

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6243345号
(P6243345)

(45) 発行日 平成29年12月6日 (2017. 12. 6)

(24) 登録日 平成29年11月17日 (2017. 11. 17)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 Z N A D

A 6 1 P 13/08 (2006. 01)

A 6 1 P 13/08

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 31/517 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 31/4709 (2006. 01)

A 6 1 K 31/517

請求項の数 8 (全 135 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-545417 (P2014-545417)
 (86) (22) 出願日 平成24年12月4日 (2012. 12. 4)
 (65) 公表番号 特表2015-500828 (P2015-500828A)
 (43) 公表日 平成27年1月8日 (2015. 1. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2012/056949
 (87) 国際公開番号 WO2013/084147
 (87) 国際公開日 平成25年6月13日 (2013. 6. 13)
 審査請求日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/566, 890
 (32) 優先日 平成23年12月5日 (2011. 12. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 35
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 ヴィンフリート・エリス
 ドイツ82152プラネック、レーナーク
 リストーシュトラッセ48番、モルフオン
 ス・アクチェングゼルシャフト

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮細胞増殖因子受容体3 (HER3) に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

HER3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを含む良性前立腺肥大を処置するための医薬組成物であって、

該抗体またはそのフラグメントがHER3 受容体のドメイン2 およびドメイン4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、該抗体またはそのフラグメントは、

(a) 配列番号38の重鎖可変領域CDR1；配列番号39の重鎖可変領域CDR2；配列番号40の重鎖可変領域CDR3；配列番号41の軽鎖可変領域CDR1；配列番号42の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号43の軽鎖可変領域CDR3；

(b) 配列番号44の重鎖可変領域CDR1；配列番号45の重鎖可変領域CDR2；配列番号46の重鎖可変領域CDR3；配列番号47の軽鎖可変領域CDR1；配列番号48の軽鎖可変領域CDR2；および配列番号49の軽鎖可変領域CDR3；または

(c) 配列番号141を有する可変重鎖(VH) 配列および配列番号140を有する可変軽鎖(VL) 配列を含む、医薬組成物。

【請求項2】

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤をさらに含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

さらに他の治療剤を含む、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

他の治療剤が H E R 1 阻害剤、H E R 2 阻害剤、H E R 3 阻害剤、H E R 4 阻害剤、m T O R 阻害剤および P I 3 キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、セツキシマブ、パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標)/トシル酸ラパチニブ、エルロチニブ H C 1 (OSI-774)、PKI-166および N - [4 - [(3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル)アミノ] - 7 - [(3 " S ") - テトラヒドロ - 3 - フラニル]オキシ] - 6 - キナゾリニル] - 4 (ジメチルアミノ) - 2 - プテンアミドから成る群から選択される H E R 1 阻害剤；ペルツズマブ、トラスツマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ/タイケルブ(登録商標)からなる群から選択される H E R 2 阻害剤；MM-121、MM-111、IB4C3、2D1D12(U3 Pharma AG)、AMG888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)および H E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択される H E R 3 阻害剤；および H E R 4 阻害剤である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

他の治療剤がテムシロリムス、リダフォロリムス/デフォロリムス、AP23573、MK8669 およびエベロリムスから成る群から選択される m T O R 阻害剤である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

他の治療剤が GDC 0941、BEZ235、BMK120 および BYL719 から成る群から選択される P I 3 キナーゼ阻害剤である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】****関連出願**

本出願は、2011年12月5日出願の米国仮出願番号 61/566,890 に対する優先権を主張し、その内容を引用により本明細書に包含させる。

【0002】**発明の分野**

本発明は、一般的に、H E R ファミリーの受容体、例えば、H E R 3 受容体と相互作用する抗体またはそのフラグメントに関する。特に、それは、ドメイン 2 および 4 の両者由来の残基を含む H E R 3 受容体の立体構造エピトープを認識し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも阻害し、かつリガンド結合(例えば、ニューレグリン)を可能にしながら、シグナル伝達のリガンド誘発活性化を防止する抗体またはそのフラグメントに関する。これらの抗体またはフラグメントは、H E R 3 発現レベル上昇により特徴付けられる多くの疾患または障害(例えば、食道癌)の処置に使用できる。これらの抗体またはフラグメントは、組織重量(例えば、前立腺または子宮重量)を減少させるまたは組織萎縮(例えば、男性乳房萎縮)を誘発する抗体またはフラグメントの能力により特徴付けられる多くの疾患または障害の処置のために使用できる。

【背景技術】**【0003】**

ヒト上皮細胞増殖因子受容体 3 (E r b B 3、H E R 3 としても知られる) は、受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、受容体タンパク質チロシンキナーゼ群の上皮細胞増殖因子受容体 (E G F R) サブファミリーに属し、E G F R (H E R 1、E r b B 1)、H E R 2 (E r b B 2、N e u) および H E R 4 (E r b B 4) もまた誘発する (Plowman et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:4905-4909; Kraus et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:9193-9197; および Kraus et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2900-2904)。プロトタイプ上皮細胞増殖因子受容体と同様、膜貫通型受容体 H E R 3 は、細胞外リガンド結合ドメイン (E C D)、E C D 内に二量体化ドメイン、膜貫通型ドメイン、細胞内タンパク質チロシンキナーゼ様ドメイン (T K D) および C 末端リン酸化ドメインから成る。他の H E R ファミリーメンバーと異なり、H E R 3 のキナーゼドメインは極めて低い内因性キナーゼ活性を示す。

10

【 0 0 0 4 】

リガンドニューレグリン (N R G) 1 またはニューレグリン 2 は、H E R 3 の細胞外ドメインと結合し、他の二量体化パートナー、例えば H E R 2 との二量体化を促進することにより受容体仲介シグナル伝達経路を活性化。ヘテロ二量体化は H E R 3 の細胞内ドメインの活性化およびトランスリン酸化を誘発し、シグナル多様化だけでなく、またシグナル増幅のための手段である。さらに、H E R 3 ヘテロ二量体化はまた活性化リガンド非存在下でも起こることができ、これは、通常リガンド非依存性 H E R 3 活性化と呼ばれる。例えば、H E R 2 が、遺伝子増幅の結果として高レベルで発現されたとき (例えば乳癌、肺癌、卵巣癌または胃癌において)、自発性 H E R 2 / H E R 3 二量体が形成され得る。この状況において、H E R 2 / H E R 3 は最も活性な E r b B シグナル伝達二量体であり、それゆえに、高度にトランスフォーミングであると考えられる。

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

H E R 3 増加は数タイプの癌、例えば乳癌、肺癌、消化器癌および膀胱癌で発見されている。興味深いことに、H E R 2 / H E R 3 発現と非浸潤段階から浸潤段階への進行の相関が示されている (Alimandi et al., (1995) Oncogene 10:1813-1821; DeFazio et al., (2000) Cancer 87:487-498; Naidu et al., (1988) Br. J. Cancer 78:1385-1390)。従って、H E R 3 仲介シグナル伝達を妨害する薬物が必要である。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

発明の要約

本発明は、H E R 3 のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む、H E R 3 受容体の立体構造エピトープに結合する抗原結合タンパク質 (例えば、抗体またはそのフラグメント) の発見に基づく。抗体またはそのフラグメントとドメイン 2 およびドメイン 4 のこの結合は H E R 3 受容体を、H E R 3 活性化が阻害されるように不活性または閉鎖立体配座で安定化させる。驚くべきことに、抗体またはそのフラグメントとのこの立体構造エピトープの結合は、リガンド依存性 (例えばニューレグリン) およびリガンド非依存性 H E R 3 シグナル伝達経路のいずれも阻害する。さらに、リガンド誘発シグナル伝達の抗体仲介阻害が、おそらく H E R 3 が活性化に必要な立体構造再配列に付されることができないためにリガンド結合を遮断することなく起こる (すなわち、リガンドおよび抗体のいずれも H E R 3 と結合できる)。また開示されているのは、H E R 3 の発現増加により特徴付けられる多くの疾患または障害および組織重量 (例えば、前立腺または子宮重量) を減少させるまたは組織萎縮 (例えば、男性乳房萎縮) を誘発する抗体またはフラグメントの能力により特徴付けられる多くの疾患または障害の処置のための本抗体またはそのフラグメントの使用方法である。

40

【 0 0 0 7 】

従って、一つの面において、本発明は、食道で H E R 3 発現が上昇している患者を選択し; H E R 3 受容体と特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを、該抗体またはそ

50

のフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより該障害を処置するように投与することを含む、食道におけるHER3発現レベル増加により特徴付けられる障害の処置方法に関する。一つの態様において、障害は食道癌およびバレット食道癌から成る群から選択される。

【0008】

他の面において、本発明は、胃癌を有する患者を選択し；抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断するようにHER3受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを、それにより胃癌を処置するように投与することを含む、胃癌の処置方法に関する。

10

【0009】

他の面において、本発明は、頭頸部癌を有する患者を選択し；抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断するようにHER3受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを、それにより頭頸部癌を処置するように投与することを含む、頭頸部癌の処置方法に関する。

【0010】

他の面において、本発明は、良性前立腺肥大を有する患者を選択し；抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断するようにHER3受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを、それにより良性前立腺肥大を処置するように投与することを含む、良性前立腺肥大の処置方法に関する。

20

【0011】

さらに別の面において、本発明は、女性化乳房を有する患者を選択し；抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断するようにHER3受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを、それにより女性化乳房を処置するように投与することを含む、女性化乳房の処置方法に関する。

30

【0012】

さらに別の面において、本発明は、子宮内膜症を有する患者を選択し；抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断するようにHER3受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを、それにより子宮内膜症を処置するように投与することを含む、子宮内膜症の処置方法に関する。

【0013】

一つの態様において、抗体またはそのフラグメントは経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与する。一つの態様において、抗体またはそのフラグメントは、生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤する。他の態様において、医薬組成物は他の治療剤を含む。一つの態様において、他の治療剤はHER1阻害剤、HER2阻害剤、HER3阻害剤、HER4阻害剤、mTOR阻害剤およびPI3キナーゼ阻害剤から成る群から選択される。一つの態様において、他の治療剤は、マツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標)/セツキシマブ、ベクティビックス(登録商標)/パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標)/ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標)/トシル酸ラパチニブ、タル

40

50

セバ(登録商標)/エルロチニブH C 1 (OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択されるH E R 1 阻害剤; ペルツズマブ、トラスツマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ/タイケルブ(登録商標)から選択されるH E R 2 阻害剤; MM-121、MM-111、IB4C3、2DID12(U3 Pharma AG)、AMG888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)およびH E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択されるH E R 3 阻害剤; およびH E R 4 阻害剤である。一つの態様において、他の治療剤はテムシロリムス/トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス/デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス/アフィニトール(登録商標)から成る群から選択されるm T O R 阻害剤である。一つの態様において、他の治療剤はGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択されるP I 3 キナーゼ阻害剤である。

10

【 0 0 1 4 】

他の面において、本発明は、食道障害または胃癌または頭頸部癌または良性前立腺肥大(B P H)または女性化乳房または子宮内膜症の処置用医薬の製造のための、抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合してリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断するようにH E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

20

【図1】ヒト、マウス、ラットおよびカニクイザルH E R 3 で得た代表的MOR10701 S E T 曲線。

【図2】F A C S タイトレーションにより決定したSK-Br-3細胞結合。

【図3】H E R 3 ドメイン結合E L I S A。

【図4】水素重水素交換エピトープマッピング。A) H D X - M S 分析に回収したHER3 ECDペプチドを点線で示す。潜在的N結合グリコシル化部位を強調する。B) M S により同定したペプチドで見られる重水素化の相対比。C) 公開されたH E R 3 結晶構造上に位置づけした保護残基。

【図5】A) H E R 3 / MOR09823およびH E R 3 / MOR09825 x 線結晶構造の表面表現。H E R 3 (明るい灰色)は閉鎖立体配座内にあり、MOR09823またはMOR09825(最も濃い灰色)はドメイン2および4の両者に結合する。B) (A)と類似の方向に示すH E R 3 / MOR09823構造からのH E R 3 の表面図。MOR09823は明瞭にするために除いた。C) パネル(A)、(B)および(D)から90°回転で見たリボン構造として記載するH E R 3 / MOR09823構造。D) ドメイン2/ドメイン4界面の近景を伴うMOR09823 Fabにより認識される不活性H E R 3 配座のリボン表示、F a b の5 以内のH E R 3 残基を強調。E) E L I S A タイトレーションによる変異体H E R 3 / MOR10703結合決定。

30

【図6】リガンド誘発(A)またはリガンド非依存性(B)H E R 3 リン酸化の阻害。

【図7】H E R 2 増幅細胞株におけるH E R 3 依存性下流シグナル伝達経路阻害。

【図8】A)BT-474およびB)ニューレグリン刺激MCF7細胞における細胞増殖に対するH E R 3 阻害の影響。

40

【図9】MCF7細胞へのニューレグリン結合によるMOR09823およびMOR09825の効果。

【図10】BiacoreTMで評価してH E R 3 / ニューレグリン複合体形成に対するMOR09823結合の影響。抗体無し(黒色棒)、MOR09823(白色棒)、105.5(灰色)および対照I g G(斜線棒)。

【図11】インピボでの(A)リガンド非依存性(BT-474)および(B)リガンド依存性(BxPC3)H E R 3 シグナル伝達のMOR09823仲介阻害。

【図12】BT-474腫瘍増殖に対するMOR10701およびMOR10703の影響。

【図13】BxPC3腫瘍増殖に対するMOR10701およびMOR10703の影響。

【図14】MOR10703インピトロ薬物組み合わせアイソボログラム(A)MOR09823/トラスツマブ、(B)MOR09823/ラパチニブ、(C)MOR10703/BEZ235、(D)MOR10703/BKM120、(E)

50

MOR10703 / BYL719、(F) MOR10703 / RAD001、(G) MOR10703 / セツキシマブおよび(H) MOR10703 / エルロチニブ。

【図 1 5】BT-474およびL3.3におけるMOR10701またはMOR10703と(A)トラスツマブおよび(B)エルロチニブとのインビボでの組み合わせ。

【図 1 6】食道細胞におけるMOR10703単独またはMOR10703と(A)セツキシマブおよび(B)BYL719とのインビトロでの組み合わせ。

【図 1 7】KYSE140およびKYSE180食道腫瘍モデルにおけるMOR10703単独またはMOR10703と(A)セツキシマブおよび(B)BYL719とのインビボでの組み合わせ。

【図 1 8】CHE007食道腫瘍モデルにおけるMOR10703単独またはMOR10703と(A)セツキシマブおよび(B)BYL719のインビボでの組み合わせおよび(C)CHES015食道腫瘍モデルにおけるMOR10703単独またはMOR10703とセツキシマブとのインビボでの組み合わせ。

【図 1 9】N87胃腫瘍モデルにおけるMOR10703単独またはMOR10703とBYL719とのインビボは長期腫瘍緩解を示す。

【図 2 0】A253 SCCHNモデルにおけるMOR10703単独またはMOR10703とセツキシマブとのインビボ組み合わせ。MOR10703またはセツキシマブいずれかの単剤での処置は腫瘍静止をもたらした。MOR10703とセツキシマブの組み合わせは腫瘍緩解をもたらした。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 6 】

発明の詳細な記載

定義

本発明をより容易に理解するために、いくつかの用語をまず定義する。更なる定義は詳細な説明中で随時示す。

【 0 0 1 7 】

ここで使用する用語“シグナル伝達”または“シグナル伝達活性”は、一般的にタンパク質-タンパク質相互作用、例えば増殖因子の受容体への結合により開始され、細胞の一つの部位から細胞の他の部位へのシグナルの伝達をもたらす生化学的因果関係を意味する。HER3では、伝達は、シグナル伝達を起こす一連の反応における1個以上のタンパク質上の1個以上のチロシン残基、セリン残基またはスレオニン残基の特異的リン酸化を含む。最後から2番目の過程は、典型的に核事象を含み、遺伝子発現を変化させる。

【 0 0 1 8 】

“HER受容体”は、HER受容体ファミリーに属する受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、EGFR、HER2、HER3およびHER4受容体ならびに将来同定されるであろうこのファミリーの他のメンバーを含む。HER受容体は、一般的にHERリガンドを結合し得る細胞外ドメイン；親油性膜貫通型ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびリン酸化できる数個のチロシン残基を担持するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含む。好ましくは、HER受容体は天然配列ヒトHER受容体である。

【 0 0 1 9 】

用語“HER1”、“erbB1”、“上皮細胞増殖因子受容体”および“EGFR”はここでは互換的に使用し、その天然に存在する変異体形態(例えばHumphrey et al., (1990) PNAS (USA) 87:4207-4211における欠失変異体EGFR)を含む、例えば、Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987)に開示されている、EGFRを意味する。erbB1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子を意味する。

【 0 0 2 0 】

用語“HER2”および“erbB2”はここでは互換的に使用し、例えば、Semba et al., (1985) PNAS (USA) 82:6497-6501およびYamamoto et al. (1986) Nature 319:230-234 (Genebank accession number X03363)に記載されたヒトHER2タンパク質を意味する。用語“erbB2”はヒトerbB2をコードする遺伝子を言い、“neu”はラットp185^{neu}をコードする遺伝子を意味する。

【 0 0 2 1 】

用語“HER4”および“ErBB4”は、ここでは、例えば、1999年4月22公開のWO99/19488に開示されているそのアイソフォーム類を含む、例えば、欧州特許出願番号599,274; Plowman et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750;およびPlowman et al., (1993) Nature, 366:473-475に開示された受容体ポリペチドを意味する。

【0022】

用語“HER3”または“HER3受容体”は“ErBB3”としても知られ、ここでは哺乳動物HER3タンパク質を言い、“her3”または“erBB3”は哺乳動物her3遺伝子を意味する。好ましいHER3タンパク質は、細胞の細胞膜に存在するヒトHER3タンパク質である。ヒトher3遺伝子は米国特許番号5,480,968およびPlowman et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4905-4909に記載されている。

10

【0023】

ヒトHER3はAccession No. NP_001973(ヒト)で規定され、下に配列番号1として示す。全ての命名法は完全長、未成熟HER3(アミノ酸1~1342)である。未成熟HER3は19位と20位の間で開裂し、成熟HER3タンパク質(20~1342アミノ酸)となる。

```

mrandalqvl gllfslargs evgnsqavcp gtInglsvtg daenqyqtly klyercevwm
gnleivltgh nadlsflqwi revtgyvlva mnefstlplp nlrvvrgtqv ydgkfaifvm
lnyntnssha lrqlrltqlt eilsggvvie knklchmdt idwrdivrdr daeivvkdng
rscppchevc kgrcwpggse dcqtltktic apqcnghcfg pnpnqcchde caggcsgpqd
tdcfacrhn dsgacvprcp qplvynkltf qlenphtky qyggvcvasc phnfvdqts
cvracppdkm evdknglkmc epcggclcpka cegtsgsrf qtvdsnidg fvnctkilgn
ldflitgng dpwhkipald peklnvfrtv reitgylniq swpphmnfs vfsnlittigg
rslynrgfsl limknlvts lgfrslkeis agriyisanr qlcyhslnw tkvlrgptee
rldikhnrpr rdcvaegkvc dplcssggcw gpgpgqlsc rnysrggvcv thcnflngep
refaheaecf schpecqme gtatcngsgs dtcaqcahfr dgphcvsscp hgvlgakgpi
ykypdvqec rpchenctqg ckqpelqdcl gqtlvligkt hltmaltvia glvvifmmlg
gtflywrgrr iqnkramrry lergesiepl dpsekankvl arifketelr klkvlsgsvf
gtvhkgvwip egesikipvc ikviedksgr qsfqavtdhm laigslhdah ivrllglcpg
sslqlvtqyl plgsldhvr qhrgalgpql llnwgvqiak gmyyleehgm vhrnlaarnv
llkpsqvqv adfgvadllp pddkqllyse aktvikmal esihfgkyth qsdvwsygv
vwelmtfgae pyaglr laev pdllekgerl aqpqictidv ymvmvkcwmi denirptfke
laneftmar dpprylvikr esgpgiapgp ephgltnkkl eevelepeld ldlldaeed
nlatttlgsa lslpvgtlr prgsqslsp ssgympmnqg nlgescquesa vsgssercpr
pvsllhpmprg clasessegh vtgseaelqe kvsmcrsr srsprrgds ayhsqrhsl
tpvtplspg leedvngyv mpdthlkgtp ssregtlssv glssvlgte ededeeyeym
nrrrrhspph pprpssleel gyeymdvgsd lsaslgstqs cplhpvpimp tagttdedy
eymnrqrdgg gpggdyaamg acpaseqgye emrafqgpg qaphvhyarl ktlrsleatd
safndpdywh srlfpkanaq rt (配列番号1)

```

20

30

40

【0024】

ここで使用する用語“HERリガンド”は、HER受容体、例えばHER1、HER2、HER3およびHER4と結合し、活性化するポリペチドを意味する。HERリガンドの例は、ニューレグリン(NRG)1、ニューレグリン2、ニューレグリン3、ニューレグリン4、ベータセルリン、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子、エピレギュリン、上皮細胞増殖因子、アンフィレギュリンおよびトランスフォーミング増殖因子アルファを含むが、これらに限定されない。本用語は、天然に存在するポリペチドの生物学的活性フラグメントおよび/または変異体を含む。

【0025】

ここで使用する用語“HER3リガンド”は、HER3と結合し、活性化するポリペチ

50

ドを意味する。HER3リガンドの例は、ニューレグリン(NRG)1およびニューレグリン2、ベータセルリン、ヘパリン結合上皮細胞増殖因子およびエピレグリンを含むが、これらに限定されない。本用語は、天然に存在するポリペチドの生物学的活性フラグメントおよび/または変異体を含む。

【0026】

“HER-HERタンパク質複合体”は、あらゆる組み合わせでHER共同受容体を含む非共有結合的に結合したオリゴマーを意味する(例えば、HER1-HER2、HER1-HER3、HER1-HER4、HER2-HER3、HER3-HER4など)。この複合体は、これらの受容体の両者を発現する細胞がHERリガンド、例えば、NRGに暴露されたときまたはHER受容体が活性または過発現されたときに形成できる。

10

【0027】

“HER2-HER3タンパク質複合体”は、HER2受容体およびHER3受容体を含む非共有結合的に結合したオリゴマーである。この複合体は、これらの受容体の両者を発現する細胞がHER3リガンド、例えば、NRGに暴露されたときまたはHER2が活性/過発現されたときに形成できる。

【0028】

ここで使用する句“HER3活性”または“HER3活性化”は、オリゴマー形成増加(例えばHER3含有複合体増加)、HER3リン酸化、立体構造再配列(例えばリガンドにより誘発されるもの)およびHER3仲介下流シグナル伝達を含む。

【0029】

HER3の文脈で使用する用語“安定化”または“安定化する”は、リガンド結合がもはやHER3を活性化できないように、HER3へのリガンド結合を遮断することなくHER3の不活性状態または配座を直接維持(ロック、係留、保持、優先的結合、支持)する抗体またはそのフラグメントを意味する。実施例に記載するアッセイ、例えば、Biacoreアッセイを使用して、HER3受容体を安定化するリガンド結合を測定できる。

20

【0030】

ここで使用する用語“リガンド依存性シグナル伝達”は、リガンドを介するHER(例えば、HER3)の活性化を意味する。HER3活性化は、下流シグナル伝達経路(例えばPI3K)が活性化されるように、オリゴマー形成(例えばヘテロ二量体化)および/またはHER3リン酸化の増加により証明される。抗体またはそのフラグメントは、実施例に記載するアッセイを使用して測定して、未処置(対照)細胞に対して、抗体またはそのフラグメントに暴露された刺激細胞におけるリン酸化HER3の量を統計学的有意に減少できる。HER3を発現する細胞は天然に存在する細胞株(例えばMCF7)でも、宿主細胞へのHER3タンパク質をコードする核酸の導入により組み換えにより産生されてもよい。細胞刺激は活性化HER3リガンドの外因性添加または活性化リガンドの内因性発現により起こり得る。

30

【0031】

“細胞におけるニューレグリン誘発HER3活性化を減少する”抗体またはそのフラグメントは、実施例に記載するアッセイを使用して測定して、未処置(対照)細胞に対してHER3チロシンリン酸化を統計学的有意に減少させる。これは、HER3のNRGおよび目的の抗体への暴露後のHER3ホスチロシンレベルに基づき決定できる。HER3を発現する細胞タンパク質天然に存在する細胞または細胞株(例えばMCF7)でも、組み換えにより産生してもよい。

40

【0032】

ここで使用する用語“リガンド非依存性シグナル伝達”は、リガンド結合に対する要求非存在下での細胞性HER3活性(例えばリン酸化)を意味する。例えば、リガンド非依存性HER3活性化は、HER2過発現またはHER3ヘテロ二量体パートナー、例えばEGFRおよびHER2における活性化変異の結果であり得る。抗体またはそのフラグメントは、未処置(対照)細胞に対して、抗原結合タンパク質(例えば、抗体)に暴露された細胞におけるリン酸化HER3の量を統計学的有意に減少できる。HER3を発現する細胞は

50

天然に存在する細胞株(例えばSK-Br-3)でも、宿主細胞へのHER3タンパク質をコードする核酸の導入による組み換えにより産生してもよい。

【0033】

ここで使用する用語“遮断”は、相互作用または過程の停止または阻止、例えば、リガンド依存性またはリガンド非依存性シグナル伝達停止を意味する。

【0034】

ここで使用する用語“認識”は、立体構造エピトープを発見し、相互作用(例えば、結合)する抗体またはそのフラグメントを意味する。

【0035】

ここで使用する用語“同時結合”は、HER受容体上のリガンド結合部位にHER抗体と共に結合できるHERリガンドを意味する。これは、本抗体およびリガンドの両者がHER受容体に一緒に結合できることを意味する。単なる説明として、HER3リガンドNRGは、HER3受容体にHER3抗体と共に結合できる。リガンドおよび抗体の同時結合を測定するためのアッセイは実施例部分に記載する(例えば、Biacore)。

【0036】

ここで使用する用語“失敗”は、特定の事象をもたらさない抗体またはそのフラグメントを意味する。例えば、“シグナル伝達の活性化を失敗した”抗体またはそのフラグメントはシグナル伝達を誘発しないもの；“立体構造変化の誘発に失敗した”抗体またはそのフラグメントは、HER受容体における構造変化を起こさないもの；HER受容体が“二量体化に失敗する”ように不活性状態でHER受容体を安定化する抗体またはそのフラグメントは、タンパク質-タンパク質複合体を形成しないものである。

【0037】

ここで使用する用語“抗体”は、HER3エピトープと相互作用(例えば、結合、立体障害、安定化/不安定化、空間配置により)し、シグナル伝達を阻害する全抗体を意味する。天然に存在する“抗体”は、ジスルフィド結合により相互接続した少なくとも2個の重(H)鎖および2個の軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(ここではVHと略す)および重鎖定常領域から成る。重鎖定常領域は、CH1、CH2およびCH3の3ドメインから成る。各軽鎖は軽鎖可変領域(ここではVLと略す)および軽鎖定常領域から成る。軽鎖定常領域はCLである1ドメインから成る。VH領域およびVL領域はさらに、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存性の領域に分散した相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に細分できる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に次のFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順番で配置された3個のCDRおよび4個のFRから成る。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体活性化経路の第一補体(C1q)を含む宿主組織または因子への結合を仲介し得る。用語“抗体”は、例えば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fvs(scFv)、ジスルフィド結合Fvs(sdFv)、Fabフラグメント、F(ab')フラグメントおよび抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば、本発明の抗体への抗Id抗体を含む)および上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを含む。抗体は任意のアイソタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)またはサブクラスのものであり得る。

【0038】

軽鎖および重鎖のいずれも、構造的および機能的相同性の領域に分割される。用語“定常”および“可変”は機能的に使用する。これに関して、当然であるが、軽(VL)鎖および重(VH)鎖部分の両者の可変ドメインは抗原認識および特異性を決定する。逆に、軽鎖(CL)および重鎖(CH1、CH2またはCH3)の定常ドメインは重要な生物学的特性、例えば分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などを与える。慣例により定常領域ドメインの番号は抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠ざかるに連れて増える。

N末端は可変領域であり、C末端は定常領域である；C H 3 およびC L ドメインは実際それぞれ重鎖および軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【 0 0 3 9 】

ここで使用する用語“抗体フラグメント”は、H E R 3 エピトープと特異的に相互作用し(例えば、結合、立体障害、安定化/不安定化、空間配置により)、シグナル伝達を阻害する能力を維持する抗体の1個以上の部分を意味する。結合フラグメントの例は、F a b フラグメント、V L、V H、C L およびC H 1 ドメインから成る一価フラグメント；ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合した1個のF a b フラグメントを含む二価フラグメントであるF (a b)₂ フラグメント；V H およびC H 1 ドメインから成るF d フラグメント；抗体の単アームのV L およびV H ドメインから成るF v フラグメント；V H ドメインから成るd A b フラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；および単離された相補性決定領域(C D R)を含むが、これらに限定されない。

10

【 0 0 4 0 】

さらに、F v フラグメントの2個のドメインであるV L およびV H は別の遺伝子によりコードされるが、これらは、組み換え方法により、V L およびV H 領域が対となり一価分子を形成する、一タンパク質鎖として製造されることを可能とする合成リンカーによりあわせることができる(一本鎖F v (s c F v)として知られる；例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426; およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883参照)。このような一本鎖抗体もまた用語“抗体フラグメント”に包含されることが意図される。これらの抗体フラグメントは当業者に知られる慣用法を使用して得て、フラグメントを、インタクト抗体と同様の方法で有用性についてスクリーニングする。

20

【 0 0 4 1 】

抗体フラグメントはまたドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、細胞内抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、v - N A R およびビス - s c F v にも含まれ得る(例えば、Hollinger and Hudson, (2005) Nature Biotechnology 23:1126-1136参照)。抗体フラグメントはポリペチドに基づきスキャフォールド、例えばフィブロネクチンIII型(F n 3)に接木され得る(フィブロネクチンポリペチドモノボディを記載する米国特許番号6,703,199参照)。

【 0 0 4 2 】

抗体フラグメントは、直列F v セグメント(V H - C H 1 - V H - C H 1)の対を含む一本鎖分子に包含され、相補的軽鎖ポリペチドと共に、抗原結合領域の対を形成し得る(Zapata et al., (1995) Protein Eng. 8:1057-1062; および米国特許番号5,641,870)。

30

【 0 0 4 3 】

用語“エピトープ”は、免疫グロブリンと特異的結合できるまたは他に分子と相互作用する、あらゆるタンパク質決定基を意味する。エピトープ決定基は、一般的に分子の化学活性表面グルーピング、例えばアミノ酸または炭水化物または糖側鎖から成り、特異的三次元構造的特徴、ならびに特異的電荷特徴を有し得る。エピトープは“直線状”でも“立体構造”でもよい。

【 0 0 4 4 】

用語“直線状エピトープ”は、タンパク質と相互作用分子(例えば抗体)の相互作用の全ての点が、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線状に生じるエピトープを意味する(連続的)。抗原上の所望のエピトープが決定されたら、例えば、本明細書に記載する技術を使用して該エピトープに対する抗体を産生できる。あるいは、発見過程で、抗体の産生および特徴づけは、望ましいエピトープに関する情報を明らかにし得る。この情報から、続いて、同エピトープに対して結合抗体を競合的スクリーニングできる。これを達成するための方法は、互いに競合的に結合する抗体、例えば抗原に対する結合を競合する抗体を発見するための交差競合試験の実施である。交差競合に基づく“ピンニング”抗体のためのハイスループット方法は、国際特許出願番号W O 2 0 0 3 / 4 8 7 3 1 に記載されている。当業者に認識されるとおり、抗体が特異的に結合できるものは実際的にエピトープで

40

50

あり得る。エピトープは、抗体が結合する残基を含み得る。

【 0 0 4 5 】

用語“立体構造エピトープ”は、不連続的アミノ酸が三次元立体構造となるエピトープを意味する。立体構造エピトープにおいて、相互作用の点は、互いに離れたタンパク質上のアミノ酸残基を通して生じる。一つの態様において、エピトープは、本明細書の実施例に記載するものである。一つの態様において、立体構造エピトープは、配列番号1の(i) H E R 3アミノ酸残基265～277および315(ドメイン2の)および(ii) H E R 3アミノ酸残基571、582～584、596～597、600～602、609～615(ドメイン4の)またはそのサブセットにより定義される。当業者に認識されるとおり、分子の形を作る残基または側鎖により占拠されている空間はエピトープが何であるかの決定を助ける。

10

【 0 0 4 6 】

一般的に、特定の標的抗原に対する抗体特異的は、タンパク質および/または巨大分子の複合体混合物中の標的抗原上のエピトープを優先的に認識する。

【 0 0 4 7 】

エピトープを含むポリペチドのある領域は、当分野で周知のエピトープマッピング技術を任意に使用して同定できる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey参照。例えば、直線状エピトープは、例えば、固体支持体上に多数のペプチドを同時に合成し、該ペプチドはタンパク質分子の部分に対応し、該ペプチドと抗体を、ペプチドを支持体に結合させたまま反応させることにより決定できる。このような技術は当分野で知られ、例えば、米国特許番号4,708,871; Geysen et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:78-182; Geysen et al., (1986) Mol. Immunol. 23:709-715に記載されている。同様に、立体構造エピトープは、例えば、アミノ酸の空間的立体構造を、例えば、水素/重水素交換、x線結晶学および二次元核磁気共鳴によって決定することにより容易に同定できる。例えば、Epitope Mapping Protocols, supra参照。タンパク質の抗原領域もまた、例えば標準的抗原性およびヒドロパシープロットを使用して、例えば、Oxford Molecular Groupから入手可能なOmiga version 1.0ソフトウェアプログラムを使用して計算することにより同定できる。このコンピュータプログラムは、抗原性プロファイルの決定にHopp/Woods法(Hopp et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828)を使用し、ヒドロパシープロットのためにKyte-Doolittle技術(Kyte et al., (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132)を使用する。

20

30

【 0 0 4 8 】

ここで使用する用語“パラトープ”は、エピトープへの結合を決定する結合領域の一般的構造を意味する。この構造は、結合領域がエピトープに結合するか否か、およびどのような方法で結合するかに影響する。パラトープは、抗体またはそのフラグメントを抗原性決定基に結合させる、抗体の抗原性部位と意味することができる。パラトープはまた抗体のイディオトープおよびエピトープに結合する相補的決定領域(CDR)も意味する。一つの態様において、パラトープは、(i) H E R 3アミノ酸残基265～277および315(ドメイン2の)および(ii)配列番号1のH E R 3アミノ酸残基571、582～584、596～597、600～602、609～615(ドメイン4の)またはそのサブセットを含む立体構造エピトープと結合する抗体の領域である。一つの態様において、パラトープは、CDR配列を含む抗体の領域である。一つの態様において、パラトープは、表1に挙げる配列を含む。一つの態様において、パラトープは、H E R 3残基と結合する少なくとも1個のアミノ酸残基を含む: A s n 2 6 6、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、T h r 2 6 9、G l n 2 7 1、G l u 2 7 3、P r o 2 7 4、A s n 2 7 5、P r o 2 7 6、H i s 2 7 7、A s n 3 1 5、A s p 5 7 1、P r o 5 8 3、H i s 5 8 4、A l a 5 9 6、L y s 5 9 7。一つの態様において、パラトープは、H E R 3残基と結合する少なくとも1個のアミノ酸残基を含む: T y r 2 6 5、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、P h e 2 7 0

