には、HER2 を発現する乳癌および胃癌）の予防または処置のためにトラスツズマブと併用してより有益な効果を有する新規の抗体を開発した。	
【0013】	
従って、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2（HER2）に対する抗体またはその抗原結合フラグメントを提供することが本発明の目的である。	30
【0014】	
なお、本発明の HER2 抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸分子を提供することも、本発明の目的である。	
【0015】	
該核酸分子を担持する組み換えベクターを提供することもまた、本発明の目的である。	
【0016】	
組み換えベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供することもまた、本発明のさらなる目的である。	
【0017】	
癌を予防または処置するための医薬組成物を提供することもまた、本発明の別の目的である。	40
【0018】	
アポトーシスを誘導するための医薬組成物を提供することもまた、本発明のさらなる目的である。	
【0019】	
本発明の他の目的および利点は、添付の特許請求の範囲および図面と合わせて、以下の本明細書の記載から明らかになり得る。	
【課題を解決するための手段】	
【0020】	
発明の詳細な説明	50

本発明の第一の面において、(a) 配列番号 1 の相補性決定領域 (CDR) H1、配列番号 2 の CDR H2 および以下の式 1



(式中、 X_1 は、His、Asn、Ser または Ala であり、 X_2 は、Leu、Phe、Tyr、His、Met、Trp、Asn、Ile または Ala であり、 X_3 は、Gly または Cys であり、 X_4 は、Gly または Ser であり、 X_5 は、Thr、Met または Ala であり、 X_6 は、Ala、Ser、Gly または Thr であり、そして X_7 は、Ser、Ala、Cys または Thr である。)

で示される CDR H3 を含む、重鎖可変領域；ならびに

(b) 軽鎖可変領域

を含む、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 (HER2) に対する抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。

【0021】

本発明者らは、HER2 関連疾患、特に癌（より具体的には、乳癌および胃癌）を予防または処置し得る抗体を開発するために鋭意研究を行った。特に、本発明者らは、単剤としての トラスツズマブ 治療に伴う抗癌効果の限界を克服することができる、トラスツズマブ と併用する抗体を開発するために鋭意研究を行った。その結果、本発明者らは、それ自体が顕著な抗癌効果を有し、癌（特に、乳癌および胃癌、より具体的には、HER2 を発現する乳癌および胃癌）の予防または処置のために トラスツズマブ と併用してより有益な効果を有する新規の抗体を開発した。

【0022】

本発明の抗体は、HER2 に特異的な結合能を有している。特に、本発明の抗体は、トラスツズマブ が結合するエピトープとは異なる HER2 上のエピトープに結合する。

【0023】

本明細書で用いる用語“トラスツズマブ”は、米国特許第 5,821,337 号に記載の抗体を意味する。

【0024】

本発明の抗体は、種々の HER2 を発現する癌細胞に対する細胞毒性効果または増殖阻害効果を示す。癌細胞に関連して用語“細胞毒性”および“増殖阻害”には意図的な区別はなく、これらの用語は、本明細書中で互換的に用いられる。

【0025】

本明細書で用いる用語“抗体”は、全抗体ならびに抗体の抗原結合フラグメントを含む、HER2 特異的抗体を意味する。

【0026】

全抗体は、2つの完全長軽鎖および2つの完全長重鎖を含み、各軽鎖は、ジスルフィド結合によって重鎖に連結されている。重鎖定常領域は、 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$ 、 $\alpha 1$ および $\alpha 2$ のサブグループに分類されている、5つの異なるアイソタイプ (γ 、 μ 、 α 、 δ および ϵ) を含む。軽鎖定常領域は、2つの異なるアイソタイプ (κ および λ) を含む (Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41–50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4, pp. 45–65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984))。

【0027】

抗原結合フラグメントは、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv などを含む、抗原に結合できる抗体フラグメントを意味する。Fab は、抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第一定常ドメイン (CH₁) からなる一つの抗原結合部位を有する。Fab' は、重鎖の CH₁ ドメインの C 末端に 1 つまたはそれ以上のシステイン残基を含むヒンジ領域が存在するという意味で、Fab とは異なる。F(ab')₂ 抗体は、Fab' のヒンジ領域のシステイン残基との間にジスルフィド結合を形成することにより作製される。Fv は、重鎖および軽鎖の可変領域からなる最小の抗体

10

20

30

40

50

フラグメントであり、F_vフラグメントを製造するための組換え技術は、国際公開番号WO 88/10649、WO 88/106630、WO 88/07085、WO 88/07086およびWO 88/09344に開示されている。二本鎖において、重鎖および軽鎖の可変領域は非共有結合により連結され、一本鎖F_vにおいて、重鎖および軽鎖の可変領域は、一般的に、ペプチドリンカーを介して共有結合によって連結されているか、またはC末端で互いに直接結合されて、二本鎖F_vのような二量体を形成する。このような抗体フラグメントは、タンパク質分解酵素を用いて得ることができ（例えば、抗体全体をパパイインで消化して、F_abフラグメントを生産し、ペプシン処理の結果、F₁(_ab')₂フラグメントを生産する）、また遺伝子組換え技術により製造することができる。

【0028】

10

ひとつの態様では、本発明の抗体は、F_ab抗体および全抗体を含む。加えて、重鎖定常領域は、 γ 、 μ 、 α 、 δ または ϵ からなるアイソタイプから選択される。好ましくは、重鎖定常領域は、 γ 1、 γ 3および γ 4アイソタイプを含み、より好ましくは、 γ 1アイソタイプを含む。軽鎖定常領域は、 κ および λ アイソタイプであり得て、好ましくは、 κ アイソタイプであり得る。従って、本発明の抗体の好ましい態様は、 κ 軽鎖および γ 1重鎖を含むF_abまたはIgG1抗体である。

【0029】

本明細書で用いる用語“重鎖”は、完全長重鎖ならびに抗原に特異的に結合するための可変領域配列および3つの定常ドメイン(C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3})のアミノ酸配列を含む可変ドメイン(V_H)を含むその部分の両方を意味する。本明細書で用いる用語“軽鎖”は、完全長軽鎖ならびに抗原に特異的に結合するための可変領域配列および定常ドメイン(C_L)のアミノ酸配列を含む可変ドメイン(V_L)を含むその部分の両方を意味する。

20

【0030】

本明細書で用いる用語“CDR（相補性決定領域）”は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の超可変領域のアミノ酸配列を意味する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)）。重鎖および軽鎖のそれぞれは、3つのCDR（重鎖（CDRH1、CDRH2およびCDRH3）および軽鎖（CDRL1、CDRL2およびCDRL3））を含む。CDRは、抗原またはエピトープに結合する抗体において重要な役割を果たす接触残基(contacting residue)を提供する。

30

【0031】

本発明の抗体において、CDRH3は、式1で示される。

【0032】

式1中、X₁は、His、Asn、SerまたはAlaであり、具体的には、His、AsnまたはSerであり、より具体的には、HisまたはAsnであり、さらにより具体的には、Hisである。

【0033】

式1中、X₂は、Leu、Phe、Tyr、His、Met、Trp、Asn、IleまたはAlaであり、具体的には、Leu、Phe、Tyr、His、Met、Trp、AsnまたはIleであり、より具体的には、Leu、PheまたはTyrであり、さらにより具体的には、Leuである。

40

【0034】

式1中、X₃は、GlyまたはCysであり、具体的にはGlyである。

【0035】

式1中、X₄は、GlyまたはSerであり、具体的にはGlyである。

【0036】

式1中、X₅は、Thr、MetまたはAlaであり、具体的にはThrである。

【0037】

式1中、X₆は、Ala、Ser、GlyまたはThrであり、具体的にはAlaであ

50

る。

【0038】

式1中、 X_7 は、Ser、Ala、CysまたはThrであり、具体的にはSerである。

【0039】

ひとつの態様では、 X_1 は、His、AsnまたはSerであり、 X_2 は、Leu、PheまたはTyrであり、 X_3 は、Glyであり、 X_4 は、Glyであり、 X_5 は、Thr、MetまたはAlaであり、 X_6 は、Ala、Ser、GlyまたはThrであり、そして X_7 は、Ser、Ala、CysまたはThrである。

【0040】

より具体的には、 X_1 は、His、AsnまたはSerであり、 X_2 は、Leu、PheまたはTyrであり、 X_3 は、Glyであり、 X_4 は、Glyであり、 X_5 は、Thrであり、 X_6 は、Alaであり、そして X_7 は、Serである。

【0041】

さらにより具体的には、CDRH3は、配列番号3、27-28、32および39-86からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。さらにより具体的には、CDRH3は、配列番号3、43、64、67、71、76、83、84または85のアミノ酸配列を含み、最も具体的には、配列番号3のアミノ酸配列を含む。

【0042】

ひとつの態様では、軽鎖可変領域は、配列番号4のCDRL1、配列番号5のCDRL2、および以下の式2

$Y_1 - Y_2 - Y_3 - Y_4 - Y_5 - Y_6 - \text{Pro} - \text{Trp} - \text{Thr}$ (2)

(式中、 Y_1 は、Gln、AspまたはAlaであり、 Y_2 は、Gln、Asn、GluまたはAlaであり、 Y_3 は、Leu、Met、Asn、Ile、Ser、Thr、AlaまたはLysであり、 Y_4 は、Tyr、Ala、Ser、Arg、Val、Gly、MetまたはPheであり、 Y_5 は、Ser、Phe、Tyr、Arg、Ile、Gly、Lys、Asn、ValまたはAlaであり、そして Y_6 は、Thr、Ser、Val、Ile、Ala、Gly、Asn、Glu、PheまたはLeuである。)

で示されるCDRL3を含む。

【0043】

式2中、 Y_1 は、Gln、AspまたはAlaであり、具体的には、GlnまたはAspであり、より具体的には、Glnである。

【0044】

式2中、 Y_2 は、Gln、Asn、GluまたはAlaであり、具体的には、Gln、AsnまたはGluであり、より具体的には、Glnである。

【0045】

式2中、 Y_3 は、Leu、Met、Asn、Ile、Ser、Thr、AlaまたはLysであり、具体的には、Leu、Met、Asn、Ile、SerまたはThrであり、より具体的には、Leu、Met、AsnまたはIleであり、さらにより具体的には、LeuまたはMetであり、最も具体的には、Leuである。

【0046】

式2中、 Y_4 は、Tyr、Ala、Ser、Arg、Val、Gly、MetまたはPheであり、具体的には、TyrまたはAlaである。

【0047】

式2中、 Y_5 は、Ser、Phe、Tyr、Arg、Ile、Gly、Lys、Asn、ValまたはAlaであり、具体的には、Ser、Phe、Tyr、ArgまたはIleであり、より具体的には、Ser、PheまたはTyrである。

【0048】

式2中、 Y_6 は、Thr、Ser、Val、Ile、Ala、Gly、Asn、Glu、PheまたはLeuであり、具体的には、Thr、Ser、Val、Ile、Ala、

10

20

30

40

50

G l yまたはA s nであり、より具体的には、T h r、S e rまたはA l aである。

【0049】

ひとつの態様では、Y₁は、G l nまたはA s pであり、Y₂は、G l nであり、Y₃は、L e u、M e t、A s n、I l e、S e rまたはT h rであり、Y₄は、T y r、A l a、S e r、A r g、V a l、G l y、M e tまたはP h eであり、Y₅は、S e r、P h e、T y r、A r gまたはI l eであり、そしてY₆は、T h r、S e r、V a l、I l e、A l a、G l yまたはA s nである。

【0050】

より具体的には、C D R L 3は、配列番号6、33-38または87-245のアミノ酸配列を含む。さらにより具体的には、C D R L 3は、配列番号6、88、109、131、155、156、157、178、218、220、222または239のアミノ酸配列を含み、より具体的には、配列番号6、88 (h z 1 E 1 1-3)、218 (h z 1 E 1 1-133) または239 (h z 1 E 1 1-154) のアミノ酸配列を含む。

【0051】

ひとつの態様では、重鎖可変領域は、配列番号8 (1 E 1 1) または24 (h z 1 E 1 1) のアミノ酸配列を含む。

【0052】

ひとつの態様では、軽鎖可変領域は、配列番号10 (1 E 1 1)、26 (h z 1 E 1 1)、247 (h z 1 E 1 1-3)、249 (h z 1 E 1 1-133) または251 (h z 1 E 1 1-154) のアミノ酸配列を含む。

【0053】

実施例に示す通り、本発明の抗体は、特に、H E R 2の細胞外ドメインのうちサブドメイン4に結合しているが、本発明の抗体は、トラスツ[®]マブのエピトープとは異なるサブドメイン4上のエピトープに結合している。

【0054】

本発明のH E R 2抗体またはその抗原結合フラグメントは、それらが特異的にH E R 2を認識することが可能である限り、配列表に記載のアミノ酸配列の変異体を包含する。例えば、抗体のアミノ酸配列は、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特徴を改善するために改変されてもよい。例えば、そのような改変は、抗体のアミノ酸残基の欠失、挿入および／または置換を含む。

【0055】

かかるアミノ酸の変異は、アミノ酸側鎖の相対的類似性に基づいて、例えば、疎水性、親水性、電荷および大きさに基づいて提供され得る。アミノ酸側鎖の大きさ、形状、およびタイプの分析により、アルギニン、リジンおよびヒスチジン残基は全て、正の電荷を有するものであり、アラニン、グリシンおよびセリンは、同様の大きさを有し、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、同様の形状を有することが明らかであり得る。従って、これらの大きな要因に基づき、アルギニン、リジンおよびヒスチジン、アラニン、グリシンおよびセリン、ならびにフェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、生物学的に機能的等価物であるとみなされ得る。