40

50

、G l y 5 8 2、P r o 5 8 3、L y s 5 9 7、I l e 6 0 0、L y s 6 0 2、G l u 6 0 9、A r g 6 1 1、P r o 6 1 2、C y s 6 1 3、H i s 6 1 4、G l u 6 1 5。当業者に認識されるとおり、抗体またはその変異体のパラトープは、本明細書に示す方法により決定できる。

【 0 0 4 9 】

ここで使用する用語“モノクローナル抗体”または“モノクローナル抗体組成物”は、アミノ酸配列が実質的に同一であるかまたは同じ遺伝的起源に由来する抗体、抗体フラグメント、二重特異性抗体などを含むポリペチドを意味する。この用語はまた単一分子組成物の抗体分子の調製物も含む。モノクローナル抗体組成物は、単一結合特異性および特定のエピトープに対する親和性を示す。

10

【 0 0 5 0 】

ここで使用する用語“ヒト抗体”は、フレームワークおよびC D R領域のいずれもヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体を含む。さらに、抗体が定常領域を含むならば、定常領域はまたこのようなヒト配列、例えば、ヒト生殖系列配列またはヒト生殖系列突然変異型配列またはヒトフレームワーク配列分析由来のコンセンサスフレームワーク配列を含むヒト配列に由来する(例えば、Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86に記載のとおり)。免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、C D Rの構造および位置は、周知の番号付けスキーム、例えば、Kabat番号付けスキーム、Chothia番号付けスキームまたはKabat-Chothiaの組合せスキームを使用して規定し得る(例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991) , eds. Kabat et al.; Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; およびAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948参照)。

20

【 0 0 5 1 】

本発明のヒト抗体は、ヒト配列によりコードされないアミノ酸残基を含んでよい(例えば、インビトロでの無作為または部位特異的突然変異誘発により導入された変異またはインビボでの体細胞変異または安定性または製造容易性を増進するための保存的置換)。

【 0 0 5 2 】

30

ここで使用する用語“ヒトモノクローナル抗体”は、フレームワークおよびC D R領域のいずれもヒト配列由来である可変領域を有する、単一結合特異性を示す抗体を意味する。一つの態様において、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得たB細胞を含むハイブリドーマにより産生される。

【 0 0 5 3 】

ここで使用する用語“組み換えヒト抗体”は、組み換え手段により製造、発現、創製または単離された全てのヒト抗体、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルである動物(例えば、マウス)から単離された抗体またはそれらから調製されたハイブリドーマ、ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、組み換え、コンピナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体およびヒト免疫グロブリン遺伝子の全てまたは一部のスプライシング、他のD N A配列に対する配列決定を含む他の手段により製造、発現、創製または単離された抗体を含む。このような組み換えヒト抗体は、フレームワークおよびC D R領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来である可変領域を含む。ある態様において、しかしながら、このような組み換えヒト抗体はインビトロ突然変異誘発(または、ヒトI g配列に対してトランスジェニックな動物を使用するとき、インビボ体細胞突然変異誘発)に付し、それゆえに、組み換え抗体のV H領域およびV L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列に由来し、関連はしているものの、インビボ

40

50

でヒト抗体生殖系列レパートリーに天然に存在し得ない配列であり得る。

【0054】

2個の物体の間の特異的結合は、少なくとも 10^2 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^3 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^4 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^5 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^6 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{13} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{14} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ または少なくとも $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ の平衡定数 (K_A) (k_{on} / k_{off}) での結合を意味する。

【0055】

抗体(例えば、HER3結合抗体)に“特異的に(または選択的に)結合する”という用語は、タンパク質および他の生物製剤の異種性集団中の同族抗原(例えば、ヒトHER3)の存在の決定因である結合反応を意味する。上記平衡定数 (K_A) に加えて、本発明のHER3結合抗体は、典型的にまた $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 未満、 10^{-2} M 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 未満、 10^{-3} M 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 未満、 10^{-4} M 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 未満、 10^{-5} M 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 未満、 10^{-6} M 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 未満、 10^{-7} M 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 未満、 10^{-8} M 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 未満、 10^{-9} M 未満、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 未満、 10^{-10} M 未満、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 未満、 10^{-11} M 未満、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、 10^{-12} M 未満、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 未満、 10^{-13} M 未満、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 未満、 10^{-14} M 未満、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 未満または 10^{-15} M 未満またはそれより低い解離速度定数 (K_D) (k_{off} / k_{on}) を有し、HER3に非特異的抗原(例えば、HSA)への結合に対する親和性より少なくとも2倍高い親和性で結合する。

【0056】

一つの態様において、抗体またはそのフラグメントは、ここに記載するまたは当業者に知られた方法(例えば、Biacoreアッセイ、ELISA、FACS、SET)(Biacore International AB, Uppsala, Sweden)で評価して、3000pM未満、2500pM未満、2000pM未満、1500pM未満、1000pM未満、750pM未満、500pM未満、250pM未満、200pM未満、150pM未満、100pM未満、75pM未満、10pM未満、1pM未満の解離定数 (K_d) を有する。ここで使用する用語“ K_{assoc} ”または“ K_a ”は特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を意味し、一方、ここで使用する用語“ K_{dis} ”または“ K_d ”は特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を意味する。ここで使用する用語“ K_D ”は、 K_d 対 K_a 比(すなわち K_d / K_a)により得られる解離定数を言い、モル濃度(M)として表す。抗体の K_D 値は、当分野で十分確立されている方法を使用して決定できる。抗体の K_D を決定する方法は、表面プラズモン共鳴を使用するまたはバイオセンサーシステム、例えばBiacore(登録商標)システムを使用することによる。

【0057】

ここで使用する用語“親和性”は、一抗原性部位での抗体と抗原の相互作用の強度を意味する。各抗原性部位内で、抗体“アーム”の変領域は、抗原と多くの部位で弱い非共有結合的力を介して相互作用し、相互作用が多いほど、親和性が強くなる。

【0058】

ここで使用する用語“結合活性”は、抗体-抗原複合体の全体的安定性または強度の情報手段である。これは、抗体エピトープ親和性；抗原および抗体両者の結合値；および相互作用部分の構造的配置である3つの主要な因子により制御される。最終的にこれらの因子は抗体の特異性、すなわち、特定の抗体が的確な抗原エピトープに結合する可能性を規定する。

【0059】

10

20

30

40

50

ここで使用する用語“結合価”は、ポリペチド中の潜在的標的結合部位の数を意味する。各標的結合部位は、1個の標的分子または標的分子上の特異的部位(すなわち、エピトープ)と特異的に結合する。ポリペチドが1個を超える標的結合部位を含むとき、各標的結合部位は、同一または異なる分子(例えば、異なる分子、例えば、同一分子上の異なる抗原または異なるエピトープ)と特異的に結合し得る。

【0060】

ここで使用する用語“アンタゴニスト抗体”は、HER3と結合し、HER3シグナル伝達の生物学的活性を中和する、例えば、ホスホ-HER3またはホスホ-Aktアッセイにおいて、例えば、HER3誘発シグナル伝達活性を減少、減弱および/または阻害する抗体である。アッセイの例は後記実施例にさらに詳細に記載する。従って、当分野で知られるおよびここに記載する方法に従い決定して、これらのHER3機能的特性(例えば、生化学、免疫化学、細胞、生理学的または他の生物学的活性など)の1個以上を“阻害”する抗体は、該抗体非存在下(例えばまたは無関係の特異性の対照抗体が存在するとき)に見られるものに対する特定の活性の統計学的に有意な減少と関連すると理解される。HER3活性を阻害する抗体は、測定パラメータの少なくとも10%少なくとも50%、80%または90%の統計学的に有意な減少を起こし、ある態様において、本発明の抗体は、細胞性HER3リン酸化レベルの減少により証明されるところによれば、HER3機能的活性を95%、98%または99%を超えて阻害し得る。

【0061】

用語“単離抗体”は、異なる抗原性特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味する(例えば、HER3と特異的に結合する単離抗体は、HER3以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。HER3と特異的に結合する単離抗体は、しかしながら、他の抗原と交差反応し得る。さらに、単離抗体は他の細胞性物質および/または化学物質を実質的に含まない可能性がある。

【0062】

用語“保存的修飾変異体”はアミノ酸および核酸配列のいずれにも使用する。特定の核酸配列に関して、保存的修飾変異体は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸または核酸がアミノ酸配列をコードしないとき本質的に同一の配列を意味する。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一の核酸があるタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは全てアミノ酸アラニンをコードする。それゆえに、アラニンがコードにより特定される全ての位置で、該コドンは、コードされるポリペチドを変えることなく、記載した対応するコドンのいずれかに変えることができる。このような核酸多様性は“サイレント多様性”であり、これは、保存的修飾多様性の1種である。ポリペチドをコードするここでの全ての核酸配列も、核酸の全ての可能なサイレント多様性を記載する。当業者は、核酸における各コドン(通常メチオニンの唯一のコドンであるAUGおよび通常トリプトファンの唯一のコドンであるTGG以外)を修飾して、機能的に同一の分子が得られることを認識する。従って、ポリペチドをコードする核酸の各サイレント多様性は、記載した配列の各々に潜在する。

【0063】

ポリペチド配列に関して、“保存的修飾変異体”は、あるアミノ酸の化学的に類似のアミノ酸への置換を起こす、ポリペチド配列への個々の置換、欠失または付加を含む。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換の表は当分野で周知である。このような保存的修飾変異体は本発明の多型変異体、種間相同体および対立遺伝子に加えられ、これらを除外しない。次の8群は、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む：1)アラニン(A)、グリシン(G)；2)アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)；3)アスパラギン(N)、グルタミン(Q)；4)アルギニン(R)、リシン(K)；5)イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)；6)フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)；7)セリン(S)、スレオニン(T)；および8)システイン(C)、メチオニン(M)(例えば、Creighton, Proteins (1984)参照)。ある態様において、用語“保存的配列修飾”は、該アミノ酸配列が包含される抗体の結合特性に顕著に影響しないまたは変えないアミノ酸

修飾を意味するために使用する。

【 0 0 6 4 】

用語“交差競合”および“交差競合する”は、ここでは互換的に、抗体または他の結合剤が、標準的競合的結合アッセイにおいて H E R 3 への他の抗体または結合剤の結合を妨害する能力を意味するために使用する。

【 0 0 6 5 】

抗体または他の結合剤が他の抗体または結合分子の H E R 3 への結合を妨害する能力または程度、すなわち、本発明において交差競合と言えるか否かは、標準的競合結合アッセイを使用して決定できる。一つの適切なアッセイは、表面プラズモン共鳴方法を使用して相互作用の程度を測定できるBiacore法(例えばBiacore 3000装置(Biacore, Uppsala, Sweden)の使用による)の使用を含む。交差競合を測定する他のアッセイは E L I S A に基づく方法を使用する。

10

【 0 0 6 6 】

ここで使用する用語“最適化”は、ヌクレオチド配列が、産生細胞または生物、一般的に真核細胞、例えば、ピキア属の細胞、トリコデルマ属の細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O)またはヒト細胞において好ましいコドンを使用してアミノ酸配列をコードするように変えられていることを意味する。最適化ヌクレオチド配列は、“親”配列としても知られる出発ヌクレオチド配列により元々コードされていたアミノ酸配列を完全にまたは最大限残すように加工する。

【 0 0 6 7 】

20

多様な種の H E R 3 に対して抗体の結合能力を評価する標準的アッセイは当分野で知られ、例えば、E L I S A、ウェスタンブロットおよび R I A を含む。適切なアッセイは実施例に詳述する。抗体の結合動態(例えば、結合親和性)も、当分野で知られた標準的アッセイ、例えばBiacore分析または F A C S 相対親和性(Scatchard)により評価できる。H E R 3 の機能的特性(例えば、H e r 経路を調節する、受容体結合アッセイ)に対する抗体の効果を評価するためのアッセイは実施例にさらに詳述する。

【 0 0 6 8 】

用語“同一パーセント”または“同一性パーセント”は、2個以上の核酸またはポリペプチド配列について、同じである2個以上の配列または部分配列を意味する。2個の配列は、次の配列比較アルゴリズムの一つを使用して、または手動整列および目視により測定して比較ウィンドウまたは指定領域で最大一致について比較し、整列したとき、2個の配列の特定のパーセンテージのアミノ酸残基またはヌクレオチドが同一であるならば、“実質的に同一”である(すなわち、特定の領域にわたり、または特定していないとき、全配列にわたり60%同一性、所望により65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または99%同一性)。所望により、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド(または10アミノ酸)長以上である領域、好ましくは100~500または1000またはそれ以上のヌクレオチド(または20、50、200またはそれ以上のアミノ酸)である領域にわたり存在する。

30

【 0 0 6 9 】

配列比較のために、典型的に1個の配列は参照配列として置き、それに対し試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用するとき、試験および参照配列をコンピュータに入力し、必要であるならば、部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。デフォルトプログラムパラメータを使用しても、別のパラメータを指定してもよい。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づき、参照配列に対する試験配列の配列同一パーセントを計算する。

40

【 0 0 7 0 】

ここで使用する“比較ウィンドウ”は、配列を、2個の配列を最適に整列後同数の連続位置の参照配列と比較し得る、20~600、通常約50~約200、さらに一般的には約100~約150から成る群から選択される連続位置の数のいずれか一つのセグメントを意味する。比較のための配列の整列方法は当分野で周知である。比較のための配列の最

50

適整列は、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局所相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性整列アルゴリズム、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性方オフの試験、これらのアルゴリズムのコンピュータでの実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのG A P、B E S T F I T、F A S T AおよびT F A S T A)または手動整列および目視(例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology参照)により実施できる。

【 0 0 7 1 】

配列同一性パーセントおよび配列類似度決定に適切な二つのアルゴリズムの例は、BLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはAltschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410にそれぞれ記載されている。BLAST解析実施用ソフトウェアはNational Center for Biotechnology Informationから公的に入手可能である。このアルゴリズムは、最初にクエリー配列中の短ワード長Wの同定により高スコア配列対(H S P)を同定し、これは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列したとき、ある正值閾値スコアTとマッチするかまたは充足する。Tは隣接ワードスコア閾値を意味する(Altschul et al., supra)。これらの初期隣接ワードヒットは、それらを含むより長いH S Pの探索を開始するための種として作用する。ワードヒットは累積的整列スコアが増え続ける限り、各配列に沿って両方向に伸長する。累積的スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM(整合残基対の報酬スコア; 常に> 0)およびN(不整合残基のペナルティスコア; 常に< 0)を使用して計算する。アミノ酸配列については、スコア付けマトリクスを使用して、累積的スコアを計算する。各方向でのワードヒット伸長は、累積的整列スコアがその達成した最大価から数X落ちたとき、累積的スコアが1個以上の負のスコアの残基整列の蓄積により0以下になったとき、またはいずれかの配列末端に達したとき停止する。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXは、感受性および整列速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列について)はデフォルトとしてワード長(W) 11、期待値(E) 10、M = 5、N = - 4および両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長3および期待値(E) 10およびB L O S U M 6 2スコア付けマトリクス(HenikoffおよびHenikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照)、整列(B) 50、期待値(E) 10、M = 5、N = - 4および両鎖の比較を使用する。

【 0 0 7 2 】

BLASTアルゴリズムはまた2配列間の類似度の統計学的分析も行う(例えば、Karlin and Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムにより提供される類似度の一つの指標は、2個のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間のマッチが偶然起こる確率の指標を提供する、最小合計確率(P(N))である。例えば、核酸は、試験核酸の参照核酸に対する好比較における最小合計確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満および最も好ましくは約0.001未満であるならば、参照配列と類似であると見なす。

【 0 0 7 3 】

2個のアミノ酸配列間の同一性パーセントは、P A M 1 2 0加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用する、A L I G Nプログラム(version 2.0)に組み込まれているE. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17のアルゴリズムを使用する。さらに、2個のアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossom 62マトリクスまたはP A M 2 5 0マトリクスおよびギャップ加重16、14、12、10、8、6または4および長さ加重1、2、3、4、5または6を使用する、G C Gソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)におけるG A Pプログラムに組み込まれている、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453アルゴリズムを使用して決定できる。

【 0 0 7 4 】

上記配列同一性パーセンテージ以外に、2個の核酸配列またはポリペチドが実質的に同一との他の指標は、下記のとおり、第一核酸によりコードされるポリペチドが、第二核酸によりコードされるポリペチドに対して惹起した抗体と免疫学的に交差反応性であることである。それゆえに、ポリペチドは、例えば、2個のペプチドが保存的置換によってのみ異なるとき、第二ポリペチドと典型的に実質的に同一である。2個の核酸配列が実質的に同一である他の指標は、下記のとおり2個の分子またはそれらの補体がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2個の核酸配列が実質的に同一であるさらに他の指標は、同じプライマーを使用して配列を増幅できることである。

【0075】

用語“核酸”は、ここでは用語“ポリヌクレオチド”と互換的に使用し、一本鎖または二本鎖形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマーを意味する。本用語は、既知ヌクレオチドアナログまたは修飾された主鎖残基または結合を含み、合成され、天然に存在するおよび天然に存在せず、参照核酸と類似の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと類似の方法で代謝される核酸を意味する。このようなアナログの例は、ホスホロチオエート類、ホスホロアミデート類、メチルホスホネート類、キラル-メチルホスホネート類、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸(PNA)を含むが、これらに限定されない。

【0076】

特に断らない限り、特定の核酸配列はまたその保存的修飾変異体(例えば、コドン置換変性)および相補的配列、ならびに明示的に示す配列も潜在的に包含する。具体的に、下記のとおり、コドン置換変性は、1個以上の選択した(または全)コドンの3位が混合残基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列の産生により達成し得る(Batzer et al., (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al., (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; およびRossolini et al., (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98)。

【0077】

用語“操作可能に結合”は、2個以上のポリヌクレオチド(例えば、DNA)セグメント間の機能的関係を意味する。典型的に、転写調節配列と転写配列との機能的関連を意味する。例えば、プロモータまたはエンハンサ配列は、適当な宿主細胞または他の発現系においてコーディング配列の転写を刺激または調節するならば、コーディング配列に操作可能に結合している。一般的に、転写配列に操作可能に結合しているプロモータ転写調節配列は、転写配列と物理的に連続しており、すなわち、それらはシス作用性である。しかしながら、ある転写調節配列、例えばエンハンサは、転写を促進するコーディング配列に物理的に連続しているか近接している必要はない。

【0078】

用語“ポリペチド”および“タンパク質”は、ここでは互換的にアミノ酸残基のポリマーを意味する。本用語は、1個以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的化学模倣物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用する。特に断らない限り、特定のポリペチド配列はまたその保存的修飾変異体を潜在的に包含する。

【0079】

用語“対象”はヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は全脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、トリ、両生類および爬虫類を含む。示していない限り、用語“患者”または“対象”はここでは互換的に使用する。

【0080】

用語“抗癌剤”は、細胞毒性剤、化学療法剤、放射線療法および放射線治療剤、標的抗癌剤および免疫治療剤を含む、細胞増殖性障害、例えば癌の処置に使用できる薬剤を意味する。

【0081】

“腫瘍”は、悪性であれ良性であれ、新生物細胞成長および増殖、および全前癌性およ

10

20

30

40

50

び癌性細胞および組織を意味する。

【 0 0 8 2 】

用語“抗腫瘍活性”は、腫瘍細胞増殖速度、生存能または転移活性の減少を意味する。抗腫瘍活性を示す可能な方法は、治療中の異常細胞の増殖速度減少または腫瘍サイズ安定化または減少の提示である。このような活性は、異種移植片モデル、同種移植片モデル、M M T Vモデルおよび他の抗腫瘍活性の試験において当分野で知られた既知モデルを含むが、これらに限定されない認められたインビトロまたはインビボ腫瘍モデルを使用して評価できる。

【 0 0 8 3 】

用語“悪性腫瘍”は、非良性腫瘍または癌を意味する。ここで使用する、用語“癌”は、調節解除されたまたは制御されない細胞増殖により特徴付けられる悪性腫瘍を意味する。癌の例は、癌腫、肉腫、白血病およびリンパ腫を含む。用語“癌”は原発悪性腫瘍(例えば、細胞が元の腫瘍以外の対象体内の他の部位に郵送していない)および二次的悪性腫瘍(例えば、元の腫瘍の部位と異なる二次的部位への腫瘍細胞の遊走である転移)を含む。

【 0 0 8 4 】

本発明の種々の面を次のセクションおよびサブセクションでさらに詳述する。

【 0 0 8 5 】

H E R 受容体の構造および活性化機構

全4種のH E R 受容体は細胞外リガンド結合ドメイン、一膜貫通型ドメインおよび細胞質チロシンキナーゼ含有ドメインを有する。H E R 受容体の細胞内チロシンキナーゼドメインは高度に保存されているが、H E R 3のキナーゼドメインは、重大なアミノ酸の置換を有し、それゆえにキナーゼ活性を欠く(Guy et al., (1994):PNAS 91, 8132-8136)。H E R 受容体のリガンド誘発二量体化は、キナーゼの活性化、C末端テイルのチロシン残基の受容体トランスリン酸化、続く細胞内シグナル伝達エフェクターの動員および活性化を誘発する(Yarden and Sliwkowski, (2001) Nature Rev 2, 127-137; Jorissen et al., (2003) Exp Cell Res 284, 31-53)。

【 0 0 8 6 】

H E Rの細胞外ドメインの結晶構造は、リガンド誘発受容体活性化の過程について幾分見識を提供する(Schlessinger, (2002) Cell 110, 669-672)。各H E R 受容体の細胞外ドメインは4サブドメインから成る：サブドメインIおよびIIIはリガンド結合部位形成に協調し、一方サブドメインII(およびおそらくサブドメインIV)は、直接受容体 - 受容体相互作用を介する受容体二量体化に関与する。リガンド結合H E R 1の構造において、サブドメインIIのハルピン(二量体化ループと呼ばれる)はパートナー受容体の二量体化ループと相互作用し、受容体二量体化を仲介する(Garrett et al, (2002) Cell 110, 763-773; Ogiso et al., (2002) Cell 110, 775-787)。対照的に、不活性H E R 1、H E R 3およびH E R 4の構造において、二量体化ループは、サブドメインIVとの分子内相互作用に関与し、これはリガンド非存在下での受容体二量体化を阻止する(Cho and Leahy, (2002) Science 297, 1330-1333; Ferguson et al., (2003) Mol Cell 12, 541-552; Bouyan et al., (2005) PNAS102, 15024-15029)。H E R 2の構造はH E R 群の中で独特である。リガンド非存在下で、H E R 2は、他のH E R 受容体との相互作用に利用可能な突出二量体化ループと共に、H E R 1のリガンド活性化状態を模倣する立体構造を有する(Cho et al., (2003) Nature 421, 756-760; Garrett et al., (2003) Mol Cell 11, 495-505)。これは、H E R 2の亢進されたヘテロ二量体化能を説明し得る。

【 0 0 8 7 】

H E R 受容体結晶構造は、H E R 受容体ホモおよびヘテロ二量体化のモデルを提供するが、あるH E R ホモおよびヘテロ二量体が他より多いこと(Franklin et al., (2004) Cancer Cell 5, 317-328)ならびに受容体二量体化および自己阻害における各ドメインの立体構造(Burgess et al., (2003) Mol Cell 12, 541-552; Mattoon et al., (2004) PNAS101, 923-928)の役割はまた幾分未解明のままである。下記のとおり、H E R 3 X線結晶構造はさらなる見識を提供する。

【 0 0 8 8 】

H E R 3 構造および立体構造エピトープ

抗原結合タンパク質、例えば、抗 H E R 3 抗体が結合する立体構造エピトープをここに提供する。初めて、抗体と複合体化した H E R 3 の細胞外ドメインの切断型(残基 2 0 ~ 6 4 0)の三次元構造が示された。H E R 3 - MOR09823 Fab複合体および H E R 3 - MOR09825は 3 . 2 および 3 . 4 分解能でそれぞれ決定されており、図 5 A に示す。ここでの開示はまた初めて不活性状態の H E R 3 と結合し、該受容体を不活性状態で安定化させる抗体またはそのフラグメントも示す。本発明の抗体はまた H E R 3 リガンド、例えばニューレグリンと H E R 3 受容体の同時結合を可能にする。

【 0 0 8 9 】

理論の提示は要求されないが、作用機序の一つの可能なモデルは、H E R 3 が典型的に不活性(閉鎖、係留)または活性(開放)状態で存在することである。リガンド結合は、ヘテロ二量体パートナーを結合できる活性(開放)状態で存在する H E R 3 が下流シグナル伝達を不活性化するように立体構造変化を誘発する。抗体、例えば MOR09823 は不活性(係留)状態の H E R 3 と結合するが、リガンド結合部位を遮断しない。抗体、例えば MOR09823 は、H E R 3 が活性立体構造に遷移するために必要なリガンド誘発構造再配列の阻止により H E R 3 を阻害し、それによりシグナル伝達を阻止する。一つの態様において、本発明の抗体またはそのフラグメントは不活性(係留)状態の H E R 3 と結合するが、リガンド結合部位を遮断しない。他の態様において、抗体またはそのフラグメントは、H E R 3 が活性立体構造に遷移するために必要なリガンド誘発構造再配列の阻止により H E R 3 を阻害し、それによりシグナル伝達を阻止する。他の態様において、抗体またはそのフラグメントは、H E R 3 受容体を不活性状態または立体構造で安定化する(直接的に維持、ロック、係留、保持、優先的結合または支持する)。一つの態様において、不活性 H E R 3 受容体は、細胞表面 H E R 3 受容体喪失に至るような優先的内部移行または分解に感受性であり得る。実施例セクションに示す生物学的データはこれらの態様を支持する。

【 0 0 9 0 】

H E R 3 の結晶は、H E R 3 またはその変異体をコードするヌクレオチド配列を適切な宿主細胞で発現させ、関連 H E R 3 標的 F a b 存在下で精製タンパク質を結晶化させることにより製造し得る。好ましくは H E R 3 ポリペチドは細胞外ドメインを含むが(ヒトポリペチドのアミノ酸 2 0 ~ 6 4 0 またはその切断変異体、好ましくはアミノ酸 2 0 ~ 6 4 0 を含む)、膜貫通型および細胞内ドメインを欠く。

【 0 0 9 1 】

H E R 3 ポリペチドはまた、例えば抽出および精製の助けとなるように、融合タンパク質として製造してもよい。融合タンパク質パートナーの例は、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ(G S T)、ヒスチジン(H I S)、ヘキサヒスチジン(6 H I S)、G A L 4 (D N A 結合および/または転写活性化ドメイン)およびベータ - ガラクトシダーゼを含む。融合タンパク質配列の除去を可能にするために、融合タンパク質パートナーと目的のタンパク質配列の間にタンパク分解開裂部位を包含させるのも好都合である。

【 0 0 9 2 】

発現後、タンパク質を、例えば固定化金属親和性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/またはゲル濾過により、精製および/または濃縮してよい。

【 0 0 9 3 】

タンパク質を、ここに記載する技術を使用して結晶化させ得る。一般に、結晶化工程において、タンパク質溶液含有液滴を結晶化緩衝液と混合し、密閉容器中で平衡化させる。平衡化は既知技術、例えば“懸滴”または“座滴”方法により達成し得る。これらの方法において、液滴をはるかに大きな結晶化緩衝液貯蔵部の上に吊るすかまたは横に置き、平衡化を蒸気拡散により達成する。あるいは、平衡化を他の方法で、例えば油下、半透膜または自由界面拡散により行ってよい(例えば、Chayen et al., (2008) Nature Methods 5, 147 - 153 参照)。

【 0 0 9 4 】

結晶が得られたら、構造を既知X線回折技術で解析し得る。多くの技術が、近似相への化学的修飾、例えば重原子誘導体化により修飾した結晶を使用する。実施に際し、結晶を、結晶を通して拡散し、タンパク質表面に結合できる、重金属原子塩類または有機金属化合物、例えば、塩化鉛、チオマレイン酸金、チメロサルまたは酢酸ウラニル含有溶液に浸漬する。結合重金属原子の位置を、次いで、浸漬結晶のX線回折分析により決定できる。結晶の原子(散乱中心)によるX線の単色ビームの回折により得られたパターンを、数式により解析して、数学的座標を得る。回折データを使用して、結晶の反復単位の電子密度地図を計算する。相情報を得る他の方法は、分子置換として知られる技術である。この方法において、回転性アルゴリズムおよび翻訳アルゴリズムを、関連構造に由来する検索モデルに適用し、目的のタンパク質について凡その方向を得る(Rossmann, (1990) Acta Cryst 10
stals A 46, 73-82参照)。電子密度地図を使用して、結晶単位セル内の個々の原子の位置を確定する(Blundel et al., (1976) Protein Crystallography, Academic Press)。

【 0 0 9 5 】

本明細書は、初めて、HER3および抗HER3抗体のFabの三次元構造を記載する。HER3の細胞外ドメインの凡そのドメイン境界は次のとおりである；ドメイン1：アミノ酸20～207；ドメイン2：アミノ酸208～328；ドメイン3：アミノ酸329～498；およびドメイン4：アミノ酸499～642。HER3および抗体の三次元構造はまた潜在的HER3モジュレーターに対する標的結合部位の同定も可能にする。好ましい標的結合部位はHER3の活性化に含まれるものである。一つの態様において、標的結合部位は、HER3のドメイン2およびドメイン4内に位置する。それゆえに、ドメイン2またはドメイン4および好ましくは両ドメインに結合する抗体またはそのフラグメントは、ドメインが互いに解離することを妨げることによりまたはドメインの相対位置を修飾することにより、HER3活性化を調節する。それゆえに、抗体またはそのフラグメントのドメイン2またはドメイン4内のアミノ酸残基への結合は、タンパク質を、活性化を阻止する立体構造に適用させる。ここでの開示はまた、初めて、HER3リガンド、例えばニューレグリンと同時に結合できる抗体またはそのフラグメントを示す。

【 0 0 9 6 】

ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、抗体またはそのフラグメントが、HER3を共同受容体(HER1、HER2およびHER4を含むが、これらに限定されない)と相互作用するのを妨げるように、HER3の特異的立体構造状態を認識する。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、HER3受容体を不活または遮断状態で安定化することによりHER3が共同受容体と相互作用するのを阻止する。一つの態様において、抗体またはそのフラグメントは、HER3のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基との結合によりHER3受容体を安定化させる。この不活性状態で、ドメイン2内に位置する二量体化ループは露出せず、それゆえに、他の共同受容体(HER1、HER2およびHER4を含むが、これらに限定されない)との二量体化に利用できない。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、配列番号1の(i)HER3アミノ酸残基265～277および315(ドメイン2の)および(ii)HER3アミノ酸残基571、582～584、596～597、600～602、609～615(ドメイン4の)またはそのサブセットを含む立体構造エピトープを有するヒトHER3タンパク質と結合する。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基265～277および315(ドメイン2の)および(ii)HER3アミノ酸残基571、582～584、596～597、600～602、609～615(ドメイン4の)内のまたは重複するアミノ酸と結合する。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、配列番号1のアミノ酸265～277および315(ドメイン2の)および(ii)HER3アミノ酸残基571、582～584、596～597、600～602、609～615(ドメイン4の)またはそのサブセット内(および/またはこれらから成るアミノ酸配列)のアミノ酸と結合する。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、ドメイン2およびドメイン4の移動性を制限し、不活性または閉鎖立体構造で安定化するように立体構造エピトープと結合する。活性立体構造形成の失敗は、活性化シグナル伝達失敗をもたら
50

す。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、ドメイン 2 内の二量体化ループを妨げ、それにより受容体 - 受容体相互作用のためにそれを利用不可能とするように立体構造エピトープと結合する。ホモまたはヘテロ二量体形成失敗は、活性化シグナル伝達失敗をもたらす。

【 0 0 9 7 】

他の面において、抗体またはそのフラグメントは、H E R 受容体、例えば H E R 3 受容体の立体構造エピトープと結合する。一つの態様において、抗体またはそのフラグメントは H E R 3 受容体を不活性状態で安定化する。他の態様において、抗体またはそのフラグメントは活性状態の H E R 3 受容体と結合し、不活性状態にする。それゆえに、抗体またはそのフラグメントは活性または不活性状態の H E R 3 と結合できるが、不活性状態の形成を優先し、活性状態の H E R 3 を不活性状態とし、活性化シグナル伝達の阻止をもたらす。

10

【 0 0 9 8 】

他の面において、抗体またはそのフラグメントは H E R 受容体、例えば H E R 3 受容体の立体構造エピトープと結合し、ここで、抗体またはそのフラグメントの結合は、H E R 3 受容体を、H E R 3 受容体が受容体 - 受容体複合体を形成するための共同受容体との二量体化に失敗するように不活性状態で安定化させる。受容体 - 受容体複合体形成の不達成は、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達の両者の活性化を阻止する。

【 0 0 9 9 】

20

他の面において、抗体またはそのフラグメントは H E R 受容体、例えば H E R 3 受容体の立体構造エピトープと結合し、ここで、抗体またはそのフラグメントの H E R 3 受容体への結合は、不活性受容体 - 受容体複合体を形成するための共同受容体との二量体化を可能にする。不活性受容体 - 受容体複合体の形成は、リガンド非依存性シグナル伝達活性化を阻止する。例えば、リガンド非依存性シグナル伝達において、H E R 3 は不活性状態で存在し得るが、しかしながら H E R 2 の過発現は H E R 2 - H E R 3 複合体形成を起こし、いずれにしてもこれらの得られた複合体は不活性であり、リガンド非依存性シグナル伝達の活性化を阻止する。

【 0 1 0 0 】

記載した構造はまた抗体またはそのフラグメント(例えば、MOR09823)と H E R 3 の相互作用界面の特異的コア H E R 3 アミノ酸残基の同定を可能にする。これは、MOR09823タンパク質 V H 鎖から 5 以内の残基と定義された。コア残基は次のとおりである：A s n 2 6 6、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、T h r 2 6 9、G l n 2 7 1、G l u 2 7 3、P r o 2 7 4、A s n 2 7 5、P r o 2 7 6、H i s 2 7 7、A s n 3 1 5、A s p 5 7 1、P r o 5 8 3、H i s 5 8 4、A l a 5 9 6、L y s 5 9 7。

30

【 0 1 0 1 】

この構造はまた抗体またはそのフラグメント(例えば、MOR09823)内の相互作用界面についての境界 H E R 3 アミノ酸残基の同定を可能にする。これらの残基は、MOR09823タンパク質 V H 鎖から 5 ~ 8 であった H E R 3 残基であり得る。境界残基は次のとおりである：P r o 2 6 2、V a l 2 6 4、T y r 2 6 5、P h e 2 7 0、L e u 2 7 2、T h r 2 7 8、L y s 3 1 4、G l y 3 1 6、G l u 3 2 1、A s n 5 6 6、S e r 5 6 8、G l y 5 6 9、S e r 5 7 0、T h r 5 7 2、A r g 5 8 0、A s p 5 8 1、G l y 5 8 2、G l y 5 9 5、G l y 5 9 8、I l e 6 0 0。