【0056】

変異を導入するために、アミノ酸の疎水親水性 (ハイドロパシー) 指標を考慮することができる。疎水性および電荷に基づいて、疎水親水性指標が各アミノ酸に与えられる。イソロイシン (+4.5) ; バリン (+4.2) ; ロイシン (+3.8) ; フェニルアラニン (+2.8) ; システイン (+2.5) ; メチオニン (+1.9) ; アラニン (+1.8) ; グリシン (-0.4) ; スレオニン (-0.7) ; セリン (-0.8) ; トリプトファン (-0.9) ; チロシン (-1.3) ; プロリン (-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リシン (-3.9) ; および、アルギニン (-4.5) 。

【0057】

タンパク質の相互作用の生物学的機能を提供するために、アミノ酸の疎水親水性指数が顕著に重要である。これはよく、変異体は、タンパク質が同様の疎水親水性指標を有するアミノ酸で置換されている場合にのみ、同様の生物学的活性を有することができることは、当業者によく知られている。変異が疎水親水性指標に基づいて導入される場合、置換は、好ましくは、 ± 2 以下の疎水親水性指標の差異、より好ましくは ± 1 以内、さらにより好ましくは ± 0.5 以内の差異を有するアミノ酸残基との間で行われる。

【0058】

同様の親水性値を有する他のアミノ酸とのアミノ酸置換が、生物学的に同等の活性を有する変異体の作製をもたらすこともまた、当業者には明らかであり得る。米国特許第4,554,101に記載の通り、各アミノ酸残基は、以下の親水性値を有する。アルギニン(+3.0); リシン(+3.0); アスパラギン酸(+3.0 $\pm$ 1); グルタミン酸(+3.0 $\pm$ 1); セリン(+0.3); アスパラギン(+0.2); グルタミン(+0.2); グリシン(0); スレオニン(-0.4); プロリン(-0.5 $\pm$ 1); アラニン(-0.5); ヒスチジン(-0.5); システイン(-1.0); メチオニン(-1.3); バリン(-1.5); ロイシン(-1.8); イソロイシン(-1.8); チロシン(-2.3); フェニルアラニン(-2.5); トリプトファン(-3.4)。

【0059】

変異が親水性値に基づいて導入することを意図される場合、置換は、好ましくは、 ± 2 以下の親水性値の差異、より好ましくは ± 1 以内、さらにより好ましくは ± 0.5 以内の差異を有するアミノ酸残基との間で行われる。

【0060】

実質的にタンパク質の活性を損なうことのないアミノ酸残基の改変は、当業者によく知られている(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。このようなアミノ酸改変には、Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/GluおよびAsp/Glyの置換が含まれるが、これらに限定されない。

【0061】

生物学的に等価な活性を有する上記の変異を考慮して、本発明の抗体またはそれをコードする核酸のいずれかは、配列表に記載の配列と実質的に同一の配列を含むことが理解され得る。実質的に同一の配列とは、常套的に用いられている配列比較アルゴリズムの1つを用いて測定される通り、好ましくは、配列表の配列と少なくとも61%、より好ましくは少なくとも70%、さらにより好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%のヌクレオチド同一性を示すものであることを意味する。比較のための配列のアライメントの方法は、当技術分野で周知である。種々のプログラムおよびアライメントアルゴリズムが記載されている。Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5: 151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992); および、Pearson et al., Methods. Mol. Biol. 24:307-31(1994)。blastp、blastm、blastx、tblastnおよびtblastx用の配列分析プログラムに関連して使用するための、NCBI Basic Local Alignment 検索ツール (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10(1990)) は、国立生物情報センター (NCBI, Bethesda, Md.) を含むいくつかの供給源ならびにインターネット上から入手可能である。それは、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>において入手可能である。このプログラムを用いて配列同一性を決定する方法の説明は、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BI-AST/blast_help.htmlにおいて利用可能である。

【0062】

本発明の抗体には、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv (scFv)、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、ならびに抗イディオタイプ (抗Id) 抗体およびそのエピトープ結合フラグメントが含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

本発明の抗体のCDR配列は、CDR配列がユニークであるために、公知の抗体のCDR配列に対して低い類似性を示す。例えば、BLAST検索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) において本発明の抗体に高い類似性を有する米国特許第7,329,737号および同第7,993,646号に記載の抗体は、親抗体(mother antibody)である1E11抗体のCDR配列に50%未満の類似性を示し、さらに、本発明の抗体の標的とは異なるhK-1に結合する。

10

【0064】

従って、本発明の抗体のアミノ酸配列は、新規かつユニークであると考えられ得る。

【0065】

本発明の別の面において、本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードする核酸分子が提供される。

【0066】

本明細書で用いる用語“核酸分子”は、包括的にDNA (gDNAおよびcDNA) またはRNA分子を意味し、核酸分子の基本的なヌクレオチドは、修飾された糖類または塩基の類似体、ならびに天然ヌクレオチドを含む (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman and Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990))。重鎖および軽鎖の可変領域をコードする本発明の核酸分子の配列を変更することができる。このような修飾は、ヌクレオチドの付加、欠失または非保存的もしくは保存的置換が含まれる。

20

【0067】

ひとつの態様では、重鎖可変領域をコードする核酸分子は、配列番号7または23のヌクレオチド配列を含む。

【0068】

ひとつの態様では、軽鎖可変領域をコードする核酸分子は、配列番号9、25、246、248または250のヌクレオチド配列を含む。

30

【0069】

本発明のHER2抗体をコードする核酸分子はまた、上記のヌクレオチド配列と実質的な相同性を共有するヌクレオチド配列を含む。実質的な相同性とは、本発明のヌクレオチド配列と他のランダム配列との間の最大のアラインメントならびに当業者に公知のアルゴリズムを用いる配列アラインメント分析によって、少なくとも80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%の相同性を共有するヌクレオチド配列を意味する。

【0070】

本発明のさらに別の面では、上記の本発明の核酸分子を含む組み換えベクターが提供される。

【0071】

40

本明細書で用いる用語“ベクター”は、プラスミドベクター、コスミドベクター、ならびに、バクテリオファージベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクターのようなウイルスベクターを含む、宿主細胞において標的遺伝子を発現するためのツールである。

【0072】

ひとつの態様では、軽鎖および重鎖の可変領域をコードする核酸分子は、プロモーターに操作可能に連結されている。

【0073】

本明細書で用いる用語“操作可能に連結されている”とは、核酸発現制御配列 (例えば、プロモーター、シグナル配列、または転写因子結合部位のアレイ) と第二の核酸配列と

50

の間の機能的結合を意味し、ここで、発現制御配列は、第二の配列に対応する核酸の転写および／または翻訳に影響を与える。

【0074】

本発明の組み換えベクターは、当業者に公知の種々の方法によって構築され得て、その実用的な方法は、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されており、それは引用により本明細書中に包含される。

【0075】

典型的に、本発明のベクターは、クローニングまたは発現ベクターとして構築され得る。加えて、本発明のベクターは、原核または真核細胞を宿主細胞として用いて構築され得る。

10

【0076】

例えば、発現ベクターが、真核宿主細胞について構築されているとき、哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター、 β -アクチンプロモーター、ヒトヘモグロビンプロモーターおよびヒト筋肉クレアチンプロモーター）または哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5 Kプロモーター、SV40プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、HSVのtkプロモーター、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモーター、HIVのLTRプロモーター、モロニーウイルスプロモーター、エプスタインバーウイルス（EBV）プロモーター、およびラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター）を用いることができる。ベクターは、一般的に、転写ターミネーターとしてポリアデニル化配列を含む。

20

【0077】

本発明のベクターは、発現された抗体を精製するために、他の配列と融合され得る。例えば、融合される配列としては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（Pharmacia, USA）、マルトース結合タンパク質（NEB, USA）、FLAG（IBI, USA）および6xHis（ヘキサヒスチジン；Quiagen, USA）が含まれる。

【0078】

本発明のベクターによって発現されるタンパク質は抗体であるため、発現された抗体はまた、精製のための付加配列なしに容易にプロテインAカラムを通して精製することができる。

30

【0079】

本発明の発現ベクターは、選択マーカー、例えばアンピシリン、ゲンタマイシン、カルベニシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、カナマイシン、ジェネテシン、ネオマイシンおよびテトラサイクリンに対する耐性遺伝子として当業者に知られている抗生物質耐性遺伝子を含む。

【0080】

本発明のさらなる面において、上記の組み換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0081】

本発明のベクターが安定に、かつ連続的にクローニングされ、発現される宿主細胞はまた、当業者に公知の任意のものが利用され、例えば、好適な真核宿主細胞としては、COS7細胞（サル腎臓細胞）、NSO細胞、SP2/0、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞、W138、BHK（ベビーハムスター腎臓）細胞、MDCK、骨髓腫細胞株、HuT78細胞およびHEK-293細胞が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0082】

本発明の別の面において、（a）薬学的に有効量の本発明のHER2に対する抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに（b）薬学的に許容される担体を含む、癌の予防または処置のための医薬組成物を提供する。

【0083】

本発明の医薬組成物は、本発明のHER2抗体またはその抗原結合フラグメントを活性

50

成分として含むため、それらに共通する説明は、本明細書の過度の複雑化を避けるために省略されている。

【0084】

実施例に記載の通り、トラスツズマブと組み合わせた本発明のHER2抗体は、顕著に増強された細胞毒性を有して癌細胞（特に、乳癌細胞、より具体的には、HER2を発現する乳癌細胞）を殺し、それ故に、癌（特に、乳癌および胃癌、より具体的には、HER2を発現する乳癌および胃癌）の治療により有効である。一態様によれば、該医薬組成物は、トラスツズマブをさらに含む。

【0085】

本発明の組成物によって予防または処置される癌としては、当業者に公知の種々の癌、例えば、乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、気管支腫瘍、鼻咽頭癌、喉頭癌、膵臓癌、膀胱癌、結腸直腸癌、結腸癌、子宮頸癌、脳腫瘍、前立腺癌、骨腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌、甲状腺癌、副甲状腺癌または輸尿管癌が含まれる。

10

【0086】

具体的には、該組成物によって予防または処置されるべき癌は、HER2を発現する癌であり、より具体的にはHER2を発現する乳癌または胃癌である。

【0087】

本発明のさらに別の面において、(a) 薬学的に有効量の本発明のHER2に対する抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに(b) 薬学的に許容される担体を含む、アポトーシスを誘導するための医薬組成物を提供する。

20

【0088】

ひとつの態様では、該医薬組成物は、アポトーシスを誘導して、癌、過形成、ケロイド、クッシング症候群、原発性アルドステロン症、紅板症、真性赤血球増加症、白板症、肥厚性癬癩、扁平苔癬、黒子症、動脈硬化症、アテローム性動脈硬化症、再狭窄または狭窄である過増殖性疾患を予防または処置する。

【0089】

薬学的に許容される担体は、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ラバーアラブル (rubber arable)、リン酸カリウム、アルギン酸、ゼラチン、ケイ酸カリウム、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウム、および鉱油を含むが、これらに限定されない、製剤用に常套の担体であってよい。本発明の医薬組成物は、潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁化剤、および防腐剤をさらに含んでいてよい。好適な薬学的に許容される担体および製剤の詳細は、レミントンの薬学 (Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)) に見出すことができ、それは引用により本明細書中に包含される。

30

【0090】

本発明の医薬組成物は、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、腹腔内、局所、経鼻、肺または直腸投与により、非経腸的に投与され得る。

【0091】

40

本発明の医薬組成物の好適な用量は、医薬製剤方法、投与方法、患者の年齢、体重、性別、疾患の重症度、食餌、投与時間、投与経路、排泄速度および該医薬組成物に対する感受性によって変化し得る。好ましくは、本発明の医薬組成物は、0.0001-100mg/kg (体重) の日用量で投与される。用語“薬学的に有効な量”は、癌を予防または処置するのに適した量を意味する。

【0092】

当業者に公知の従来技術によれば、医薬組成物は、薬学的に許容される担体および／または添加剤と共に製剤され得て、最終的には単位用量形態および複数回投与量形態を含むいくつかの形態で提供される。製剤は、油性または水性媒体、再懸濁液またはエマルジョン、抽出物、粉末、坐薬、顆粒、錠剤またはカプセル剤であってもよく、さらには、分散

50

剤または安定化剤を含む。

【0093】

本発明の抗体は、HER2発現に関係する障害、疾患または病状を診断するために使用され得る。

【0094】

本発明のさらなる面において、本発明のHER2に対する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、HER2発現に関係する障害、疾患または病状を診断するためのキットを提供する。

【0095】

HER2発現に関係する障害、疾患または病状は、特に、癌、例えば、乳癌、卵巣癌、胃癌、肺癌、肝臓癌、気管支腫瘍、鼻咽頭癌、喉頭癌、膵臓癌、膀胱癌、結腸直腸癌、結腸癌、子宮頸癌、脳腫瘍、前立腺癌、骨腫瘍、頭頸部癌、皮膚癌、甲状腺癌、副甲状腺癌または輸尿管癌である。具体的には、本発明の診断キットは、HER2を発現する癌、より具体的にはHER2を発現する乳癌または胃癌を診断するために使用される。

【0096】

本発明の抗体は、患者における本発明の抗体の薬剤反応性を分析するために使用することができる。

【0097】

本発明の別の面において、本発明の抗体を含む薬剤反応性を分析するためのキットを提供する。

【0098】

本発明の分析キットは、患者における本発明の抗体の薬剤反応性を評価するために使用される。例えば、患者から得られた癌細胞を本発明の抗体と共にインキュベートし、抗体が細胞に結合することが明らかにされる場合、該患者は、本発明の抗体の薬剤反応性を有すると決定される。

【0099】

本発明のキットは抗体を含むため、免疫アッセイまたは免疫染色のために製造され得る。免疫アッセイまたは免疫染色の形式としては、放射免疫アッセイ、放射免疫沈降、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、捕捉ELISA、阻害または競合アッセイ、サンドイッチアッセイ、フローサイトメトリー、免疫蛍光染色および免疫親和性精製が含まれるが、これらに限定されない。免疫アッセイまたは免疫染色の手順は、Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; および、Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999に見出すことができ、これは、引用により本明細書に包含される。

【0100】

例えば、放射免疫アッセイによれば、放射性同位体(例えば、 C^{14} 、 I^{125} 、 P^{32} および S^{35})で標識された抗体は、癌細胞の表面上のHER2を識別するために使用され得る。ELISA法によれば、本発明の方法の具体例は、以下の工程を含む。(i) 分析すべき生体サンプルで固体基質の表面をコーティングし、(ii) 該生体サンプルを一次抗体としての本発明のHER2抗体と共にインキュベートし、(iii) 工程(ii)の結果物を酵素と結合した二次抗体と共にインキュベートし、そして(iv) 酵素の活性を測定する。

【0101】

固体基質は、炭化水素ポリマー(例えば、ポリスチレンおよびポリプロピレン)、ガラス、金属またはゲルであってもよい。最も好ましくは、固体基質は、マイクロタイタープレートである。

【0102】

二次抗体に結合した酵素は、比色、蛍光、発光または赤外線反応を触媒する酵素、例え

10

20

30

40

50

ば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、およびシトクロム P_{450} を含む。アルカリホスファターゼを用いるとき、ブロモクロロインドリルホスフェート (BCIP)、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT)、ナフトール-AS-BI-ホスフェートおよび ECF (増強化学蛍光) を基質として使用してもよい。西洋ワサビペルオキシダーゼを使用する場合、クロロナフトール、アミノエチルカルバゾール、ジアミノベンジジン、D-ルシフェリン、ルシゲニン (ビス-N-メチルアクリジニウムニトレート)、レゾルフィンベンジルエーテル、ルミノール、アンプレックスレッド試薬 (10-アセチル-3,7-ジヒドロキシフェノキサジン、Pierce)、HYR (p-フェニレンジアミン-HCl およびピロカテコール)、TMB (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)、ABTS (2,2'-アジンージ [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸])、o-フェニレンジアミン (OPD) およびナフトール/ピロニン、グルコースオキシダーゼおよび m-NBT (ニトロブルーテトラゾリウム) ならびに m-PMS (フェナジンメチルスルファート) を基質として使用してもよい。

【0103】

捕捉 ELISA 法によれば、本発明の方法の具体例は、以下の工程を含み得る。(i) 固体基質の表面を捕捉抗体としての HER2 抗体でコーティングし、(ii) 捕捉抗体を分析すべき生体サンプルと共にインキュベートし、(iii) 工程 (ii) の結果物を、検出抗体として、検出可能なシグナルを発生する標識と結合した HER2 抗体と共にインキュベートし、そして (iv) 標識から生じたシグナルを測定する。

【0104】

検出抗体は、検出可能なシグナルを発生する標識を有している。標識には、化学物質 (例えば、ビオチン)、酵素 (例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、およびシトクロム P_{450})、放射性物質 (例えば、 C^{14} 、 I^{125} 、 P^{32} および S^{35})、蛍光物質 (例えば、フルオレセイン)、発光、化学発光および FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 標識が含まれるが、これらに限定されない。抗体を標識するための種々の標識および方法は、Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 に見出され得る。

【0105】

ELISA および捕捉 ELISA における酵素活性またはシグナルの測定は、当技術分野で周知の種々の方法によって行われ得る。ビオチンを標識として使用する場合、検出はストレプトアビジンを用いて行うことができる。ルシフェラーゼが使用される場合、検出はルシフェリンを用いて行われ得る。

【0106】

本発明のキットに適用可能な生体サンプルには、細胞、組織、組織由来の抽出物、溶解物または精製物、血液、血漿、血清、リンパ液および腹水が含まれるが、これらに限定されない。

【0107】

本発明の抗体は、インビボまたはインビトロでの画像化のために使用され得る。本発明の別の面において、本発明の抗体および該抗体に結合してシグナルを発生する標識を含むイメージング組成物を提供する。

【0108】

シグナル発生標識としては、T1 造影剤 (例えば、Gd キレート化合物)、T2 造影剤 (例えば、超常磁性物質 (例えば、マグネタイト、 Fe_3O_4 、 $\gamma-Fe_2O_3$ 、マンガンフェライト、コバルトフェライト、ニッケルフェライト))、放射性同位体 (例えば、 ^{11}C 、 ^{15}O 、 ^{13}N 、 P^{32} 、 S^{35} 、 ^{44}Sc 、 ^{45}Ti 、 ^{118}I 、 ^{136}La 、 ^{198}Tl 、 ^{200}Tl 、 ^{205}Bi および ^{206}Bi)、蛍光物質、例えば、フルオレセイン、フィコエリトリン、ローダミン、リサミン、Cy3 および Cy5)、化学発光物質、磁性粒子、質量標識および電子密度の高い粒子が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0109】

本発明の抗体は、単独で癌治療において有用であるが、該抗体はHER2を発現する細胞を標的とし得るから、他の薬剤と組み合わせることによりADC（抗体薬物複合体）の形態で提供されてもよい。

【0110】

従って、本発明の別の面では、本発明の抗体および該抗体と結合した薬剤を含むADC（抗体薬物複合体）が提供される。

【0111】

抗体と組み合わせる薬剤には、化学物質、放射性核種、免疫療法剤、サイトカイン、ケモカイン、毒素、生物学的薬剤および酵素阻害剤、特に以下の抗癌剤：アシビシン、アクラルピシン、アコダゾール（acodazole）、アクロマイシン、アドゼレシン、アラノシン、アルデスロイキン、アロプリノールナトリウム、アルトレタミン、アミノグルテチミド、アモナフィド、アンプリゲン、アムサクリン、アンドロゲン、アングイジン、グリシン酸アフィジコリン、アシュリー（asaley）、アスパラギナーゼ、5-アザシチジン、アザチオプリン、バチルス・カルメット・ゲラン（BCG）、ベーカーズアンチフォール、ベーター2'-デオキシチオグアノシン、ビスアントレン塩酸、硫酸プレオマイシン、ブスルファン、ブチオニンスルホキシミン、BWA773U82、BW502U83/HCl、BW7U85メシル酸、セラセミド（ceracemide）、カルベタイマー（carbetimer）、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、クロロキノキサリンスルホンアミド、クロロゾトシン、クロモマイシンA3、シスプラチン、クラドリピン、コルチコステロイド、コリネバクテリウムパルブム、CPT-11、クリスナートル、シクロシチジン、シクロホスファミド、シタラビン、シテムベナ、ダビスマレアート、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシンHCl、ジアザウリジン（deazauridine）、デクスラゾキサン、ジアンヒドロガラクトール、ジアジクオン、ジブロモズルシトール、ジデムニンB、ジエチルジチオカルバメート、ジグリコールアルデヒド、ジヒドロ-5-アザシチジン、ドキソルピシン、エキノマイシン、エダトレキセート（dedatrexate）、エデルフォシン、エフロルニチン、エリオット溶液、エルサミトルシン、エピルピシン、エピルピシン（esorubicin）、リン酸エストラムスチン、エストロゲン、エタニダゾール、エチオホス、エトポシド、ファドロゾール、ファザラビン、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナスチリド、フラボン酢酸、フロクスウリジン、リン酸フルダラビン、5-フルオロウラシル、フルオゾール（商標）、フルタミド、硝酸ガリウム、ゲムシタビン、酢酸ゴセレリン、ヘプスルファム、ヘキサメチレンビスアセトアミド、ホモハリングトニン、硫酸ヒドラジン、4-ヒドロキシアンドロステジオン、ヒドロキシウレア（hydrozyurea）、イダルピシンHCl、イホスファミド、4-イポメアノール、イプロプラチン、イソトレチノイン、ロイコポリンカルシウム、酢酸リュープロリド、レバミゾール、リポソームダウノルピシン、リポソームカプセル化ドキソルピシン、ロムスチン、ロニダミン、メイタンシン、メクロレタミン塩酸塩、メルファラン、メノガリル、メルバロン、6-メルカプトプリン、メスナ、カルメット・ゲラン桿菌のメタノール抽出残渣、メトトレキサート、N-メチルホルムアミド、ミフェプリストン、ミトグアゾン、マイトマイシン-C、ミトタン、ミトキサントロン塩酸塩、単球/マクロファージコロニー刺激因子、ナビロン、ナフォキシジン、ネオカルチノスタチン、酢酸オクトレオチド、オルマプラチン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パーラ、ペントスタチン、ピペラジンジオン、ピポプロマン、ピラルピシン、ピリトレキシム、ピクサントロン（piroxantrone）塩酸塩、PIXY-321、プリカマイシン、ポルフィマーナトリウム、プレドニムスチン、プロカルバジン、プロゲスチン、ピラゾフリン、ラゾキサン、サルグラモスチム、セムスチン、スピロゲルマニウム、スピロムスチン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、スロフェヌール（sulofenur）、スラミンナトリウム、タモキシフェン、タキソテール、テガフル、テニポシド、テレフタルアミジン、テロキシロン（teroxirone）、チオグアニン、チオテパ、チミジン注射、チアゾフリン、トポテカン、トレミフェン、トレチノイン、トリフルオペラジン塩酸塩、トリフルリジン、トリメトトレキサート、TNF（腫瘍壊死因子）、ウラシ

10

20

30

40

50

ルマスタード、TNFビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、ビンゾリジン、Y o s h i 8 6 4、ゾルピシン、シトシンアラビノシド、エトポシド、メルファラン、タキソテールおよびタキソールが含まれるが、これらに限定されない。

【発明の効果】

【0112】

本発明の効果

本発明の特徴および利点を以下にまとめる。

(a) 本発明の抗体は、癌細胞（特に、乳癌および胃癌細胞）において過剰に発現されたHER2、具体的には、トラストズマブに対するエピトープとは異なるHER2上のエピトープに特異的に結合する。

10

(b) 本発明の抗体のCDR配列は、公知のHER2抗体のCDR配列とは低い類似性を示し、このことは、CDR配列がユニークであることを示す。

(c) トラストズマブと組み合わせた本発明の抗体は、顕著に増強された細胞毒性を有して癌細胞を殺し、それ故に、癌（特に、乳癌および胃癌）の治療において極めて有効である。

(d) 理論はともかく、併用療法の増強された効果は、本発明の抗体が、トラストズマブに対するエピトープと異なるHER2上のエピトープに結合し、トラストズマブと協働してHER2を阻害することを示し得る。

(e) アポトーシスを誘導し得る本発明の抗体は、過増殖性疾患の予防または処置に使用され得る。

20

(f) 本発明は、癌診断、薬剤反応性の分析、イメージングおよびADC（抗体薬物複合体）、ならびに癌治療においても有用であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0113】

【図1】図1は、p c D N A 3 . 3 - I g G 重鎖(Heavy)ベクターおよびp O p t i V E C - I g G カッパ(Kappa)ベクターの遺伝子マップを示す。

【図2】図2Aおよび2Bは、NCI-N87癌細胞株およびBT-474癌細胞株に対する、1E11抗体での単剤処理および1E11抗体とトラストズマブの併用処理の増殖阻害効果をそれぞれ示すグラフである。TRA、PER、およびh I g Gはそれぞれ、トラストズマブ、ペルツマブ、およびヒトI g G（陰性対照）を示す。

30

【図3】図3Aおよび3Bは、1E11抗体が、トラストズマブの結合ドメインとは異なるHER2サブドメインのドメインに結合することを示す。図3Aおよび3Bはそれぞれ、SPR分析およびELISA分析の結果を示す。

【図4】図4Aは、1E11抗体が、HER2が属するE r b Bファミリータンパク質のうち、HER2に特異的に結合するかどうかを調べるELISA分析の結果を示す。セツキシマブ（CET）を、EGFRタンパク質に対する対照抗体として使用した。図4Bは、1E11抗体がヒト以外のHER2に結合するかどうかを調べるELISA分析の結果を示す。

【図5】図5Aは、NCI-N87細胞を、1E11抗体またはトラストズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いて処理したとき、アポトーシスが発生した癌細胞の割合の分析結果を示す。図5Bは、BT-474細胞を、1E11抗体またはトラストズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いて処理したとき、アポトーシスが発生した癌細胞の割合の分析結果を示す。図5Cは、NCI-N87細胞を、1E11抗体またはトラストズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いて処理した24時間および48時間後の細胞生存率の分析結果を示す。対照群は、抗体用の溶媒であるPBSのみで処理した細胞の生存率を示す。図5Dは、NCI-N87細胞を1E11抗体またはトラストズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いて処理した24時間後のカスパーゼ-3/7活性の分析結果を示す。対照群は、抗体用の溶媒であるPBSのみで処理した細胞の生存率を示す。

40

【0114】

【図6】図6Aは、1E11抗体またはトラストズマブ単独またはそれらの組み合わせを

50

用いる処理によるHER2下流シグナル伝達の減少を示すウェスタンブロット分析の結果を示す。図6Bは、1E11抗体またはトラスツズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いる処理によるヘテロ二量体化誘導性細胞増殖に対する阻害効果を示すグラフである。陰性対照（陰性対照）は、リガンドや抗体で処理しない細胞の生存率を示し、陽性対照（陽性対照対照）は、抗体で処理することなくリガンドのみで処理した細胞の生存率を示す。

【図7】図7Aから7Cは、1E11抗体またはトラスツズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いる処理によるNCI-N87異種移植動物モデルにおける腫瘍細胞増殖阻害効果を示す。図7Aは、腫瘍容積の変化を示すグラフであり、図7Bは、腫瘍重量の変化を示すグラフであり、図7Cは、腫瘍組織の染色結果を示す画像である。対照Abは、パ