40

【 0 1 0 2 】

記載した構造はまた抗体またはそのフラグメント(例えば、MOR09823)と H E R 3 の相互作用界面についての特異的コア H E R 3 アミノ酸残基の同定を可能にする。これは、MOR09823タンパク質 V L 鎖から 5 以内の残基と定義された。コア残基は次のとおりである：T y r 2 6 5、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、P h e 2 7 0、G l y 5 8 2、P r o 5 8 3、L y s 5 9 7、I l e 6 0 0、L y s 6 0 2、G l u 6 0 9、A r g 6 1 1、P r o 6 1 2、C y s 6 1 3、H i s 6 1 4、G l u 6 1 5。

50

【 0 1 0 3 】

この構造はまた抗体またはそのフラグメント(例えば、MOR09823)との相互作用界面についての境界 H E R 3 アミノ酸残基の同定を可能にする。これらの残基は、MOR09823タンパク質 V L 鎖から 5 ~ 8 であった H E R 3 残基であり得る。境界残基は次のとおりである： A s n 2 6 6、T h r 2 6 9、A s p 5 7 1、A r g 5 8 0、A s p 5 8 1、H i s 5 8 4、P r o 5 9 0、A l a 5 9 6、P r o 5 9 9、T y r 6 0 1、T y r 6 0 3、A s p 6 0 5、G l n 6 0 7、C y s 6 1 0、A s n 6 1 6、C y s 6 1 7、C y s 6 2 1、G l y 6 2 3、P r o 6 2 4。

【 0 1 0 4 】

表 1 1 および 1 2 (MOR09823) および表 1 3 および 1 4 (MOR09825) にそれぞれ証明しており、重鎖は主に抗原結合タンパク質がエピトープ内のドメイン 2 のアミノ酸残基とおよび少ない相互作用でドメイン 4 のアミノ酸残基と結合することに関し、一方、軽鎖は、主に、エピトープのドメイン 4 内のアミノ酸残基とおよび少ない相互作用でドメイン 2 内のアミノ酸残基と結合と結合することに関する。

【 0 1 0 5 】

従って、本教示を知った当業者は、抗原結合タンパク質のどの残基および領域が、抗原結合タンパク質の H E R 3 と結合する能力を過度に阻害することなく変更できるか予測できる。

【 0 1 0 6 】

コア相互作用界面アミノ酸は、H E R 3 パートナータンパク質から 5 もしくはそれより少なくとも 1 原子少ない全アミノ酸残基であると決定された。5 は、ファンデルワールス半径 + 可能な水仲介水素結合内の原子を斟酌してコア領域カットオフ距離として選択した。境界相互作用界面アミノ酸は、H E R 3 パートナータンパク質から 8 またはそれより少なくとも 1 原子少ない、コア相互作用一覧には包含されない全アミノ酸残基と決定された。

【 0 1 0 7 】

ある態様において、MOR09823と結合し、覆い、上記残基との相互作用を阻止する抗原結合タンパク質を、H E R 3 との結合または中和に使用し得る。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、次の H E R 3 残基(配列番号 1)の少なくとも 1 個と結合または相互作用する： A s n 2 6 6、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、T h r 2 6 9、G l n 2 7 1、G l u 2 7 3、P r o 2 7 4、A s n 2 7 5、P r o 2 7 6、H i s 2 7 7、A s n 3 1 5、A s p 5 7 1、P r o 5 8 3、H i s 5 8 4、A l a 5 9 6、L y s 5 9 7。ある態様において、抗体およびそのフラグメントは、次の H E R 3 残基(配列番号 1)の少なくとも 1 個と結合または相互作用する： T y r 2 6 5、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、P h e 2 7 0、G l y 5 8 2、P r o 5 8 3、L y s 5 9 7、I l e 6 0 0、L y s 6 0 2、G l u 6 0 9、A r g 6 1 1、P r o 6 1 2、C y s 6 1 3、H i s 6 1 4、G l u 6 1 5。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、次の H E R 3 残基(配列番号 1)の少なくとも 1 個と結合または相互作用する： A s n 2 6 6、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、T h r 2 6 9、G l n 2 7 1、G l u 2 7 3、P r o 2 7 4、A s n 2 7 5、P r o 2 7 6、H i s 2 7 7、A s n 3 1 5、A s p 5 7 1、P r o 5 8 3、H i s 5 8 4、A l a 5 9 6、L y s 5 9 7、T y r 2 6 5、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、P h e 2 7 0、G l y 5 8 2、P r o 5 8 3、L y s 5 9 7、I l e 6 0 0、L y s 6 0 2、G l u 6 0 9、A r g 6 1 1、P r o 6 1 2、C y s 6 1 3、H i s 6 1 4、G l u 6 1 5。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、次の H E R 3 残基(配列番号 1)の組み合わせと結合または相互作用する： A s n 2 6 6、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、T h r 2 6 9、G l n 2 7 1、G l u 2 7 3、P r o 2 7 4、A s n 2 7 5、P r o 2 7 6、H i s 2 7 7、A s n 3 1 5、A s p 5 7 1、P r o 5 8 3、H i s 5 8 4、A l a 5 9 6、L y s 5 9 7、T y r 2 6 5、L y s 2 6 7、L e u 2 6 8、P h e 2 7 0、G l y 5 8 2、P r o 5 8 3、L y s 5 9 7、I l e 6 0 0、L y s 6 0 2、G l u 6 0 9、A r g 6 1 1、P r o 6 1 2、C y s 6 1 3、H i s 6 1 4、G l u 6 1 5。ある態様におい

10

20

30

40

50

て、抗体またはそのフラグメントbは、次のHER3残基(配列番号1)の全てと結合または相互作用する: Asn266、Lys267、Leu268、Thr269、Gln271、Glu273、Pro274、Asn275、Pro276、His277、Asn315、Asp571、Pro583、His584、Ala596、Lys597、Tyr265、Lys267、Leu268、Phe270、Gly582、Pro583、Lys597、Ile600、Lys602、Glu609、Arg611、Pro612、Cys613、His614、Glu615。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは上記残基の1個以上から5以内である。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは上記残基の1個以上から5~8である。ある態様において、抗体またはそのフラグメントは、上記残基の1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、20個、25個、30個、35個、40個、45個または50個と相互作用し、遮断し、または8以内である。

【0108】

HER3およびHER3:MOR09823の複合体の3D構造の利用可能性は、例えば、他のHER3抗体をさらに詳細に調査するフレームワークを提供する。HER3の3D構造は、あるものが細胞増殖を阻害し、あるものが刺激し、他のものは効果がないために、モノクローナル抗体についてのエピトープを位置づけ、それらの作用機序を推測することを可能にする。MOR09823に対する立体構造エピトープは、HER3のドメイン2および4に位置している。この受容体の3D構造の利用可能性は、これらの阻害剤の的確な作用機序の決定およびHER3受容体機能を妨害する新しい試みの設計を促進する。一つの態様において、本発明の抗体は、MOR09823と同じ立体構造エピトープに結合する。

【0109】

ある態様において、表1に挙げた抗体のいずれかと結合する立体構造エピトープが特に有用である。ある態様において、HER3立体構造エピトープを使用して、HER3に結合する抗体またはそのフラグメントを単離できる。ある態様において、HER3立体構造エピトープを使用して、HER3に結合する抗体またはそのフラグメントを産生できる。ある態様において、HER3立体構造エピトープをHER3立体構造エピトープと結合する抗体またはそのフラグメントを作製するための免疫原として使用できる。ある態様において、HER3立体構造エピトープを動物に投与し、HER3と結合する抗体を続いて該動物から得ることができる。

【0110】

ある態様において、抗体と接触するまたは抗体に包埋される残基を含むドメイン/領域を、HER3(例えば、野生型抗原)における特異的残基を突然変異させ、抗体またはそのフラグメントが該変異体、または変異体HER3タンパク質と結合できるかを決定するまたは野生型からの親和性変化を測定することにより同定できる。多数の個々の変異を製造することにより、結合に直接役割を有するまたは変異が抗体と抗原の結合に影響を与え得るように抗体と十分に極めて接近している残基を同定できる。これらのアミノ酸の知識から、抗体と接触するまたは抗体に覆われる残基を含む抗原(HER3)のドメインまたは領域を解明できる。既知技術、例えばアラニン走査を使用した突然変異誘発は、機能的に関連するエピトープの定義を助ける。アルギニン/グルタミン酸走査プロトコルを使用する突然変異誘発もまた使用できる(例えば、Nanevycz et al., (1995), J. Biol. Chem. 270(37):21619-21625 and Zupnick et al., (2006), J. Biol. Chem. 281(29):20464-20473 参照)。一般に、アルギニンおよびグルタミン酸は、これらのアミノ酸が荷電を有し、嵩高く、それゆえに、変異が導入される抗原の領域における抗原結合タンパク質と抗原の結合を破壊する可能性があるために、野生型ポリペプチドにおいてはアミノ酸に置換されている(典型的に個々に)。野生型抗原に存在するアルギニンはグルタミン酸に置き換える。多様なこのような個々の変異体を得て、集めた結合結果を分析して、どの残基が結合に影響するか決定できる。一連の変異体HER3抗原を創製し、この各々変異を有する変異体抗原である。種々のHER3抗体またはそのフラグメントとの各変異体HER3抗原の結合を測定し、選択した抗体またはそのフラグメントが野生型HER3(配列番号1)と結合

する能力を比較し得る。

【0111】

ここで使用する抗体またはそのフラグメントと突然変異体または変異体HER3との結合の変更(例えば減少または増加)は、結合親和性(例えば、既知方法、例えば下記実施例に記載するBiacore試験またはビーズベースのアッセイで測定して)、 EC_{50} における変化および/または抗原結合タンパク質の総結合能(例えば、抗原結合タンパク質濃度対抗原濃度のプロットにおける B_{max} の減少により証明される)における変化(例えば減少)があることを意味する。結合の顕著な変更は、変異残基が抗体またはそのフラグメントへの結合に関与していることを示す。

【0112】

ある態様において、結合の顕著な減少は、抗体またはそのフラグメントと変異体HER3抗原の間の結合親和性、 EC_{50} および/または能力が抗体またはそのフラグメントと野生型HER3(例えば、配列番号1)の結合に対して10%を超えて、20%を超えて、40%を超えて、50%を超えて、55%を超えて、60%を超えて、65%を超えて、70%を超えて、75%を超えて、80%を超えて、85%を超えて、90%を超えてまたは95%を超えて減少していることを意味する。

【0113】

ある態様において、抗体またはそのフラグメントの結合は、野生型HER3タンパク質(例えば、配列番号1)と比較して1箇所以上(例えば、1箇所、2箇所、3箇所、4箇所、5箇所、6箇所、7箇所、8箇所、9箇所、10箇所またはそれ以上)の変異を有する変異体HER3タンパク質に対して顕著に減少または増加している。

【0114】

変異体形態は、配列番号1に示す野生型配列を参照して述べているが、当然であるが、HER3の対立遺伝子またはスプライス変異体において、アミノ酸は異なり得る。このようなHER3の対立遺伝子形質について顕著に変更された結合(例えば、低いまたは高い結合)を示す抗体またはそのフラグメントも意図される。

【0115】

抗体の一般的構造的側面に加えて、パラトープとエプトープの間のより特異的な相互作用を構造的手法を介して試験し得る。一つの態様において、CDRの構造はパラトープに寄与し、これを介して抗体はエプトープに結合できる。このようなパラトープの形態は多くの方法で決定し得る。伝統的構造的試験手法、例えばNMRまたはx線結晶学を使用できる。これらの手法はパラトープ単独またはエプトープに結合中の形を試験できる。あるいは、分子モデルをインシリコで作成し得る。構造を、商用パッケージ、例えばAccelrys(San Diego, Calif.)のInsightIIモデリングパッケージの助けを借りて相同性モデリングを介して作成し得る。要約すれば、既知構造のタンパク質のデータベース、例えばProtein Data Bankに対して検索するために試験すべき抗体の配列を使用できる。既知構造との相同タンパク質を同定したら、これらの相同タンパク質をモデリング鋳型として使用する。可能な鋳型の各々を整列し、そうして、鋳型の構造に基づく配列整列を作成できる。未知構造の抗体の配列を、次いで、これらの鋳型と整列させて、未知構造を有する抗体の分子モデルを作成できる。当業者に認識されたとおり、このような構造をインシリコで作成する多くの代替法があり、このいずれも使用し得る。例えば、QUANTA(Polygen Corp., Waltham, Mass.)およびCHARM(Brooks et al., (1983), J. Comp. Chem. 4:187)を用いる米国特許番号5,958,708として発行されたHardman et al.に記載のものに準じる方法を使用し得る(引用によりその全体を本明細書に包含させる)。

【0116】

パラトープの形が、可能なパラトープがエプトープと結合するか、そしてどのように結合するかを決定するだけでなく、エプトープとパラトープの間の相互作用それ自体も変異体抗体の設計における大きな情報源である。当業者には認識されたとおり、この相互作用を試験できる多様な方法がある。ひとつの方法は、おそらく上記のとおり作成した構造的モデルを使用し、次いで、とりわけ、パラトープとそのエプトープの間の立体構造および

10

20

30

40

50

方向性空間のMonte Carloサーチの実施を可能にするドッキングモジュールを有する例えばInsightII(Accelrys, San Diego, Calif.)を使用する。結果は、エピトープがパラトープとどこでどのように相互作用するかを推測できるものである。一つの態様において、エピトープの一つのフラグメントまたは変異体のみを使用して対応する相互作用の決定を助ける。一つの態様において、エピトープ全体を、パラトープとエピトープの間の相互作用のモデリングに使用する。

【0117】

これらのモデル構造を使用して、どの残基がエピトープとパラトープの間の相互作用に最も重要であるか予測できる。それゆえに、一つの態様において、どの残基を、抗体の結合特徴を変えるために変化させるかを容易に選択できる。例えば、ドッキングモデルから、パラトープのある残基の側鎖は、エピトープの結合を立体的に障害し、それゆえに、これらの残基の小さな側鎖を有する残基への変更が有利である可能性があることは明らかである。これを多くの方法で決定できる。例えば、2個のモデルを単に調査し、官能基および接近状態に基づき相互作用を推定し得る。あるいは、より有利なエネルギー相互作用を得るために、上記のとおりエピトープとパラトープの反復対合を行い得る。また、抗体がエピトープと結合し得る、別の方法で決定するために、抗体の多様な変異体のこれらの相互作用も決定できる。また、所望である特定の特徴を有する抗体を得るために、抗体の構造をどのように変えるべきかを決定するための多様なモデルを組み合わせることができる。

【0118】

上で決定したモデルを種々の技術により試験できる。例えば、相互作用エネルギーを、どの変異体をさらに試験すべきかを決定するために上記プログラムで決定できる。また、クーロン力およびファンデルワールス相互作用を使用して、エピトープと変異体パラトープの相互作用エネルギーを決定できる。また部位特異的突然変異誘発を使用して、抗体構造における予測した変化が、実際結合特徴における所望の変化をもたらすかに使用する。あるいは、モデルが正しいことを確認し、またはパラトープとエピトープの間で起こり得る一般的結合テーマを決定するために、エピトープを変化させ得る。

【0119】

当業者に認識されるとおり、これらのモデルは本態様の抗体およびその変異体の製造に必要なガイダンスを提供するが、おそらく、インビトロを介する、インシリコモデルの日常的試験の実施がなお望ましいことがある。さらに、当業者に明らかとなり、修飾はまた抗体の活性に付加的副作用を有し得る。例えば、結合を強くすると予測される何らかの変更が、大きな結合を誘発し得るが、また抗体の活性を減少または変更する他の構造的変化も起こし得る。これが当てはまるか否かの決定は当分野で日常的であり、多くの方法で達成できる。例えば、活性を、ELISA試験を介して試験できる。あるいは、サンプルを、表面プラズモン共鳴デバイスの使用を介して試験できる。

【0120】

HER3抗体

本発明は、HER3の立体構造エピトープを認識する抗体を提供する。本発明は、HER3に対する一群の抗体がリガンド依存性およびリガンド非依存性HER3シグナル伝達経路のいずれも遮断できるとの驚くべき発見に基づく。HER3の特定の立体構造エピトープと結合する一群の抗体を表1に開示する。一つの態様において、抗体はリガンド依存性およびリガンド非依存性HER3シグナル伝達の両者を阻害する。他の態様において、抗体はHER3と結合し、リガンド結合部位へのHER3リガンド結合を遮断しない(すなわちリガンドおよび抗体の両者が同時にHER3に結合できる)。

【0121】

本発明は、HER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)と特異的に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号15、33、51、69、87、105、123、141、159、177、195、213、231、249、267、285、303、321、339、357および375のアミノ酸配列を有するVHドメインを含む。本発明は、HER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルH

10

20

30

40

50

HER3)と特異的に結合する抗体を提供し、該抗体は、配列番号14、32、50、68、86、104、122、140、158、176、194、212、230、248、266、284、302、320、338、356および374のアミノ酸配列を有するVLDメインを含む。本発明はまたHER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)と特異的に結合する抗体を提供し、該抗体は、下記表1に挙げたVH CDRのいずれか一つのアミノ酸配列を有するVH CDRを含む。特に、本発明は、HER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)と特異的に結合する抗体を提供し、該抗体は、下記表1に挙げたVH CDRのいずれか一つのアミノ酸配列を有する1個、2個、3個、4個、5個またはそれ以上のVH CDRを含む(あるいは、これらから成る)。

10

【0122】

本発明の他の抗体は、CDR領域において変異されているが、表1に記載する配列に示すCDR領域と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%同一性を有するアミノ酸を含む。ある態様において、表1に記載する配列に示すCDR領域と比較したとき、CDR領域において1個、2個、3個、4個または5個を超えないアミノ酸が変異されているが、なお元の抗体のエピトープへの特異性を維持する変異アミノ酸配列を含む。

【0123】

本発明の他の抗体は、フレームワーク領域において変異されているが、表1に記載する配列に示すフレームワーク領域と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%同一性を有するアミノ酸を有する。ある態様において、表1に記載する配列に示すフレームワーク領域と比較したときフレームワーク領域において1個、2個、3個、4個、5個、6個または7個を超えないアミノ酸が変異されているが、なお元の抗体のエピトープへの特異性を維持する変異アミノ酸配列を含む。本発明はまた、HER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)と特異的に結合する抗体のVH、VL、完全長重鎖および完全長軽鎖をコードする核酸配列も提供する。

20

【0124】

本発明のHER3抗体は、HER3のドメイン2およびドメイン4からのアミノ酸残基を含むHER3の立体構造エピトープと結合する。

【0125】

30

【表 1】

表 1：本発明のHER3抗体の例

配列番号	Ab 領域	
MOR09823		
配列番号 2 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 3 (Kabat)	HCDR2	VTGAVGRYYPDVSKG
配列番号 4 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 5 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 6 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 7 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 8 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 9 (Chothia)	HCDR2	GAVGR
配列番号 10 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 11 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 12 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号(Chothia) 13	LCDR3	YSSFPTT
配列番号 14	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPTTFGQGTKEIK
配列番号 15	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG RTYYPDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWGQGT LVTVSS
配列番号 16	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGATCGTG TGACCATACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATGGTGCTTCTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTACGCGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTA
配列番号 17	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGCGCCTGCTGCAACCGGGGCGAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAAGCCCTGGGAAGGCTCTCGAGTGGGTGAGCGTTACTGGTGCTGTTGGT CGTACTTATTATCCTGATCTGTAAAGGTCGTTTACCATTTCACGTGATAATT CGAAAAACACCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGT GTATTATTGCGCGCTTGGGTGATGAGGTTTGTATTTGGGGCCAAAGGCACC CTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 18	軽カ ² β ²	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFPTTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPKAKVQWVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 19	重 IgG1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG RTYYPDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD KTHCTPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
MOR09824		
配列番号 20 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 21 (Kabat)	HCDR2	VISAWGHVKYYADSVKG
配列番号 22 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 23 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 24 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 25 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT

10

20

30

40

【表 2】

配列番号 26 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 27 (Chothia)	HCDR2	SAWGHV
配列番号 28 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 29 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 30 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 31 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 32	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQGTKEIK
配列番号 33	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWGQGTTLVTSS
配列番号 34	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTGTGACCATTAACGTCAGAGCGAGCCAGGGTATTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGTAAGCACCAGAACTATTAATTTATGGTCTTCTTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTATAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATGCGCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAA
配列番号 35	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGATTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCTGGGAAGGCTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATTTCTGCTTGGGGT CATGTTAAGTATTATGCTGATTCTGTTAAGGTCGTTTACCATTTCACGTGATA ATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC CGTGATATTATGCGCGCTTGGGGTGATGAGGTTTGTATATTGGGGCCAAGGC ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 36	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 37	重 IgG1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISAWGHVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWGQGT TLVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNYTKS LSLSPGK
MOR09825		
配列番号 38 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 39 (Kabat)	HCDR2	AINSQGKSTYYADSVKG
配列番号 40 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 41 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 42 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 43 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 44 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 45 (Chothia)	HCDR2	NSQGKS
配列番号 46 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 47 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 48 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 49 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 50	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQGTKEIK

【 0 1 2 6 】

【表 3】

配列番号 51	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGG KSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSS
配列番号 52	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGATCGTG TGACCATTAACGTCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGTAAGCACCCGAACTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAA
配列番号 53	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGCTATTAAATCTCAGGGT AAGTCTACTTATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTTCACGTGATA ATTGCAAAACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC CGTGATTATTGCGCGGCTGGGGTGATGAGGGTTTGTATTTGGGGCCAAGGC ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 54	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQYSSFPPTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 55	重 IgG1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGG KSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR09974		
配列番号 56 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 57 (Kabat)	HCDR2	VINPSGNFTNYADSVKG
配列番号 58 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 59 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 60 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 61 (Kabat)	LCDR3	QYSSFPPT
配列番号 62 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 63 (Chothia)	HCDR2	NPSGNF
配列番号 64 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 65 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 66 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 67 (Chothia)	LCDR3	YSSFPPT
配列番号 68	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQYSSFPPTFGQGTKEIK
配列番号 69	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVINPSG NFTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSS
配列番号 70	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGATCGTG TGACCATTAACGTCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGTAAGCACCCGAACTATTAATTTATGGTGCTTCTTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTTCAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAA

10

20

30

40

【表 4】

配列番号 71	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATTAATCCTTCTGGT AATTTTACTAATTATGCTGATTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTTCACGTGATA ATTCGAAAAACACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTTGGGGTGATGAGGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGC ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 72	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIIPPDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 73	重 IgG1	QVQLVDSGSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVINPSG NFTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWGGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10452		
配列番号 74 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 75 (Kabat)	HCDR2	NTSPIGYTTYAGSVKG
配列番号 76 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 77 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 78 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 79 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPFT
配列番号 80 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 81 (Chothia)	HCDR2	SPIGY
配列番号 82 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 83 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 84 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 85 (Chothia)	LCDR3	YSSFPFT
配列番号 86	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTFGQGTKEIK
配列番号 87	VH	QVQLVDSGSGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVNTSPIG YTTYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWGGQT LVTVSS
配列番号 88	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGTGATCGTG TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATGGTGCTTCTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAA
配列番号 89	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCAATACTTCTCCTATTGGT TATACTTATTATGCTGGTTCTGTTAAGGGTCGTTTACCATTTCACGTGATAATT CGAAAAACACCCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGT GTATTATTGCGCGCGTTGGGGTGATGAGGGTTTTGATATTTGGGGCCAAGGCACC CTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 90	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPFTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIIPPDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEA

【 0 1 2 7 】

【表 5】

配列番号 91	重鎖 (VHおよびCH1ド メインのみ)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSNTSPIG YTTYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS
MOR10701		
配列番号 92 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 93 (Kabat)	HCDR2	VTGAVGRSTIYPDSVKG
配列番号 94 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 95 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 96 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 97 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 98 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 99 (Chothia)	HCDR2	GAVGRS
配列番号 100 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 101 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 102 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 103 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 104	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGTKVEIK
配列番号 105	VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSNTGAVG RSTIYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGT TLVTVSS
配列番号 106	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGCAGAG TGACCATCACCTGTGCGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTTACCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTGGAATCAAG
配列番号 107	DNA VH	GAGGTGCAATGTGCTGGAAGCGGCGGAGGCCTGGTGAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACAGGCGCGTGGGC AGAAGCACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 108	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYISLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 109	重 IgG1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSNTGAVG RSTIYPDSVKGRTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGT TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKHTHTCPFCPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWKVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10702		
配列番号 110 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 111 (Kabat)	HCDR2	VISAWGHVKYYADSVKG
配列番号 112 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 113 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 114 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS

10

20

30

40

【表 6】

配列番号 115 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 116 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 117 (Chothia)	HCDR2	SAWGHV
配列番号 118 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 119 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 120 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 121 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 122	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGTKVEIK
配列番号 123	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISAWG HVKEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWDGQ TLVTVSS
配列番号 124	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCTGGGCGCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGTTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGTGGAAATCAAG
配列番号 125	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGCGGAGCCTGA GACTGTCTTGGCGCGCAGCGGCTTCACTTCAGCAGCTAGCCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGCTGGGGC CACGTGAAGTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCTTGCTCACCGTCAGCTCA
配列番号 126	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 127	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISAWG HVKEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWDEGFDIWDGQ TLVTVSSASTKGFSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSC DKHTCTCPCPAPELLEGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTKQS LSLSPGK
MOR10703		
配列番号 128 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 129 (Kabat)	HCDR2	AINSQGKSTYYADSVKG
配列番号 130 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 131 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 132 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 133 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 134 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 135 (Chothia)	HCDR2	NSQGKS
配列番号 136 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 137 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 138 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 139 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT

【 0 1 2 8 】

【表 7】

配列番号 140	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGTKVEIK
配列番号 141	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAINSGG KSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSS
配列番号 142	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTGCGGGCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCCGCAAGGCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGCGGTGCCAAGCAGATTACGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
配列番号 143	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCAACAGCCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACCCTGTACTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCTGGTCCCGTCAGCTCAGCTCA
配列番号 144	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 145	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAINSGG KSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEKSC DKHTCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10703 N52S		
配列番号 146 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 147 (Kabat)	HCDR2	AI <u>S</u> QGKSTYYADSVKG
配列番号 148 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 149 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 150 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 151 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPFT
配列番号 152 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 153 (Chothia)	HCDR2	<u>S</u> SQGKS
配列番号 154 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 155 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 156 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 157 (Chothia)	LCDR3	YSSFPFT
配列番号 158	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGTKVEIK
配列番号 159	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAIN <u>S</u> SGG KSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSS

10

20

30

40

【表 8】

配列番号 160	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGGGGCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
配列番号 161	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGCTGTCTGCGCCGCGCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCAGCCAGGGCAAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACTCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGCGCAGAGGGCTTCGACATCTGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 162	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 163	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI <u>SSQ</u> GKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTEFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHLEALHNHYTQKSLSLSPGK
MOR10703 N52G		
配列番号 164 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 165 (Kabat)	HCDR2	AI <u>GSQ</u> GKSTYYADSVKG
配列番号 166 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 167 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 168 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 169 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPFT
配列番号 170 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 171 (Chothia)	HCDR2	<u>GSQ</u> GKS
配列番号 172 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 173 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 174 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 175 (Chothia)	LCDR3	YSSFPFT
配列番号 176	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPFTFGQGTKEIK
配列番号 177	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI <u>GSQ</u> GKSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGLVTVSS
配列番号 178	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGGGGCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

【表 9】

配列番号 179	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCGGCAGCCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCCTGTACTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 180	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 181	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIGSQG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10703 N52S_S52aN		
配列番号 182 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 183 (Kabat)	HCDR2	AI <u>SN</u> QGKSTYYADSVKG
配列番号 184 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 185 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 186 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 187 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 188 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 189 (Chothia)	HCDR2	<u>SN</u> QGKS
配列番号 190 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 191 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 192 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 193 (Chothia)	LCDR3	YSSFPPT
配列番号 194	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 195	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAI <u>SN</u> QG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSS
配列番号 196	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTACGGCGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

10

20

30

40

【表 10】

配列番号 197	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCAACCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 198	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 199	重 IgG1	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISNQG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTKQS LSLSPGK
MOR10703 A50V_N52S		
配列番号 200 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 201 (Kabat)	HCDR2	<u>V</u> ISQGGKSTYYADSVKG
配列番号 202 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 203 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 204 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 205 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 206 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 207 (Chothia)	HCDR2	<u>S</u> SQGKS
配列番号 208 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 209 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 210 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 211 (Chothia)	LCDR3	YSSFPPT
配列番号 212	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 213	VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS <u>V</u> ISQGG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSS
配列番号 214	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTGAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

【表 1 1】

配列番号 215	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTCTCAGCAGCCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCTTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 216	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 217	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS YIS QGG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKS LSLSPGK
MOR10703 A50V_N52G		
配列番号 218 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 219 (Kabat)	HCDR2	YIS QGGKSTYYADSVKG
配列番号 220 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 221 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 222 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 223 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 224 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 225 (Chothia)	HCDR2	GS QGKS
配列番号 226 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 227 (Chothia)	LCDR1	SGQGISNW
配列番号 228 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 229 (Chothia)	LCDR3	YSSFPPT
配列番号 230	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 231	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS YIS QGG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSS
配列番号 232	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTACGGCGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

10

20

30

40

【表 1 2】

配列番号 233	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTTCATCGGCAGCCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 234	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 235	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS VI GSQG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT SVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10703 S52aA		
配列番号 236 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 237 (Kabat)	HCDR2	AIN A QGKSTYYADSVKG
配列番号 238 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 239 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 240 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 241 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 242 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 243 (Chothia)	HCDR2	NA A QGKS
配列番号 244 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 245 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 246 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 247 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 248	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 249	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIN A QG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSS
配列番号 250	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTGCGGGCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTACCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

【 0 1 3 1 】

10

20

30

40

【表 13】

配列番号 251	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCAACGCCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 252	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 253	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINAQQG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10703 S52aT		
配列番号 254 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 255 (Kabat)	HCDR2	AIN <u>T</u> QGKSTYYADSVKG
配列番号 256 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 257 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 258 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 259 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 260 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 261 (Chothia)	HCDR2	N <u>T</u> QGKS
配列番号 262 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 263 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 264 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 265 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 266	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 267	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIN <u>T</u> QG KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSS
配列番号 268	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTGGGCGAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTACCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

10

20

30

40

【表 1 4】

配列番号 269	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCAACACCCAGGGC AAGAGCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 270	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIIPPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 271	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAIN <u>TQ</u> KSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10701 R55S		
配列番号 272 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 273 (Kabat)	HCDR2	VTGAVG <u>S</u> STYYPDSVKG
配列番号 274 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 275 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 276 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 277 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 278 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 279 (Chothia)	HCDR2	GAVG <u>SS</u>
配列番号 280 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 281 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 282 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 283 (Chothia)	LCDR3	YSSFPPT
配列番号 284	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 285	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSVTGAVG <u>S</u> STYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGGG TLVTVSS
配列番号 286	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG
配列番号 287	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTGGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACAGGCGCGCTGGGC AGCAGCACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 288	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIIPPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【表 15】

配列番号 289	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG STYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10701 R55G		
配列番号 290 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 291 (Kabat)	HCDR2	VTGAVG <u>g</u> STYYPDSVKG
配列番号 292 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 293 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 294 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 295 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 296 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 297 (Chothia)	HCDR2	GAVG <u>g</u> S
配列番号 298 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 299 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 300 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 301 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 302	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQGTKEIK
配列番号 303	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG <u>g</u> STYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSS
配列番号 304	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCAGGCATCAGCAACTGGCTGGCTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACCACTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
配列番号 305	DNA VH	GAGGTGCAATGTCTGGAAAGCGGCGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCGCCGCGCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGACTGGAATGGTGTCCGTGACAGGCGCGTGGGC GGAAGCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGCCCGGTTACCATCAGCCGGGACA ACAGCAAGAACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGC CGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 306	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPKGAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPITFGQGTKEIKRTV AAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 307	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG <u>g</u> STYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR10701 R55K		
配列番号 308 (Kabat)	HCDR1	SYAMS

10

20

30

40

【表 16】

配列番号 309 (Kabat)	HCDR2	VTGAVG <u>K</u> STYYPDSVKG
配列番号 310 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 311 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 312 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 313 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 314 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 315 (Chothia)	HCDR2	GAVG <u>K</u> S
配列番号 316 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 317 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 318 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 319 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 320	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGGQGTKVEIK
配列番号 321	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG <u>K</u> STYYPDSVKGRTTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGTLVTVSS
配列番号 322	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTGGGGCCAGCCAGGGCATCAGCAACTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAGAGCGGCGTGCCAAGCAGATTGAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAGCTTCCCCACCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
配列番号 323	DNA VH	GAGGTGCAATGTCTGGAAAGCGGCGGAGGCGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTGCGCCGCGCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCCTGGCAAGGACTGGAATGGTGTCCGTGACAGCGCCGCTGGGC AAAAGCACCTACTACCCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 324	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPTTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 325	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG <u>K</u> STYYPDSVKGRTTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
MOR10701 欠失 S56		
配列番号 326 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 327 (Kabat)	HCDR2	VTGAVGRYYYPDSVKG
配列番号 328 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 329 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 330 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 331 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPTT
配列番号 332 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 333 (Chothia)	HCDR2	GAVGRT
配列番号 334 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 335 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW

【表 17】

配列番号 336 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 337 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 338	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 339	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG RTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGT LVTVSS
配列番号 340	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG TGACCATCACCTGTGCGGCCAGCCAGGCGATCAGCAACTGGCTGGCTGGTATCA GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCTCCCTGCAG AGCGGCGTGCCAAGCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAG CAGCTTCCCCACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAG
配列番号 341	DNA VH	GAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGA GACTGTCTTGCCTGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGT CCGCCAGGCCCTTGCAAGGACTGGAATGGGTGTCCGTGACAGCGCCGTGGGC AGAACCTACTACCCGACAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCAGCCGGGACAACA GCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGTGCCAGATGGGGCGACGAGGCTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTCAGCTCA
配列番号 342	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
配列番号 343	重 IgG1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVTGAVG RTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCD KTHHTCPPCPAPELGGPSVLEFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
MOR12609		
配列番号 344 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 345 (Kabat)	HCDR2	VINGLGYTTFYADSVKG
配列番号 346 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 347 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 348 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 349 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFPPT
配列番号 350 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 351 (Chothia)	HCDR2	NGLGYT
配列番号 352 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 353 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 354 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 355 (Chothia)	LCDR3	YSSFPT
配列番号 356	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQYSSFPPTFGQGTKVEIK
配列番号 357	VH	QVQLVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVINGLG YTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLTVSS

10

20

30

40

【表 18】

配列番号 358	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGATCGTG TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATGGTCTTCTTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTACGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAA
配列番号 359	DNA VH	CAGGTGCAATTTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGAACCGGGCGGCGAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATTAATGGTCTTGGT TATACTACTTTTTATGCTGATTCTGTAAAGGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATA ATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGC CGTGTATTATTGCGCGCGTTGGGGTGATGAGGGTTTTGATATTGGGGCCAAGGC ACCCTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 360	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFTTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 361	重 IgG1	QVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSVINGLG YTTFYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
MOR12610		
配列番号 362 (Kabat)	HCDR1	SYAMS
配列番号 363 (Kabat)	HCDR2	GTGPGYGGTYYPDSVKG
配列番号 364 (Kabat)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 365 (Kabat)	LCDR1	RASQGISNWL
配列番号 366 (Kabat)	LCDR2	GASSLQS
配列番号 367 (Kabat)	LCDR3	QQYSSFTT
配列番号 368 (Chothia)	HCDR1	GFTFSSY
配列番号 369 (Chothia)	HCDR2	GPYGG
配列番号 370 (Chothia)	HCDR3	WGDEGFDI
配列番号 371 (Chothia)	LCDR1	SQGISNW
配列番号 372 (Chothia)	LCDR2	GAS
配列番号 373 (Chothia)	LCDR3	YSSFTT
配列番号 374	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQYSSFTTFGQGTKEIK
配列番号 375	VH	QVQLVESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGTGPYG GTYYPDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGDEGFDIWGQGT LTVVSS
配列番号 376	DNA VL	GATATCCAGATGACCCAGAGCCCGTCTAGCCTGAGCGGAGCGTGGGTGATCGTG TGACCATTACCTGCAGAGCGAGCCAGGGTATTTCTAATTGGCTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGTAAAGCACCGAACTATTAATTTATGGTCTTCTTCTTTGCAA AGCGGGGTCCCGTCCCGTTTACGCGGCTCTGGATCCGGCACTGATTTTACCCTGA CCATTAGCAGCCTGCAACCTGAAGACTTTGCGGTTTATTATTGCCAGCAGTATTC TTCTTTTCTACTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTTGAAATTAAA

【 0 1 3 4 】

10

20

30

40

【表 19】

配列番号 377	DNA VH	CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGCCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCCTGC GTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTTACCTTTAGCAGCTATGCGATGAGCTGGGT GCGCCAAGCCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTACTGGTCTTATGGT GGTACTTATTATCCTGATTCTGTTAAGGTCGTTTTACCATTTCACGTGATAATT CGAAAAACACCCGTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGGCCGT GTATTATTGCGCGCGTTGGGGTGATGAGGGTTTTGATATTGGGGCCAAGGCACC CTGGTGACGGTTAGCTCA
配列番号 378	軽カッパ	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQ SGVPSRFGSGSGSDFTLTISLQPEDEAVYYCQQYSSFPFTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 379	重 IgG1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGTGPYG GTYYPDSVKGREFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGEDGFDIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNMSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCD KTHHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK

10

【0135】

本発明の他の抗体は、アミノ酸または該アミノ酸をコードする核酸は変異されているが、表 1 に記載する配列と少なくとも 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98% および 99% 同一性を有するものを含む。ある態様において、表 1 に記載する配列に示す可変領域と比較したとき可変領域において 1 個、2 個、3 個、4 個または 5 個を超えないアミノ酸が変異されているが、実質的に同じ治療活性を維持する変異アミノ酸配列を含む。

20

【0136】

これらの抗体またはそのフラグメントの各々が H E R 3 に結合できるため、V H、V L、完全長軽鎖および完全長重鎖配列(アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列)は、他の本発明の H E R 3 結合抗体を創製するために“混合および整合”させ得る。このような“混合および整合”した H E R 3 結合抗体を、当分野で知られた結合アッセイ(例えば、E L I S A および実施例セクションに記載する他のアッセイ)を使用して試験できる。これらの鎖を混合および整合するとき、特定の V H / V L 対合からの V H 配列を、構造的に類似する V H 配列と置き換えなければならない。同様に特定の完全長重鎖 / 完全長軽鎖対合からの完全長重鎖配列を、構造的に類似する完全長重鎖配列と置き換えなければならない。同様に、特定の V H / V L 対合からの V L 配列を、構造的に類似する V L 配列と置き換えなければならない。同様に特定の完全長重鎖 / 完全長軽鎖対合からの完全長軽鎖配列を、構造的に類似する完全長軽鎖配列と置き換えなければならない。従って、一つの面において、本発明は、配列番号 15、33、51、69、87、105、123、141、159、177、195、213、231、249、267、285、303、321、339、357 および 375 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および配列番号 14、32、50、68、86、104、122、140、158、176、194、212、230、248、266、284、302、320、338、356 および 374 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する単離モノクローナル抗体またはそのフラグメントを提供し、ここで、該抗体は H E R 3 (例えば、ヒトおよび / またはカニクイザル)に特異的に結合する。

30

40

【0137】

他の面において、本発明は、表 1 に記載する重鎖および軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 またはこれらの組み合わせを含む H E R 3 結合抗体を提供する。抗体の V H C D R 1 のアミノ酸配列は配列番号 2、8、20、26、38、44、56、62、74、80、92、98、110、116、128、134、146、152、164、170、182、188、200、206、218、224、236、242、254、260、272、278、290、296、308、314、326、332、344、350

50

、362および368に示す。抗体のVH CDR2のアミノ酸配列は配列番号3、9、21、27、39、45、57、63、75、81、93、99、111、117、129、135、147、153、165、171、183、189、201、207、219、225、237、243、255、261、273、279、291、297、309、315、327、333、345、351、363および369に示す。抗体のVH CDR3のアミノ酸配列は配列番号4、10、22、28、40、46、58、64、76、82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364および370に示す。抗体のVL CDR1のアミノ酸配列は配列番号5、11、23、29、41、47、59、65、77、83、95、101、113、119、131、137、149、155、167、173、185、191、203、209、221、227、239、245、257、263、275、281、293、299、311、317、329、335、347、353、365および371に示す。抗体のVL CDR2のアミノ酸配列は配列番号6、12、24、30、42、48、60、66、78、84、96、102、114、120、132、138、150、156、168、174、186、192、204、210、222、228、240、246、258、264、276、282、294、300、312、318、330、336、348、354、366および372に示す。抗体のVL CDR3のアミノ酸配列は配列番号7、13、25、31、43、49、61、67、79、85、97、103、115、121、133、139、151、157、169、175、187、193、205、211、223、229、241、247、259、265、277、283、295、301、313、319、331、337、349、355、367および373に示す。CDR領域はKabatシステムを使用して描かれる(Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342: 877-883; およびAl-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273, 927-948)。

【0138】

具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号2の重鎖可変領域CDR1；配列番号3のCDR2；配列番号4のCDR3；配列番号5の軽鎖可変領域CDR1；配列番号6のCDR2；および配列番号7のCDR3を含む。

【0139】

具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号20の重鎖可変領域CDR1；配列番号21のCDR2；配列番号22のCDR3；配列番号23の軽鎖可変領域CDR1；配列番号24のCDR2；および配列番号25のCDR3を含む。

【0140】

具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号38の重鎖可変領域CDR1；配列番号39のCDR2；配列番号40のCDR3；配列番号41の軽鎖可変領域CDR1；配列番号42のCDR2；および配列番号43のCDR3を含む。

【0141】

具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号56の重鎖可変領域CDR1；配列番号57のCDR2；配列番号58のCDR3；配列番号59の軽鎖可変領域CDR1；配列番号60のCDR2；および配列番号61のCDR3を含む。

【0142】

具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号74の重鎖可変領域CDR1；配列番号75のCDR2；配列番号76のCDR3；配列番号77の軽鎖可変領域C

10

20

30

40

50

D R 1 ; 配列番号 7 8 の C D R 2 ; および配列番号 7 9 の C D R 3 を含む。

【 0 1 4 3 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 9 2 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 9 3 の C D R 2 ; 配列番号 9 4 の C D R 3 ; 配列番号 9 5 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 9 6 の C D R 2 ; および配列番号 9 7 の C D R 3 を含む。

【 0 1 4 4 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 1 0 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 1 1 の C D R 2 ; 配列番号 1 1 2 の C D R 3 ; 配列番号 1 1 3 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 1 4 の C D R 2 ; および配列番号 1 1 5 の C D R 3 を含む。

10

【 0 1 4 5 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 2 8 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 2 9 の C D R 2 ; 配列番号 1 3 0 の C D R 3 ; 配列番号 1 3 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 3 2 の C D R 2 ; および配列番号 1 3 3 の C D R 3 を含む。

【 0 1 4 6 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 4 6 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 4 7 の C D R 2 ; 配列番号 1 4 8 の C D R 3 ; 配列番号 1 4 9 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 5 0 の C D R 2 ; および配列番号 1 5 1 の C D R 3 を含む。

【 0 1 4 7 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 6 4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 6 5 の C D R 2 ; 配列番号 1 6 6 の C D R 3 ; 配列番号 1 6 7 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 6 8 の C D R 2 ; および配列番号 1 6 9 の C D R 3 を含む。

20

【 0 1 4 8 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 8 2 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 8 3 の C D R 2 ; 配列番号 1 8 4 の C D R 3 ; 配列番号 1 8 5 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 1 8 6 の C D R 2 ; および配列番号 1 8 7 の C D R 3 を含む。

【 0 1 4 9 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 0 0 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 0 1 の C D R 2 ; 配列番号 2 0 2 の C D R 3 ; 配列番号 2 0 3 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 0 4 の C D R 2 ; および配列番号 2 0 5 の C D R 3 を含む。

30

【 0 1 5 0 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 1 8 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 1 9 の C D R 2 ; 配列番号 2 2 0 の C D R 3 ; 配列番号 2 2 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 2 2 の C D R 2 ; および配列番号 2 2 3 の C D R 3 を含む。

【 0 1 5 1 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 3 6 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 3 7 の C D R 2 ; 配列番号 2 3 8 の C D R 3 ; 配列番号 2 3 9 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 4 0 の C D R 2 ; および配列番号 2 4 1 の C D R 3 を含む。

40

【 0 1 5 2 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 5 4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 5 5 の C D R 2 ; 配列番号 2 5 6 の C D R 3 ; 配列番号 2 5 7 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 5 8 の C D R 2 ; および配列番号 2 5 9 の C D R 3 を含む。

【 0 1 5 3 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 7 2 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 7 3 の C D R 2 ; 配列番号 2 7 4 の C D R 3 ; 配列番号 2 7 5 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 7 6 の C D R 2 ; および配列番号 2 7 7 の C D R 3 を含む。

50

【 0 1 5 4 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 9 0 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 9 1 の C D R 2 ; 配列番号 2 9 2 の C D R 3 ; 配列番号 2 9 3 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 2 9 4 の C D R 2 ; および配列番号 2 9 5 の C D R 3 を含む。

【 0 1 5 5 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 0 8 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 0 9 の C D R 2 ; 配列番号 3 1 0 の C D R 3 ; 配列番号 3 1 1 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 1 2 の C D R 2 ; および配列番号 3 1 3 の C D R 3 を含む。

10

【 0 1 5 6 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 2 6 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 2 7 の C D R 2 ; 配列番号 3 2 8 の C D R 3 ; 配列番号 3 2 9 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 3 0 の C D R 2 ; および配列番号 3 3 1 の C D R 3 を含む。

【 0 1 5 7 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 4 4 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 4 5 の C D R 2 ; 配列番号 3 4 6 の C D R 3 ; 配列番号 3 4 7 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 4 8 の C D R 2 ; および配列番号 3 4 9 の C D R 3 を含む。

20

【 0 1 5 8 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 6 2 の重鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 6 3 の C D R 2 ; 配列番号 3 6 4 の C D R 3 ; 配列番号 3 6 5 の軽鎖可変領域 C D R 1 ; 配列番号 3 6 6 の C D R 2 ; および配列番号 3 6 7 の C D R 3 を含む。

【 0 1 5 9 】

具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 5 の V H および配列番号 1 4 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 3 の V H および配列番号 3 2 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 5 1 の V H および配列番号 5 0 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 6 9 および配列番号 6 8 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 8 7 の V H および配列番号 8 6 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 0 5 の V H および配列番号 1 0 4 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 2 3 の V H および配列番号 1 2 2 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 4 1 の V H および配列番号 1 4 0 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 5 9 の V H および配列番号 1 5 8 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 7 7 の V H および配列番号 1 7 6 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 1 9 5 の V H および配列番号 1 9 4 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 1 3 の V H および配列番号 2 1 2 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 3 1 の V H および配列番号 2 3 0 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 4 9 の V H および配列番号 2 4 8 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 6 7 の V H および配列番号 2 6 6 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 2 8 5 の V H および配列番号 2 8 4 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 0 3 の V H および配列番号 3 0 2 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 2 1 の V H および配列番号 3 2 0 の V L を含む。具体的態様において、H E R 3 に結合する抗体は、配列番号 3 3 9 の V

30

40

50

Hおよび配列番号338のVLを含む。具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号357のVHおよび配列番号356のVLを含む。具体的態様において、HER3に結合する抗体は、配列番号375のVHおよび配列番号374のVLを含む。一つの態様において、HER3抗体はアンタゴニスト抗体である。ある態様において、HER3に結合する抗体は、表1に記載する抗体である。

【0160】

ここで使用する、ヒト抗体は、抗体の可変領域または完全長鎖がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られるならば、特定の生殖系列配列の“産物である”またはこれに“由来する”重鎖または軽鎖可変領域または完全長重鎖または軽鎖を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を担持するトランスジェニックマウスを目的の抗原で免疫化するかまたはファージ上に示されるヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーを目的の抗原についてスクリーニングすることを含む。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列の“産物である”またはこれに“由来する”ヒト抗体は、それ自体、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較し、ヒト抗体の配列と配列が最も近い(すなわち、最大%同一性)ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択することにより同定できる。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列の“産物である”またはこれに“由来する”ヒト抗体は、例えば、天然に存在する体細胞変異または部位特異的変異の意図的導入により、生殖系列配列と比較してアミノ酸差異を有し得る。しかしながら、VHまたはVLフレームワーク領域において、選択したヒト抗体は、典型的に、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、他種の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列(例えば、マウス生殖系列配列)と比較したとき、ヒト抗体をヒトと同定するアミノ酸残基を含む。ある場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列とアミノ酸配列が少なくとも60%、70%、80%、90%または少なくとも95%またはさらに少なくとも96%、97%、98%または99%同一であり得る。典型的に、組み換えヒト抗体は、VHまたはVLフレームワーク領域においてにおいて、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と10個を超えないアミノ酸差異を示す。ある場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と5個を超えないまたは4個、3個、2個または1個を超えないアミノ酸差異を示し得る。Kabatを使用した、代表的数のHER3抗体についてVHおよびVL生殖系列配列を使用する異なる生殖系列化(germlined versions)を、表2に示す。CDR位置を太字で強調する。表において生殖系列化(germlined)配列と共に使用した注記は次のとおりである：MOR10701 - VH__3 - 07はVH生殖系列配列3 - 07のフレームワーク領域内のMOR10701 CDRループを意味し(命名法はVbaseに従う)、MOR10703 - VK__L1は、VK__L1の生殖系列フレームワーク領域のMOR10703からのCDRを意味し、ここで、VKはカップ軽鎖である。

【0161】

10

20

30

【表 20】

表 2：選択した数の種々の代表的抗体の生殖系列化物

配列番号	配列名	アミノ酸配列
	MOR10701 VH ドメイン	
配列番号 380	MOR10701-VH_3-07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMN SLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 381	MOR10701-VH_3-09	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMN SLRAEDTALYYCA KWGDEGF DI
配列番号 382	MOR10701-VH_3-11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVS VTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMN SLRAEDTAVYYCAR WGDEGF DI
配列番号 383	MOR10701-VH_3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQATGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISR ENAKNS LYLQMN SLRAGDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 384	MOR10701-VH_3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISR DDSKNT LYLQMN SLKTEDTAVYYCT TWGDEGF DI
配列番号 385	MOR10701-VH_3-20	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMN SLRAEDTALYHCA RWGDEGF DI
配列番号 386	MOR10701-VH_3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMN SLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 387	MOR10701-VH_3-23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCA KWGDEGF DI
配列番号 388	MOR10701-VH_3-30	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCA KWGDEGF DI
配列番号 389	MOR10701-VH_3-30 .3	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 390	MOR10701-VH_3-30 .5	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCA KWGDEGF DI
配列番号 391	MOR10701-VH_3-33	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 392	MOR10701-VH_3-43	EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNS LYLQMN SLRTEDTALYYCA KWGDEGF DI
配列番号 393	MOR10701-VH_3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMN SLRDEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 394	MOR10701-VH_3-49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMSWFRQAPGKGLEWV GVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISR DGSKSIAYLQMN SLKTEDTAVYY CTR WGDEGF DI
配列番号 395	MOR10701-VH_3-53	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS VTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAR WGDEGF DI

10

20

30

40

【表 2 1】

配列番号 396	MOR10701-VH_3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEYS VTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMGSLRAEDMAVYYCAR WGDEGF DI
配列番号 397	MOR10701-VH_3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 398	MOR10701-VH_3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDDS SKNS LYLQMNSLKTEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 399	MOR10701-VH_3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQASGKGLEWV GVTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDDS SKNT AYLQMNSLKTEDTAVYYCT RWGDEGF DI
配列番号 400	MOR10701-VH_3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLVWVS VTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN AKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGDEGF DI
配列番号 401	MOR10701-VH_3-d	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS VTGAVGRSTYYPD SVK GRFTISRDN SKNT LHLQMNSLRAEDTAVYYCKK WGDEGF DI
	MOR10703 VH ドメ イン	
配列番号 402	MOR10703-VH_3-07	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 403	MOR10703-VH_3-09	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCA KWGDEGF DI
配列番号 404	MOR10703-VH_3-11	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWIRQAPGKGLEWVS A INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGDEGF DI
配列番号 405	MOR10703-VH_3-13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQATGKGLEWV SA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMNSLRAGDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 406	MOR10703-VH_3-15	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDDS SKNT LYLQMNSLKTEDTAVYYCTT WGDEGF DI
配列番号 407	MOR10703-VH_3-20	EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMNSLRAEDTALYHCA RWGDEGF DI
配列番号 408	MOR10703-VH_3-21	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN AKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 409	MOR10703-VH_3-23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA KWGDEGF DI
配列番号 410	MOR10703-VH_3-30	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA KWGDEGF DI
配列番号 411	MOR10703-VH_3-30 .3	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RWGDEGF DI
配列番号 412	MOR10703-VH_3-30 .5	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AA INSQ GKSTYYAD SVK GRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA KWGDEGF DI

10

20

30

40

【 0 1 6 2 】

【表 2 2】

配列番号 413	MOR10703-VH_3-33	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV AAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RWGDEGFDI
配列番号 414	MOR10703-VH_3-43	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAK WGDEGFDI
配列番号 415	MOR10703-VH_3-48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCA RWGDEGFDI
配列番号 416	MOR10703-VH_3-49	EVQLVESGGGLVQPGRLRLSCTASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GAINSQGKSTYYADSVKGRFTISR DGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR WGDEGFDI
配列番号 417	MOR10703-VH_3-53	EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGDEGFDI
配列番号 418	MOR10703-VH_3-64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR WGDEGFDI
配列番号 419	MOR10703-VH_3-66	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGDEGFDI
配列番号 420	MOR10703-VH_3-72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWV GAINSQGKSTYYADSVKGRFTISR DDKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCA RWGDEGFDI
配列番号 421	MOR10703-VH_3-73	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQASGKGLEWV GAINSQGKSTYYADSVKGRFTISR DDKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCT RWGDEGFDI
配列番号 422	MOR10703-VH_3-74	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLVWVS AINSQGKSTYYADSVKGRFTISR DN AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR WGDEGFDI
配列番号 423	MOR10703-VH_3-d	EVQLVESRGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AINSQGKSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLHLQMNSLRAEDTAVYYCKK WGDEGFDI
	MOR10701 VK ドメイン	
配列番号 424	MOR10701-VKI_O1 2 (MOR10701 wt と 同一)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 425	MOR10701-VKI_O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 426	MOR10701-VKI_O1 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYSSFPPT
配列番号 427	MOR10701-VKI_O8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQYSSFPPT
配列番号 428	MOR10701-VKI_A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKLLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSSFPPT
配列番号 429	MOR10701-VKI_A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKRLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 430	MOR10701-VKI_L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWFQQKPGKVPKHLIY GASSLQSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 431	MOR10701-VKI_L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWFQQKPGKAPKSLIYG ASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSFPPT

10

20

30

40

【表 2 3】

配列番号 432	MOR10701-VKI_L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 433	MOR10701-VKI_L4	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 434	MOR10701-VKI_L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 435	MOR10701-VKI_L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 436	MOR10701-VKI_L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 437	MOR10701-VKI_L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 438	MOR10701-VKI_L23	AIRMTQSPFSLASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPAKAPKLFYIG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 439	MOR10701-VKI_L9	AIRMTQSPSSFSASTGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISCLQSEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 440	MOR10701-VKI_L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVITISCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPELLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITISCLQSEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 441	MOR10701-VKI_L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 442	MOR10701-VKI_L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPDDFATYYCQQYSSFPPT
	MOR10701 VK ドメイン	
配列番号 443	MOR10703-VKI_O1 2 (MOR10703 wt と 同一)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 444	MOR10703-VKI_O2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 445	MOR10703-VKI_O1 8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYSSFPPT
配列番号 446	MOR10703-VKI_O8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYSSFPPT
配列番号 447	MOR10703-VKI_A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQYSSFPPT
配列番号 448	MOR10703-VKI_A30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKRLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 449	MOR10703-VKI_L14	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWFQQKPGKVPKHLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 450	MOR10703-VKI_L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWFQQKPGKAPKSLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 451	MOR10703-VKI_L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 452	MOR10703-VKI_L4	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 453	MOR10703-VKI_L18	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 454	MOR10703-VKI_L5	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 455	MOR10703-VKI_L19	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT
配列番号 456	MOR10703-VKI_L8	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPEDFATYYCQQYSSFPPT

10

20

30

40

【表 2 4】

配列番号 457	MOR10703-VKI_L23	AIRMTQSPFSLASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQQKPAKAPKLFYGA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTT
配列番号 458	MOR10703-VKI_L9	AIRMTQSPSSFASTGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYSSFPPTT
配列番号 459	MOR10703-VKI_L24	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPELLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQYSSFPPTT
配列番号 460	MOR10703-VKI_L11	AIQMTQSPSSLASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSFPPTT
配列番号 461	MOR10703-VKI_L12	DIQMTQSPSTLASVGDRTTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKLLIY GASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYCQQYSSFPPTT

10

【 0 1 6 4 】

【表 2 5】

表 3 : J Hセグメント

配列番号 462	JH1	WGQGTLLTVSS
配列番号 463	JH2	WGRGTLTVSS
配列番号 464	JH3	WGQGTMTTVSS
配列番号 465	JH4	WGQGTLLTVSS
配列番号 466	JH5	WGQGTLLTVSS
配列番号 467	JH6	WGQGTTVTVSS

【 0 1 6 5 】

20

【表 2 6】

表 4 : J Kセグメント

配列番号 468	JK1	FGQGTKVEIK
配列番号 469	JK2	FGQGTKLEIK
配列番号 470	JK3	FGPGTKVDIK
配列番号 471	JK4	FGGGTKVEIK
配列番号 472	JK5	FGQGTRLEIK

【 0 1 6 6 】

VH - 生殖系列化配列と JHセグメントの任意の組み合わせを使用できる。組み合わせの代表例を表 5 に示す。

30

【表 2 7】

表 5 : VH-生殖系列化配列と JHセグメントの組み合わせの代表例

配列番号 473	MOR10701-VH_3-1 5_JH1	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGVTGAVGRSTYYPD SV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTWGDEGFDI WG QGTLLTVSS
配列番号 474	MOR10701-VH_3-1 5_JH3	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGVTGAVGRSTYYPD SV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTWGDEGFDI WG QGTMTTVSS
配列番号 475	MOR10703-VH_3-1 5_JH1	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGAIN SQ GKSTYYAD SV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTWGDEGFDI WG QGTLLTVSS
配列番号 476	MOR10703-VH_3-1 5_JH3	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVGAIN SQ GKSTYYAD SV KGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTED TAVYYCTTWGDEGFDI WG QGTMTTVSS

40

【 0 1 6 7 】

VL - 生殖系列化配列と JKセグメントの任意の組み合わせを使用できる。組み合わせの代表例を表 6 に示す。

【表 28】

表 6：V K－生殖系列化配列と J Kセグメントの組み合わせの代表例

配列番号 477	MOR10701-VKI_O2_J K1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKL LIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSF PTTFGGGTKVEIK
配列番号 478	MOR10701-VKI_O2_J K4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKAPKL LIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSF PTTFGGGTKVEIK
配列番号 479	MOR10703-VKI_A20_J K4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKL LIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSSF PTTFGGGTKVEIK
配列番号 480	MOR10703-VKI_A20_J K1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPGKVPKL LIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSSF PTTFGGGTKVEIK

10

【0168】

V HをJ HとおよびV KをJ Kと組み合わせたら、V HまたはJ HとV KまたはJ Kの任意の組み合わせを使用できる。一つの態様において、各抗体について任意のV H生殖系列化領域を任意のV K(V L)生殖系列化領域と組み合わせることができる。組み合わせの代表的数の例を表 7 に示す。

【表 29】

表 7：生殖系列化配列の組み合わせの代表例

	組み合わせ 1	
配列番号 481	MOR10701-VH_3-15_JH3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAM SWVRQAPGKGLE WVG VTGAVGRSTYY PDS SVK GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTA VYYCTTWGDEGF DIW GQGTMTVTVSS
配列番号 482	MOR10701-VKI_A30_JK4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGIS NWLAWYQQKPGKAPKR LIY GASSLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQYSSF PTTFGGG TKVEIK
	組み合わせ 2	
配列番号 483	MOR10701-VH_3-30_JH1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAM SWVRQAPGKGLE WVA VTGAVGRSTYY PDS SVK GRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCAKWGDEGF DIW GQGT TLTV SS
配列番号 484	MOR10701-VKI_L1_JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGIS NWLAWFQQKPGKAPKS LIY GASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQYSSF PTTFGQGT KLEIK
	組み合わせ 3	
配列番号 485	MOR10701-VH_3-30_JH2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAM SWVRQAPGKGLE WVA VTGAVGRSTYY PDS SVK GRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCAKWGDEGF DIW GRGTLTVTVSS
配列番号 486	MOR10701-VKI_L1_JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGIS NWLAWFQQKPGKAPKS LIY GASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQYSSF PTTFGQGT KLEIK
	組み合わせ 4	
配列番号 487	MOR10703-VH_3-20_JH5	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAM SWVRQAPGKGLE WV SAINSQ GK STYYAD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLRAEDTA LYHCARWGDEGF DIW GQGT TLTV SS
配列番号 488	MOR10703-VKI_L15_JK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGIS NWLAWYQQKPEKAPKS LIY GASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQYSSF PTTFGP G TKVDIK
	組み合わせ 5	
配列番号 489	MOR10703-VH_3-33_JH2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAM SWVRQAPGKGLE WVA AINSQ GK STYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARWGDEGF DIW GRGTLTVTVSS
配列番号 490	MOR10703-VKI_A20_JK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGIS NWLAWYQQKPGKVPKL LIY GASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDVATYYC QQYSSF PTTFGQGT KVEIK
	組み合わせ 6	
配列番号 491	MOR10703-VH_3-33_JH3	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAM SWVRQAPGKGLE WVA AINSQ GK STYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTA VYYCARWGDEGF DIW GQGTMTVTVSS
配列番号 492	MOR10703-VKI_A20_JK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQGIS NWLAWYQQKPGKVPKL LIY GASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDVATYYC QQYSSF PTTFGQGT KLEIK

【0169】

一つの態様において、本発明は、 Xaa_1 - HCDR1 - Xaa_2 - HCDR2 - Xaa_3 - HCDR3 - Xaa_4 の配列を含む重鎖可変領域に関し、ここで、重鎖 HCDR1、HCDR2、HCDR3 は表 1 および 2 から選択される任意の重鎖 CDR である。説明のみを目的として、配列は：

Xaa_1 - SYAMS - Xaa_2 - AINSQGKSTYYADSVKG - Xaa_3 - WGDEGF**DI** - Xaa_4 (配列番号 493) であってよく、ここで、

Xaa_1 は任意の 30 アミノ酸のフレームワーク領域であり；

Xaa_2 は任意の 14 アミノ酸のフレームワーク領域であり；

Xaa_3 は任意の 32 アミノ酸のフレームワーク領域であり；

Xaa_4 は任意の 11 アミノ酸のフレームワーク領域である。

【 0 1 7 0 】

一つの態様において、本発明は、 $X a a_1 - L C D R 1 - X a a_2 - L C D R 2 - X a a_3 - L C D R 3 - X a a_4$ の配列を含む軽鎖可変領域に監視、ここで、軽鎖 $L C D R 1$ 、 $L C D R 2$ 、 $L C D R 3$ は表 1 および 2 から選択される任意の軽鎖 $C D R$ である。説明のみを目的として、配列は：

$X a a_1 - R A S Q G I S N W L A - X a a_2 -$ ガス $S L Q S - X a a_3 - Q Q Y S S F P T T - X a a_4$ (配列番号 4 9 4) であってよく、ここで、

$X a a_1$ は任意の 2 3 アミノ酸のフレームワーク領域であり；

$X a a_2$ は任意の 1 5 アミノ酸のフレームワーク領域であり；

$X a a_3$ は任意の 3 2 アミノ酸のフレームワーク領域であり；

$X a a_4$ は任意の 1 0 アミノ酸のフレームワーク領域である。

10

【 0 1 7 1 】

ここに開示する抗体は一本鎖抗体、二重特異性抗体、ドメイン抗体、ナノボディおよびユニボディの誘導体であり得る。“一本鎖抗体”(s c F v)は、V Hドメインに結合したV Lドメインを含む一ポリペチド鎖から成り、ここで、V LドメインおよびV Hドメインは対合して一価分子を形成する。一本鎖抗体は当分野で知られた方法に従い製造できる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426およびHuston et al., (1988) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。“摘芽(disbud)”は2本の鎖から成り、各鎖は、同ポリペチド鎖上の軽鎖可変領域に短ペプチドリinkerを介して結合した重鎖可変領域を含み、ここで、同じ鎖上の2個の領域は互いに対合しないが、他の鎖上の相補的ドメインと対合して、二重特異性分子を形成する。二重特異性抗体の製造方法は当分野で知られている(例えば、Holliger et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448およびPoljak et al., (1994) Structure 2:1121-1123参照)。ドメイン抗体(d A b s)は抗体の小さな機能的結合単位であり、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域に対応する。ドメイン抗体は細菌、酵母および哺乳動物細胞系で十分発現する。ドメイン抗体およびその産生方法のさらなる詳細は当分野で知られている(例えば、米国特許6,291,158；6,582,915；6,593,081；6,172,197；6,696,245；欧州特許0368684および0616640；WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019およびWO03/002609参照)。ナノボディは、抗体の重鎖に由来する。ナノボディは典型的に1個の可変ドメインおよび2個の定常ドメイン(C H 2およびC H 3)を含み、元の抗体の抗原結合能力を維持する。ナノボディは、当分野で知られる方法により製造できる(例えば、米国特許番号6,765,087、米国特許番号6,838,254、WO06/079372参照)。ユニボディは、I g G 4抗体の1個の軽鎖および1個の重鎖から成る。ユニボディは、I g G 4抗体のヒンジ領域の除去により製造し得る。ユニボディおよびその製造方法のさらなる詳細はWO2007/059782に見ることができる。

20

30

【 0 1 7 2 】

相同抗体

さらに他の態様において、本発明は、表 1 に記載した配列と相同であるアミノ酸配列を含む抗体またはそのフラグメントに関し、該抗体はH E R 3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルH E R 3)と結合し、表 1 に記載した抗体の所望の機能的特性を維持する。

40

【 0 1 7 3 】

例えば、本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離モノクローナル抗体(またはその機能的フラグメント)に関し、ここで、重鎖可変領域は、配列番号15、33、51、69、87、105、123、141、159、177、195、213、231、249、267、285、303、321、339、357および375から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号14、32、50、68、86、104、122、140、158、176、194、212、230、248、

50

266、284、302、320、338、356および374から成る群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、該抗体はHER3(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)と結合し、HER3のシグナル伝達活性を中和し、これは、リン酸化アッセイまたは他のHERシグナル伝達の指標により測定できる(例えば、実施例に記載するホスホ-HER3アッセイ、ホスホ-Aktアッセイ、細胞増殖およびリガンド遮断アッセイ)。また本発明の範囲に包含されるのは、可変重鎖および軽鎖親ヌクレオチド配列;および哺乳動物細胞での発現のための完全長重鎖および軽鎖配列最適化である。本発明の他の抗体は、変異されているが、上記配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%同一性を有するアミノ酸または核酸を含む。ある態様において、上記配列に示す可変領域と比較したとき、可変領域において1個、2個、3個、4個または5個を超えないアミノ酸がアミノ酸欠失、挿入または置換により置換されている変異アミノ酸配列を含む。

【0174】

他の態様において、VHおよび/またはVLアミノ酸配列は、表1に示す配列と50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。他の態様において、VHおよび/またはVLアミノ酸配列は、1個、2個、3個、4個または5個を超えないアミノ酸位置のアミノ酸置換以外同一である。表1に記載した抗体のVH領域およびVL領域と高い(すなわち、80%以上)同一性を有するVH領域およびVL領域を有する抗体は突然変異誘発(例えば、部位特異的またはPCR仲介突然変異誘発)、その後のここに記載する機能的アッセイを使用するコードされた改変された抗体の残存機能についての試験により得ることができる。

【0175】

他の態様において、重鎖および/または軽鎖ヌクレオチド配列の可変領域は、上記配列と60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であり得る。

【0176】

ここで使用する、2配列間の“同一性パーセント”は、2配列の最適整列のために導入する必要がある、ギャップ数およびギャップ長を考慮に入れた、これらの配列により共有される同一位置の数の関数(すなわち、%同一性は同一位置数/位置の総数×100である)である。2配列間の配列比較および同一性パーセント決定は、下記非限定的例に記載する数学的アルゴリズムを使用して達成できる。

【0177】

これに加えてまたはこれ以外に、本発明のタンパク質配列は、さらに、例えば、関連配列を同定するための、公的データベースに対する検索を実施するための“クエリー配列”として使用できる。例えば、このような検索はAltschul et al., (1990) J.Mol. Biol. 215:403-10のBLASTプログラム(version 2.0)を使用して実施できる。

【0178】

保存的修飾を有する抗体

ある態様において、本発明の抗体は、CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を有し、ここで、これらのCDR配列の1個以上がここに記載する抗体またはその保存的修飾に基づく特定のアミノ酸配列を有し、該抗体は本発明のHER3結合抗体の所望の機能的特性を維持する。

【0179】

従って、本発明は、CDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む重鎖可変領域およびCDR1配列、CDR2配列およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域から成る単離されたHER3モノクローナル抗体またはそのフラグメントを提供し、ここで、重鎖可変領域CDR1アミノ酸配列は配列番号2、8、20、26、38、44、56、62、74、80、92、98、110、116、128、134、146、152、164、