10

リビズマブである。

【図8】図8Aおよび8Bは、ヒト化抗体であるhz1E11抗体での単独処理、ならびにhz1E11抗体およびトラスツズマブの併用処理による、NCI-N87癌細胞株およびOE-19癌細胞株に対する増殖阻害効果をそれぞれ示すグラフである。

【0115】

【図9】図9は、hz1E11抗体またはトラスツズマブ単独またはそれらの組み合わせを用いる処理によるNCI-N87異種移植動物モデルにおける腫瘍細胞増殖阻害効果を示す。対照Abは、パ

リビズマブである。

【図10】図10Aおよび10Bは、hz1E11抗体のCDRH3およびCDRL3のアラニンスキャニング結果をそれぞれ示す。

20

【図11】図11Aから11Fは、親和性を改善されたヒト化抗体であるhz1E11-3、hz1E11-133、およびhz1E11-154抗体での単独処理、ならびにそれらとトラスツズマブとの併用処理による、NCI-N87、OE-19、およびBT-474癌細胞株に対する増殖阻害効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0116】

本発明は、実施例によりさらに詳細に説明され得る。これらの実施例は、より具体的に例示することを意図しており、添付の特許請求の範囲に記載の本発明の範囲が実施例に、またはそれにより限定されるものではないことは、当業者には明らかであり得る。

【実施例】

30

【0117】

実施例

実施例1：HER2抗体の開発

抗体を調製するために、HER2タンパク質の細胞外ドメイン（ECD）を動物細胞を用いて製造し、その後、それを抗原として用いた。ヒトIgG1およびFc部分（CH2-CH3）のヒンジ領域が、ECDのC末端に結合されているDNAを、HindIIIおよびBamHI制限酵素を用いてクローニングした。次いで、クローニングされたベクターを、FreeStyleTM 293F（Invitrogen, Cat. No. R790-07）細胞にポリエチレンイミン（Polyscience Inc., Cat. No. 23966）を用いて一過性にトランスフェクションし、HER2-ECD Fc融合タンパク質を、該細胞培養物からプロテイン

Aセラミック・ハイパードF樹脂（PALL, Cat No. 20078-028）を用いて精製した。精製されたタンパク質を、タンパク質アッセイ色素（Bio-Rad, Cat. No. 500-0006）を用いて、SDS-PAGEを行って定量し、その濃度および純度をクーマシー染色によって確認した。100μgの精製されたタンパク質抗原をフロイントのアジュバント（Sigma, Cat. No. F5506）と混合し、その後、BALB/cマウス（DBL Co., Ltd., Korea）に腹腔内注入した。2週間目に、100μgの抗原をPBSで希釈し、再度注入し、その3日後に、マウスの脾臓を取り出し、そこからリンパ球を単離した。単離したリンパ球を骨髓腫細胞株SP2/O-Ag14（ATCC, Cat. No. CRL-1581）と5：1の比で混合し、PEG-1500（Roche, Cat. No. 783641）を用いて融合させた。融合した細胞を、HATサブプリメント（Sigma, Cat. No. H0262）を含む培地で培養し、融合細胞（ハイブ

40

50

リドーマ)を、選択的に選別し、培養した。

【0118】

このようにして得られたハイブリドーマ細胞を、それらが抗原に結合する抗体を生産する細胞であるかどうかを決定するために、ELISAアッセイにより調べた。HER2-ECDFcまたはChromPureヒトIgG (hIgG, Jackson Immunoresearch Lab. Inc., Cat. No. 009-000-003)を、Costar 96ウェルプレート (Corning, Cat. No. 3590)に、室温にて、 $1\mu\text{g/mL}$ の濃度で1時間、固定化した。これをTBS-T (0.05% トライトンX-100)で3回洗浄し、次いで室温にて30分間、300 μL のTBS-T/SM (2% スキムミルク)を用いてブロッキングした。ブロッキングされたプレートを3回洗浄し、ハイブリドーマ培養液を添加し、そして37℃にて1時間、抗体に結合させた。結果物を3回洗浄後、二次抗体としての抗マウスIgG-HRP (Pierce, Cat. No. 31439)を、TBS-T/SMで1:5, 000の比で希釈し、37℃にて1時間、これに結合させた。結果物を3回洗浄後、TMB (SurModics, Cat. No. TMB-1000-01)を加え、室温にて5分間発色させ、1N硫酸 (DukSan, Cat. No. 254)を加えて発色を停止させた。吸光度をVictor X3 (PerkinElmer, Cat. No. 2030-0030)を用いて450nmで測定し、HER2-ECDFcに特異的に結合する抗体を選択した。

10

【0119】

HER2は、細胞表面上に発現されるタンパク質であるため、開発された抗体が、細胞ベースのELISAアッセイにより、HER2を過剰発現する細胞に結合したかどうかを調べた。HER2を過剰発現する卵巢癌細胞株であるSKOV-3 (Korean Cell Line Bank (KCLB), Cat. No. 30077)を、Costar 96ウェル細胞培養プレート (Corning, Cat. No. 3595)に10,000細胞/ウェルの濃度で分注し、24時間培養した。次の日に、細胞培養上清を除去後、これをPBSで3回洗浄し、ハイブリドーマ培養液を添加し、そして37℃にてさらに2時間培養した。結果物をTBS-Tで3回洗浄後、PBS/FBS (3% FBS)で1:5, 000の比で希釈したヤギ抗マウスIgG-HRPを二次抗体としてそれに添加し、室温にて1時間処理した。結果物をTBS-Tで3回洗浄後、TMBを用いて発色させた。陰性対照としてのSP2/O細胞培養物よりも高い吸光度を示す61個のクローンを選択した。

20

【0120】

実施例2：乳癌細胞の増殖に対する、開発された抗体の阻害効果の比較

30

乳癌細胞の増殖に対する阻害効果を確認するために、細胞生存アッセイを行うために、ハイブリドーマ培養液から抗体を精製した。ハイブリドーマを、3% FBSを含む培地中で培養し、IgGの形態の抗体を、プロテイン-A樹脂を用いて精製した。精製した抗体を、SDS-PAGEを行って、BCAアッセイ (Pierce, Cat. No. 23227)により定量し、それらの濃度および純度をクーマシー染色によって確認した。

【0121】

細胞生存アッセイを、HER2が過剰発現されている、代表的な乳癌細胞株であるBT-474および代表的な胃癌細胞株であるNCI-N87細胞株に対する、単独処理またはトラスツズマブとの併用処理により行った。併用処理について、開発された抗体とトラスツズマブを1:1の混合比 (重量比)の混合物を用いた。96ウェルプレートにBT-474 (ATCC, Cat. No. HTB-20, 10,000細胞/ウェル)およびNCI-N87 (ATCC, Cat. No. CRL-5822, 10,000細胞/ウェル)細胞を分注し、24時間培養した。精製した抗体をそれぞれ $5\mu\text{g/mL}$ の濃度で処理し、BT-474およびNCI-N87細胞株をさらに4日間培養した。細胞生存アッセイのために、CK-8 (Dojindo, Cat. No. CK-04-13)を10%の終濃度で添加し、37℃にて3時間処理し、その吸光度を測定した。相対生存率は、100%の生存率に設定された抗体で処理していないウェルの吸光度と比較して計算した。上記に基づき、1E11抗体を選択した。

40

【0122】

実施例3：抗体配列の分析

50

抗体配列アッセイのために、ファージ F a b 抗体ライブラリーを、それぞれのハイブリドーマの R N A を用いて構築し、3 段階のパニング (panning) を、H E R 2－E C D－F c に結合するファージを得るために行った (Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press)。ハイブリドーマを培養した後、R N A を、S V 総 R N A 単離システム (Promega, Cat. No. Z3100) を用いて単離し、c D N A をそこから合成した。既知のプライマーセット (参照: Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press) を用いて、抗体の可変領域を増幅し、ヒト C k および C H 1 に連結後に S f i I 制限酵素を用いて p C o m b 3 X ベクター (Barbas laboratory, The Scripps Research Institute) にクローニングし、その後、E R 2 5 3 7 細菌 (New England Biolabs, Cat. No. 801-N) に形質転換した。形質転換された細菌は、ファージを得るために V C S M 1 3 ヘルパーファージ (Stratagene, Cat. No. 200251) を用いてトランスフェクションされ、H E R 2－E C D－F c が固定化されているため、H E R 2－E C D－F c に結合したクローンをイムノチューブ (immuntube(登録商標)) を用いて得た。

【0123】

抗体のそれぞれについてのコロニーのうち、H E R 2－E C D－F c に結合する抗体を E L I S A アッセイにより確認した。形質転換された細菌のコロニーを、600 nm の吸光度が 0.5 に達するまで 37℃ にて培養し、1 mM の終濃度の I P T G で処理して、30℃ で一晚培養しながら、F a b の形態で抗体を発現させた。5 mL の培養後、細胞を遠心により集め、0.4 mL の 1×T E S (50 mM T r i s、1 mM E D T A、20% (v/v) スクロース、pH 8.0) 注に懸濁し、4℃ にて 10 分間処理した。そこへ 0.6 mL の 0.2×T E S を添加後、結果物を 4℃ にて 30 分間処理し、遠心して、上清を回収した。1 μg/mL の濃度で H E R 2－E C D－F c でコーティングした C o s t a r 96 ウェルハーフエリアプレート (Corning Inc., Cat. No. 3690) を T B S－T で 3 回洗浄後、T B S－T / S M (3% 無脂肪スキムミルク、0.05% トライトン X－100) を用いて、室温にて 1 時間ブロッキングした。各コロニーについての培養液またはペリプラズム抽出物 (Periplasm) を、T B S－T / S M を用いて 1:3 の比でそれを希釈することによって処理し、室温にて 1 時間結合させた。3 回洗浄後、二次抗体としての抗 H A－H R P (Roche, Cat. No. 120-138-190-01) を 1:5000 の比で希釈し、室温にて 1 時間結合させて、3 回洗浄し、T M B を用いて発色させた。

【0124】

細胞培養液またはペリプラズム抽出物中の大部分のコロニーが 0.2 以上の吸光度を有し、抗体の配列を、これらのクローンについて分析した。配列分析は、単一のハイブリドーマに由来するコロニーは、同じ配列を有することが示されたことを明らかにした。1 E 1 1 抗体の相補性決定領域 (C D R) のアミノ酸配列を以下の表 1 にまとめる。

【0125】

【表 1】

表 1

1 E 1 1 抗体の相補性決定領域 (C D R) のアミノ酸配列

	軽鎖	重鎖
CDR 1	L A S Q T I G T W L A	S Y T M S
CDR 2	A T S L A D	Y I S N G G G S T Y Y P D T V K G
CDR 3	Q Q L Y S T P W T	H L G G T A S F D Y

【0126】

実施例 4: キメラ抗体の構築および生産

キメラ抗体は、本発明の抗体をより新薬開発を可能にする形態 (druggable form) で調製するために構築された。

【0127】

ヌクレオチド配列分析を完了させるためにマウス抗体の可変領域を増幅し、ヒト定常領域C κ およびCHに結合させ、重鎖部分をp c DNA 3. 3-T O P O (Invitrogen, Cat. No., K8300-01) ベクターによりT A クローニングし、一方で、軽鎖部分をp O p t i V E C-T O P O (Invitrogen, Cat. No., 12744-017) ベクターによりT A クローニングした。増幅に用いたプライマーを以下の表2および3に示す。フォワードプライマーをC l a I 制限部位を用いて挿入し、他方、リバースプライマーを重鎖についてN h e I 制限部位を、軽鎖についてB s i W I 制限部位をそれぞれ用いて添加した。さらに、可変領域内のフォワードプライマーを、キメラ抗体が細胞培養液中に分泌され得るように、シグナル配列を用いて添加した。本発明で用いるC κ およびCHのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、配列番号11から14に記載されている。

10

【0128】

P C R 反応 (95℃にて30秒、58℃にて30秒、そして72℃にて30秒) を、上記のプライマーおよびG o T a q DNA ポリメラーゼ (Promega, Cat. No. M3005) を用いて35サイクル繰り返して行った。可変領域および定常領域の増幅されたP C R 産物のそれぞれを、1%アガロースゲル電気泳動後に、Q i a q u i c k ゲル抽出キット (QIAGEN, Cat. No. 28706) を用いて精製した。可変領域および定常領域を連結するために、可変領域および定常領域のP C R 産物を等量で混合し、オーバーラップ伸長P C R を、可変領域についてフォワードプライマーを、定常領域についてリバースプライマーを用いて行い、遺伝子産物を得て、該産物を上記と同様の方法で精製した。オーバーラップ伸長P C R (95℃にて30秒、58℃にて30秒、そして72℃にて45秒) を、複数のプライマーを用いて35サイクル繰り返して行い、G o T a q DNA ポリメラーゼ (Promega, Cat. No. M3005) を用いて行った。増幅された遺伝子産物を、製造元のマニュアルに従って、重鎖部分についてp c DNA 3. 3-T O P O (Invitrogen, Cat. No., K8300-01) ベクターにT A クローニングし、軽鎖部分についてp O p t i V E C-T O P O (Invitrogen, Cat. No., 12744-017) ベクターにT A クローニングした。

20

【0129】

【表2】

表2

可変領域の増幅のためのプライマー

30

プライマー	配列
LF-1	<u>CCGATCGATATGGAGACAGACACACTCCTGCT</u> <u>ATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCA</u> <u>CGTGGGATATTTCAGATG</u>
LR-1	CGGCGTACGTTTTCAGCTCCAGCTTGG
HF-1	<u>CCGATCGATATGGAGACAGACACACTCCTGCT</u> <u>ATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCA</u> <u>CGTGGGAGGTGAAGCT</u>
HR-1	CGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGAC

40

【0130】

【表 3】

表 3

定常領域の増幅のためのプライマー

プライマー	配列
Ck-F	GGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACC
Ck-R	CCGCTCGAGTTAACACTCTCCCCTGTTG
CH-F	CACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCAT CG
CH-R	CCGCTCGAGTCATTTACCCGGGGACAGGGAG

10

【0131】

上の表中、太字部分は制限酵素のための制限部位を示し、下線を引いた部分はシグナル配列を示す。

【0132】

最終的に構築された p c D N A 3. 3-I g Gヘビーベクターおよび p O p t i V E C-I g Gカップベクターの遺伝子地図を図 1 に示す。

【0133】

その後、クローニングされたベクターを、F r e e S t y l e T M 2 9 3 F (Invitrogen, Cat. No. R790-07) 動物細胞にポリエチレンジオキサン (Polyscience Inc., Cat. No. 23966) を用いて一過的にトランスフェクションし、キメラ抗体をプロテイン-Aセラム・ハイパード F 樹脂 (PALL, Cat No. 20078-028) を用いて細胞培養液から精製した。精製されたキメラ抗体を、B C A アッセイ (Pierce, Cat. No. 23227) により、S D S-P A G E を行って定量し、それらの濃度および純度をクーマシー染色によって確認した。

20

【0134】

実施例 5：乳癌および胃癌細胞の増殖に対する開発された抗体の阻害効果の比較

開発された抗体の抗癌効果をその濃度に応じて確認するために、細胞生存率アッセイを、H E R 2 を過剰発現している癌細胞株、例えば、B T-4 7 4 (乳癌細胞株) および N C I-N 8 7 (胃癌細胞株) について行った。B T-4 7 4 (10, 000 細胞/ウェル) および N C I-N 8 7 (10, 000 細胞/ウェル) を 70 μ L の容量で 96 ウェルプレートに分注し、24 時間培養しながら、固定化した。次の日、30 μ L の抗体を培養細胞に添加した。処理された抗体の終濃度は、各抗体当たり最大 20 μ g / m L であって、1:4 の比で連続希釈し、アッセイを 5 つの異なる濃度で行った。トラスツズマブとの組み合わせで処理したとき、開発された抗体とトラスツズマブとの比を 1:1 の比に設定した (例えば、図 2 A および 2 B 中、投与量が 1 μ g / m L であったとき、1 μ g / m L の T R A および 1 μ g / m L の 1 E 1 1 を投与した)。抗体で処理した後、B T-4 7 4 および N C I-N 8 7 細胞をさらに 4 日間培養し、10% の終濃度まで C C K-8 を添加し、37 $^{\circ}$ C にて 3 時間処理した。その後、処理した細胞の吸光度を、V i c t o r X 3 を用いて 450 n m で測定した。抗体で処理されていない細胞の吸光度を 100% に設定し、それらの相対生存率を計算した (図 2 A および 2 B)。

30

40

【0135】

開発された 1 E 1 1 抗体は、トラスツズマブに反応した N C I-N 8 7 細胞株 (図 2 A) および B T-4 7 4 (図 2 B) 細胞株の増殖に対する阻害効果を示した。さらに、1 E 1 1 抗体とトラスツズマブの併用療法は、N C I-N 8 7 および B T-4 7 4 細胞株については、トラスツズマブ単独での処理よりも、癌細胞の増殖に対する高い阻害活性を示した。興味深いことに、1 E 1 1 抗体およびトラスツズマブの併用療法は、N C I-N 8 7 細胞株について、トラスツズマブおよびペルツズマブの療法よりも癌細胞の増殖に対して高い阻害活性を示した (図 2 A)。

【0136】

50

実施例 6：トラスツズマブとの併用療法における開発された抗体の相乗効果の確認

胃癌における開発された 1 E 1 1 抗体とトラスツズマブの併用療法の抗癌効果が相乗効果であるかどうかを確認するために、N C I－N 8 7 細胞を 1 E 1 1 抗体またはトラスツズマブ単独またはそれらの組み合わせで処理して、抗癌効果を分析した（図 2 A）。濃度に応じた抗癌効果を、C a l c u S y n プログラム（Biosoft）により、少なくとも 2 つの薬剤の併用投与の効果を分析する C h o u & T a l a l a y の方法（Chou et al., Adv. Enzyme. Regul. 22:27－55(1984)）を用いて分析した（表 4）。2 つの薬剤が併用投与されるとき、それらは、アゴニスト作用、相加作用、または相乗作用のいずれかを示す。薬剤の、相互作用は、併用係数（C I）の点で C h o u & T a l a l a y の方法を用いて分析することができる。1 以上の C I 値はアゴニスト作用を示し、C I 値が 1 および 1 以下は、相加作用および相乗作用をそれぞれ示す。

【0 1 3 7】

【表 4】

表 4

1 E 1 1 + トラスツズマブ			
C. I.			r
ED 5 0	ED 7 5	ED 9 0	
0. 0 3 1 5	0. 0 4 5 9	0. 0 7 5 1	0. 9 5 9 2 1

【0 1 3 8】

上記の表中、E D 5 0、E D 7 5 および E D 9 0 は、5 0 %、7 5 % および 9 0 % の集団においてそれぞれ効果を示す、有効量を示す。‘ r ’ は、中央値－効果プロット（median－effect plot）の線形相関係数を示している。

【0 1 3 9】

図 2 A および表 4 で見られる通り、それらの併用時のトラスツズマブおよび 1 E 1 1 クローンの 2 つの薬剤の C I 値は、0. 1 未満であった。従って、2 つの抗体を組み合わせで投与した場合に相乗効果を有することが確認された。

【0 1 4 0】

実施例 7：開発された抗体とトラスツズマブとのエピトープの比較

H E R 2 に対する抗体であるトラスツズマブは、H E R 2 E C D の 4 つのドメインのうちドメイン 4 に結合することが知られている。開発された抗体の H E R 2 上のエピトープがトラスツズマブのものと重複するかどうかを確認するために、エピトープビニング（epitope binning）を、B i a c o r e 3 0 0 0（GE Healthcare）を用いた表面プラズモン共鳴（S P R）により行った。約 1, 0 0 0 R U（応答単位）のトラスツズマブを、E C D / N H S を用いたアミンカップリング法により C M 5 センサーチップ（GE Healthcare, Cat. No. BR－1000－12）に固定化した。3 2 0 n M の濃度の H E R 2－E C D－H i s タンパク質を、センサーチップに結合させ、そこに H B S－P 緩衝液（1 0 m M H E P E S、1 5 0 m M N a C l、1 m M E D T A、0. 0 0 5 % トゥイーン－2 0、p H 7. 4）を用いて 4 分間トラスツズマブを固定化させ、そこに 5 分間、緩衝液のみを流し、その後、トラスツズマブと H E R 2－E C D との結合を安定化させた。次いで、そこに 1 μ g / m L の濃度で二次抗体を 4 分間結合させ、その上に緩衝液を流した。全ての実験において、流量は 5 0 μ L / 分に設定した。二次結合した抗体が、トラスツズマブが結合した H E R 2－E C D タンパク質にさらに結合するとき、それらは、トラスツズマブと共通のエピトープを共有していない抗体である。

【0 1 4 1】

図 3 A に示す通り、二次抗体として用いた h I g G は、H E R 2 に結合しないため、さらなる結合はなく、トラスツズマブは同じエピトープを有するため、それがさらに結合することはない。対照的に、1 E 1 1 抗体は、トラスツズマブに結合させた H E R 2－E C D にさらに結合し、それ故に、それは、トラスツズマブのエピトープと異なるエピトープ

を有することが確認された。

【0142】

1E11クローンが結合するドメイン領域を確認するために、HER2タンパク質の細胞外ドメインを構成する4つのサブドメイン（ドメイン1-4）を、ヒトIgG1のヒンジ領域およびFc領域を結合させた動物細胞を用いて個々に製造し、プロテイン-Aを用いて精製した。1E11クローン、トラストズマブ、ペルツズマブの結合は、このように生産された組み換えタンパク質についてのELISAアッセイにより確認された。図3Bに見られる通り、1E11クローンは、トラストズマブと同様に、サブドメイン4に結合することが示された。

【0143】

以上の結果から、1E11クローンは、HER2タンパク質のECDのサブドメイン4に結合するが、それらは、トラストズマブとは異なるエピトープに結合することが確認された（図3）。

【0144】

実施例8：HER2に対する開発された抗体の特異性

開発された1E11抗体は、HER2が属するErbBファミリータンパク質のうち、HER2に特異的に結合し、それらがヒト以外の種のHER2と結合するか否かは、ELISAアッセイによって確認された。開発された1E11抗体がErbBファミリータンパク質のうちHER2に特異的に結合するかどうかを確認するために、ErbBファミリーに属するEGFR、HER2、HER3およびHER4の細胞外ドメインを、ELISAアッセイにより調べた。EGFR（EGFR-ECD-Fc）の細胞外ドメインを、HER2-ECD-Fcと同様の方法で製造し、HER3（R&D Systems, #348-RB-050）およびHER4（R&D Systems, #1131-ER-050）を購入した。開発された抗体が異なる種のHER2タンパク質に対する種間交差反応性を示すかどうかを確認するために、ヒト、アカゲザル、カニクイザル、マウス、およびラットのHER2細胞外ドメインを使用し、ELISAアッセイによって確認した。カニクイザルの細胞外ドメインは、ヒトHER2-ECD-Fcと同様にして作製し、アカゲザルのHER2細胞外ドメイン（Sino Biological Inc., #90020-K08H）、マウスのHER2細胞外ドメイン（Sino Biological Inc., #50714-M08H）、およびラットのHER2細胞外ドメイン（Sino Biological Inc., #80079-R08H）を購入した。

【0145】

図4Aおよび4Bに見られる通り、開発された1E11抗体は、ヒトErbBファミリータンパク質のうち、HER2に特異的に結合し、アカゲザルおよびカニクイザルのHER2タンパク質の種間交差反応を有することが確認された。

【0146】

実施例9：HER2抗体のアポトーシス分析

本発明者らは、HER2抗体のアポトーシス誘導能力を分析して、1E11抗体とトラストズマブの同時投与の抗癌効果の基本的分子機序を明らかにした。アポトーシス誘導能を調べるために、NCI-N87およびBT-474細胞を10μg/mLの1E11抗体、トラストズマブまたはそれらの組み合わせで48時間処理した（併用投与について、10μg/mLの1E11および10μg/mLのトラストズマブ）。抗体処理後、細胞をトリプシンで剥離し、500,000細胞を、ApoScreen アネキシンVアポトーシスキット（SouthernBiotech, #10010-02）を用いてフローサイトメトリー分析（Cytomics FC500, Beckman Coulter Inc.）により分析した（図5aおよび5b）。

【0147】

アポトーシスにおいて重要な役割を果たすカスパーゼ-3およびカスパーゼ-7の活性を測定するために、1E11抗体、トラストズマブまたはそれらの組み合わせの抗癌効果を、処理時間にわたって分析した。NCI-N87細胞を、抗体を10μg/mLの抗体で処理した。処理の24時間および48時間後に、カスパーゼ-Glo（Promega, #G7571）を用いて細胞生存率アッセイを行った（図5c）。細胞生存率が、処理の24時間後

10

20

30

40

50

に急激に減少したことが示された。このような結果に基づいて、カスパーゼー 3 / 7 の活性は、処置の 2 4 時間後に測定された。NCI-N87 細胞を、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体で 2 4 時間、処理した。カスパーゼー G10 3 / 7 アッセイ (Promega, #G809) を用いて、カスパーゼー 3 / 7 活性を測定した (図 5 d)。

【0148】

図 5 a および 5 b に示す通り、1E11 抗体単独では、HER2 を過剰発現する胃癌 (NCI-N87 細胞) および乳癌 (BT-474 細胞) に対して、トラスツズマブとは異なり、アポトーシス誘導活性を発揮することが示された。1E11 抗体のアポトーシス活性は、トラスツズマブとの併用処理でさらに増加した。1E11 とトラスツズマブの併用処理の増加したアポトーシス活性は、アポトーシスにおいて重要な役割を果たす、カスパーゼー 3 / 7 活性の増加によるものと分析された (図 5 d)。

【0149】

実施例 10: 抗体による HER2 の細胞シグナル伝達阻害

HER2 を過剰発現する胃癌および乳癌細胞に対する、トラスツズマブとの組み合わせでの 1E11 の抗癌機序を解明するために、本発明者らは、細胞における HER2 シグナル伝達活性を分析した。NCI-N87 細胞を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体で 2 4 時間処理した。その後、細胞を細胞溶解溶液 [50mM トリス、 $\text{pH} 7.4$ 、 150mM NaCl、 1% NP-40、 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、 1mM NaF、 1mM Na_3VO_4 、 1mM PMSF およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma)] で溶解して、細胞溶解物を得た。該細胞溶解物をウェスタンブロット分析を行った。HER2 (#4290)、pHER2 (#2243)、pHER3 (#4791)、EGFR (#4267)、pEGFR (#3777)、AKT (#4691)、pAKT (#4060)、ERK (#4695)、および pERK (#4370) 抗体を、Cell Signaling Technology 社から購入した。HER3 (sc-285) 抗体を、Santa Cruz Biotechnology 社から購入し、GAPDH (AbC-1001) 抗体をコーディング対照として AbClon から購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体 (AbC-5001) および抗ラット抗体 (AbC-5003) もまた、AbClon から購入した。バンドは、Ab シグナル (AbClon, AbC-3001) を用いて可視化した。