170、182、188、200、206、218、224、236、242、254、
 260、272、278、290、296、308、314、326、332、344、
 350、362および368およびその保存的修飾から成る群から選択され、重鎖可変領域CDR2アミノ酸配列は配列番号3、9、21、27、39、45、57、63、75、
 81、93、99、111、117、129、135、147、153、165、171、183、189、201、207、219、225、237、243、255、261、273、279、291、297、309、315、327、333、345、351、363および369およびその保存的修飾から成る群から選択され、重鎖可変領域CDR3アミノ酸配列は配列番号4、10、22、28、40、46、58、64、76、
 82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364および370およびその保存的修飾から成る群から選択され、軽鎖可変領域CDR1アミノ酸配列は配列番号5、11、23、29、41、47、59、65、77、
 83、95、101、113、119、131、137、149、155、167、173、185、191、203、209、221、227、239、245、257、263、275、281、293、299、311、317、329、335、347、353、365および371およびその保存的修飾から成る群から選択され、軽鎖可変領域CDR2アミノ酸配列は配列番号6、12、24、30、42、48、60、66、78、
 84、96、102、114、120、132、138、150、156、168、174、186、192、204、210、222、228、240、246、258、264、276、282、294、300、312、318、330、336、348、354、366および372およびその保存的修飾から成る群から選択され、軽鎖可変領域CDR3アミノ酸配列は配列番号7、13、25、31、43、49、61、67、79、
 85、97、103、115、121、133、139、151、157、169、175、187、193、205、211、223、229、241、247、259、265、277、283、295、301、313、319、331、337、349、355、367および373およびその保存的修飾から成る群から選択され、該抗体またはそのフラグメントはHER3に特異的に結合し、HERシグナル伝達経路の阻害によりHER3活性を中和し、これは、リン酸化アッセイまたは他のHERシグナル伝達の指標により測定できる(例えば、実施例に記載するホスホ-HER3アッセイ、ホスホ-Aktアッセイ、細胞増殖およびリガンド遮断アッセイ)。

【0180】

同じエピトープに結合する抗体

本発明は、表1および図7に記載したHER3結合抗体と同じエピトープと相互作用(例えば、結合、立体障害、安定化/不安定化、空間配置による)する、抗体を提供する。さらなる抗体は、それゆえに、HER3結合アッセイにおいて本発明の他の抗体と交差競合(例えば、統計学的に有意な方法での結合の競合的阻害)する能力に基づき同定できる。試験抗体が本発明の抗体のHER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)への結合を阻害する能力は、試験抗体がHER3への結合について該抗体と競合することを意味し、このような抗体は、理論に縛られないが、HER3タンパク質上の競合する抗体と同じまたは関連(例えば、構造的に類似または空間的に近位)エピトープに結合する。ある態様において、HER3上の本発明の抗体と同じエピトープに結合する抗体はヒトモノクローナル抗体である。このようなヒトモノクローナル抗体はここに記載するとおり製造および単離できる。

【0181】

一つの態様において、抗体またはそのフラグメントは、HER3のドメイン2およびドメイン4の両者に結合し、HER3を不活性立体構造で保持し、これはドメイン2内に存在する二量体化ループの露出を妨げる。これにより他のファミリーメンバー、例えばHER1、HER2およびHER4とのヘテロ二量体化が妨げられる。抗体またはそのフラグ

10

20

30

40

50

メントはリガンド依存性およびリガンド非依存性HER3シグナル伝達のいずれも阻害する。

【0182】

他の態様において、抗体またはそのフラグメントはHER3のドメイン2およびドメイン4の両者に、HER3リガンド、例えばニューレグリンの同時結合を遮断することなく結合する。理論を述べる必要はないが、HER3のドメイン2およびドメイン4のいずれにも結合する抗体またはそのフラグメントが、HER3上のリガンド結合部位を遮断することなくHER3を不活性立体構造に保持することはありそうである。それゆえに、HER3リガンド(例えば、ニューレグリン)は本抗体またはそのフラグメントと同時にHER3に結合できる。

10

【0183】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、HER3のリガンド依存性および非依存性活性化の両者を、リガンド結合を妨げることなく阻害する。これは次の理由から有利であると考えられる：

- (i) 治療抗体は、各腫瘍型が各機構により誘導されるため、HER3活性化の一機構(すなわちリガンド依存性またはリガンド非依存性)を標的とする抗体よりも広域の腫瘍に臨床的有用性を有する。
- (ii) 治療抗体は、HER3活性化の両機構が同時に関与する腫瘍型に有用である。HER3活性化の一機構(すなわちリガンド依存性またはリガンド非依存性)を標的とする抗体はこれらの腫瘍型にほとんど効果がないかまったく効果がない。
- (iii) リガンド結合を妨げることなくHER3のリガンド依存性活性化を阻害する抗体の効果は、リガンドの濃度増加に悪影響を与える可能性が低い。これは、極めて高濃度のHER3リガンドにより駆動される腫瘍型における効果の上昇または耐性がHER3リガンドの上方制御により仲介されるとき薬物耐性傾向の減少に反映される。
- (iv) 不活性形態の安定化によりHER3活性化を阻害する抗体は、HER3活性化の代替機構により駆動される薬物耐性の傾向が低い。

20

【0184】

結果として、本発明の抗体は、既存の治療抗体が臨床的に無力である状態の処置に使用し得る。

【0185】

操作および修飾抗体

本発明の抗体は、さらに、ここに示すVHおよび/またはVL配列の1個以上を有する抗体を出発物質として使用して、修飾抗体を設計し、その修飾抗体は出発抗体から変更された特性を有し得る。抗体は、可変領域の一方または両方(すなわち、VHおよび/またはVL)内、例えば1個以上のCDR領域および/または1個以上のフレームワーク領域内の1個以上の残基の修飾により操作し得る。これに加えてまたはこれとは別に、抗体は、例えば抗体のエフェクター機能を変更するために、定常領域内の残基の修飾により操作してよい。

30

【0186】

実施できる可変領域走査の一つのタイプはCDR移植である。抗体は、標的抗原と主に6個の重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を介して相互作用する。この理由のため、CDR内のアミノ酸配列は、CDR以外の配列よりも抗体毎により多様性である。CDR配列がほとんどの抗体-抗原相互作用を担うため、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列に移植した特異的な天然に存在する抗体由来のCDR配列を含む発現ベクターの構築により、特異的な天然に存在する抗体の特性を模倣する組み換え抗体を発現させることが可能である(例えば、Riechmann et al., (1998) Nature 332:323-327; Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winterの米国特許番号5,225,539およびQueen et al.の米国特許5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370参照)。

40

50

【 0 1 8 7 】

従って、本発明の他の態様は、それぞれ配列番号 2、8、20、26、38、44、56、62、74、80、92、98、110、116、128、134、146、152、164、170、182、188、200、206、218、224、236、242、254、260、272、278、290、296、308、314、326、332、344、350、362 および 368 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 1 配列；配列番号 3、9、21、27、39、45、57、63、75、81、93、99、111、117、129、135、147、153、165、171、183、189、201、207、219、225、237、243、255、261、273、279、291、297、309、315、327、333、345、351、363 および 369 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 2 配列；配列番号 4、10、22、28、40、46、58、64、76、82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364 および 370 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 3 配列を含む重鎖可変領域；およびそれぞれ配列番号 5、11、23、29、41、47、59、65、77、83、95、101、113、119、131、137、149、155、167、173、185、191、203、209、221、227、239、245、257、263、275、281、293、299、311、317、329、335、347、353、365 および 371 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 1 配列；配列番号 6、12、24、30、42、48、60、66、78、84、96、102、114、120、132、138、150、156、168、174、186、192、204、210、222、228、240、246、258、264、276、282、294、300、312、318、330、336、348、354、366 および 372 から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する C D R 2 配列；および配列番号 7、13、25、31、43、49、61、67、79、85、97、103、115、121、135、139、151、157、169、175、187、193、205、211、223、229、241、247、259、265、277、283、295、301、313、319、331、337、349、355、367 および 373 から成る群から選択されるアミノ酸配列から成る C D R 3 配列を有する軽鎖可変領域を含む、単離された H E R 3 結合モノクローナル抗体またはそのフラグメントに関する。それゆえに、このような抗体はモノクローナル抗体の V H および V L C D R 配列を含むが、これらの抗体と異なるフレームワーク配列もなお含み得る。このようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公的 D N A データベースまたは公表された刊行物から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列 D N A 配列は“Vase”ヒト生殖系列配列データベース(インターネットの www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase から入手可能)、ならびに Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; および Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948; Tomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; および Cox et al., (1994) Eur. J Immunol. 24:827-836 に見ることができ；これらの内容は、本明細書に引用により明示的に包含させる。

【 0 1 8 8 】

本発明の抗体で使用するためのフレームワーク配列の例は、選択した本発明の抗体により使用されるフレームワーク配列、例えば、本発明のモノクローナル抗体により使用されるコンセンサス配列および/またはフレームワーク配列と構造的に類似するものである。V H C D R 1、2 および 3 配列および V L C D R 1、2 および 3 配列をフレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子に見られるものと同一配列を有するフレ

ームワーク領域に移植できまたはC D R配列を生殖系列配列と比較して1個以上の変異を含むフレームワーク領域に移植できる。例えば、ある場合には抗体の抗原結合能力の維持または亢進のためにフレームワーク領域内の残基を変異させることが有利であることが判明している(例えば、Queen et alの米国特許5,530,101;5,585,089;5,693,762および6,180,370参照)。

【0189】

他のタイプの可変領域修飾は、“親和性成熟”として知られる、V Hおよび/またはV L C D R 1、C D R 2および/またはC D R 3領域内のアミノ酸残基を変異させ、それにより目的の抗体の1個以上の結合特性(例えば、親和性)を改善させることである。部位特異的突然変異誘発またはP C R 仲介突然変異誘発を変異の導入のために行ってよく、目的の抗体結合または他の機能的特性に対する影響をここに記載するおよび実施例に提供するインビトロまたはインビボアッセイで評価できる。保存的修飾(上記のとおり)を導入できる。変異はアミノ酸置換、付加または欠失であり得る。さらに、典型的にC D R領域内の1個、2個、3個、4個または5個を超えない残基を変更する。

【0190】

従って、他の態様において、本発明は、配列番号2、8、20、26、38、44、56、62、74、80、92、98、110、116、128、134、146、152、164、170、182、188、200、206、218、224、236、242、254、260、272、278、290、296、308、314、326、332、344、350、362および368から成る群から選択されるアミノ酸配列またはアミノ酸配列と比較して1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列から成るV H C D R 1領域;配列番号3、9、21、27、39、45、57、63、75、81、93、99、111、117、129、135、147、153、165、171、183、189、201、207、219、225、237、243、255、261、273、279、291、297、309、315、327、333、345、351、363および369から成る群から選択されるアミノ酸配列または配列番号3、9、21、27、39、45、57、63、75、81、93、99、111、117、129、135、147、153、165、171、183、189、201、207、219、225、237、243、255、261、273、279、291、297、309、315、327、333、345、351、363および369と比較して1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を有するV H C D R 2領域;配列番号4、10、22、28、40、46、58、64、76、82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364および370から成る群から選択されるアミノ酸配列または配列番号4、10、22、28、40、46、58、64、76、82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364および370と比較して1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を有するV H C D R 3領域;配列番号5、11、23、29、41、47、59、65、77、83、95、101、113、119、131、137、149、155、167、173、185、191、203、209、221、227、239、245、257、263、275、281、293、299、311、317、329、335、347、353、365および371から成る群から選択されるアミノ酸配列または配列番号5、11、23、29、41、47、59、65、77、83、95、101、113、119、131、137、149、155、167、173、185、191、203、209、221、227、239、245、257、263、275、281、293、299、311、317、329、335、347、353

10

20

30

40

50

、365および371と比較して1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を有するV L C D R 1領域；配列番号6、12、24、30、42、48、60、66、78、84、96、102、114、120、132、138、150、156、168、174、186、192、204、210、222、228、240、246、258、264、276、282、294、300、312、318、330、336、348、354、366および372から成る群から選択されるアミノ酸配列または配列番号6、12、24、30、42、48、60、66、78、84、96、102、114、120、132、138、150、156、168、174、186、192、204、210、222、228、240、246、258、264、276、282、294、300、312、318、330、336、348、354、366および372と比較して1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を有するV L C D R 2領域；および配列番号7、13、25、31、43、49、61、67、79、85、97、103、115、121、135、139、139、151、157、169、175、187、193、205、211、223、229、241、247、259、265、277、283、295、301、313、319、331、337、349、355、367および373から成る群から選択されるアミノ酸配列または配列番号7、13、25、31、43、49、61、67、79、85、97、103、115、121、135、139、139、151、157、169、175、187、193、205、211、223、229、241、247、259、265、277、283、295、301、313、319、331、337、349、355、367および373と比較して1個、2個、3個、4個または5個のアミノ酸置換、欠失または付加を有するアミノ酸配列を有するV L C D R 3領域を有する重鎖可変領域から成る、単離されたH E R 3結合モノクローナル抗体またはそのフラグメントに関する。

【0191】

抗体フラグメントの代替的フレームワークまたはスキャフォールドへの移植

得られたポリペプチドがH E R 3と特異的に結合する少なくとも1個の結合領域を含む限り、多種多様な抗体/免疫グロブリンフレームワークまたはスキャフォールドを用いることができる。このようなフレームワークまたはスキャフォールドはヒト免疫グロブリンの5個の主用なイディオタイプまたはそのフラグメントを含み、好ましくはヒト化側面を有する他の動物種の免疫グロブリンを含む。新規フレームワーク、スキャフォールドおよびフラグメントは当業者により発見および開発され続けている。

【0192】

一つの面において、本発明は、本発明のC D Rが移植できる非免疫グロブリンスキャフォールドを使用する非免疫グロブリンに基づく抗体の製造方法に関する。現在または将来的に知られる非免疫グロブリンフレームワークおよびスキャフォールドを、標的H E R 3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルH E R 3)に特異的な結合領域を含む限り、用い得る。既知の非免疫グロブリンフレームワークまたはスキャフォールドは、フィブロネクチン(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、アンキリン(Molecular Partners AG, Zurich, Switzerland)、ドメイン抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, MAおよびAblynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、リポカリン(Pieris Proteolab AG, Freising, Germany)、小モジュラー免疫薬(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、マキシボディ(Avidia, Inc., Mountain View, CA)、プロテインA(Affibody AG, Sweden)およびアフィリン(ガンマ結晶またはユビキチン)(Scil Proteins GmbH, Halle, Germany)を含むが、これらに限定されない。

【0193】

フィブロネクチンスキャフォールドはフィブロネクチンIII型ドメイン(例えば、フィブロネクチンIII型の第10モジュール(¹⁰F n 3ドメイン))に基づく。フィブロネクチンIII型ドメインは、7個または8個のベータ鎖を有し、これは2個のベータシートに分散し、これ自体互いに包装されて、タンパク質のコアを形成し、さらにループ(C D Rに類

10

20

30

40

50

似)を含み、これはベータ鎖を互いに連結し、溶媒に晒される。ベータシートサンドイッチの各端に少なくとも3個のこのようなループがあり、ここで、該端はベータ鎖の方向に対して垂直なタンパク質の境界である(US 6,818,418参照)。これらのフィブロネクチンに基づくスキヤフォールドは免疫グロブリンではないが、全体的折り畳みは、ラクダおよびラマIgGにおける全抗原認識単位を含む重鎖の可変領域である、最小機能的抗体フラグメントのものと密接に関連する。この構造のために、非免疫グロブリン抗体は、自然に近い抗原結合特性および抗体の親和性を模倣する。これらのスキヤフォールドは、インビボの抗体親和性成熟の過程に類似するインビトロでのループ無作為化およびシャフリング方法に使用できる。これらのフィブロネクチンに基づく分子をスキヤフォールドとして使用でき、そこで、分子のループ領域を標準的クローニング技術を使用して本発明のCDRに置き換えることができる。

10

【0194】

アンキリン方法は、アンキリン由来反復モジュールを有するタンパク質を、異なる標的への結合に使用できる可変領域を担持するスキヤフォールドとして使用することに基づく。アンキリン反復モジュールは、2個の逆平行螺旋およびターンから成る33アミノ酸ポリペプチドである。可変領域の結合は、リボソームディスプレイを使用してほとんど最適化される。

【0195】

アビマーは天然Aドメイン含有タンパク質、例えばHER3由来である。これらのドメインは、本来タンパク質-タンパク質相互作用に使用され、ヒトに置いて250を超えるタンパク質が構造的にAドメインに基づく。アビマーは、アミノ酸リンカーを介して結合する多くの異なる“Aドメイン”モノマー(2-10)から成る。アビマーは、例えば、米国特許出願公開20040175756; 20050053973; 20050048512; および20060008844に記載する方法を使用して、標的抗原に結合できるように創製できる。

20

【0196】

アフィボディ親和性リガンドは、プロテインAのIgG結合ドメインの1個のスキヤフォールドに基づく3螺旋束から成る小さく、単純なタンパク質である。プロテインAは黄色ブドウ球菌である細菌由来の表面タンパク質である。このスキヤフォールドドメインは58アミノ酸から成り、そのうち13個は無作為化されて、多数のリガンド変異体と共にアフィボディライブラリーを産生する(例えば、US 5,831,012参照)。アフィボディ分子は抗体を模倣し、150kDaである抗体の分子量と比較して、6kDaの分子量を有する。サイズが小さいにも係らず、アフィボディ分子の結合部位は抗体のものに類似する。

30

【0197】

アンチカリンはPieris ProteoLab AG社により開発された製品である。リボカリンに由来し、通常化学的に感受性のまたは不溶性の化合物の生理学的輸送または貯蔵する、小さく、堅牢なタンパク質のどこにでもある群である。数種の天然リボカリンはヒト組織または体液に生じる。タンパク質構造は免疫グロブリンを暗示し、強固なフレームワークの頂上に超可変ループがある。しかしながら、抗体またはそれらの組み換えフラグメントとは対照的に、リボカリンは、160~180アミノ酸残基の一ポリペプチド鎖から成り、一免疫グロブリンドメインよりほんのわずかだけ大きい。結合ポケットを形成する4個のループの組は明白な構造的可塑性を示し、多様な側鎖を許容する。結合部位は、それゆえに、高親和性および特異性で異なる形の処方標的分子を認識するために、独自の工程で再形成され得る。リボカリンファミリーの1タンパク質であるPieris Brassicaeのビリン結合タンパク質(BBP)は、4個のループの組の突然変異誘発によりアンチカリンを開発するために使用されている。アンチカリンを記載する特許の一例は、PCT公開番号WO 199916873である。

40

【0198】

アフィリン分子は、タンパク質および小分子に対する特異的親和性のために設計された小非免疫グロブリンタンパク質である。新規アフィリン分子を2個のライブラリーから極

50

めて迅速に選択でき、その各々は異なるヒト由来スキャフォールドタンパク質に基づく。アフィリン分子は免疫グロブリンタンパク質に対する構造的相同性を示さない。現在、2種のアフィリンスキャフォールドが用いられ、その一方はヒト構造的眼水晶体タンパク質であるガンマ結晶であり、他方は“ユビキチン”スーパースファミリータンパク質である。両ヒトスキャフォールドとも極めて小さく、高温安定性を示し、pH変化および変性剤にほとんど耐性である。この高安定性は主にタンパク質のベータシート構造の伸長による。ガンマ結晶由来タンパク質の例はWO 200104144に記載させ、“ユビキチン様”タンパク質の例はWO 2004106368に記載される。

【0199】

タンパク質エピトープ模倣物(P E M)は、タンパク質 - タンパク質相互作用に關与する主二次構造であるタンパク質のベータハルピン二次構造を模倣する中程度のサイズの、環状、ペプチド様分子(MW 1 ~ 2 kDa)である。

【0200】

ある態様において、Fc領域を変えることにより、Fab sをサイレントIgG1形式に変換する。例えば、表1の抗体をIgG形式に変換することができる。

【0201】

ヒトまたはヒト化抗体

本発明は、HER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザル/マウス/ラットHER3)に特異的に結合する完全ヒト抗体を提供する。キメラまたはヒト化抗体と比較して、本発明のヒトHER3結合抗体は、ヒト対象に投与したとき、抗原性がさらに低減されている。

【0202】

ヒトHER3結合抗体は当分野で知られている方法を使用して産生できる。例えば、ヒューマニアリング方法が非ヒト抗体の改変ヒト抗体への変換に使用されている。米国特許公開20050008625は、非ヒト抗体と比較して同じまたは良好な結合特徴を維持しながら、抗体において非ヒト抗体可変領域をヒト可変領域と置き換えるインビボ方法を記載する。本方法は、非ヒト参照抗体の完全ヒト抗体への可変領域のエピトープ誘導置換に依存する。得られたヒト抗体は、一般的に参照非ヒト抗体と構造的に関連しないが、参照抗体と同じ抗原上の同じエピトープと結合する。要約すると、連続的エピトープ誘導相補性置換手法が、抗原の試験抗体への結合に応答するレポーターシステムの存在下、限定的量の抗原に対する結合について、細胞を“コンペティター”と参照抗体の多様なハイブリッドのライブラリー(“試験抗体”)の間で競合させることにより可能となる。コンペティターは参照抗体またはその誘導体、例えば一本鎖Fvフラグメントであり得る。コンペティターはまた参照抗体と同じエピトープに結合する抗原の天然または人工リガンドであり得る。コンペティターに対する唯一の条件は、参照抗体と同じエピトープに結合することおよび抗原結合について参照抗体と競合することである。試験抗体は、非ヒト参照抗体由来の抗原結合V領域を共通しておよび多様な源、例えばヒト抗体のレパートリーライブラリーから無作為に選択された他のV領域を有する。参照抗体からの共通V領域は、選択が参照抗体に対する最高抗原結合忠実度に偏向されるようにガイドとして働き、試験抗体を抗原上の同じエピトープに同じ方向に配置する。

【0203】

多くのタイプのレポーターシステムを使用して、試験抗体と抗原の所望の相互作用を決定できる。例えば、フラグメント相補性によるレポーター活性化が、試験抗体が抗原と結合したときしか起こらないように、相補レポーターフラグメントをそれぞれ抗原および試験抗体と関連させ得る。試験抗体 - および抗原 - レポーターフラグメント融合体がコンペティターと共発現されたとき、レポーター活性化は、コンペティターと競合する試験抗体の能力に依存性となり、これは、該抗原に対する試験抗体の親和性と比例する。使用できる他のレポーターシステムは、米国特許出願10/208,730(公開番号20030198971)に開示された自己阻害レポーター再活性化系(RAIR)のリアクティベーターまたは米国特許出願10/076,845(公開番号20030157579)に開示さ

10

20

30

40

50

れた競合的活性化システムを含む。

【0204】

連続的エピトープ誘導相補性置換システムで、コンペティター、抗原およびレポーター成分と共に一試験抗体を発現する細胞を同定するために選択する。これらの細胞において、各試験抗体は、限定的量の抗原への結合について一対一でコンペティターと競合する。レポーターの活性は試験抗体に結合した抗原の量に比例し、これは試験抗体の抗原に対する親和性および試験抗体の安定性に比例する。試験抗体を、最初に、試験抗体として発現されたとき参照抗体に対する活性に基づき選択する。第一回目の選択の結果は、一連の“ハイブリッド”抗体であり、その各々は参照抗体由来の同じ非ヒトV領域およびライブラリー由来のヒトV領域から成り、その各々は抗原の参照抗体と同じエピトープに結合する。第一回目で選択した1個以上のハイブリッド抗体は、抗原に対して参照抗体と同等または高い親和性を有する。

10

【0205】

第二V領域置換工程において、第一工程で選択したヒトV領域を、残りの非ヒト参照抗体V領域について同族ヒトV領域の多様なライブラリーでのヒト置換の選択のためのガイドとして使用する。第一回目で選択されたハイブリッド抗体はまた第二回目の選択のコンペティターとして使用できる。第二回目の選択の結果は、参照抗体と構造的に異なるが、同じ抗原への結合について参照抗体と競合する一連の完全ヒト抗体である。選択したヒト抗体のいくつかは、同じ抗原上の参照抗体と同じエピトープに結合する。これらの選択したヒト抗体の中で、1個以上が、参照抗体と同等または高い親和性で同じエピトープに結合する。

20

【0206】

上に参照抗体として記載したマウスまたはキメラHER3結合抗体の一つを使用して、この方法を使用して、同じ結合特異性および同じまたは良好な結合親和性でヒトHER3と結合するヒト抗体を容易に産生できる。さらに、このようなヒトHER3結合抗体はまたヒト抗体を慣習的に製造する会社、例えば、KaloBios, Inc. (Mountain View, CA)から商業的に得ることもできる。

【0207】

ラクダ科抗体

新世界メンバー、例えばラマ種(*Lama paccos*、*Lama glama*および*Lama vicugna*)を含むラクダおよびヒトコブラクダ(*Camelus bactrianus*および*Camelus dromaderius*)ファミリーのメンバーから得た抗体タンパク質は、サイズ、構造的複雑性およびヒト対象への抗原性について特徴づけされている。哺乳動物のこのファミリー由来のある種のIgG抗体は生来軽鎖を欠き、それゆえに、他の動物由来の抗体の2個の重鎖および2個の軽鎖の典型的4鎖四次構造と構造的に区別されることが判明している。PCT/E P 93 / 02214 (1994年3月3日公開のWO 94 / 04678)参照。

30

【0208】

VHHとして同定される小さな一可変ドメインであるラクダ科抗体の領域は、標的に対して高親和性を有する小タンパク質を産生するために遺伝子操作することにより得ることができ、“ラクダ科ナノボディ”として知られる低分子量抗体由来タンパク質をもたらす。1998年6月2日発行の米国特許番号5,759,808参照；またStijlemans et al., (2004) J Biol Chem 279:1256-1261; Dumoulin et al., (2003) Nature 424:783-788; Pleschberger et al., (2003) Bioconjugate Chem 14:440-448; Cortez-Retamozo et al., (2002) Int J Cancer 89:456-62; およびLauwereys et al., (1998) EMBO J 17:3512-3520も参照。ラクダ科抗体および抗体フラグメントの操作されたライブラリーは、例えば、Ablynx、Ghent、Belgium(例えば、US 20060115470; Domantis(US 20070065440、US 20090148434)から商業的に入手可能である。非ヒト起源の他の抗体と同様、ラクダ科抗体のアミノ酸配列を組み換えにより変更して、ヒト配列をより密接に模倣する配列を得ることができ、すなわち、ナノボディを“ヒト化”できる。こうして、ラクダ科抗体のヒトに対する天然の低抗原性をさらに減らすことができる

40

50

。

【0209】

ラクダ科ナノボディは、ヒトIgG分子の1/10の分子量であり、タンパク質はわずか数ナノメートルの物理的直径を有する。サイズが小さいことによる一つの結果は、ラクダ科ナノボディが大型抗体タンパク質で機能的に探知されない抗原性部位に結合する能力であり、すなわち、ラクダ科ナノボディは古典的免疫学的技術を使用して他の場合には隠れている抗原を検出する試薬としておよび可能な治療剤として有用である。それゆえに、サイズが小さいことによる別の結果は、ラクダ科ナノボディが標的タンパク質の溝または狭い隙間における特異的部位への結合の結果阻害でき、それゆえに古典的抗体よりも古典的低分子量剤の機能をより模倣した能力において役立ち得ることである。

10

【0210】

低分子量および小型サイズにより、さらに、ラクダ科ナノボディは極めて熱安定であり、厳しいpHおよびタンパク分解消化に安定であり、抗原性が低い。他の結果は、ラクダ科ナノボディが循環系から組織に容易に移動し、血液脳関門すら通過し、神経組織に影響する障害を処置できることである。ナノボディはさらに血液脳関門を通過する薬物輸送を促進できる。2004年8月19日公開の米国特許出願20040161738参照。これらの特性は、ヒトへの低抗原性と組み合わせ、大きな治療可能性を示す。さらに、これらの分子は原核細胞、例えば大腸菌で完全に発現でき、バクテリオファージと融合タンパク質で発現され、機能的である。

20

【0211】

従って、本発明の特性は、HER3に対する高親和性を有するラクダ科抗体またはナノボディである。ここでのある種の態様において、ラクダ科抗体またはナノボディはラクダ科動物で天然に産生され、すなわち、ラクダ科でここで他の抗体について記載した技術を使用したHER3またはそのペプチドフラグメントでの免疫化後に産生される。あるいは、HER3結合ラクダ科ナノボディは改変され、すなわち、例えば、ここでの実施例に記載するとおりHER3を標的として用いるパニング法を使用した、突然変異誘発したラクダ科ナノボディタンパク質を適当に示すファージのライブラリーからの選択により製造する。改変ナノボディは、さらにレシピエント対象における45分～2週間の半減期を有するように遺伝子操作によりカスタマイズできる。具体的態様において、ラクダ科抗体またはナノボディは、本発明のヒト抗体の重鎖または軽鎖のCDR配列を、例えばPCT/E 30 P 93 / 0 2 2 1 4に記載のとおり、ナノボディまたはドメイン抗体フレームワーク配列に移植することにより得る。一つの態様において、ラクダ科抗体またはナノボディは、次のHER3残基の少なくとも1個と結合する：Asn266、Lys267、Leu268、Thr269、Gln271、Glu273、Pro274、Asn275、Pro276、His277、Asn315、Asp571、Pro583、His584、Ala596、Lys597。一つの態様において、ラクダ科抗体またはナノボディは、次のHER3残基の少なくとも1個と結合する：Tyr265、Lys267、Leu268、Phe270、Gly582、Pro583、Lys597、Ile600、Lys602、Glu609、Arg611、Pro612、Cys613、His614、Glu615。

40

【0212】

二重特異性分子および多価抗体

他の面において、本発明は、本発明のHER3結合抗体またはそのフラグメントを含む二重パラトープ、二重特異性または多特異的分子に関する。本発明の抗体またはそのフラグメントを誘導体化または他の機能的分子、例えば、他のペプチドまたはタンパク質(例えば、他の抗体または受容体に対するリガンド)と結合して、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子と結合する二重特異性分子を産生できる。本発明の抗体は、実際、誘導体化または1個を超える他の機能的分子と結合して、2個を超える異なる結合部位および/または標的分子と結合する二重パラトープまたは多特異的分子を産生できる；このような二重パラトープまたは多特異的分子。本発明の二重特異性分子を製造するために、

50

本発明の抗体を、二重特異性分子が得られるように、1個以上の他の結合分子、例えば他の抗体、抗体フラグメント、ペプチドまたは結合模倣物と機能的に結合(例えば、化学カップリング、遺伝的融合、非共有結合的結合またはその他)できる。

【0213】

さらに臨床的利益が、1抗体への2個以上の抗原の結合により提供され得る(Coloma et al., (1997); Merchant et al., (1998); Alt et al., (1999); Zuo et al., (2000); Lu et al., (2004); Lu et al., (2005); Marvin et al., (2005); Marvin et al., (2006); Shen et al., (2007); Wu et al., (2007); Dimasi et al., (2009); Michaelson et al., (2009)). (Morrison et al., (1997) Nature Biotech. 15:159-163; Alt et al. (1999) FEBS Letters 454:90-94; Zuo et al., (2000) Protein Engineering 13:361-367; Lu et al., (2004) JBC 279:2856-2865; Lu et al., (2005) JBC 280:19665-19672; Marvin et al., (2005) Acta Pharmacologica Sinica 26:649-658; Marvin et al., (2006) Curr Opin Drug Disc Develop 9:184-193; Shen et al., (2007) J Immun Methods 218:65-74; Wu et al., (2007) Nat Biotechnol. 11:1290-1297; Dimasi et al., (2009) J Mol Biol. 393:672-692; およびMichaelson et al., (2009) mAbs 1:128-141)。

10

【0214】

二重特異性分子は、当分野で知られた方法を使用して、成分結合特異性をコンジュゲートすることにより製造できる。例えば、二重特異性分子の各結合特異性を別々に製造し、次いで互いにコンジュゲートし、例えば、多様なカップリングまたは架橋剤を共有結合に使用できる。架橋剤の例はプロテインA、カルボジイミド、N - スクシンイミジル - S - アセチル - チオアセテート(SATA)、5,5' - ジチオピス(2 - ニトロ安息香酸)(DTNB)、o - フェニレンジマレイミド(oPDM)、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)およびスルホスクシンイミジル4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート(スルホ - SMCC)(例えば、Karpovskiy et al., (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。他の方法はPaulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78:118-132; Brennan et al., (1985) Science 229:81-83)およびGlennie et al., (1987) J. Immunol. 139:2367-2375参照)に記載のものを含む。コンジュゲーション剤(Conjugating agent)はSATAおよびスルホ - SMCCであり、いずれもPierce Chemical Co.(Rockford, IL)から入手可能である。

20

30

【0215】

結合特異性が抗体であるとき、2個の重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によりコンジュゲートできる。具体的態様において、ヒンジ領域を、コンジュゲーション前に奇数、例えば1個のスルフヒドリル残基を含むように修飾する。

【0216】

あるいは、両結合特異性を同じベクターでコード化させ、発現させ、同じ宿主細胞で集合させ得る。この方法は、二重特異性分子がmAb x mAb、mAb x Fab、Fab x Fab₂またはリガンド x Fab融合タンパク質であるとき特に有用である。本発明の二重特異性分子は、1個の一本鎖抗体および結合決定基を含む一本鎖分子または2個の結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は、少なくとも2個の一本鎖分子を含み得る。二重特異性分子の製造方法は、例えば米国特許番号5,260,203;米国特許番号5,455,030;米国特許番号4,881,175;米国特許番号5,132,405;米国特許番号5,091,513;米国特許番号5,476,786;米国特許番号5,013,653;米国特許番号5,258,498;および米国特許番号5,482,858に記載されている。

40

【0217】

二重特異性分子のその特異的標的への結合は、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射免疫アッセイ(REA)、FACS分析、バイオアッセイ(例えば、増殖阻害)またはウェスタンブロットアッセイにより確認できる。これらのアッセイの各々は、一般的に特に興味深いタンパク質 - 抗体複合体の存在を、目的の複合体に特異的な標識試薬

50

(例えば、抗体)を用いて検出する。

【0218】

他の面において、本発明は、本発明のHER3に結合する抗体の少なくとも2個の同一または異なるフラグメントを含む多価化合物を提供する。抗体フラグメントは、タンパク質融合または共有結合または非共有結合的結合を介して互いに結合できる。四価化合物は、例えば、本発明の抗体の抗体と本発明の抗体の定常領域と結合する抗体、例えばFcまたはヒンジ領域の架橋により得ることができる。三量体形成ドメインは、例えばBoreanの特許EP1012280B1に記載されている。五量体形成モジュールは例えばPCTEP97/05897に記載されている。

【0219】

一つの態様において、二重パラトープ/二重特異性は、HER3のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基と結合する。

【0220】

他の態様において、本発明は、一モノクローナル抗体が抗原結合部位が1個を超える抗原と結合するように修飾された二重機能抗体、例えばHER3と他の抗原(例えば、HER1、HER2およびHER4)のいずれにも結合する二重機能抗体に関する。他の態様において、本発明は、同じ立体構造を有する抗原、例えば“閉”または“不活性”状態のHER3と同じ立体構造を有する抗原を標的とする二重機能抗体を提供する。“閉”または“不活性”状態のHER3と同じ立体構造を有する抗原の例は、HER1およびHER4を含むが、これらに限定されない。それゆえに、二重機能抗体はHER3とHER1、HER3とHER4またはHER1とHER4に結合し得る。二重機能抗体の二重結合特異性は、さらに二重の活性または活性阻害に反映され得る(例えば、Jenny Bostrom et al., (2009) Science:323;1610-1614参照)。

【0221】

半減期が延長した抗体

本発明は、インビボでの半減期が延長したHER3タンパク質と特異的に結合する抗体を提供する。

【0222】

多くの因子がインビボでのタンパク質の半減期に影響し得る。例は、腎臓濾過、肝臓での代謝、タンパク分解酵素(プロテアーゼ類)での分解および免疫原性応答(例えば、抗体によるタンパク質中和およびマクロファージおよび樹状細胞による取り込み)である。多様な戦略が本発明の抗体の半減期を伸ばすために使用できる。例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、reCODE PEG、抗体スキャフォールド、ポリシアル酸(PSA)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、アルブミン結合リガンドおよび炭水化物シールドへの化学結合;血清タンパク質に結合するタンパク質、例えばアルブミン、IgG、FcRnおよび移行への遺伝子融合;血清タンパク質に結合する他の結合部分、例えばナノボディ、Fab's、DARPin's、アビマー、アフィボディおよびアンチカリンへのカップリング(遺伝的または化学的);rPEG、アルブミン、アルブミンのドメイン、アルブミン結合タンパク質およびFcへの遺伝子融合;またはナノ担体、徐放性製剤または医療デバイスへの取り込み。

【0223】

インビボでの抗体の血清循環を延長するために、不活性ポリマー分子、例えば高分子量PEGを、PEGの抗体のN末端またはC末端への部位特異的コンジュゲーションまたはリシン残基に存在するイプシロン-アミノ基を介して、多機能的リンカーと共にまたは伴わず、抗体またはそのフラグメントに結合できる。抗体をペグ化するために、抗体またはそのフラグメントは、典型的にポリエチレングリコール(PEG)、例えばPEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体と、1個以上のPEG基が抗体または抗体フラグメントと結合する条件下で反応させる。ペグ化は反応性PEG分子(または類似の反応性水可溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応により実施できる。ここで使用する、用語“ポリエチレングリコール”は、他のタンパク質の誘導体化に使用されているあら

10

20

30

40

50

ゆる形態のPEG、例えばモノ(C1 - C10)アルコキシ - またはアリールオキシ - ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール - マレイミドを包含することを意図する。ある態様において、ペグ化する抗体は非グリコシル化抗体である。生物学的活性の最小限の喪失となる直鎖または分枝鎖ポリマー誘導体化を有する。コンジュゲーション程度はSDS-PAGEおよびマスマスペクトロメトリーにより厳しくモニターし、抗体へのPEG分子の適切なコンジュゲーションを確実にする。未反応PEGを、分子ふるいまたはイオン交換クロマトグラフィーにより抗体-PEGコンジュゲートから分離できる。PEG誘導体化抗体を、当業者に周知の方法を使用して、例えば、ここに記載した免疫アッセイにより結合活性ならびにインビボ有効性について試験できる。タンパク質のペグ化方法は当分野で知られ、本発明の抗体に適用できる。例えば、Nishimura et al. のEP0154316およびIshikawa et al. のEP0401384参照。

10

【0224】

他の修飾ペグ化方法は、再構成化学的直交操作技術(ReCODE PEG)であり、これは、化学的に特定の側鎖を生合成タンパク質に、tRNAシンセターゼおよびtRNAを含む再構成システムを介して取り込む。この方法は、30を超える新アミノ酸の大腸菌、酵母および哺乳動物細胞における生合成タンパク質への取り込みを可能にする。tRNAは非天然アミノ酸を、アンバーコドンが位置する任意の場所に取り込み、アンバーを停止コドンから化学的に特定のアミノ酸の取り込みのシグナルとなるものに変換する。

【0225】

組み換えペグ化方法(rPEG)も血清半減期延長に使用できる。この方法は、300~600アミノ酸の不定形タンパク質尾部に既存の医薬タンパク質を遺伝的融合させることを含む。このような不定形タンパク質鎖の見かけの分子量がその実際の分子量の約15倍大きくなるため、タンパク質の血清半減期は、大きくのびる。化学コンジュゲーションおよび再精製を必要とする伝統的ペグ化と比較して、製造工程は極めて単純であり、産物は均質である。

20

【0226】

ポリシアル化は他の方法であり、これは、治療ペプチドおよびタンパク質の活性寿命を延長し、安定性を改善するのに天然ポリマーポリシアル酸(PSA)を使用する。PSAは、シアル酸(糖)のポリマーである。タンパク質および治療ペプチド薬物送達にしようとしたとき、ポリシアル酸はコンジュゲーションに保護的微小環境を提供する。これが循環中の治療タンパク質の活性寿命を延ばし、免疫系により認識されるのを妨げる。PSAポリマーはヒト体内で天然に見られる。何百万年もの間、壁をこれで覆うように進化したある種の細菌により導入された。これらの天然にポリシアル化された細菌は、次いで、分子模写により、体内の防御系から逃れることに成功した。PSAは、天然の最終的な隠蔽方法であり、このような細菌により大量に、予定された物理的特徴で産生できる。細菌PSAは、ヒト体内でのPSAと化学的同一である限り、タンパク質とカップリングしたときでさえ完全に非免疫原性である。

30

【0227】

他の方法は、抗体に結合したヒドロキシエチルデンプン(“HES”)誘導体である。HESは、蠟状トウモロコシ澱粉由来の修飾天然ポリマーであり、体内の酵素により代謝され得る。HES溶液を、通常血液量不足を補い、血液のレオロジー的特性を改善するために投与する。抗体のヘシル化(hesylation)は、分子の安定性の増加ならびに腎クリアランス減少により循環半減期の延長を可能にし、生物学的活性を高める。種々のパラメータ、例えばHESの分子量を変えることにより、広範なHES抗体コンジュゲートをカスタマイズできる。

40

【0228】

インビボで長い半減期を有する抗体はまたIgG定常ドメインまたはそのFcRn結合フラグメント(好ましくはFcまたはヒンジFcドメインフラグメント)への1個以上のアミノ酸修飾(すなわち、置換、挿入または欠失)の導入によっても産生できる。例えば、国際公開番号WO98/23289；国際公開番号WO97/34631；および米国特許

50

番号 6, 2 7 7, 3 7 5 参照。

【 0 2 2 9 】

さらに、抗体または抗体フラグメントをインビボでより安定にし、またはインビボで半減期を長くするために、抗体をアルブミンとコンジュゲートできる。本技術は当分野で周知であり、例えば、国際公開番号 WO 9 3 / 1 5 1 9 9、WO 9 3 / 1 5 2 0 0 および WO 0 1 / 7 7 1 3 7 ; および欧州特許番号 EP 4 1 3, 6 2 2 を参照のこと。

【 0 2 3 0 】

HER3 抗体またはそのフラグメントはまた 1 個以上のヒト血清アルブミン(HSA)ポリペチドまたはその一部と融合させ得る。成熟形態で 5 8 5 アミノ酸のタンパク質である HSA は、血清浸透圧の相当な割合を担い、また内因性および外因性リガンドの担体として機能する。アルブミンの担体分子としての役割およびその不活性性質は、インビボでのポリペチドの担体および輸送体として使用するために望ましい特性である。種々のタンパク質の担体としてアルブミン融合タンパク質の成分としてアルブミンを使用することは、WO 9 3 / 1 5 1 9 9、WO 9 3 / 1 5 2 0 0 および EP 4 1 3 6 2 2 に示唆されている。ポリペチドへの融合のための HSA の N 末端フラグメントの使用も提唱されている (EP 3 9 9 6 6 6)。従って、抗体またはそのフラグメントのアルブミンへの遺伝的または化学的融合またはコンジュゲートにより、インビトロおよび/またはインビボで溶液で安定化でき、貯蔵寿命を延ばしおよび/または分子の活性を長時間維持できる。

【 0 2 3 1 】

アルブミンの他のタンパク質への融合は、HSA またはそのフラグメントをコードする DNA が該タンパク質をコードする DNA と連結するような遺伝子操作により達成できる。次いで適切な宿主を融合ヌクレオチド配列で形質転換または形質移入し、融合ポリペチドが発現されるように適切なプラスミド上に配置させる。発現は、インビトロで、例えば、原核または真核細胞からまたはインビボで例えばトランスジェニック生物から行い得る。HSA 融合に関連するさらなる方法は、例えば、WO 2 0 0 1 0 7 7 1 3 7 および WO 2 0 0 3 0 6 0 0 7 に見ることができ、本明細書に引用により包含させる。具体的態様において、融合タンパク質の発現を哺乳動物細胞株、例えば、CHO 細胞株で行う。低または高 pH での抗体の受容体に対する変えられた示差的結合も本発明の範囲内で考慮される。例えば、抗体の親和性を、その受容体に低 pH、例えば、リソソーム (lysosome) 内での低 pH で結合し続けるように、抗体をさらなるアミノ酸、例えばヒスチジン (histine) を抗体の CDR に含むように修飾することにより、修飾してよい (例えば、Tomoyuki Igawa et al. (2010) Nature Biotechnology; 28, 1203-1207 参照)。

【 0 2 3 2 】

抗体コンジュゲート

本発明は、融合タンパク質を産生するために異種タンパク質またはポリペチド(またはそのフラグメント、好ましくは少なくとも 1 0、少なくとも 2 0、少なくとも 3 0、少なくとも 4 0、少なくとも 5 0、少なくとも 6 0、少なくとも 7 0、少なくとも 8 0、少なくとも 9 0 または少なくとも 1 0 0 アミノ酸のポリペチド)と組み換えの融合または化学的結合(共有結合および非共有結合の両者を含む)した HER3 タンパク質に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを提供する。特に、本発明は、ここに記載する抗体フラグメント(例えば、Fab フラグメント、Fd フラグメント、Fv フラグメント、F(ab)2 フラグメント、VH ドメイン、VH CDR、VL ドメインまたは VL CDR)および異種タンパク質、ポリペチドまたはペプチドを含む融合タンパク質を提供する。タンパク質、ポリペチドまたはペプチドを抗体または抗体フラグメントと融合または結合する方法は当分野で知られている。例えば、米国特許 5, 3 3 6, 6 0 3、5, 6 2 2, 9 2 9、5, 3 5 9, 0 4 6、5, 3 4 9, 0 5 3、5, 4 4 7, 8 5 1 および 5, 1 1 2, 9 4 6 ; 欧州特許番号 EP 3 0 7, 4 3 4 および EP 3 6 7, 1 6 6 ; 国際公開番号 WO 9 6 / 0 4 3 8 8 および WO 9 1 / 0 6 5 7 0 ; Ashkenazi et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539; Zheng et al., (1995) J. Immunol. 154:5590-5600; および Vil et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337- 11341 参照)。

【 0 2 3 3 】

さらなる融合タンパク質を、遺伝子混合、モチーフ混合、エクソン混合および/またはコドン混合(ここでは纏めて“DNA混合”と呼ぶ)の技術を介して産生し得る。DNA混合は、本発明の抗体またはそのフラグメントの活性改変に使用し得る(例えば、高親和性および低解離速度の抗体またはそのフラグメント)。一般的に、米国特許5,605,793、5,811,238、5,830,721、5,834,252および5,837,458; Patten et al., (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76; およびLorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308-313参照(これら特許および刊行物の各々は、引用によりその全体を本明細書に包含させる)。抗体またはそのフラグメントまたはコードする抗体またはそのフラグメントは、組換え前にエラープローンPCR、無作為ヌクレオチド挿入または他の方法による無作為突然変異誘発に付すことにより変え得る。HER3タンパク質に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントをコードするポリヌクレオチドを1個以上の異種分子の1個以上の成分、モチーフ、セクション、パーツ、ドメイン、フラグメントなどと組み換えし得る。

10

【 0 2 3 4 】

さらに、抗体またはそのフラグメントは、マーカー配列、例えば精製を容易にするためのペプチドと融合し得る。好ましい態様において、マーカーアミノ酸配列はヘキサ-ヒスチジンペプチド、例えばとりわけpQEベクター(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)で提供されるタグであり、その多くが市販されている。Gentz et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載のとおり、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タンパク質の簡便な精製のために提供される。精製に有用な他のペプチドタグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質由来のエピトープに対応する赤血球凝集素(“HA”)タグ(Wilson et al., (1984) Cell 37:767)および“フラッグ”タグを含むが、これらに限定されない。

20

【 0 2 3 5 】

他の態様において、本発明の抗体またはそのフラグメントは診断剤または検出可能剤とオン樹ゲートできる。このような抗体は、臨床的試験法の一部として疾患または障害の発症、進展、進行および/または重症度のモニタリングまたは予後診断、例えば特定の治療の有効性の決定に有用であり得る。このような診断および検出は、例えば、オースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼを含むが、これらに限定されない種々の酵素; 例えば、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンであるがこれらに限定されない接合団; 例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフィコエリトリンであるが、これらに限定されない蛍光物質; 例えば、ルミノールであるが、これに限定されない発光物質; 例えば、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンであるが、これらに限定されない生物発光物質; 例えば、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I および ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In および ^{111}In)、テクネチウム(^{99}Tc)、タリウム(^{201}Tl)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{86}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn および ^{117}Tl であるが、これらに限定されない放射性物質; および種々の陽電子放出断層撮影および非放射性常磁性金属イオンを使用する陽電子放出金属を含むが、これらに限定されない検出可能物質に抗体をカップリングさせることにより達成できる。

30

40

【 0 2 3 6 】

50

本発明は、さらに治療部分とコンジュゲートした抗体またはそのフラグメントの使用を包含する。抗体またはそのフラグメントは治療部分、例えば細胞毒、例えば、細胞増殖抑制または細胞破壊的薬剤、治療剤または放射性金属イオン、例えば、アルファ - エミッターとコンジュゲートし得る。細胞毒または細胞毒性剤は細胞に有害な薬剤を含む。

【0237】

さらに、抗体またはそのフラグメントを、ある生物学的応答を修飾する治療部分または薬物部分とコンジュゲートし得る。治療部分または薬物部分は古典的薬学治療剤に限定されると解釈してはならない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質、ペプチドまたはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、毒素、例えばアブリン、リシン A、シュードモナス外毒素、コレラ毒素またはジフテリア毒素；タンパク質、例えば腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、アポトーシス剤、抗血管形成剤；または生物学的応答修飾剤、例えば、例えば、リンホカインを含み得る。一つの態様において、抗HER3抗体またはそのフラグメントは治療部分、例えば細胞毒、薬物(例えば、免疫抑制剤)または放射性毒素とコンジュゲートする。このようなコンジュゲートはここでは“免疫コンジュゲート”と呼ぶ。1個以上の細胞毒を含む免疫コンジュゲートは“免疫毒素”と呼ぶ。細胞毒または細胞毒性剤は、細胞に有害(例えば、殺す)薬剤を含む。例はタクソン、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、 α -コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびビユーロマイシンおよびそのアナログまたはホモログを含む。治療剤はまた、例えば、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、切除剤(例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNu)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン、アントラサイクリン類(例えば、ダウノルピシン(旧ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(旧アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))および抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)を含む(例えば、Seattle Genetics US 20090304721参照)。

【0238】

本発明の抗体とコンジュゲートできる治療細胞毒の他の例は、デュオカルマイシン類、カリチアマイシン類、マイタンシン類およびオーリスタチンおよびその誘導体を含む。カリチアマイシン抗体コンジュゲートの例は市販品である(MyloTargTM; Wyeth-Ayerst)。

【0239】

細胞毒を、当分野で利用可能なリンカー方法を使用して本発明の抗体とコンジュゲートできる。細胞毒を抗体とコンジュゲートするのに使用されているリンカータイプの例は、ヒドラゾン類、チオエーテル類、エステル類、ジスルフィド類およびペプチド含有リンカーを含むが、これらに限定されない。例えば、リソソーム区画内の低pHに感受性であるようにまたはプロテアーゼ類、例えば腫瘍組織で優先的に発現されるプロテアーゼ類、例えばカテプシン類(例えば、カテプシン類B、C、D)での分解に感受性であるようにリンカーを選択できる。

【0240】

細胞毒のタイプ、リンカーおよび治療剤を抗体とコンジュゲートするための方法についてのさらなる記載は、Saito et al., (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) Adv. Dru

10

20

30

40

50

g Deliv. Rev. 53:247-264もまた参照のこと。

【 0 2 4 1 】

本発明の抗体はまた放射性同位体とコンジュゲートして、放射免疫コンジュゲートとも呼ぶ細胞毒性放射性医薬を産生し得る。診断的または治療的に使用するための抗体とコンジュゲートできる放射性同位体の例は、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰およびルテチウム¹⁷⁷を含むが、これらに限定されない。放射免疫コンジュゲートの製造方法は当分野で確立されている。放射免疫コンジュゲートの例は、ZevalinTM (DEC Pharmaceuticals)およびBexxarTM (Corixa Pharmaceuticals)を含む市販品であり、類似方法を、本発明の抗体を使用する放射免疫コンジュゲートの製造に使用している。ある態様において、大環状キレート剤は1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロドデカン - N, N', N'', N''' - 四酢酸(DOTA)であり、これはリンカー分子を介して抗体に結合できる。このようなリンカー分子は通常当分野で知られ、Denardo et al., (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson et al., (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7; およびZimmerman et al., (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50に記載され、各々その全体を引用により本明細書に包含させる。

【 0 2 4 2 】

治療部分を抗体にコンジュゲートさせる技術は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)およびThorpe et al., (1982) Immunol. Rev. 62:119-58を参照のこと。

【 0 2 4 3 】

抗体は、標的抗原の免疫アッセイまたは精製に特に有用である固体支持体とも結合し得る。このような固体支持体は、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリビニルクロライドまたはポリプロピレンを含むが、これらに限定されない。

【 0 2 4 4 】

抗体組み合わせ

他の面において、本発明は、他の治療剤、例えば他の抗体、小分子阻害剤、mTOR阻害剤またはPI3キナーゼ阻害剤と使用する本発明のHER3抗体またはそのフラグメントに関する。例は、次のものを含むが、これらに限定されない：

HER1阻害剤：HER3抗体またはそのフラグメントをHER1阻害剤と共に使用でき、これは、マツズマブ(EMD72000)、アーピタックス(登録商標)/セツキシマブ(Imclone)、ベクティビックス(登録商標)/パニツムマブ(Amgen)、mAb 806およびニモツズマブ(The raCIM)、イレッサ(登録商標)/ゲフィチニブ(Astrazeneca); CI-1033(PD183805)(Pfizer)、ラパチニブ(GW-572016)(GlaxoSmithKline)、タイケルブ(登録商標)/トシル酸ラパチニブ(SmithKlineBeecham)、タルセバ(登録商標)/エルロチニブHC1(OSI-774)(OSI Pharma)およびPKI-166(Novartis)およびN-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[[[(3''S)]-テトラヒドロ-3-フラニル]オキシ]-6-キナゾリニル]-4(ジメチルアミノ)-2-ブテンアミド(商品名Tovok(登録商標)でBoehringer Ingelheimが販売)を含むが、これらに限定されない。

【 0 2 4 5 】

HER2阻害剤：HER3抗体またはそのフラグメントをHER2阻害剤と共に使用でき

、これは、ペルツズマブ(商品名OmniTarg(登録商標)でGenentechが販売)、トラスツマブ(商品名Herceptin(登録商標)でGenentech/Rocheが販売)、MM-111、ネラチニブ(別名HKI-272、(2E)-N-[4-[[3-クロロ-4-[(ピリジン-2-イル)メトキシ]フェニル]アミノ]-3-シアノ-7-エトキシキノリン-6-イル]-4-(ジメチルアミノ)プト-2-エナミドおよびPCT公開番号WO 05/028443に記載)、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ(商品名タイケルブ(登録商標)でGlaxoSmithKlineが販売)を含むが、これらに限定されない。

【0246】

HER3阻害剤：HER3抗体またはそのフラグメントをHER3阻害剤と共に使用でき、これは、MM-121、MM-111、IB4C3、2DID12(U3 Pharma AG)、AMG888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)およびHER3を阻害する小分子を含むが、これらに限定されない。

10

【0247】

HER4阻害剤：HER3抗体またはそのフラグメントをHER4阻害剤と共に使用できる。

【0248】

PI3K阻害剤：HER3抗体またはそのフラグメントをPI3キナーゼ阻害剤と共に使用でき、これは、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[[4-(メチルスルホニル)ピペラジン-1-イル]メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリン(別名GDC 0941およびPCT公開番号WO 09/036082およびWO 09/055730に記載)、2-メチル-2-[4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル]プロピオニトリル(別名BEZ 235またはNVP-BEZ 235およびPCT公開番号WO 06/122806に記載)、BKM120およびBYL719を含むが、これらに限定されない。

20

【0249】

mTOR阻害剤：HER3抗体またはそのフラグメントをmTOR阻害剤と共に使用でき、これは、テムシロリムス(商品名トーリセル(登録商標)でPfizerが販売)、リダフォロリムス(旧名称デフォロリムス、(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-「[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.04,9]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート、別名デフォロリムス、AP23573およびMK8669(Ariad Pharm.)およびPCT公開番号WO 03/064383に記載)、エペロリムス(RAD001)(商品名Afinitor(登録商標)でNovartisが販売)を含むが、これらに限定されない。1種以上の治療剤を、本発明のHER3抗体またはそのフラグメントの投与と同時に前にまたは後に投与し得る。

30

【0250】

本発明の抗体の製造方法

(i) 抗体をコードする核酸

40

本発明は、上記HER3結合抗体鎖のセグメントまたはドメインを含むポリペチドをコードする実質的に精製された核酸分子を提供する。本発明の核酸のいくつかは、HER3抗体重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列および/または軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。具体的態様において、核酸分子は表1に同定したものである。ある別の本発明の核酸分子は、表1に同定したヌクレオチド配列と実質的に同一(例えば、少なくとも65、80%、95%または99%)なヌクレオチド配列である。適当な発現ベクターから発現されたとき、これらのポリヌクレオチドによりコードされるポリペチドはHER3抗原結合能力を示すことができる。

【0251】

また本発明で提供されるのは、上記HER3結合抗体の重鎖または軽鎖の少なくとも1

50

個のCDR領域および通常全3個のCDR領域をコードするポリヌクレオチドである。いくつかの他のポリヌクレオチドは、上記HER3結合抗体の重鎖および/または軽鎖の全てまたは実質的に全ての可変領域配列をコードする。コード縮重のため、多様な核酸配列が免疫グロブリンアミノ酸配列の各々をコードする。

【0252】

本発明の核酸分子は抗体の可変領域および定常領域のいずれもコードし得る。本発明の核酸配列のいくつかは、表1に示すHER3抗体の成熟重鎖可変領域配列と実質的に同一(例えば、少なくとも80%、90%または99%)な成熟重鎖可変領域配列をコードするヌクレオチドである。いくつかの他の核酸配列は、表1に示すHER3抗体の成熟軽鎖可変領域配列と実質的に同一(例えば、少なくとも80%、90%または99%)な成熟軽鎖可変領域配列をコードするヌクレオチドである。

10

【0253】

ポリヌクレオチド配列は、デノボ固相DNA合成またはHER3結合抗体またはその結合フラグメントをコードする既存配列(例えば、下記実施例に記載する配列)のPCR突然変異誘発により製造できる。核酸の直接化学合成は当分野で知られる方法、例えばNarang et al., (1979) Meth. Enzymol. 68:90のホスホトリエステル方法; Brown et al., (1979) Meth. Enzymol. 68:109のホスホジエステル方法; Beaucage et al., (1981) Tetra. Lett., 22:1859のジエチルホスホロアミデート方法; および米国特許番号4,458,066の固体支持方法により達成できる。PCRによるポリヌクレオチド配列への変異導入は、例えば、PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19:967; およびEckert et al., (1991) PCR Methods and Applications 1:17に記載のとおり達成できる。

20

【0254】

また本発明で提供されるのは、上記HER3結合抗体の製造のための発現ベクターおよび宿主細胞である。種々の発現ベクターを、HER3結合抗体鎖または結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドの発現に使用できる。ウイルスベースおよび非ウイルス発現ベクターの両方とも、哺乳動物宿主細胞での抗体の産生に使用できる。非ウイルスベクターおよびシステムは、プラスミド、典型的にタンパク質またはRNAを発現するための発現カセットを伴うエピソームベクターおよびヒト人工的染色体を含む(例えば、Harrington et al., (1997) Nat Genet 15:345参照)。例えば、哺乳動物(例えば、ヒト)細胞でのHER3結合ポリヌクレオチドおよびポリペプチド発現に有用な非ウイルスベクターは、pThioHis A、BおよびC、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、BおよびC(Invitrogen, San Diego, CA)、MP5Vベクターおよび他のタンパク質を発現することが当分野で知られる多数の他のベクターを含む。有用なウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、SV40を使用したベクター、乳頭腫ウイルス、HBPEプスタイン・バーウイルス、ワクシニアウイルスベクターおよびセムリキ森林ウイルス(SFV)に基づくベクターを含む。Brent et al., (1995) supra; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807; およびRosenfeld et al., (1992) Cell 68:143参照。

30

40

【0255】

発現ベクターの選択は、ベクターを発現する意図する宿主細胞による。典型的に、発現ベクターは、HER3結合抗体鎖またはフラグメントをコードするポリヌクレオチドに操作可能に結合したプロモータおよび他の調節配列(例えば、エンハンサ)を含む。ある態様において、誘導性プロモータを使用して、誘導条件下以外での挿入配列の発現を阻止する。誘導性プロモータは、例えば、アラビノース、lacZ、メタロチオネインプロモータまたはヒートショックプロモータを含む。形質転換生物培養を、発現産物が宿主細胞に十分に耐容性であるコーディング配列に対して集団を偏向させることなく、非誘導条件下で伸長できる。プロモータに加えて、他の調節要素がHER3結合抗体鎖またはフラグメントの効率的発現のために必要であるかまたは望ましいことがある。これらの要素は、典型

50

的に A T G 開始コドンおよび隣接リボゾーム結合部位または他の配列を含む。さらに、発現効率は、使用する細胞系への適当なエンハンサの導入により高められ得る(例えば、Scharf et al., (1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125; およびBittner et al., (1987) Meth. Enzymol., 153:516参照)。例えば、S V 4 0 エンハンサまたはC M V エンハンサを、哺乳動物宿主細胞における発現増加に使用し得る。

【 0 2 5 6 】

発現ベクターはまた挿入されたH E R 3 結合抗体配列によりコードされるポリペプチドとの融合タンパク質を形成するための分泌シグナル配列位置を提供し得る。大抵、挿入されたH E R 3 結合抗体配列は、ベクターへの挿入前にシグナル配列と結合する。H E R 3 結合抗体軽および重鎖可変ドメインをコードする配列を受け入れるために使用するベクターは、しばしば定常領域またはその一部もコードする。このようなベクターは、定常領域との融合タンパク質としての可変領域の発現を可能にし、それにより、インタクト抗体またはそのフラグメントの産生に至る。典型的に、このような定常領域はヒトのである。

【 0 2 5 7 】

H E R 3 結合抗体鎖の担持および発現用の宿主細胞は原核細胞でも真核細胞でもよい。大腸菌は、本発明のポリヌクレオチドのクローニングおよび発現に有用な原核宿主の一つである。使用に適する他の微生物宿主は、桿菌、例えばバチルス・スプチリスおよび他の腸内細菌科、例えばサルモネラ、セラチアおよび種々のシュードモナス種を含む。これらの原核宿主において、典型的に宿主細胞に適合性の制御配列(例えば、複製開始点)を含む発現ベクターも製造できる。さらに、任意の数の多様な周知のプロモータ、例えばラクトースプロモータシステム、トリプトファン(t r p)プロモータシステム、ベータ-ラクタマーゼプロモータシステムまたはファージラムダのプロモータシステムが存在し得る。プロモータは、典型的に発現を、所望によりオペレータ配列と共に制御し、転写および翻訳の開始および完了のためのリボゾーム結合部位配列などを含む。他の微生物、例えば酵母も本発明のH E R 3 結合ポリペプチドの発現に使用できる。バキュロウイルスベクターと組み合わせた昆虫細胞も使用できる。

【 0 2 5 8 】

ある好ましい態様において、哺乳動物宿主細胞を、本発明のH E R 3 結合ポリペプチドの発現および産生に使用する。例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現するハイブリドーマ細胞株(例えば、実施例に記載する1 D 6 . C 9 骨髄腫ハイブリドーマクローン)または外因性発現ベクターを担持する哺乳動物細胞株(例えば、下に例示するS P 2 / 0 骨髄腫細胞)であり得る。これらは、任意の正常致死または正常または異常不死動物またはヒト細胞を含む。例えば、インタクト免疫グロブリンを分泌できる多くの適切な宿主細胞株が開発されており、C H O 細胞株、種々のC o s 細胞株、H e L a 細胞、骨髄腫細胞株、形質転換B細胞およびハイブリドーマを含む。ポリペプチド発現のための哺乳動物組織細胞培養の使用は、一般的に、例えば、Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987に記載されている。哺乳動物宿主細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、例えば複製開始点、プロモータおよびエンハンサ(例えば、Queen et al., (1986) Immunol. Rev. 89:49-68参照)および必要な処理情報部位、例えばリボゾーム結合部位、R N A スプライス部位、ポリアデニル化部位および転写ターミネータ配列を含み得る。これらの発現ベクター通常は、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルス由来のプロモータを含む。適切なプロモータは構成的、細胞型特異的、段階特異的および/または調節可能または制御可能であり得る。有用なプロモータは、メタロチオネインプロモータ、構成的アデノウイルス主要後期プロモータ、デキサメサゾン-誘導性M M T V プロモータ、S V 4 0 プロモータ、MRP p o l I I I I プロモータ、構成的M P S V プロモータ、テトラサイクリン-誘導性C M V プロモータ(例えばヒト最初期C M V プロモータ)、構成的C M V プロモータおよび当分野で知られるプロモータ-エンハンサ組み合わせを含むが、これら限定されない。

【 0 2 5 9 】

目的のポリヌクレオチド配列を含む発現ベクターの挿入方法は細胞性宿主のタイプによ

10

20

30

40

50

る。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが原核細胞で通常利用され、一方リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが他の細胞性宿主で使用され得る(一般的にSambrook, et al., supra参照)。他の方法は、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム処理、リポソーム仲介形質転換、注入および微量注入、弾道的方法、ピロソーム、免疫リポソーム、ポリカチオン：核酸コンジュゲート、ネイキッドDNA、人工的ウイルス粒子、ヘルペスウイルス構造的タンパク質VP22への融合(Elliot and O'Hare, (1997) Cell 88:223)、DNA取り込みの薬剤による亢進およびエクスビボ形質導入を含む。組み換えタンパク質の長期、高収率産生のために、安定な発現がしばしば望まれる。例えば、HER3結合抗体鎖または結合フラグメントを安定に発現する細胞株を、ウイルス複製開始点または内因性発現要素および選択可能マーカー遺伝子を含む本発明の発現ベクターを使用して製造できる。ベクター導入後、細胞を1～2日間富化培地で増殖させ、選択培地に移す。選択可能マーカーの目的は選択への耐性の付与であり、その存在により、選択培地中の導入配列の完全発現を成功させた細胞の増殖を可能にする。耐性の、安定形質移入細胞を、細胞型に適当な組織培養技術を使用して増殖できる。

【0260】

(ii) 本発明のモノクローナル抗体の産生

モノクローナル抗体(mAbs)を、慣用のモノクローナル抗体方法論、例えば、Kohler and Milstein, (1975) Nature 256:495の標準的体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む多様な技術により製造できる。モノクローナル抗体製造のための多くの技術は、例えば、Bリンパ球のウイルスまたは発癌性形質転換を使用し得る。

【0261】

ハイブリドーマ製造のための動物系はマウス系である。マウスで産生されるハイブリドーマは確立された方法である。免疫化プロトコルおよび融合のための免疫化脾細胞の単離のための技術は当分野で知られている。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)および融合法も知られている。

【0262】

本発明のキメラまたはヒト化抗体を、上記のとおり製造したマウスモノクローナル抗体の配列に基づき製造できる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを目的のマウスハイブリドーマから得て、標準的分子生物学技術を使用して非マウス(例えばヒト)免疫グロブリン配列を含むように改変できる。例えば、キメラ抗体を製造するために、マウス可変領域を、当分野で知られた方法を使用してヒト定常領域と結合できる(例えば、Cabilly et al.の米国特許番号4,816,567参照)。ヒト化抗体を賛成するために、マウスCDR領域を、当分野で知られた方法を使用してヒトフレームワークに挿入できる。例えば、Winterの米国特許番号5,225,539およびQueen et alの米国特許5,530,101; 5,585,089; 5,693,762および6,180,370参照。

【0263】

ある態様において、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。HER3に対するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を担持するトランスジェニックまたは染色体転移マウスを使用して産生できる。これらのトランスジェニックおよび染色体転移マウスは、ここではそれぞれHuMAbマウスおよびKMマウスと呼び、ここでは纏めて“ヒトIgマウス”と呼ぶ。

【0264】

HuMAbマウス(登録商標)(Medarex, Inc.)は、非再配列ヒト重(μ および δ)および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子微小遺伝子座を、不活性化内因性 μ および δ 鎖座である標的変異と共に含む(例えば、Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474):856-859参照)。従って、マウスはマウスIgMまたは δ の発現が低く、免疫化に応答して、導入したヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラス転換および体細胞変異に付され、高親和性ヒトIgGモノクローナルを産生する(Lonberg et al., (1994) supra; reviewed in Lonberg, (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg and Huszar, (1995) Intern. Rev. Immunol.13:65-93およびHarding and

10

20

30

40

50

Lonberg, (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci. 764:536-546参照)。H u M A b マウスの産生および使用およびこのようなマウスで行うゲノム修飾は、さらにTaylor et al., (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen et al., (1993) International Immunology 5:647-656; Tuailon et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724; Choi et al., (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen et al., (1993) EMBO J. 12:821-830; Tuailon et al., (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor et al., (1994) International Immunology 579-591; およびFishwild et al., (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に記載され、その内容全体を引用によりその全体を特に本明細書に包含させる。さらに、米国特許 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; および 5,770,429; 全てLonbergおよびKay; Surani et al.の米国特許番号 5,545,807; 全てLonbergおよびKayの P C T 公開番号 W O 9 2 1 0 3 9 1 8、W O 9 3 / 1 2 2 2 7、W O 9 4 / 2 5 5 8 5、W O 9 7 1 1 3 8 5 2、W O 9 8 / 2 4 8 8 4 および W O 9 9 / 4 5 9 6 2; およびKorman et alの P C T 公開番号 W O 0 1 / 1 4 4 2 4 も参照のこと。

【 0 2 6 5 】

他の態様において、本発明のヒト抗体は、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を担持するマウス、例えばヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を担持するマウスを使用して惹起できる。このようなマウスは“ K M マウス ” と呼び、Ishida et alの P C T 公開 W O 0 2 / 4 3 4 7 8 に詳述されている。

【 0 2 6 6 】

なおさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系が当分野で利用可能であり、本発明の H E R 3 結合抗体の惹起に使用できる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と呼ぶ代替トランスジェニック系を使用できる。このようなマウスは、例えば、Kucherlapati et alの米国特許 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 および 6,162,963 に記載されている。

【 0 2 6 7 】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替染色体転移動物系が当分野で利用可能であり、本発明の H E R 3 結合抗体の惹起に使用できる。例えば、“ T C マウス ” と呼ぶヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両者を担持するマウスを使用でき、このようなマウスはTomizuka et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を担持するウシが文献に記載されており (Kuroiwa et al., (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本発明の H E R 3 結合抗体の惹起に使用できる。

【 0 2 6 8 】

ヒト本発明のモノクローナル抗体はまたヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ方法を使用しても製造できる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ方法は当分野で確立され、下記実施例に記載する。例えば：Ladner et al.の米国特許 5,223,409; 5,403,484; および 5,571,698; Dower et al.の米国特許 5,427,908 および 5,580,717; McCafferty et al.の米国特許 5,969,108 および 6,172,197; および Griffiths et al.の米国特許 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 および 6,593,081 参照。

【 0 2 6 9 】

ヒト本発明のモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫細胞が、ヒト抗体応答が免疫化により産生されるように再構成されている S C I D マウスを使用しても製造できる。このようなマウスは、例えば、Wilson et al.の米国特許 5,476,996 および 5,698,767 に記載されている。