【0150】

本発明者らは、1E11 およびトラスツズマブの併用処理が、HER2 と EGFR または別の ErbB ファミリータンパク質のような HER3 とのヘテロ二量体化を阻害するかどうかを、さらに調べた。NCI-N87 細胞は、HER2 と EGFR とのヘテロ二量体化を誘導するために EGF で処理し、HER2 と HER3 とのヘテロ二量体化の誘導のために HRG (ヘレグリン) で処理した。NCI-N87 細胞は、 0.1% FBS を添加した細胞培地中に分注し、2 4 時間培養した。その後、細胞を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体で 1 時間処理し、次いで $200 \text{ng}/\text{mL}$ の EGF (R&D Systems, #236-EG-200) または HRG (R&D Systems, #377-HB/CF) で処理した。3 日後、細胞生存率を試験した。

【0151】

図 6 a に示す通り、1E11 およびトラスツズマブの併用療法は、HER2 タンパク質濃度の低下に寄与する。HER2 タンパク質濃度が低下すると、リン酸化 HER2 タンパク質も減少した。本発明者らは、全タンパク質濃度の変化なしで、リン酸化 HER3 および EGFR 濃度の減少を観察した。このような結果は、1E11 およびトラスツズマブの併用療法が、HER2、HER3 および EGFR の活性を制御することができることを示している。そのような活性を制御することによって、周知の HER2 下流因子である AKT および ERK の活性もまた、総タンパク質濃度を変化させることなく改変された。

【0152】

1E11 およびトラスツズマブの併用療法は、HER2 および EGFR (または HER3) のヘテロ二量体化による細胞増殖の減少をもたらすことが示された (図 6 b)。HER2 および EGFR のヘテロ二量体化を誘導し得る EGF、ならびに HER2 および HER3 のヘテロ二量体化を誘導し得る HRG による NCI-N87 細胞増殖は、他の受容体

に結合してH E R 2を阻害することが知られているペルツズマブと同様のレベルで、1 E 1 1およびトラスツズマブの併用処理により減少された。

【0153】

これらの結果は、H E R 2およびE G F R（またはH E R 3）のヘテロ二量体化を介する細胞シグナル伝達が、1 E 1 1およびトラスツズマブの併用療法によって抑制されたことを示す。

【0154】

実施例11：動物モデルにおける抗体の抗癌効果

1 E 1 1抗体の抗癌効果は、動物モデルを用いて評価した。無胸腺ヌード雌マウス（Daehan Biolink, Korea）を、異種移植モデルを調製するために、 5×10^6 のNCI-N 87細胞を皮下注射した。腫瘍サイズを約 200 mm^3 まで増殖させ、次いで、マウスを4つの群に無作為化した。4つの群の動物に対して、 10 mg/kg のパリビズマブ（トラスツズマブのアイソタイプコントロール（MedImmune LLC.））、1 E 1 1、トラスツズマブ、および1 E 1 1とトラスツズマブの併用でそれぞれ2週間腹腔内投与した。併用投与のために、各抗体を 10 mg/kg の用量で投与した。腫瘍容積を経時的に測定した。22日目に、動物を屠殺し、腫瘍を単離した。腫瘍容積を、式 $(L * W * W) / 2$ （式中、“L”は、最大腫瘍直径を示し、“W”は最小腫瘍直径を示す）を用いて計算した。単離された腫瘍を計量し、免疫組織化学分析のために調製した。腫瘍異種移植片組織をホルマリン固定処理し、パラフィン包埋標本切片とした。これらを、ヘマトキシリン（DAKO、#CS700）およびエオシン（DAKO、#CS701）（H&E）染色ならびにH E R 2抗体（Cell Signaling Technology, #4290）を用いるH E R 2タンパク質染色によって調べた。

【0155】

1 E 1 1単独は、トラスツズマブと同程度に腫瘍増殖を阻害した（図7a）。1 E 1 1は、各単一抗体処理と比較して、トラスツズマブとの組み合わせで顕著に増大した抗腫瘍活性を示した。抗腫瘍活性はまた、実験後に抽出された腫瘍塊を分析することにより確認された（図7b）。1 E 1 1とトラスツズマブの併用処理によるH E R 2を発現する細胞の減少は、免疫組織化学染色で観察され（図7c）、それはウェスタンブロッティングの結果と互換性があった（図6a）。これらの結果は、トラスツズマブと組み合わせた1 E 1 1が、単一の抗体処理と比較して、H E R 2タンパク質の発現の抑制に起因して、腫瘍増殖を顕著に阻害することを示す。

【0156】

実施例12：ヒト化抗体の開発およびそれらの効果の確認

実施例4で開発されたキメラ1 E 1 1抗体のヒト化抗体は、CDRグラフト法を用いて開発された。開発された抗体のCDRを受容するために、ヒト抗体について、高いヌクレオチド配列ベースの相同性を有するヒト生殖系列抗体遺伝子のVおよびJ遺伝子を、IMGT/V-QUEST（Brochet, X. et al., Nucl Acids Res. 36:503-508(2008)）を用いて選択した。重鎖のV遺伝子およびJ遺伝子として、IGHV3-48*03遺伝子およびIGHJ4*01遺伝子をそれぞれ選択し、それらの配列相同性はそれぞれ85.07%および87.23%であった。さらに、軽鎖のV遺伝子およびJ遺伝子として、IGKV1-39*01遺伝子およびIGKJ1*01遺伝子をそれぞれ選択し、それらの配列相同性はそれぞれ81.36%および81.08%であった。CDRの移植のみが親和性を低下させるという報告を考慮して、抗体の全体構造に影響を与え得るバーニアゾーン（vernier zone）に対応する重鎖のKababの番号付けに基づいて、H49は、ヒト生殖系列遺伝子上でアラニンの代わりにセリンで置換されている。開発されたヒト化抗体hz1E11は、FreeStyle（商標）293F細胞株を用いてIgGの形態で製造された。開発されたhz1E11の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号24および26にそれぞれ記載されている。

【0157】

H E R 2に対する1 E 1 1の親和性、開発されたヒト化抗体であるhz1E11の親和

10

20

30

40

50

性は、表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイにより測定された。全ての実験を、Biacore 3000を用いて行った。最初に、ヒトIgGに対するヤギ抗体を、アミンカップリング法によりCM5センサーチップに1000RUの濃度で固定化した。トラスツズマブ、ペルツズマブ、およびh z 1 E 1 1をそれぞれ、2.84 μ M、5.68 μ M、および7.1 μ MにHBS-P緩衝液を用いて希釈した。HER2-ECD-Hisタンパク質に結合する前に、各抗体を、50 μ L/分の速度で180秒間結合させ、安定化の目的のために緩衝液をその上に流した。次に、HER2-ECD-Hisタンパク質を、640 nM、320 nM、160 nM、80 nM、40 nM、20 nMおよび0 nMの濃度で4分間結合させて、その上に緩衝液を15分間流した。センサーチップは、10 mM グリシン-HCl（pH 1.5）緩衝液をその上に流すことにより再循環させた。全てのセンサーグラムデータを、BIA評価ソフトウェアを用いて1:1相互作用モデルにより分析した。抗体の親和性は、以下の表5にまとめた。トラスツズマブおよびペルツズマブの親和性は、それぞれ1.94 nMおよび1.89 nMであり、一方、開発した抗体1 E 1 1の親和性は、16.0 nMであった。1 E 1 1のヒト化抗体の親和性は、10.4 nMであり、既存の1 E 1 1抗体とはほとんど差異がなかった。

【0158】

【表5】

表5

抗体	K _a (M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (s ⁻¹)	K _D (nM)
トラスツズマブ	3.9E+04	7.6E-05	1.94
ペルツズマブ	3.6E+04	6.8E-05	1.89
1 E 1 1	3.0E+04	4.7E-04	16.0
h z 1 E 1 1	4.9E+04	5.1E-04	10.4

【0159】

1 E 1 1の開発されたヒト化抗体であるh z 1 E 1 1の抗癌効果は、HER2を過剰発現するヒト胃癌細胞株NCI-N87およびOE-19において確認された（図8）。NCI-N87細胞におけるh z 1 E 1 1の単剤処理は、トラスツズマブ処理と同様の癌の生存率の減少を示したが、h z 1 E 1 1とトラスツズマブの併用処理は、各抗体の単剤処理と比較して癌の生存率の顕著に高い減少を示した（図8A）。さらに、異なるヒト胃癌細胞株であるOE-19におけるh z 1 E 1 1とトラスツズマブの併用処理は、各抗体の単剤処理と比較して癌の生存率のより高い減少を示した（図8B）。さらに、h z 1 E 1 1とトラスツズマブの併用処理は、癌細胞の増殖に対して、1 E 1 1とトラスツズマブの併用処理（図2A）よりも高い阻害効果を示した（図8A）。h z 1 E 1 1とトラスツズマブの併用処理は、NCI-N87およびOE-19細胞株において、癌細胞の増殖に対して、トラスツズマブとペルツズマブの併用処理よりも高い阻害効果を示した

【0160】

上記の結果は、1 E 1 1の開発されたヒト化抗体であるh z 1 E 1 1が、従来の1 E 1 1と比較して同等の結合能力を有し、改善された抗癌効果を有することを示す。

【0161】

1 E 1 1の開発されたヒト化抗体であるh z 1 E 1 1のトラスツズマブとの併用処理の抗癌効果は、NCI-N87を用いて異種移植モデルにおいて確認された。NCI-N87移植により形成された癌を有するマウスに、開発された抗体およびトラスツズマブのアイソタイプ対照群、h z 1 E 1 1、トラスツズマブ、ならびにh z 1 E 1 1およびトラスツズマブの組み合わせをそれぞれ1週間に2回腹腔内注射した。アイソタイプ対照群とトラスツズマブを、10 mg/kgの用量で投与した。併用処理の場合には、h z 1 E 1 1およびトラスツズマブを1:1の比で混合し、各抗体に基づき、1 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kgおよび10 mg/kgの用量で投与した。h z 1 E 1 1およびトラスツズマブの併用処理は、用量依存的に癌の増殖の減少を示した（図9）。10 mg/kg

kgのトラスツズマブの投与で観察された抗癌効果は、1mg/kgのh z 1 E 1 1またはトラスツズマブの投与でも観察された。h z 1 E 1 1およびトラスツズマブの5mg/kgより高用量での投与は、癌の増殖を阻害するだけでなく、既に形成された癌も減少させたことが示された。

【0162】

実施例13：開発された抗体の結合領域の確認

開発された抗体の抗原に結合するために重要な領域を確認するために、重鎖および軽鎖のCDR3に対応するアミノ酸をアラニンに返還することによって結合能を試験するアラニンスキニングアッセイを行った。K a b a tの番号付けに従い95、96、97、98、99および100aに対応する重鎖のCDR3領域のうち、ヒスチジン（H）、ロイシン（L）、グリシン（G）、グリシン（G）、スレオニン（T）およびセリン（S）、ならびにK a b a t番号付けに従い89、90、91、92、93および94に対応する軽鎖のCDR3領域のうち、グルタミン（Q）、グルタミン（Q）、ロイシン（L）、チロシン（Y）、セリン（S）およびスレオニン（T）を、Q u i k C h a n g e部位特異的変異導入キット（S t r a t a g e n e、#200518）を用いてアラニンに変更した。開発された抗体はアラニンを有するため、重鎖のCDR3のうち、A100をアッセイから除外した。細菌において各改変された抗体を発現させた後、その発現をそこからのペリプラズム抽出液を得た後にドットプロットにより確認し、結合能力をE L I S AアッセイによりH E R 2－E C Dについて分析した（参照：図10）。

【0163】

【表6】

表6

	改変された配列	改変された位置	H e r 2－E C Dへの結合能（450nmでの吸光度）
CDR－L3	AQLYSTPWT	Q89A	1.711
	QALYSTPWT	Q90A	1.705
	QQAYSTPWT	L91A	1.492
	QQLASTPWT	Y92A	1.803
	QQLYATPWT	S93A	1.733
	QQLYSAPWT	T94A	1.628
CDR－H3	ALGGTASFDY	H95A	1.59
	HAGGTASFDY	L96A	1.66
	HLAGTASFDY	G97A	1.08
	HLGATASFDY	G98A	0.051
	HLGGAASFDY	T99A	0.839
	HLGGTAAFDY	S100aA	1.597
	親抗体	h z 1 E 1 1	1.75

【0164】

表6および図10Aおよび10Bに見られる通り、改変された抗体は、同様のレベルで発現されたが、重鎖のG98Aは、その結合能の完全な消失を示し、重鎖のG97Aは、その結合能の顕著な減少を示した。他の領域の変更は、抗原－抗体結合に顕著な効果を示さなかった。

【0165】

実施例14：開発された抗体の親和性の改善

開発された抗体の親和性を向上させるために、軽鎖および重鎖の無作為化CDR3のライブラリを開発した。K a b a tの番号付けによるアミノ酸番号F100、D101、お

よび Y 1 0 2 に対応する重鎖の C D R 3 のうち F、D および Y、ならびに K a b a t の番号付けによる P 9 5、W 9 6 および T 9 7 に対応する軽鎖の C D R 3 のうち P、W および T は、それらがヒト抗体において一般的に見出されるアミノ酸であるため、無作為化から除外された。上記のアミノ酸を除く、重鎖および軽鎖の C D R 3 アミノ酸の 2 0 個の無作為化されたアミノ酸のファージ抗体ライブラリが、開発された (Phage display: a laboratory manual, Carlos Barbas III, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press)。特に、上記で用いたプライマーは、重鎖および軽鎖の C D R 3 に相当する領域に関連し、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) およびチミン (T) が、等しい比率で混合されて、無作為化されるべきアミノ酸に対応するコドンの第一および第二の位置にランダムに挿入され、グアニン (G) またはシトシン (C) が、等しい比率で混合されて、第三の位置に挿入されるように、合成された。

10

【 0 1 6 6 】

開発されたライブラリから改善された親和性を有するクローンを選択するために、H E R 2 - E C D - H i s タンパク質を、E Z - L i n k S u l f o - N H S - L C - ビオチニル化キット (Thermo Scientific, #21435) を用いてビオチニル化し、抗体を選択するための抗原として用いた。開発されたファージ抗体ライブラリおよびビオチン - H E R 2 - E C D - H i s タンパク質を、室温にて 2 時間結合させ、抗原に結合したファージを、5 0 μ L のダイナビーズ M - 2 7 0 ストレプトアビジン (Invitrogen, #653.06) を用いて分離した。上記の選別プロセスを 4 回行い、こうして選択されたコロニーのうち H E R 2 - E C D に結合する抗体を発現するコロニーを、ペリプラズム抽出物を用いた E L I S A アッセイにより選択し、選択されたコロニーで発現される抗体の配列を、ヌクレオチド分析により確認した。H E R 2 - E C D に結合する抗体の重鎖および軽鎖の C D R 3 のアミノ酸配列を、以下の表 7 および 8 にまとめる。各表中の数字は、h z 1 E 1 1 の重鎖および軽鎖の C D R 3 のアミノ酸配列を示す。

20

【 0 1 6 7 】

【表 7】

表 7

親和性を改善するプロセスから選択された変異体のCDRH3配列

1	HLGGTASFDY	14	HLGGMSSFDY	27	HWGGTASFD Y	40	PLGGTASFD Y
2	AFGGTASFDY	15	HLGGMTSFD Y	28	HYGGTASFDY	41	QLAGTASFD Y
3	DLGGTASFDY	16	HLGGSSSFDY	29	MNGGTASFDY	42	SFGGTASFD Y
4	FWGGTASFDY	17	HLGGTACFD Y	30	NFGGTASFDY	43	SHGGTASFD Y
5	HCGGTASFDY	18	HLGGTGAFD Y	31	NHGGMASFD Y	44	SLGGTASFD Y
6	HFGGTASFDY	19	HLGGTGSFD Y	32	NHGGTASFDY	45	SMGGTASFD Y
7	HHGGTASFDY	20	HLGGTSTFDY	33	NIGGTASFDY	46	SNGGTASFD Y
8	HIGGTASFDY	21	HLGGTTSFDY	34	NLGGTASFDY	47	SWGGTASFD Y
9	HLCSTASFDY	22	HLGSTASFDY	35	NMGGTASFDY	48	SYGGTASFD Y
10	HLCVTASFDY	23	HLYRTASFDY	36	NNGGTASFDY	49	YYGGTASFD Y
11	HLGGAASFDY	24	HMGGTASFD Y	37	NWGGTASFD Y		
12	HLGGLPSFDY	25	HRGGTASFDY	38	NYGGAASFDY		
13	HLGGMASFDY	26	HVGGTASFD Y	39	NYGGTASFDY		

【 0 1 6 8 】

【表 8】

表 8

親和性を改善するプロセスから選択された変異体のCDRL3配列

1	QQLYSTPWT	41	QQLAYEPW T	81	QQMAFVPWT	121	QQMV RTPW T
2	DQLYGTPW T	42	QQLAYSPWT	82	QQMAFY PWT	122	QQMVRVPW T
3	DQMYSTPW T	43	QQLAYTPW T	83	QQMAGFPWT	123	QQMVSIPWT
4	HQLAFTPWT	44	QQLAYVPW T	84	QQMASVPWT	124	QQMYGTPW T
5	LQHNEFPWT	45	QQLGFAPW T	85	QQMAYGPWT	125	QQMYKTPW T
6	QDMSRTPWT	46	QQLGFIPWT	86	QQMAYSPWT	126	QQMYRTPW T
7	QELSTTPWT	47	QQLGFSPWT	87	QQMAYTPWT	127	QQNAFEPWT
8	QEMMRTPW T	48	QQLGFVPW T	88	QQMDFTPWT	128	QQNAFGPW T
9	QNLAYSPWT	49	QQLGYAPW T	89	QQMEHTPWT	129	QQNAFIPWT
10	QNMYGTPW T	50	QQLGYSPWT	90	QQMFAIPWT	130	QQNAFSPWT
11	QQA AFSPWT	51	QQLHSTPWT	91	QQMFGSPWT	131	QQNAFTPWT
12	QQAAYSPWT	52	QQLKNTPW T	92	QQMFRTPWT	132	QQNAFVPWT
13	QQAAYVPW T	53	QQLMRKPW T	93	QQMFSTPWT	133	QQNAYAPW T
14	QQCTSDPW T	54	QQLRAS PWT	94	QQMFSVPWT	134	QQNAYGPW T

10

20

30

【表 9】

15	QQHDVGPWT	55	QQLRNLPWT	95	QQMGFSPWT	135	QQNAYNPWT
16	QQIAFGPWT	56	QQLRNSPWT	96	QQMGYAPWT	136	QQNAYSPWT
17	QQIAFNPWT	57	QQLRNPWT	97	QQMGYSPWT	137	QQNFIAPWT
18	QQIAFSPWT	58	QQLRSAPWT	98	QQMHIFPWT	138	QQNMIVPWT
19	QQIAFTPWT	59	QQLRSSPWT	99	QQMMAVPWT	139	QQNRISPWT
20	QQIAFVPWT	60	QQLRSVPWT	100	QQMMKSPWT	140	QQNRIWPWT
21	QQIAKTPWT	61	QQLRVIPWT	101	QQMMRTPWT	141	QQNRVIPWT
22	QQIAYSPWT	62	QQLSFTPWT	102	QQMMRVPWT	142	QQNRVVPWT
23	QQIAYTPWT	63	QQLSFVPWT	103	QQMRKIPWT	143	QQNSYSPWT
24	QQIAYVPWT	64	QQLSKTPWT	104	QQMRNPWT	144	QQNVIVPWT
25	QQIFSVPWT	65	QQLSRAPWT	105	QQMRRVPWT	145	QQNVNVPWT
26	QQIGFSPWT	66	QQLSRSPWT	106	QQMRSTPWT	146	QQNYKLPWT
27	QQIGWTPWT	67	QQLSVTPWT	107	QQMSFSPWT	147	QQSAFVPWT
28	QQIMTLPTWT	68	QQLSYAPWT	108	QQMSHSPWT	148	QQSAYAPWT
29	QQIREIPWT	69	QQLSYSPWT	109	QQMSKIPWT	149	QQSAYIPWT
30	QQISFMPWT	70	QQLVRIPWT	110	QQMSRVPWT	150	QQSEACPWT
31	QQISFSPWT	71	QQLVRNPWT	111	QQMSYAPWT	151	QQSFNTPWT
32	QQIYITPWT	72	QQLV RTPWT	112	QQMSYGPWT	152	QQSKTVPWT
33	QQKAYAPWT	73	QQLVRVPWT	113	QQMSYIPWT	153	QQTAFGPWT
34	QQKKGIPWT	74	QQLYSSPWT	114	QQMSYSPWT	154	QQTAFSPWT
35	QQKMGNPWT	75	QQMAFAPWT	115	QQMSYTPWT	155	QQTAYAPWT
36	QQKSVAPWT	76	QQMAFGPWT	116	QQMSYVPWT	156	QQTAYSPWT
37	QQLAFAPWT	77	QQMAFIPWT	117	QQMTRVPWT	157	QQTR RTPWT
38	QQLAFMPWT	78	QQMAFNPWT	118	QQMV IIPWT	158	QQTSFAPWT
39	QQLAFSPWT	79	QQMAFSPWT	119	QQMVREPWT	159	QQVAYSPWT
40	QQLAFVPWT	80	QQMAFTPWT	120	QQMVRSPWT	160	QQVFAIPWT

【0169】

選択されたクローンのうち改善された K o f f を有するクローンを選択するために、該クローンを、B i a c o r e 3000 (GE Healthcare) により分析した。H E R 2 - E C D - H i s タンパク質を、E C D / N H S を用いてアミンカップリング法により C M 5 センサーチップに固定化した。I P T G を用いて各クローンから抗体を発現させた後、そこからペリプラズム抽出物を得て、H E R 2 - E C D - H i s に結合させた。各抗体についての K o f f 値を、B I A 評価ソフトウェアによって分析した。以上のことから、改善された K o f f 値を有する抗体が選択された（参照：表 9 a）。表 9 a は、本発明者らによって開発されたクローンのうち、h z 1 E 1 1 親抗体と比較して同様または改善された K o f f 値を示すクローンの代表的な例を示している。

【0170】

【表 10】

表 9 a

クローン	h z 1 E 1 1		変異 導入 鎖	k o f f	減少度 (倍)
	L C D R 3	H C D R 3			
hz1E11	QQLYSTPWT	HLGGTASFDY	—	1.13E-03	1.0
M3-L-A1-3-1A12 (hz1E11-133)	QQNAYAPWT	HLGGTASFDY	L	3.72E-05	30.4
M3-L-A1-3-1F11 (hz1E11-154)	QQTAFSPWT	HLGGTASFDY	L	1.17E-04	9.7
M1-L-A1-3-1C3	DQMYSTPWT	HLGGTASFDY	L	1.52E-04	7.4
M3-H-A1-2-1B12	QQLYSTPWT	NYGGTASFDY	H	2.12E-04	5.3
M1-H-A1-2-1B5	QQLYSTPWT	HFGGTASFDY	H	4.53E-04	2.5
M3-H-A1-1-1C11	QQLYSTPWT	SWG GTASFDY	H	5.67E-04	2.0
M3-H-A1-1-1A10	QQLYSTPWT	SYGGTASFDY	H	1.16E-03	1.0
M3-LH-A1-1-1H1	QQNFIAPWT	NYGGTASFDY	LH	1.66E-03	0.7
M3-LH-A3-3-2B1	QQLVRNPWT	NFGGTASFDY	LH	1.65E-04	6.5
M3-L-A3-4-2E8	QQIAYVPWT	HLGGTASFDY	L	1.80E-04	5.9
M1-LH-A3-3-1A6	QQLVRTPWT	NYGGTASFDY	LH	1.84E-04	5.8
M3-H-A3-3-2A7	QQLSYSTPWT	NFGGTASFDY	H	2.26E-04	4.7
M3-LH-A3-3-2F1	QQNAYNPWT	HLGGTASFDY	L	2.45E-04	4.4
M3-LH-A3-3-2A5	QQMFSTPWT	HWGGTASFDY	LH	2.98E-04	3.6
M3-H-A3-3-2D8	QQLYSTPWT	HWGGTASFDY	H	3.30E-04	3.2
M3-LH-A1-2-2F4	QQLVRIPWT	NLGGTASFDY	LH	3.31E-04	3.2
M3-L-A1-3-2C2	QQLGFIPWT	HLGGTASFDY	L	5.26E-04	2.0
M3-H-A3-1-2F3	QQLYSTPWT	NLGGTASFDY	H	7.70E-04	1.4
M3-H-A2-1-1F2	QQLYSTPWT	SNGGTASFDY	H	1.27E-03	0.8

【0171】

表 9 a に見られる通り、本発明の一般式 1 で示される種々の C D R H 3 および一般式 2 で示される C D R L 3 は、親抗体 h z 1 E 1 1 の C D R H 3 および C D R L 3 と比較して同様のまたは改善された K o f f 値を示す。

【0172】

軽鎖の無作為化 C D R 3 配列のうち、実験は、h z 1 E 1 1 - 3、h z 1 E 1 1 - 1 3 3 および h z 1 E 1 1 - 1 5 4 を用いて行った。

【0173】

h z 1 E 1 1 - 3、h z 1 E 1 1 - 1 3 3 および h z 1 E 1 1 - 1 5 4 の重鎖可変領域は、h z 1 E 1 1 のものと同じであり、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 2 4 7、2 4 9 および 2 5 1 にそれぞれ記載されている。

【0174】

選択された 3 種類の抗体の親和性の増加を確認するために、抗体は、I g G の形態で製造された。2 0 0 0 R U の濃度のヤギ抗ヒト I g G (Invitrogen, #H10500) を、E C D / N H S 法によって C M 5 センサーチップに固定化した。次いで、抗体を 5 0 μ L / 分の速度で 5 分間結合させて、そして緩衝液を安定化の目的のために 5 分間、その上に流した。抗体の結合のために用いた抗体の濃度は、トラストズマブ (T R A) について 0. 4 μ g / m L、ペルツズマブ (P E R) について 0. 8 μ g / m L、ならびに h z 1 E 1 1 および選択された抗体について 1 μ g / m L であった。抗体を安定化した後、6 4 0 n M、3 2 0 n M、1 6 0 n M、8 0 n M、4 0 n M、2 0 n M、および 0 n M の濃度の H E

R 2－E C D－H i s タンパク質を、50 μ L／分の速度で4分間結合させて、その上に緩衝液を15分間流し、分離させた。各濃度を分析した後、それらは、10 mMのグリシン（pH 1.5）を用いてリサイクルされ、後続のアッセイを行った。抗体の親和性は、B I A 評価ソフトウェアにより分析した。分析結果を表9 bにまとめる。

【0175】

【表11】

表9 b

抗体	Ka(1/Ms)	kd (1/s)	Rmax	KD(M)
hz1E11	3.60E+04	8.30E－04	61	2.30E－08
hz1E11－3	3.80E+04	2.00E－04	64	5.20E－09
hz1E11－133	6.40E+04	9.90E－05	68	1.50E－09
hz1E11－154	8.60E+04	9.90E－05	65	1.10E－09
TRA	4.90E+04	1.50E－04	43	3.00E－09
PER	3.80E+04	1.20E－04	56	3.30E－09

10

【0176】

上記の表9 bにおいて、k a、k d、R m a xおよびK Dはそれぞれ、会合速度定数、解離速度定数、最大結合容量、平衡解離定数を示す。

【0177】

20

表9 bに見られる通り、h z 1 E 1 1－1 3 3およびh z 1 E 1 1－1 5 4は、h z 1 E 1 1のK o f f値と比較して、K o f f値、すなわち、k d値の8.4倍の減少を示すが、それらは、k o n値、すなわち、k a値のわずかな増加を示した。最終的な親和性に関して、h z 1 E 1 1－1 3 3は1.5 nMを示し、h z 1 E 1 1－1 5 4は、1.1 nMを示し、h z 1 E 1 1のそれと比較して、15倍の改善および20倍の改善となった結果が明らかとなった。