【 0 2 7 0 】

(iii) フレームワークまたは F c 操作

10

20

30

40

50

改変された本発明の抗体は、例えば抗体の特性を改善するために、V Hおよび/またはV L内のフレームワーク残基に修飾されているものを含む。典型的にこのようなフレームワーク修飾は、抗体の免疫原性を減らすために行う。例えば、一つの手法は、1個以上のフレームワーク残基の対応する生殖系列配列への“復帰突然変異”である。より具体的に、体細胞変異に付された抗体は、抗体が由来する生殖系列配列と異なるフレームワーク残基を有し得る。このような残基は、抗体フレームワーク配列と抗体が由来する生殖系列配列の比較により同定できる。フレームワーク領域配列をその生殖系列配置に戻すために、体細胞変異を、例えば、部位特異的突然変異誘発により生殖系列配列に“復帰突然変異”させる。このような“復帰突然変異”抗体もまた本発明に包含されることを意図する。

【0271】

10

他のタイプのフレームワーク修飾は、T細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的免疫原性を減らすために、フレームワーク領域または1個以上のCDR領域内でさえ1個以上の残基を突然変異させることを含む。この技法は“脱免疫原性化”と呼ばれ、Carr et al.の米国特許公開20030153043にさらに詳述される。

【0272】

フレームワークまたはCDR領域内で成される修飾に加えてまたはそれとは別に、本発明の抗体は、典型的に抗体の1個以上の機能的特性、例えば血清半減期、補体固定化、Fc受容体結合および/または抗原依存性細胞毒性を変えるために、Fc領域内に修飾を含むように改変し得る。さらに、本発明の抗体は、同様に抗体の1個以上の機能的特性を変えるために化学的修飾(例えば、1個以上の化学部分を抗体に結合できる)できまたはそのグリコシル化を変えるように修飾し得る。これらの態様の各々を下に詳述する。Fc領域の残基の番号付けは、KabatのEU指数である。

20

【0273】

一つの態様において、CH1のヒンジ領域を、ヒンジ領域におけるシステイン残基数が変わるように、例えば、増えるまたは得るように修飾する。この技法はさらにBodmer et al.の米国特許番号5,677,425に記載される。CH1のヒンジ領域のシステイン残基数を、例えば、軽鎖および重鎖の集合を促進するまたは抗体の安定性を上昇または減少させるために変える。

【0274】

他の態様において、抗体のFcヒンジ領域を、抗体の生物学的半減期を減らすように変異する。より具体的に、1個以上のアミノ酸変異を、抗体が天然Fc-ヒンジドメインpA結合に対してブドウ球菌性プロテインA(SpA)結合が障害されるように、Fc-ヒンジフラグメントのCH2-CH3ドメイン界面領域に導入する。この技法はさらにWard et al.の米国特許番号6,165,745に詳述される。

30

【0275】

さらに別の態様において、Fc領域を、抗体のエフェクター機能を変えるために少なくとも1個のアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することにより変える。例えば、1個以上のアミノ酸を、抗体のエフェクターリガンドに対する親和性が変わるが、親抗体の抗原結合能力を維持するように異なるアミノ酸残基で置換する。親和性が変えられるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。この技法は、Winter et al.の米国特許5,624,821および5,648,260にさらに詳述される。

40

【0276】

他の態様において、アミノ酸残基から選択された1個以上のアミノ酸を、抗体のC1q結合が変えられおよび/または補体依存性細胞毒性(CDC)が減らされるかまたはなくなるように異なるアミノ酸残基で置換する。この技法は、Idusogie et al.の米国特許6,194,551にさらに詳述される。

【0277】

他の態様において、1個以上のアミノ酸残基を変え、それにより、抗体が補体を固定する能力を変える。この技法はBodmer et al.のPCT公開WO94/29351にさらに

50

詳述される。

【0278】

さらに他の態様において、Fc領域を、1個以上のアミノ酸修飾により、抗体が抗体依存性細胞毒性(ADCC)を仲介する能力を高めるおよび/または抗体のFc受容体に対する親和性を高めるように修飾する。この技法はPrestaのPCT公開WO00/42072にさらに詳述される。さらに、ヒトIgG1のFcRI、FcRII、FcRIIIおよびFcRnに対する結合部位は位置づけられており、結合が改善された変異体が記載されている(Shields et al., (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604参照)。

【0279】

さらに別の態様において、抗体のグリコシル化を修飾する。例えば、非グリコシル化抗体(すなわち、グリコシル化を欠く抗体)を製造できる。グリコシル化は、例えば、抗体の“抗原”への親和性を高めるために変え得る。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1箇所以上のグリコシル化部位を変えることにより達成できる。例えば、1個以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位を除き、それによりその部位でのグリコシル化を無くするような1個以上のアミノ酸置換を行う。このような非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める。このような手法は、Co et al.の米国特許5,714,350および6,350,861にさらに詳述される。

【0280】

これに加えてまたはこれとは別に、抗体は、グリコシル化のタイプが変わるように修飾でき、例えばフコシル残基の量が少ない低フコシル化抗体または二分G1cNac構造が多い抗体である。このような変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を高めることが証明されている。このような炭水化物修飾は、例えば、グリコシル化機構が変更された宿主細胞での抗体の発現により達成できる。グリコシル化機構が変えられた細胞は文献に記載され、組み換え本発明の抗体を発現し、それによりグリコシル化が変えられた抗体を産生する宿主細胞として使用できる。例えば、Hang et al.のEP1,176,195は、細胞株で発現された抗体が低フコシル化であるような、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が機能的に破壊された細胞株を記載する。PrestaのPCT公開WO03/035835は、フコースをAsn(297)結合炭水化物に結合させる能力が減少し、また宿主細胞で発現された抗体が低フコシル化である変異体CHO細胞株、Lec13細胞を記載する(またShields et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740参照)。Umana et al.のPCT公開WO99/54342は、改変細胞株で発現された抗体で二分G1cNac構造が増加されるように糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ類(例えば、ベータ(1,4)-NアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))が改変された細胞株を記載し、これは抗体のADCC活性を高める(またUmana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180参照)。

【0281】

他の態様において、抗体は、その生物学的半減期を延長するように修飾する。種々の手法が可能である。例えば、Wardの米国特許番号6,277,375に記載のとおり次の変異の1個以上を導入できる：T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を延長するために、Presta et al.の米国特許5,869,046および6,121,022に記載のとおり、抗体をCH1またはCL領域内で修飾して、IgGのFc領域のCH2ドメインの2ループから取ったサルベージ受容体結合エピトープを含むように変更できる。

【0282】

(iv) 改変抗体の製造方法

上記のとおり、ここで示すVHおよびVL配列または完全長重鎖および軽鎖配列を有するHER3結合抗体を使用して、完全長重鎖および/または軽鎖配列、VHおよび/またはVL配列またはそれに結合した定常領域の修飾により新規HER3結合抗体を製造できる。それゆえに、本発明の他の面において、本発明のHER3結合抗体の構造的特性を使用して、本発明の抗体機能的特性の少なくとも1個、例えばヒトHER3への結合を維持

10

20

30

40

50

し、また H E R 3 の 1 個以上の機能的特性を阻害する構造的に関連する H E R 3 結合抗体の製造に使用する。例えば、本発明の抗体またはその変異の 1 個以上の C D R 領域を、上記のとおり、組み換え的に既知フレームワーク領域および/または他の C D R と組み合わせ、さらなる、組み換え的に改変された、本発明の H E R 3 結合抗体を製造できる。他のタイプの修飾は先のセクションに記載したものを含む。製造方法のための出発物質は、ここに提供する V H および/または V L 配列の 1 個以上または 1 個以上のその C D R 領域である。改変抗体を製造するために、実際ここに提供する V H および/または V L 配列の 1 個以上または 1 個以上のその C D R 領域を有する抗体の製造(すなわち、タンパク質としての発現)が必要である。むしろ、配列に含まれる情報を出発物質として使用して、元の配列由来の“第二世代”配列を製造し、次いで“第二世代”配列を製造し、タンパク質として発現させる。

10

【 0 2 8 3 】

従って、他の態様において、本発明は、配列番号 2、8、20、26、38、44、56、62、74、80、92、98、110、116、128、134、146、152、164、170、182、188、200、206、218、224、236、242、254、260、272、278、290、296、308、314、326、332、344、350、362 および 368 から成る群から選択される C D R 1 配列；配列番号 3、9、21、27、39、45、57、63、75、81、93、99、111、117、129、135、147、153、165、171、183、189、201、207、219、225、237、243、255、261、273、279、291、297、309、315、327、333、345、351、363 および 369 から成る群から選択される C D R 2 配列；および/または配列番号 4、10、22、28、40、46、58、64、75、82、94、100、112、118、130、136、148、154、166、172、184、190、202、208、220、226、238、244、256、262、274、280、292、298、310、316、328、334、346、352、364 および 370 から成る群から選択される C D R 3 配列を有する重鎖可変領域抗体配列；および配列番号 5、11、23、29、41、47、59、65、77、83、95、101、113、119、131、137、149、155、167、173、185、191、203、209、221、227、239、245、257、263、275、281、293、299、311、317、329、335、347、353、365 および 371 から成る群から選択される C D R 1 配列；配列番号 6、12、24、30、42、48、60、66、78、84、96、102、114、120、132、138、150、156、168、174、186、192、204、210、222、228、240、246、258、264、276、282、294、300、312、318、330、336、348、354、366 および 372 から成る群から選択される C D R 2 配列；および/または配列番号 7、13、25、31、43、49、61、67、79、85、97、103、115、121、133、139、151、157、169、175、187、193、205、211、223、229、241、247、259、265、277、283、295、301、313、319、331、337、349、355、367 および 373 から成る群から選択される C D R 3 配列を有する軽鎖可変領域抗体配列から成る H E R 3 結合抗体の製造方法であって、重鎖可変領域抗体配列および/または軽鎖可変領域抗体配列内の少なくとも 1 個のアミノ酸残基を少なくとも 1 個の変更された抗体配列を作るように変更し、変更された抗体配列をタンパク質として発現させることを含む、方法を提供する。変更された抗体配列はまた U S 2 0 0 5 0 2 5 5 5 2 に記載のとおり固定された C D R 3 配列または最小必須結合決定基および C D R 1 および C D R 2 配列の多様性を有する抗体ライブラリーのスクリーニングにより製造できる。スクリーニングは、抗体を抗体ライブラリーからスクリーニングするのに適当なスクリーニング方法、例えばファージディスプレイ方法により実施できる。

20

30

40

【 0 2 8 4 】

50

標準的分子生物学技術を使用して、変更された抗体配列を製造および発現できる。変更された抗体配列によりコードされる抗体は、ここに記載するHER3結合抗体の機能的特性の1個、いくつかまたは全てを維持し、該機能的特性は、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3への特異的結合を含み；該抗体はHER3と結合し、ホスホ-HERアッセイにおいてHERシグナル伝達活性阻害によりHER3生物学的活性を中和する。

【0285】

変更された抗体の機能的特性は、当分野で利用可能なおよび/またはここに記載する、例えば実施例に示す標準的アッセイ(例えば、ELISA)を使用して評価できる。

【0286】

本発明の抗体の製造方法のある種の態様において、変異を無作為にまたは選択的にHER3結合抗体コーディング配列の全てまたは一部に導入でき、得られた修飾HER3結合抗体を、ここに記載するとおり結合活性および/または他の機能的特性についてスクリーニングできる。変異的方法は文献に記載されている。例えば、ShortのPCT公開WO02/092780は、飽和突然変異誘発、合成ライゲーションアセンブリまたはこれらの組み合わせを使用する抗体変異の創製およびスクリーニング方法を記載する。あるいは、Lazar et al.のPCT公開WO03/074679は、抗体の生理化学特性を最適化するためのコンピュータ利用スクリーニング方法を記載する。

【0287】

本発明の抗体の特徴づけ

本発明の抗体は、種々の機能的アッセイにより特徴づけできる。例えば、ここに記載するホスホ-HERアッセイにおけるHERシグナル伝達阻害により生物学的活性を中和する能力、HER3タンパク質(例えば、ヒトおよび/またはカニクイザルHER3)への親和性、エピトープピンニング、タンパク質分解に対する抵抗性およびHER3下流シグナル伝達を遮断する能力により特徴づけできる。種々の方法を使用して、HER3仲介シグナル伝達を測定できる。例えば、HERシグナル伝達経路は(i)ホスホ-HER3測定；(ii)HER3または他の下流シグナル伝達タンパク質(例えばAkt)のリン酸化測定、(iii)ここに記載するリガンド遮断アッセイ、(iv)ヘテロ二量体形成、(v)HER3依存性遺伝子発現特徴、(vi)受容体内部移行および(vii)HER3駆動細胞表現型(例えば増殖)によりモニタできる。

【0288】

抗体がHER3に結合する能力は、目的の抗体をラベリングすることにより直接的にまたは該抗体はラベリングされてなくてよく、結合を間接的に当分野で知られる種々のサンドイッチアッセイ形式で検出できる。

【0289】

ある態様において、本発明のHER3結合抗体は、HER3ポリペプチドまたはタンパク質への参照HER3結合抗体の結合を遮断または競合する。これらはまた完全ヒト上記HER3結合抗体であり得る。これらはまた参照抗体と同じエピトープに結合する他のマウス、キメラまたはヒト化HER3結合抗体であり得る。参照抗体結合を遮断または競合する能力は、試験下のHER3結合抗体が参照抗体で規定されるのと同じまたは類似のエピトープまたは参照HER3結合抗体が結合するエピトープと十分に近位のエピトープに結合することを示す。このような抗体は、特に参照抗体で同定された有益な特性を共有する可能性が高い。参照抗体を遮断または競合する能力は、例えば、競合結合アッセイにより決定できる。競合結合アッセイで、試験下の抗体を、共通抗原、例えばHER3ポリペプチドまたはタンパク質への参照抗体の特異的結合を阻害する能力について試験する。試験抗体は、過剰の試験抗体が実質的に参照抗体の結合を阻害するならば、抗原への特異的結合に対して参照抗体と競合する。実質的阻害は、試験抗体が参照抗体の特異的結合を通常少なくとも10%、25%、50%、75%または90%減らすことを意味する。

【0290】

HER3タンパク質への結合についてHER3結合抗体と参照HER3結合抗体の競合を評価するために使用できる多くの既知の競合結合アッセイがある。これらは、例えば、

10

20

30

40

50

固相直接または間接放射免疫アッセイ(R I A)、固相直接または間接酵素免疫アッセイ(E I A)、サンドイッチ競合アッセイ(Stahli et al., (1983) Methods in Enzymology 9: 242-253参照); 固相直接ビオチン - アビジン E I A (Kirkland et al., (1986) J. Immunol. 137:3614-3619参照); 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ Harlow & Lane, supra参照); I - 1 2 5 標識を使用する固相直接標識 R I A (Morel et al., (1988) Molec. Immunol. 25:7-15参照); 固相直接ビオチン - アビジン E I A (Cheung et al., (1990) Virology 176:546-552); および直接標識 R I A (Moldenhauer et al., (1990) Scand. J. Immunol. 32:77-82)を含む。典型的に、このようなアッセイは、これらの非標識試験 H E R 3 結合抗体および標識参照抗体のいずれかを担持する固体表面または細胞への精製抗原の結合の使用を含む。競合的阻害は、試験抗体存在下での固体表面または細胞に結合した標識の量の決定により測定する。通常試験抗体は過剰に存在する。競合アッセイ(競争抗体)で同定した抗体は、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体および立体障害が起きるのに参照抗体が結合したエピトープと十分に近位の隣接エピトープに結合する抗体を含む。

【 0 2 9 1 】

選択した H E R 3 結合モノクローナル抗体が特有のエピトープに結合するか否かを決定するために、各抗体を、市販の試薬(例えば、Pierce, Rockford, ILの試薬)を使用してビオチニル化し得る。非標識モノクローナル抗体およびビオチニル化モノクローナル抗体を使用する競合試験を、H E R 3 ポリペチド被覆 E L I S A プレートを使用して行い得る。ビオチニル化 M A b 結合をストレプトアビジン - アルカリホスファターゼプローブで検出できる。精製 H E R 3 結合抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプ E L I S A を実施できる。例えば、マイクロタイタープレートのウェルを 1 μ g/ml の抗ヒト I g G で、一夜、4 で被覆し得る。1 % B S A で遮断後、プレートを 1 μ g/ml 以下のモノクローナル H E R 3 結合抗体または精製アイソタイプコントロールと、環境温度で 1 ~ 2 時間反応させる。次いでウェルをヒト I g G 1 またはヒト I g M - 特異的アルカリホスファターゼ - コンジュゲートプローブと反応させる。次いでプレートを発色させ、精製抗体のアイソタイプが決定できるように分析する。

【 0 2 9 2 】

モノクローナル H E R 3 結合抗体の H E R 3 ポリペチドを発現する生存細胞への結合を証明するために、フローサイトメトリーを使用できる。要約すると、H E R 3 発現細胞株(標準的増殖条件下で増殖)を種々の濃度の H E R 3 結合抗体と、0.1 % B S A および 1 0 % ウシ胎児血清含有 P B S 中で混合し、4 で 1 時間インキュベートし得る。洗浄後、細胞をフルオレセイン - 標識抗ヒト I g G 抗体と、一次抗体染色と同じ条件下で反応させる。サンプルを、一細胞上で開閉される光および側方散乱特性を使用する F A C S c a n 装置により分析できる。蛍光顕微鏡を使用する別のアッセイをフローサイトメトリーアッセイに加えてまたは変わりに使用できる。細胞をまさに長期のように染色し、蛍光顕微鏡で試験できる。この方法は個々の細胞の可視化を可能にするが、抗原密度により感受性が低下し得る。

【 0 2 9 3 】

本発明の H E R 3 結合抗体を、ウェスタンブロッティングにより H E R 3 ポリペチドまたは抗原性フラグメントとの反応性についてさらに試験し得る。要約すると、精製 H E R 3 ポリペチドまたは融合タンパク質または H E R 3 発現細胞から抽出した細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に付す。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロース膜に移し、1 0 % ウシ胎児血清で遮断し、試験するモノクローナル抗体でプローブする。ヒト I g G 結合を、ヒト I g G アルカリホスファターゼを使用して検出し、B C I P / N B T 基質錠剤(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)で発色できる。

【 0 2 9 4 】

多くの読み出し情報を、リガンド誘発ヘテロ二量体形成の細胞ベースのアッセイにおける H E R 3 抗体の有効性および特異性の評価に使用できる。活性を次の 1 個以上により評

10

20

30

40

50

価できる：

(i) 標的細胞株、例えばMCF-7乳癌細胞中の他のE G FファミリーメンバーでのH E R 2のリガンド誘発ヘテロ二量体化の阻害。細胞ライセートからのH E R 2複合体の免疫沈殿を、他のE G F受容体の非存在下／存在下で受容体 - 特異的抗体と共に実施でき、複合体内のそれらの生物学的に関連するリガンドを他のE G F受容体に対する抗体のプロービングによる電気泳動／ウェスタン伝達後に分析できる。

【0295】

(ii) リガンド活性化ヘテロ二量体によるシグナル伝達経路活性化の阻害。H E R 3との結合は、受容体のE G Fファミリーの他のメンバーがリガンド結合後に最大細胞性応答を誘発するためのキーであるように見える。キナーゼ欠損H E R 3の場合、H E R 2は、後の増殖因子リガンドの結合が起こるようにシグナル伝達を可能にするために機能的チロシンキナーゼドメインを提供する。それゆえに、H E R 2およびH E R 3を共発現する細胞をリガンド、例えばヘレグリンで、阻害剤非存在下および存在下に処理し、H E R 3チロシンリン酸化に対する影響を処置細胞ライセートからのH E R 3の免疫沈殿および続く抗ホスホチロシン抗体を使用するウェスタンブロットティングを含む多くの方法によりモニターできる(詳細はAgus op. cit. 参照)。あるいは、Waddleton et al., (2002) Anal. Biochem. 309:150-157に記載のとおり、ハイスループットアッセイを、H E R 3を可溶化ライセートを抗H E R 3受容体抗体で被覆した96ウェルプレートのウェルに捕捉し、チロシンリン酸化を、例えば、ユーロピウム標識抗ホスホチロシン抗体を使用して測定することにより開発できる。

【0296】

この手法の拡大版として、活性化受容体ヘテロ二量体の下流を活性化することが知られるエフェクター分子、例えばマイトージェン - 活性タンパク質キナーゼ群 (M A P K) およびA k tを直接、処置ライセートから免疫沈殿し、これらのタンパク質の活性化形態を検出する抗体とブロットティングするかまたはこれらのタンパク質が特異的基質を修飾／活性化する能力を分析することにより分析してよい。

【0297】

(iii) リガンド誘発細胞性増殖の阻害。多様な細胞株、例えば多くの乳房および前立腺癌細胞株は、E r b B受容体の組み合わせを共発現することが知られている。アッセイを24 / 48 / 96ウェル形式で、D N A合成(トリチウム標識チミジン取り込み)、細胞数増加(クリスタルバイオレット染色)などに基づく読み出し情報で実施できる。

【0298】

多くの読み出し情報を使用して、リガンド非依存性ホモおよびヘテロ二量体形成の細胞ベースのアッセイにおけるH E R 3抗体の有効性および特異性を評価できる。例えば、H E R 2過発現は、自発性二量体形成の結果としてキナーゼドメインのリガンド非依存性活性化を誘発する。過発現したH E R 2は、他のH E R分子、例えばH E R 1、H E R 3およびH E R 4とホモまたはヘテロ二量体を形成する。

【0299】

抗体またはそのフラグメントが、腫瘍原性表現型がH E R 3ヘテロ二量体細胞シグナル伝達のリガンド活性化に少なくとも一部依存性であることが知られるヒト腫瘍細胞株、例えばBxPC3膵癌細胞などの腫瘍異種移植片のインビボ増殖を阻止する能力。これは、免疫不全マウスを単独でまたは当該細胞株に適当な細胞毒性剤と組み合わせて用いて評価できる。機能的アッセイの例は下記実施例セクションにも記載する。

【0300】

予防および治療使用

本発明は、有効量の本発明の抗体を処置を必要とする対象に投与することによる、H E R 3シグナル伝達経路と関連する疾患または障害の処置方法を提供する。具体的態様において、本発明は、有効量の本発明の抗体を処置を必要とする対象に投与することによる、癌(例えば、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、肝癌、胃癌、膵癌、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、骨肉腫、扁平上皮細胞癌、末梢神経鞘腫瘍、シュ

10

20

30

40

50

ワン腫、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、バレット食道癌、神経膠芽腫、軟組織の明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎癌、黒色腫、前立腺癌、良性前立腺肥大(BPH)、女性化乳房および子宮内膜症)の処置方法を提供する。ある態様において、本発明は、有効量の本発明の抗体を処置を必要とする対象に投与することによる、HERシグナル伝達経路と関連する癌の処置または予防方法を提供する。

【0301】

具体的態様において、本発明は、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、肝癌、胃癌、脾癌、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、骨肉腫、扁平上皮細胞癌、末梢神経鞘腫瘍シュワン腫、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、バレット食道癌、神経膠芽腫、軟組織の明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎癌、黒色腫、前立腺癌、良性前立腺肥大(BPH)、女性化乳房および子宮内膜症を含むが、これらに限定されないHERシグナル伝達経路と関連する癌の処置方法を提供する。

10

【0302】

一つの態様において、本発明は、HER3抗体またはそのフラグメントを使用する食道癌の処置方法を提供する。

【0303】

一つの態様において、本発明は、HER3抗体またはそのフラグメントを使用する良性前立腺肥大(BPH)の処置に関連する。BPHは、高齢男性に一般的な疾患であり、尿道の圧迫を起こし、排尿および膀胱問題に至る前立腺の非新生物拡大により特徴付けられる(Mahapokai1 W, van Sluijs FJ & Schalken JA. 2000 Prostate Cancer and Prostatic Diseases 3, 28-33)。BPHの解剖的または顕微鏡的証拠が60~70歳の男性の約55%の剖検で存在する。前立腺の経尿道的切除は長年処置選択肢である。結果として、BPHは、高齢男性の外科的介入の最も一般的な理由の一つである。処置の低浸潤性方法は次のものを含む：

20

(i) アルファ1-ブロッカー(ドキサゾシン、ブラゾシン、タムスロシン、テラゾシンおよびアルフゾシン)は、高血圧の処置にも使用される一群の薬である。これらの薬物は膀胱頸部および前立腺の筋肉を弛緩させ、排尿を容易にする。

(ii) フィナスチリドおよびデュタステライドは、アンドロゲンレベルを下げ、そうして前立腺のサイズを小さくし、尿流速を上げ、BPHの症状を軽減する。症状改善が観察されるまで3~6ヶ月間かかり得る。フィナスチリドおよびデュタステライドの使用と関連する潜在的副作用は性欲低下と不能を含む。

30

【0304】

実験の章での結果は、初めて、BPHがニューレグリン依存性適応症であることを証明した。本知見はまたMOR10703が、性的成熟ラットでホルモンレベルに影響することなく前立腺サイズを顕著に減少させることも示し、MOR10703がBPHの処置に有用であることを示唆する。

【0305】

BPH治療剤としてMOR10703および他のHER3抗体をさらに試験するために、一次ヒトBPH外科的標本を、無胸腺マウスまたはラットに移植し、Her3抗体の効果をモデルを使用して試験し得る(Otto U et al. Urol Int 1992;48:167-170)。あるいは、BPHの側面を5-アンドロスタン-3 β ,17 β -ジオールとエストラジオールの長期投与を介して去勢イヌに誘発し、HER3抗体をこれらのイヌモデルで試験できる(Walsh PC, Wilson JD. J Clin Invest 1976;57:1093-1097)。

40

【0306】

一つの態様において、本発明は、HER3抗体またはそのフラグメントを使用する女性化乳房の処置に関する。女性化乳房の物理的顕在化は、男性での乳房拡大であり、通常両側の乳房で起こるが、片方のみのこともあり、非対称的または一側性女性化乳房として知られる。女性化乳房の原因は通常次のものである：

(i) テストステロン対エストロゲン比を不均衡にする高エストロゲンレベル。

(ii) 前立腺癌またはBPH処置に使用したアンドロゲンアンタゴニストまたは抗アンド

50

ロゲン。これらの薬物はテストステロンを抑制するが、テストステロン抑制により、エストロゲンが上昇し始める。

【 0 3 0 7 】

多くの治験薬が現在試験されているが、現在女性化乳房で承認された処置はない。結果として、女性化乳房は乳房組織の外科的切除により処置される。男性乳腺のMOR10703誘発不可逆性萎縮の観察は、女性化乳房の処置に有益であり得ることを示す。

【 0 3 0 8 】

ヒト女性化乳房の処置におけるMOR10703および他のH E R 3抗体をさらに試験するために、女性化乳房のトランスジェニックマウスモデルを使用できる。これらのモデルは、マウス乳腺にヒトアロマターゼを発現させることにより開発され、ヒト女性化乳房の多くの面を再現する(Li et al., Endocrinology 2002;143:4074-4083; Tekmal et al., Cancer Res 1996;56:3180-318)。

【 0 3 0 9 】

一つの態様において、本発明は、H E R 3抗体またはそのフラグメントを使用する女性化乳房の処置に関する。MOR10703および他のH E R 3抗体はまた、子宮の裏側(子宮内膜)からの細胞が子宮腔外に出現し、増殖する婦人科学的状態である子宮内膜症の処置についても試験する。子宮内膜症の主であるが、普遍的ではない症状は、種々の顕性化での骨盤痛である。子宮内膜症の根底の原因は十分に特徴付けられていないが、エストロゲン存在に依存性であると考えられる。雌マウスにおけるMOR10703誘発子宮内膜萎縮が子宮重量を減少させたため、子宮内膜症処置に使用し得る。MOR10703および他のH E R 3抗体の子宮内膜症に対する効果をさらに試験するために、正常循環および卵巣摘出無胸腺マウスまたは循環非肥満糖尿病性(N O D) - 重症複合免疫不全(S C I D)マウスに増殖期のヒト子宮内膜を腹腔を移植し、これらのS C I Dマウスをモデルとして使用できる(Grummer et al., 2001. Human Reproduction; 16; 1736-1743)。

【 0 3 1 0 】

H E R 3抗体はまた呼吸器疾患、骨粗鬆症、骨関節症、多嚢胞性腎臓疾患、糖尿病、統合失調症、血管疾患、心臓疾患、非発癌性増殖性疾患、線維症および神経変性疾患、例えばアルツハイマー病を含むが、これらに限定されない他の異常または欠損H E R シグナル伝達と関連する障害の処置または予防にも使用できる。

【 0 3 1 1 】

H E R 3結合抗体との組み合わせ処置に適切な薬剤は、E r b Bシグナル伝達経路を調節できることが知られる標準治療剤を含む。H E R 2の標準治療剤の適切な例は、Herceptinおよびタイケルブを含むが、これらに限定されない。E G F Rの標準治療剤の適切な例は、イレッサ、タルセバ、アービタックスおよびベクティビックスを含むが、これらに限定されない。H E R 3結合抗体との組み合わせ処置に適切な他の薬剤は、受容体チロシンキナーゼ群、G - タンパク質共役受容体、増殖/生存シグナル伝達経路、核ホルモン受容体、アポトーシス経路、細胞周期および血管形成を調節するものを含み得るが、これらに限定されない。

【 0 3 1 2 】

診断的使用

一つの面において、本発明は、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)または癌を有するまたは癌を発症するリスクのある個体の状況においてH E R 3タンパク質および/または核酸発現ならびにH E R 3タンパク質機能を決定する診断的アッセイを包含する。

【 0 3 1 3 】

診断的アッセイ、例えば競合的アッセイは、共通結合パートナーの限られた数の結合部位について標識アナログ(“トレーサー”)が試験サンプル検体と競合する能力に基づく。結合パートナーは、一般的に競合の前または後に不溶化され、次いで、結合パートナーに結合したトレーサーおよび検体を非結合トレーサーおよび検体と分離する。この分離は傾捨(結合パートナーが予め不溶化されているとき)または遠心分離(結合パートナーが競合

10

20

30

40

50

的反応後沈殿するとき)により達成される。試験サンプル検体の量は、マーカー物質の量により測定した結合トレーサー量と反比例する。試験サンプルに存在する検体の量を定量的に決定するために、既知の量の検体での用量 - 応答曲線を調製し、試験結果と比較する。これらのアッセイは、酵素を検出可能マーカーとして使用するとき E L I S A システムと呼ばれる。この形態のアッセイにおいて、抗体と H E R 3 結合抗体の競合的結合が、血清サンプル中の抗体、最も具体的に、血清サンプル中の中和抗体の指標である、結合 H E R 3 タンパク質、好ましくは本発明の H E R 3 エピトープをもたらす。

【 0 3 1 4 】

本アッセイの顕著な利点は、測定が抗体を直接中和することである(すなわち、H E R 3 タンパク質、具体的に、エピトープの結合を妨害するもの)。このようなアッセイ、特に E L I S A 試験の形態は臨床環境および日常的血液スクリーニングで広く適用されている。

10

【 0 3 1 5 】

本発明の他の面は、個体における H E R 3 核酸発現または H E R 3 タンパク質活性を決定し、それにより該個体に適当な治療または予防剤を選択する方法を提供する(ここでは“薬理ゲノミクス”と呼ぶ)。薬理ゲノミクスは、個体の遺伝子型(例えば、個体が特定の薬剤に応答する能力を決定するために試験した個体の遺伝子型)に基づく個体の治療または予防処置のための薬剤(例えば、薬物)の選択を可能にする。

【 0 3 1 6 】

本発明のさらに別の面は、治療における H E R 3 タンパク質の発現または活性に対する薬剤(例えば、薬物)の影響のモニタリングに関する。

20

【 0 3 1 7 】

医薬組成物

H E R 3 結合抗体(インタクトまたは結合フラグメント)を含む医薬または無菌組成物を製造するために、H E R 3 結合抗体(インタクトまたは結合フラグメント)を薬学的に許容される担体または添加物と混合する。組成物は、癌(乳癌、結腸直腸癌、肺癌、多発性骨髄腫、卵巣癌、肝癌、胃癌、膵癌、急性骨髄球性白血病、慢性骨髄球性白血病、骨肉腫、扁平上皮細胞癌、末梢神経鞘腫瘍シュワン腫、頭頸部癌、膀胱癌、食道癌、パレット食道癌、神経膠芽腫、軟組織の明細胞肉腫、悪性中皮腫、神経線維腫症、腎癌、黒色腫、前立腺癌、良性前立腺肥大(B P H)、女性化乳房および子宮内膜症)の処置または予防に適切な1種以上の他の治療剤をさらに含み得る。

30

【 0 3 1 8 】

治療および診断剤の製剤は、例えば、凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液、ローションまたは懸濁液の形で、生理学的に許容される担体、添加物または安定化剤との混合により製造できる(例えば、Hardman et al., (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 参照)。

40

【 0 3 1 9 】

治療のための投与レジメンの選択は、該物体の血清または組織代謝回転速度、症状のレベル、物体の免疫原性および生物学的マトリクスにおける標的細胞の接近性を含む、数種の因子による。ある態様において、投与レジメンは、許容されるレベルの副作用に一致して、患者に送達される治療の量を最大化する。従って、送達される生物剤の量は、一部、特定の物質および処置する状態の重症度による。適当な投与量の抗体、サイトカインおよび小分子の選択のための指標は利用可能である(例えば、Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclon

50

al Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baert et al., (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Migrom et al., (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamon et al., (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitz et al., (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghosh et al., (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipsky et al., (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602参照)。

【0320】

適当な投与量の決定は、例えば、当分野で処置に影響することが知られたまたは処置に影響することが予測されるパラメータまたは因子を使用して、臨床医が行う。一般的に、最適投与量より幾分少ない量で投与を開始し、その後、何らかの負の副作用に対して所望のまたは最適効果が得られるまで少しずつ増加させる。重要な診断的指標は、例えば、炎症の症状、または産生される炎症性サイトカインレベルである。

【0321】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者に毒性ではなく、特定の患者、組成物および投与方法で所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分の量を得るために、変わり得る。選択した投与量は、用いる特定の発明の組成物またはそのエステル、塩またはアミドの活性、投与時間、用いる特定の化合物の排泄速度、処置期間、他の薬物、用いる特定の組成物と組み合わせる化合物および/または物質、処置する患者の年齢、性別、体重、状態、一般的状态および薬歴などの医学分野で知られた因子を含む、多様な薬物動態因子による。