【0178】

実施例15：改善された親和性を有する抗体の抗癌効果の確認

改善された親和性を有する抗体の抗癌効果を、H E R 2を過剰発現する胃癌および乳癌に関して確認した。H E R 2を過剰発現する胃癌細胞株N C I－N 8 7およびO E－1 9、H E R 2を過剰発現する乳癌細胞株B T－4 7 4を、各抗体単独で処理したか、またはトラスツズマブとの組み合わせで処理したときの、濃度に依存した癌細胞の生存率を分析した。

30

【0179】

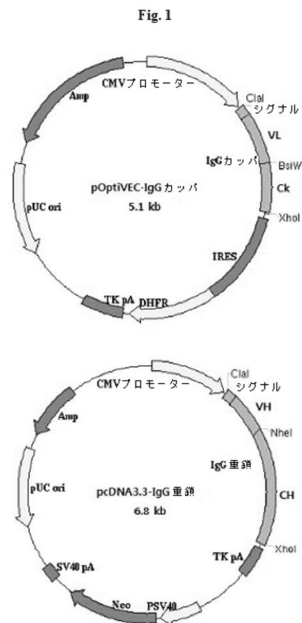
図11 Aから11 Fに見られる通り、改善された親和性を有するh z 1 E 1 1－3、h z 1 E 1 1－1 3 3、およびh z 1 E 1 1－1 5 4抗体は、h z 1 E 1 1の効果と比較して、単独処理および併用処理において改善された効果を示した。

【0180】

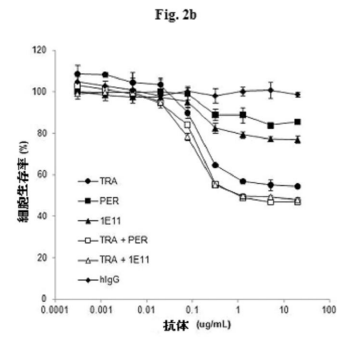
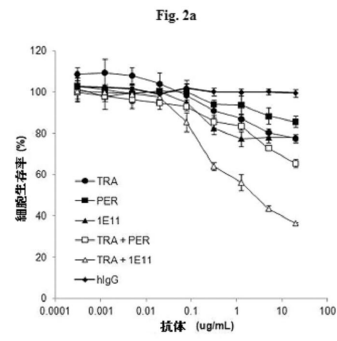
本発明の好ましい態様が記載されているが、本発明の精神の範囲内にあるその変異体および改変は当業者に明らかとなり得ることが理解されるべきであり、そして本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲およびその等価物によって決定されるべきである。

40

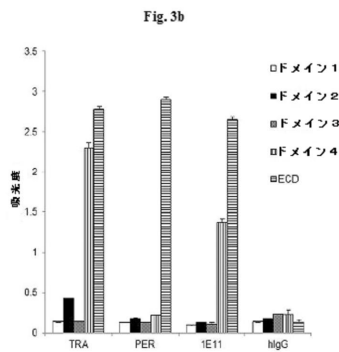
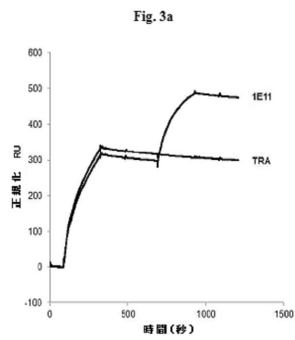
【図 1】



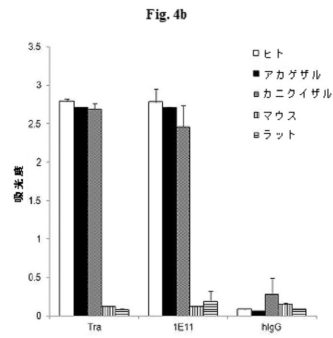
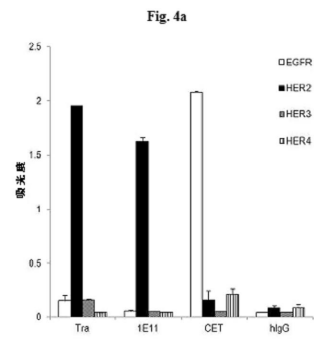
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【図 5 - 1】

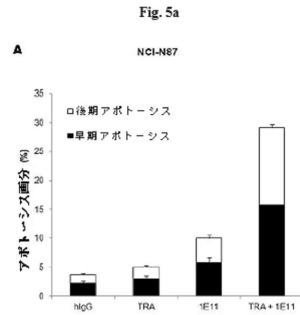
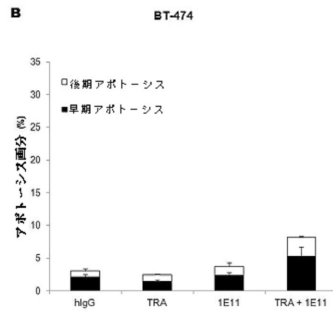


Fig. 5b



【図 5 - 2】

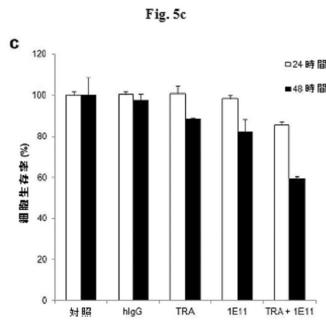
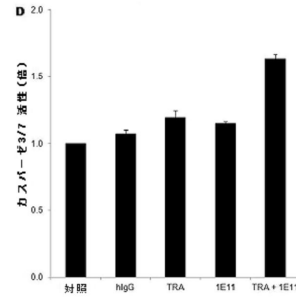
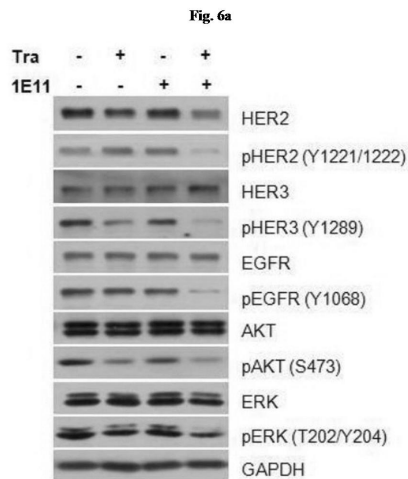


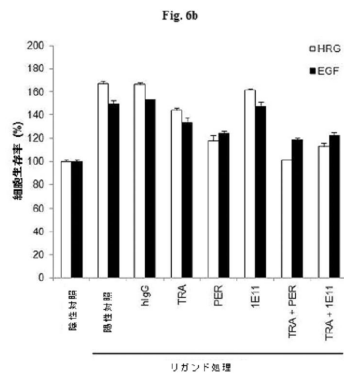
Fig. 5d



【図 6 a】



【図 6 b】



【図 7 - 1】

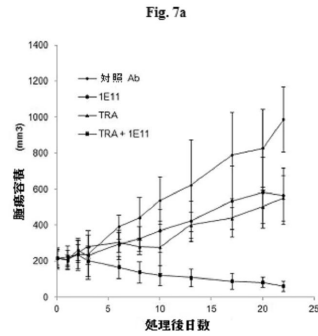
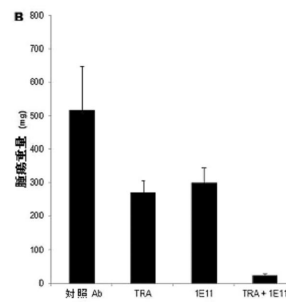
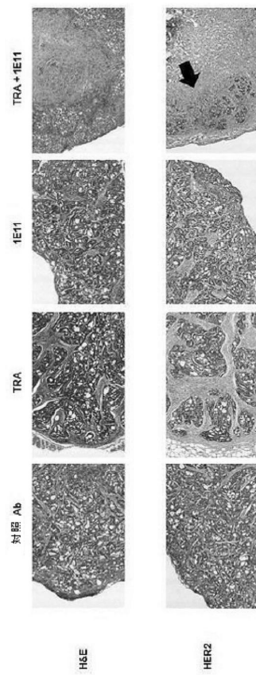


Fig. 7b



【図 7-2】

Fig. 7c



【図 8】

Fig. 8a

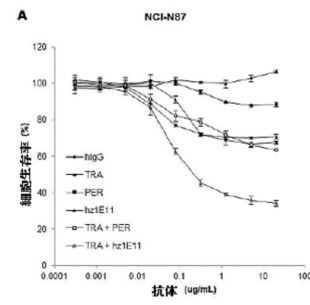
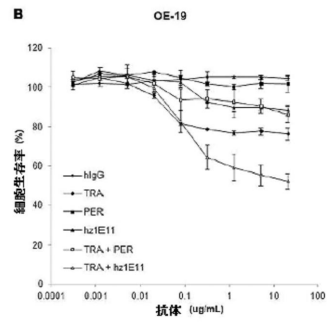
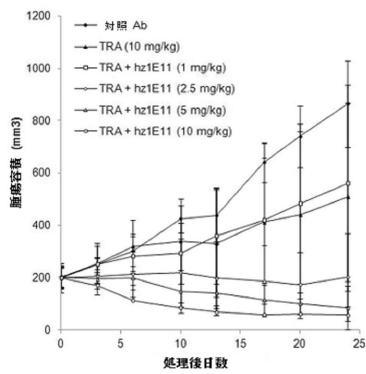


Fig. 8b



【図 9】

Fig. 9



【図 10】

Fig. 10a

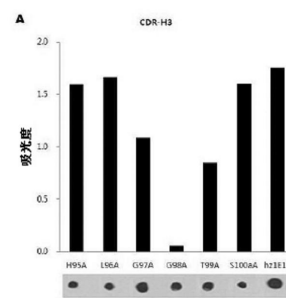
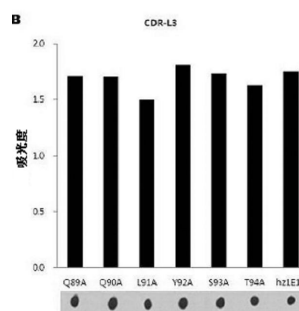


Fig. 10b



【図 11-1】

Fig. 11a

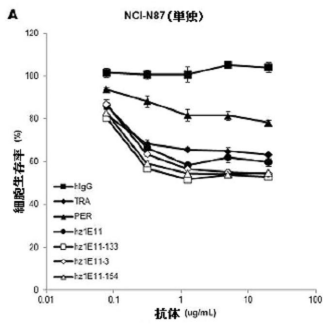
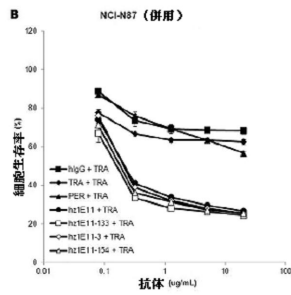


Fig. 11b



【図 11-2】

Fig. 11c

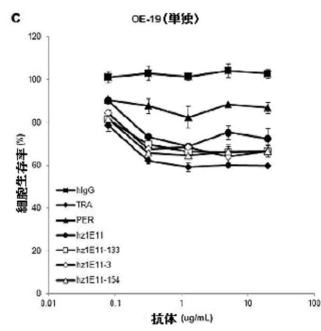
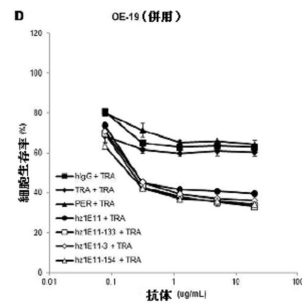


Fig. 11d



【図 11-3】

Fig. 11e

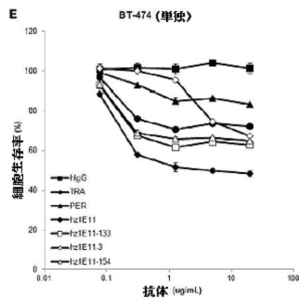
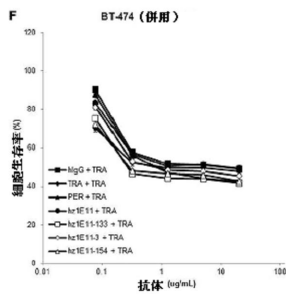


Fig. 11f



【配列表】

0006234548000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 P	5/46	(2006.01)	A 6 1 P	5/46	
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
			G 0 1 N	33/574	A
			G 0 1 N	33/577	B

- (72)発明者 イ・ジョンソ
大韓民国137-877ソウル、ソチョグ、ソチョジュンアンロ8ギル38-23番
- (72)発明者 キム・キュテ
大韓民国152-880ソウル、クログ、デジタルロ32ガギル96番
- (72)発明者 イ・ヨンハ
大韓民国133-735ソウル、ソンドング、マジャンロ39ギル43番、シンソン・ミソジウム・アパート102-701番
- (72)発明者 イ・スギョン
大韓民国120-788ソウル、ソデムング、トンギルロ34ギル43番、ホンジェウォン・ヒョнде・アパート105-701
- (72)発明者 ファン・インシク
大韓民国407-802インチョン、ケヤング、ジュプトロ528番、サンボ・アパート2-304
- (72)発明者 コ・ボングク
大韓民国151-876ソウル、クワナクク、チョウォンロ66番、301ホ

審査官 小倉 梢

- (56)参考文献 BMC Cancer, 2012年, Vol. 12:450, p. 1-16
Hybridoma, 2011年, Vol. 30, No. 4, p. 347-353
Cancer Res., 2009年, Vol. 69, p. 9330-9336

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
U n i P r o t / G e n e S e q
W P I D S / W P I X (S T N)