【0322】

本発明の抗体またはそのフラグメントを含む組成物は、連続的注入でまたは、例えば、1日、1週間または週1~7回の間隔での投与により提供され得る。静脈内、皮下、局所的、経口、経鼻、直腸、筋肉内、脳内または吸入により投与され得る。特異的投与プロトコルは、顕著な望ましくない副作用を避ける最大投与量または投与頻度を含む。総週投与量は少なくとも0.05 µg/kg体重、少なくとも0.2 µg/kg、少なくとも0.5 µg/kg、少なくとも1 µg/kg、少なくとも10 µg/kg、少なくとも100 µg/kg、少なくとも0.2 mg/kg、少なくとも1.0 mg/kg、少なくとも2.0 mg/kg、少なくとも10 mg/kg、少なくとも25 mg/kgまたは少なくとも50 mg/kgである(例えば、Yang et al., (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold et al., (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liu et al., (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portielji et al., (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144参照)。抗体またはそのフラグメントの所望の投与量は、モル濃度/kg体重ベースの抗体またはポリペプチドとほぼ同じである。抗体またはそのフラグメントの所望の血漿濃度は、モル濃度/kg体重でおおよそである。投与量は少なくとも15 µg、少なくとも20 µg、少なくとも25 µg、少なくとも30 µg、少なくとも35 µg、少なくとも40 µg、少なくとも45 µg、少なくとも50 µg、少なくとも55 µg、少なくとも60 µg、少なくとも65 µg、少なくとも70 µg、少なくとも75 µg、少なくとも80 µg、少なくとも85 µg、少なくとも90 µg、少なくとも95 µgまたは少なくとも100 µgであり得る。対象への投与は少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回または12回またはそれ以上の回数であり得る。

【0323】

本発明の抗体またはそのフラグメントについて、患者に投与される投与量は、0.0001 mg/kg~100 mg/kg患者体重であり得る。投与量は0.0001 mg/kgおよび20 mg/kg、0.0001 mg/kgおよび10 mg/kg、0.0001 mg/kgおよび5 mg/kg、0.0001 および2 mg/kg、0.0001 および1 mg/kg、0.0001 mg/kgおよび0.75 mg/kg、0.0001 mg/kgおよび0.5 mg/kg、0.0001 mg/kg~0.25 mg/kg、0.0001~0.15 mg/kg、0.0001~0.10 mg/kg、0.0001~0.5 mg/kg、0.0001~0.25 mg/kgまたは0.01~0.10 mg/kg患者体重であり得る。

【0324】

発明の抗体またはそのフラグメントの投与量は、患者の体重キログラム(kg)をmg/kgで投与すべき投与量に掛けて計算する。本発明の抗体またはそのフラグメントの投与量は患者体重で150 µg/kg以下、125 µg/kg以下、100 µg/kg以下、95 µg/kg以下、90 µg/kg以下、85 µg/kg以下、80 µg/kg以下、75 µg/kg以下、70 µg/kg以下、65 µg/kg以下、60 µg/kg以下、55 µg/kg以下、50 µg/kg以下、45 µg/kg以下、40 µg/kg以下、35 µg/kg以下、30 µg/kg以下、25 µg/kg以下、20 µg/kg以下、15 µg/kg以下、10 µg/kg以下、5 µg/kg以下、2.5 µg/kg以下、2 µg/kg以下、1.5 µg/kg以下、1 µg/kg以下、0.5 µg/kg以下または0.5 µg/kg以下であり得る。

10

【0325】

本発明の抗体またはそのフラグメントの単位投与量は0.1mg~20mg、0.1mg~15mg、0.1mg~12mg、0.1mg~10mg、0.1mg~8mg、0.1mg~7mg、0.1mg~5mg、0.1~2.5mg、0.25mg~20mg、0.25~15mg、0.25~12mg、0.25~10mg、0.25~8mg、0.25mg~7mg、0.25mg~5mg、0.5mg~2.5mg、1mg~20mg、1mg~15mg、1mg~12mg、1mg~10mg、1mg~8mg、1mg~7mg、1mg~5mgまたは1mg~2.5mgであり得る。

【0326】

本発明の抗体またはそのフラグメントの投与量は、対象において少なくとも0.1 µg/ml、少なくとも0.5 µg/ml、少なくとも1 µg/ml、少なくとも2 µg/ml、少なくとも5 µg/ml、少なくとも6 µg/ml、少なくとも10 µg/ml、少なくとも15 µg/ml、少なくとも20 µg/ml、少なくとも25 µg/ml、少なくとも50 µg/ml、少なくとも100 µg/ml、少なくとも125 µg/ml、少なくとも150 µg/ml、少なくとも175 µg/ml、少なくとも200 µg/ml、少なくとも225 µg/ml、少なくとも250 µg/ml、少なくとも275 µg/ml、少なくとも300 µg/ml、少なくとも325 µg/ml、少なくとも350 µg/ml、少なくとも375 µg/mlまたは少なくとも400 µg/mlの血清力価を達成し得る。あるいは、本発明の抗体またはそのフラグメントの投与量は、対象において少なくとも0.1 µg/ml、少なくとも0.5 µg/ml、少なくとも1 µg/ml、少なくとも2 µg/ml、少なくとも5 µg/ml、少なくとも6 µg/ml、少なくとも10 µg/ml、少なくとも15 µg/ml、少なくとも20 µg/ml、少なくとも25 µg/ml、少なくとも50 µg/ml、少なくとも100 µg/ml、少なくとも125 µg/ml、少なくとも150 µg/ml、少なくとも175 µg/ml、少なくとも200 µg/ml、少なくとも225 µg/ml、少なくとも250 µg/ml、少なくとも275 µg/ml、少なくとも300 µg/ml、少なくとも325 µg/ml、少なくとも350 µg/ml、少なくとも375 µg/mlまたは少なくとも400 µg/mlの血清力価を達成し得る。

20

30

【0327】

本発明の抗体またはそのフラグメントの投与を繰り返してよく、投与を少なくとも1日、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、30日間、45日間、2ヶ月間、75日間、3ヶ月間または少なくとも6ヶ月間離してよい。

【0328】

特定の患者への有効量は、例えば、処置する状態、患者の全体的健康、投与方法、経路および投与量ならびに副作用の重症度の因子により変わり得る(例えば、Maynard et al., (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK参照)。

40

【0329】

投与経路は、例えば、局所または皮膚適用、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、病巣内への注射または注入または徐放系またはインプラントにより得る(例えば、Sidman et al., (1983) Biopolymers 22:547-556; Langer et al., (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105; Epstein et

50

al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwang et al., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; 米国特許 6,350,466 および 6,316,024 参照)。必要であれば、組成物はまた注射部位の疼痛を軽減するために可溶化剤および局所麻酔剤、例えばリドカインも含み得る。さらに、肺投与を、また、例えば吸入器またはネブライザーおよびエアロゾル化剤を用いる製剤の使用により行い得る。例えば、米国特許 6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540 および 4,880,078；および PCT 公開番号 WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346 および WO 99/66903 参照、その各々は引用によりその全体を本明細書に包含させる。

10

【0330】

本発明の組成物は、多様な当分野で知られる方法の 1 種以上を使用して 1 個以上の投与経路で投与してもよい。当業者には当然であるが、投与経路および/または投与方法は所望の結果により変わる。本発明の抗体またはそのフラグメントのための選択した投与経路は、例えば、注射または注入による静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経腸投与経路を含む。非経腸投与は、経腸および局所投与以外の投与経路を意味して、通常注射により、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、関節内、眼窩内、心内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入を含む。あるいは、本発明の組成物は、非経腸以外の経路、例えば局所、上皮または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、膣、直腸、舌下または局所的に投与できる。一つの態様において、本発明の抗体またはそのフラグメントを注入により投与する。他の態様において、本発明の多特異的エピトープ結合タンパク質を皮下に投与する。

20

【0331】

本発明の抗体またはそのフラグメントを制御放出または徐放系で投与するとき、制御放出または徐放系を達成するためにポンプを使用してよい(Langer, supra; Sefton, (1987) CRC Crit. Ref Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., (1980), Surgery 88:507; Saud ek et al., (1989) N. Engl. J. Med. 321:574 参照)。重合物質を使用して、本発明の治療剤の制御放出または徐放系を達成できる(例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ba ll (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, (1983) J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., (1985) Science 228:190; During et al., (1989) Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., (1989) J. Neurosurg. 71:105 ; 米国特許番号 5,679,377 ; 米国特許番号 5,916,597 ; 米国特許番号 5,912,015 ; 米国特許番号 5,989,463 ; 米国特許番号 5,128,326 ; PCT 公開番号 WO 99/15154 ; および PCT 公開番号 WO 99/20253 参照)。徐放性製剤に使用するポリマーの例は、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセテート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLGA)およびポリオルトエステルを含むが、これらに限定されない。一つの態様において、徐放性製剤に使用するポリマーは不活性であり、溶出可能不純物がなく、貯蔵に安定であり、無菌および生分解性である。制御放出または徐放系は、予防または治療標的の近接に設置でき、それゆえに、全身投与量の一部しか必要ではない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照)。

30

40

【0332】

制御放出系は Langer, (1990), Science 249:1527-1533) のレビューに記載されている。当業者に知られるあらゆる技術を、1 個以上の本発明の抗体またはそのフラグメントを含む徐放性製剤に使用できる。例えば、米国特許番号 4,526,938、PCT 公開 WO

50

91/05548、PCT公開WO96/20698、Ning et al., (1996), Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., (1995) PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., (1997) Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, and Lam et al., (1997) Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760参照、その各々は引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0333】

本発明の抗体またはそのフラグメンを局所的に投与するならば、軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、シャンプー、スプレー、エアロゾル、溶液、エマルジョンまたは当業者に周知の他の形態に製剤できる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)参照。非スプレー可能局所投与形態について、担体または1個以上の添加物を含む半固体または固体形態への粘性は、局所適用に適用し、ある場合、水より大きい動的粘性を典型的に用いる。適切な製剤は、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏、粉末、リニメント剤、軟膏(salves)などを含むが、これらに限定されず、所望であれば、滅菌または補助剤(例えば、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝液または塩類)と混合して、種々の特性、例えば、例えば、浸透圧を変える。他の適切な局所投与形態は、スプレー可能エアロゾル製剤を含み、ここで、ある場合、固体または液体不活性担体と組み合わせた活性成分は、加圧揮発物(例えば、ガス状噴射剤、例えばフレオン)と混合物であるかまたは圧搾ビンに入れられている。加湿剤または湿潤剤も、所望であれば、医薬組成物および投与形態に添加してよい。このようなさらなる成分の例は当分野で周知である。

【0334】

抗体またはそのフラグメントを含む組成物を鼻腔内投与するならば、エアロゾル形態、スプレー、ミストまたは液滴の形態に製剤できる。特に、本発明に従い使用するための予防または治療剤は、適切な噴射剤(例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適切なガス)を使用して、エアロゾルスプレーの形で送達するのが好都合であり得る。加圧エアロゾルの場合、投与量単位を、定量を送達するためのバルブを備えることにより規定し得る。吸入器または吹き入れ器(insufflator)で使用するためのカプセルおよびカートリッジ(例えば、ゼラチンから成る)を、化合物および適切な粉末基剤、例えばラクトースまたはデンプンを含んで製剤してよい。

【0335】

第二治療剤、例えば、サイトカイン、ステロイド、化学療法剤、抗生物質または放射線と共投与または処置するための方法は当分野で知られている(例えば、Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa. Hardman et al., (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice:A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.参照)。有効量の治療剤は、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも約30%、少なくとも40%または少なくとも50%症状を軽減し得る。

【0336】

本発明の抗体またはそのフラグメントと組み合わせて投与し得る他の治療剤(例えば、予防または治療剤)は本発明の抗体またはそのフラグメントから5分未満離れて、30分未満離れて、1時間未満離れて、約1時間離れて、約1~約2時間離れて、約2時間~約

3 時間離れて、約 3 時間～約 4 時間離れて、約 4 時間～約 5 時間離れて、約 5 時間～約 6 時間離れて、約 6 時間～約 7 時間離れて、約 7 時間～約 8 時間離れて、約 8 時間～約 9 時間離れて、約 9 時間～約 10 時間離れて、約 10 時間～約 11 時間離れて、約 11 時間～約 12 時間離れて、約 12 時間～18 時間離れて、18 時間～24 時間離れて、24 時間～36 時間離れて、36 時間～48 時間離れて、48 時間～52 時間離れて、52 時間～60 時間離れて、60 時間～72 時間離れて、72 時間～84 時間離れて、84 時間～96 時間離れてまたは 96 時間～120 時間離れて投与してよい。2 個以上の治療剤を、同じ患者の来院時に投与してよい。

【0337】

本発明の抗体またはそのフラグメントおよび他の治療剤を、周期的投与してよい。周期治療は、一定期間の第一治療(例えば、第一予防または治療剤)の投与、続く一定期間の第二治療(例えば、第二予防または治療剤)の投与、所望により、続く一定期間の第三治療(例えば、予防または治療剤)の投与などを含み、この連続的投与を繰り返し、すなわち、治療剤の一つに対する耐性の発生を減らすために、治療剤の一つの副作用を減らすまたは避けるためにおよび/または治療剤の有効性を改善するために周期とする。

【0338】

ある態様において、本発明の抗体またはそのフラグメントは、インビボでの適切な分配を確実にするために製剤できる。例えば、血液脳関門(BBB)は多くの高親水性化合物を排除する。本発明の治療化合物が BBB を通過することを確実にするために(望むならば)、例えば、リポソームに製剤できる。リポソームの製造方法について、例えば、米国特許 4,522,811; 5,374,548; および 5,399,331 参照のこと。リポソームは、特異的細胞または臓器に選択的に輸送される 1 個以上の部分を含み、それゆえに、標的薬物送達を促進し得る(例えば、Ranade, (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685)。ターゲティング部分の例は、フォレートまたはビオチン(例えば、Low et al の米国特許番号 5,416,016 参照); マンノシド(Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 抗体(Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357:140; Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 界面活性剤プロテイン A 受容体(Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p 120 (Schreier et al, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090) であり、また K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273 参照のこと。

【0339】

本発明は、処置を必要とする対象への、本発明の抗体またはそのフラグメントを単独またはまたは他の治療剤と組み合わせて含む医薬組成物の投与のプロトコルを提供する。本発明の組み合わせ治療剤の治療剤(例えば、予防または治療剤)は、対象に同時にまたは連続的に投与してよい。本発明の組み合わせ治療剤の治療(例えば、予防または治療剤)はまた周期的投与してよい。周期治療、一定期間の第一治療(例えば、第一予防または治療剤)の投与、続く一定期間の第二治療(例えば、第二予防または治療剤)の投与を含み、この連続的投与を繰り返し、すなわち、治療剤の一つに対する耐性の発生を減らすために、治療剤の一つの副作用を減らすまたは避けるためにおよび/または治療剤の有効性を改善するために周期とする。

【0340】

本発明の組み合わせ治療剤の治療剤(例えば、予防または治療剤)は、対象に同時に投与してよい。用語“同時”は、正確に同じ時間の治療剤(例えば、予防または治療剤)の投与に限定されず、むしろ本発明の抗体が、他の治療と、他の方法で投与されたよりも大きな利益を提供できるような時間間隔内で、本発明の抗体またはそのフラグメントを含む医薬組成物を対象に連続的に投与することを意味する。例えば、各治療を、対象に同時にまたは連続的に、異なる時点に任意の順番で投与してよい; しかしながら、同時に投与しないならば、所望の治療または予防効果を提供するために十分に近い時間に投与しなければならない。各治療を対象に別々に任意の適当な形態および任意の適切な経路で投与できる。種々の態様において、治療剤(例えば、予防または治療剤)を、対象に、15 分未満離れて

、30分未満離れて、1時間未満離れて、約1時間離れて、約1時間～約2時間離れて、約2時間～約3時間離れて、約3時間～約4時間離れて、約4時間～約5時間離れて、約5時間～約6時間離れて、約6時間～約7時間離れて、約7時間～約8時間離れて、約8時間～約9時間離れて、約9時間～約10時間離れて、約10時間～約11時間離れて、約11時間～約12時間離れて、24時間離れて、48時間離れて、72時間離れてまたは1週間離れて投与してよい。他の態様において、2個以上の治療剤(例えば、予防または治療剤)を、同じ患者の来院時に投与してよい。

【0341】

組み合わせ治療剤の予防または治療剤を、対象に同じ医薬組成物で投与できる。あるいは、組み合わせ治療剤の予防または治療剤を、対象に同時に別々の医薬組成物で投与できる。予防または治療剤を対象に同一または異なる投与経路で投与できる。

10

【0342】

本発明を十分に記載しているが、次の実施例および特許請求の範囲によりさらに説明し、これらは説明的でありさらに限定することを意図しない。

【実施例】

【0343】

実施例1：抗体のための方法、材料およびスクリーニング

(i) 細胞株

BXPC-3、SK-Br-3、BT-474、MDA-MB-453、FaDuおよびMCF-7細胞株をATCCから購入し、10%ウシ胎児血清(FBS)添加増殖培地で一般的に増殖させた。

20

【0344】

(ii) 組み換えヒト、カニクイザル、マウスおよびラットHER3ベクター

マウスHER3細胞外ドメインをマウス脳cDNA(Clontech)からPCR増幅し、配列をRefseq NM_010153との比較により確認した。ラットHER3 ECDをRat-2細胞mRNAから逆転写させ、配列をNM_017218との比較により確認した。カニクイザルHER3 cDNA鋳型を、種々のカニクイザル組織(Zyagen Laboratories)のRNAを使用して製造し、RT-PCR産物をpCR^(登録商標)-TOPO-XL(Invitrogen)にクローン化し、両鎖を配列決定した。ヒトHER3は、ヒト胎児脳cDNAライブラリー(Source)由来であり、配列をNM_001982との比較により確認した。

【0345】

30

タグ付け組み換えタンパク質を産生するために、ヒト、マウス、ラットおよびカニクイザルHER3をPwo Taqポリメラーゼ(Roche Diagnostics)を使用してPCR増幅した。増幅PCR産物をゲル精製し、フレーム内N末端CD33リーダー配列およびC末端タグ、例えば、フラッグタグを含むように予め修飾されたpDonR201(Invitrogen)gatewayエンターベクターにクローン化した。TAGは、抗TAGモノクローナル抗体を介する単量体タンパク質の精製を可能にする。標的遺伝子をAttB1およびAttB2と隣接させ、Gateway^(登録商標)クローニング方法(Invitrogen)を使用して、Gateway適応専売目的地ベクター(例えば、pcDNA3.1)に組換えした。組換え反応を、CMVプロモータを含む専売目的地ベクターとGateway LR反応を用いて行い、タグ発現ベクターを創製したが、任意の市販ベクターを使用できる。

40

【0346】

さらに、HER3 ECDを、C末端因子X開裂部位上流およびヒトIgGヒンジおよびFcドメインを融合する組み換えHER3タンパク質を産生し、Fcタグ付タンパク質を創製した。これを達成するために、種々のHER3 ECDをPCR増幅し、因子X部位ヒンジ-hFcのフレーム内C末端融合を含むように修飾したベクター(例えば、pcDNA3.1)にクローン化した。産生したオープンリーディングフレームを、Gateway^(登録商標)組み換えクローニング方法(Invitrogen)を用いてさらにクローニングするためにAttB1およびAttB2部位に隣接させた。LR Gateway反応を使用して、HER3-FcをCMVプロモータ含有目的地発現構築物に伝達した。HER3点変異発現構築物を、標準的部位特異的突然変異誘発プロトコルを使用して産生し、得られたベクター配列を確認した。

50

【 0 3 4 7 】

【表 3 0】

表 8. H E R 3 発現ベクターの産生。H E R 3 アミノ酸番号付けはNP_001973(ヒト)、N P_034283(マウス)およびNP_058914(ラット)に基づく

名称	備考
Hu HER3	CD33-[ヒトHER3, 残基20-640]-TAG
Mu HER3	CD33-[マウスHER3, 残基20-643]-TAG
ラットHER3	CD33-[ラットHER3, 残基20-643]-TAG
カニクイザルHER3	CD33-[カニクイザルHER3, 残基20-643]-TAG
HER3 D1-2	CD33-[ヒトHER3, 残基20-329]-TAG
HER3 D2	CD33-[ヒトHER3, 残基185-329]-TAG
HER3 D3-4	CD33-[ヒトHER3, 残基330-643]-TAG
HER3 D4	CD33-[ヒトHER3, 残基496-643]-TAG
Hu HER3-Fc	[ヒトHER3, 残基1-643]-Fc
Mu HER3-Fc	[マウスHER3, 残基1-643]-Fc
カニクイザルHER3-Fc	[カニクイザルHER3, 残基1-643]-Fc
ラットHER3-Fc	[ラットHER3, 残基1-643]-Fc
HER3 D2-Fc	[ヒトHER3残基207-329]-Fc
HER3 K267A	CD33-[ヒトHER3, 残基20-640, K267A]-TAG
HER3 L268A	CD33-[ヒトHER3, 残基20-640, L268A]-TAG
HER3 K267A/L268A	CD33-[ヒトHER3, 残基20-640, K267A/L268A]-TAG

10

20

【 0 3 4 8 】

(iii) 組み換え H E R 3 タンパク質発現

所望の H E R 3 組み換えタンパク質を、予め懸濁液培養に適用させ、Novartis専売無血清培地で培養した H E K 2 9 3 由来細胞株で発現させた。小規模発現検証を、リポフェクションに基づき、一過性 6 ウェルプレートトランスフェクションアッセイで行った。一過性トランスフェクションを介する大規模タンパク質産生を 1 0 ~ 2 0 L 規模でWave™ bio reactorシステム(Wave Biotech)で行った。D N A ポリエチレンイミン(Polysciences)をプラスミド担体として、1 : 3 (w : w) 比で使用した。細胞培養上清をトランスフェクション 7 ~ 1 0 日後に回収し、精製前にクロスフロー濾過およびダイアフィルトレーションにより濃縮した。

30

【 0 3 4 9 】

(iv) タグ付タンパク質精製

組み換えタグ付 H E R 3 タンパク質(例えば、T A G - H E R 3)を、細胞培養上清を回収し、1 0 kDaカットオフフィルター(Fresenius)でクロスフロー濾過することにより 1 0 倍濃縮して精製した。抗 T A G カラムを、抗 T A G モノクローナル抗体の C N B r 活性化セファロース 4 B への、最終比 1 0 mg 抗体 / 樹脂 mL でのカップリングにより調製した。濃縮上清を、3 5 ml 抗 T a g カラムに流速 1 ~ 2 mL / 分で適用した。P B S でのベースライン洗浄後、結合物質を 1 0 0 mM グリシン(p H 2 . 7)で溶出し、中和し、濾過滅菌した。タンパク質濃度を 2 8 0 nm の吸光度測定により決定し、理論的計数 0 . 6 6 A U / mg を使用して返還した。精製タンパク質を最後に S D S - P A G E 、N 末端配列決定および L C - M S により特徴づけした。

40

【 0 3 5 0 】

(v) F c タグ精製

濃縮細胞培養上清を 5 0 ml プロテイン A セファロース Fast Flow カラムに流速 1 ml / 分で適用した。P B S でのベースライン洗浄後、カラムを 1 0 カラム体積の 1 0 mM N a H ₂ P O ₄ / 3 0 % (v / v) イソプロパノール、p H 7 . 3、続いて 5 カラム体積の P B S

50

で洗浄した。最後に、結合物質を 50 mM シトレート / 140 mM NaCl (pH 2.7) で溶出し、中和し、濾過滅菌した。

【0351】

(vi) 過発現細胞株の産生

高レベルのHER3を細胞表面に発現する細胞株を産生するために、ヒトEGFRのアミノ酸残基669～1210のフレーム内に融合したヒトHER3のアミノ酸残基20～667の上流のCD33リーダー配列をコードするインサートを含む哺乳動物発現ベクターを構築した。哺乳動物細胞で発現されたとき、得られたキメラタンパク質はN末端HER3細胞外および膜貫通型ドメインおよびC末端EGFR細胞質ドメインを含む。HER3/1ベクターをCHO-S細胞(Invitrogen)に形質移入し、安定なプールを抗生物質選択後産生した。得られた細胞株(CHO HER3/1)は高レベルのHER3細胞外ドメインをその細胞表面に発現した。

10

【0352】

(vii) HuCAL GOLD^(登録商標)パニング

ヒトHER3を認識する抗体を選択するために、複数パニング戦略を用いた。ヒトHER3タンパク質に対する治療抗体を、抗体変異体タンパク質源として市販のファージディスプレイライブラリー、MorphoSys HuCAL GOLD^(登録商標)ライブラリーを使用して、高結合親和性を有するクローンの選択により産生した。ファージミドリライブラリーはHuCAL^(登録商標)コンセプト(Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86)に基づき、ファージ表面へのFab提示にCysディスプレイ^(登録商標)方法を使用する(LohningのWO 01/05950)。

20

抗HER3抗体単離のために、標準的ならびにRapMATパニング戦略を固相、溶液、全細胞および示差全細胞パニング手法を使用して実施した。

【0353】

(viii) 固相パニング

抗HER3抗体を同定するために、多様な固相パニング戦略を種々の組み換えHER3タンパク質を使用して行った。各回の固相パニングを行うために、Maxisorpプレート(Nunc)をHER3タンパク質でコートした。タグ付タンパク質を、抗Fc(ヤギまたはマウス抗ヒトIgG、Jackson Immuno Research)、抗Tag抗体で予めコートしたプレートまたは受動的吸着を介して捕捉した。被覆プレートをPBSで洗浄し、遮断した。被覆プレートをPBSで2回添加し、HuCAL GOLD^(登録商標)ファージ-抗体を、2時間、室温でシェーカーで添加した。結合ファージを溶出し、大腸菌TG-1に添加し、ファージ感染のためにインキュベートした。続いて感染細菌を単離し、寒天プレートで平板培養した。コロニーをプレートからかきとり、ファージをレスキューし、増幅した。各HER3パニング戦略は個々のパニングから成り、特有の抗原、抗原濃度および洗浄強度を含む。

30

【0354】

(ix) 溶液相パニング

各回の溶液相パニングを、ニューレグリン1-1(R&D Systems)存在下または非存在下で種々のピオチニル化組み換えHER3タンパク質を使用して行った。タンパク質をEZ-結合スルホ-NHS-LCピオチニル化キット(Pierce)を、製造者の指示に従い使用して、ピオチニル化した。800 µlのストレプトアビジン結合磁気ビーズ(Dynabeads, Dynal)をPBSで1回洗浄し、一夜、Chemiblocker(Chemicon)で遮断した。HuCAL GOLD^(登録商標)ファージ-抗体および適当なピオチニル化HER3を反応チューブでインキュベートした。ストレプトアビジン磁気ビーズを20分添加し、磁気粒子分離機(Dynal)で回収した。結合ファージは、DTT含有緩衝液の各チューブへの添加によりDynabeadsから溶出し、大腸菌TG-1に添加した。ファージ感染を固相パニングで記載したのと同じ方法で行った。各HER3パニング戦略は個々のパニングから成り、特有の抗原、抗原濃度および洗浄強度を含む。

40

【0355】

(x) 細胞ベースのパニング

50

細胞パニングのために、HuCAL GOLD(登録商標)ファージ-抗体を、約 10^7 細胞でローテータ上で2時間、室温でインキュベートし、続いて遠心分離した。細胞ペレットを単離し、ファージを細胞から溶出した。上清を回収し、大腸菌TG-1に添加し、培養を上記の方法で続けた。2細胞ベースの戦略を抗HER3抗体同定に使用した：

- a) 全細胞パニング：この戦略において、多様なインタクト細胞株を抗原として使用した。
- b) 示差全細胞パニング：この戦略において、抗原は、連続的に細胞および組み換えHER3タンパク質から成った(例として1981.09参照)。細胞ベースのパニングを上記のとおりに行い、組み換えタンパク質を抗原として用いるとき固相パニングプロトコルを使用した。洗浄はPBS(2-3X)およびPBST(2-3X)を使用して行った。

10

【0356】

(xi) RapMAT^{T M} ライブラリー産生およびパニング

ライブラリー多様性を維持しながら抗体結合親和性を増やすために、溶液および固相パニング両者の第二ラウンドアウトプットを、RapMAT^{T M} プロセスに入れ、一方全細胞および示差全細胞パニング戦略の第三ラウンドアウトプットを入れた(Prassler et al., (2009) Immunotherapy; 1: 571-583)。RapMAT^{T M} ライブラリーを、ディスプレイベクターpMO RPH(登録商標)25_bla_LHCへのパニングにより選択したファージのFabコード化インサートのサブクロニングにより産生し、さらにH-CDR2 RapMAT^{T M} ライブラリーおよびL-CDR3 RapMAT^{T M} ライブラリーを産生するために、特異的制限酵素を使用して消化した。インサートを、プール組成物に従いH-CDR2またはL-CDR3についてTRIM成熟カセット(Virnekas et al., (1994) Nucleic Acids Research 22:5600- 5607)で置き換えた。ライブラリーサイズは $8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ クローンの範囲と概算された。RapMAT抗体-ファージを産生し、さらに先に記載の実験法を使用する2回の溶液、固相または細胞ベースパニングに付した。

20

【0357】

実施例2：抗HER3 IgGの一過性発現

懸濁液適応HEK293-6E細胞を、BioWave20で約 2×10^6 生存可能細胞/mLの密度まで培養した。細胞を、関連無菌DNA：PEI-MIXで一過性に形質移入し、さらに培養した。トランスフェクション7日後、細胞をFreseniusフィルター(0.2 μm)を使用してクロスフロー濾過した。無細胞物質を、10 kDaカットオフフィルター(Fresenius)を使用するクロスフロー濾過で濃縮し、濃縮物をステリカップフィルター(0.22 μm)で濾過滅菌した。無菌上清を4℃で貯蔵した。

30

【0358】

実施例3：抗HER3 IgGの精製

IgGの精製を、AEKTA 100explorer Airクロマトグラフィースystemで、6℃で、冷却キャビネットで、XK16/20カラムと25 mLの自己充填MabSelect SuRe樹脂(全GE Healthcare)を使用して行った。全流速は、充填以外、5バールの圧力限界で3.5 mL/分であった。カラムを3カラム体積のPBSで平衡化し、濾過発酵上清に2.0 mL/分で充填した。カラムを8カラム体積のPBSで洗浄した。IgGを、50 mMシトレート/70 mM NaCl(pH 4.5)で開始し、12カラム体積で50 mMシトレート/70 mM NaCl(pH 2.5)まで直線的に低下するpH勾配、続いて同じpH 2.5緩衝液で2カラム体積定常工程で溶出した。IgG含有フラクションをプールし、直ちに中和し、濾過滅菌(Millipore Steriflip、0.22 μm)した。OD₂₈₀を測定し、タンパク質濃度を配列データに基づき計算した。プールを、凝集(SEC-MALS)および純度(SDS-PAGEおよびMS)について別々に試験した。

40

【0359】

実施例4：大腸菌中のHuCAL(登録商標)-Fab抗体の発現および精製

TG-1細胞中のpMORPH(登録商標)X9_Fab_MHによりコードされるFabフラグメントの発現を、シェーカーフラスコ培養で、500 mLの34 μg/mLクロラムフェニコール添加2×YT培地で行った。培養を30℃でOD_{600nm}が0.5に達するまで振盪した。

50

0.75 mM IPTG (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド) 添加により、20 時間、30 で発現を誘発した。細胞をリゾチームを使用して破壊した。His₆ タグ付 Fab フラグメントを IMAC (Bio-Rad) により単離した。1 × ダルベッコ PBS (pH 7.2) への緩衝液交換を PD10 カラムを使用して行った。サンプルを濾過滅菌 (0.2 μm) した。タンパク質濃度を UV 分光光度法で決定した。サンプルの純度を変性、還元 15 % SDS - PAGE で確認した。Fab 調製物の均一性を天然状態で、分子ふるいクロマトグラフィー (HP - SEC) により検量標準と共に決定した。

【0360】

実施例 5：溶液平衡タイトレーション (SET) による HER3 抗体親和性 (K_D) 測定

溶液での親和性決定を、本質的に先に記載のとおり行った (Friguet et al., (1985) J Immunol Methods 77:305-19)。SET 方法の感受性および精度を改善するために、古典的 ELISA から ECL ベースの方法に変えた (Haenel et al., (2005) Anal biochem 339: 182-84)。

先に記載した非標識 HER3 タグ (ヒト、ラット、マウスまたはカニクイザル) を、SET による親和性決定に使用した。

【0361】

データを、カスタマイズしたフィッティングモデルを適用する XLfit ソフトウェア (ID Business Solutions) で評価した。各 IgG の K_D 決定について、下記モデルを使用した (Piehler, et al (Piehler et al., (1997) J Immunol Methods 201:189-206) に基づき変更)。

【数 1】

$$y = \frac{2B_{\max}}{[IgG]} \left[\frac{[IgG]}{2} - \frac{\left(\frac{x + [IgG] + K_D}{2} - \sqrt{\frac{(x + [IgG] + K_D)^2}{4} - x[IgG]} \right)^2}{2[IgG]} \right]$$

[IgG]：適用した総 IgG 濃度

x：適用した総可溶性抗原濃度 (結合部位)

B_{max}：抗原なしの IgG の最大シグナル

K_D：親和性

【0362】

実施例 6：FACS による抗体細胞結合決定

ヒト癌細胞で発現する内因性ヒト抗原に対する抗体の結合を FACS で評価した。抗体 EC₅₀ 値を決定するために、SK-Br-3 細胞を accutase を用いて回収し、1 × 10⁶ 細胞 / mL に FACS 緩衝液 (PBS / 3 % FBS / 0.2 % NaN₃) で希釈した。1 × 10⁵ 細胞 / ウェルを 96 ウェルプレート (Nunc) の各ウェルに添加し、210 g で 5 分、4 で遠心分離し、上清を取った。試験抗体の連続的希釈物 (FACS 緩衝液で 1 : 4 希釈工程で希釈) をペレット化細胞に添加し、1 時間、氷上でインキュベートした。100 μL FACS 緩衝液で 3 回細胞を洗浄し、ペレット化した。FACS 緩衝液で 1 / 200 希釈した PE コンジュゲートヤギ抗ヒト IgG (Jackson ImmunoResearch) を細胞に添加し、氷上で 1 時間インキュベートした。さらなる洗浄工程を 100 μL FACS 緩衝液で 3 回行い、続いて 210 g で 5 分、4 で遠心分離した。最後に、細胞を 200 μL FACS 緩衝液に再懸濁し、蛍光値を FACSArray (BD Biosciences) で測定した。細胞表面結合抗 HER3 抗体の量を、平均チャネル蛍光の測定により評価した。

【0363】

実施例 7：HER3 ドメインおよび変異体結合

96 ウェル Maxisorp プレート (Nunc) を、一夜、4 で 200 ng の適当な組み換えヒトタンパク質 (HER3 タグ、D1-2 タグ、D2 タグ、D3-4 タグ、D4 タグ、HER3 K267A タグ、HER3 L268A タグ、HER3 K267A/L268A および タグ付無関係対照) で被覆した。全ウェルを PBS /

0.1% Tween-20で3回洗浄し、1時間PBS / 1% BSA / 0.1% Tween-20で遮断し、PBS / 0.1% Tween-20で3回洗浄した。抗HER3抗体を、関連ウェルに最終濃度10 µg/mLまで適当なウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートをPBS / 0.1% Tween-20で3回洗浄し、PBS / 1% BSA / 0.1% Tween-20で1 / 1000希釈した適当なペルオキシダーゼ結合検出抗体を添加した。使用した検出抗体はヤギ抗マウス(Pierce、31432)、ウサギ抗ヤギ(Pierce、31402)およびヤギ抗ヒト(Pierce、31412)であった。プレートを室温で1時間インキュベートし、PBS / 0.1% Tween-20で3回洗浄した。100 µl TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)基質溶液(BioFfx)を全ウェルに添加し、6分後、反応を50 µl 2.5% H₂SO₄で停止させた。各組み換えタンパク質へのHER3抗体の結合の程度を、SpectraMaxプレートリーダー(Molecular Devices)を使用してOD₄₅₀を測定して決定した。適当なとき、用量応答曲線をGraphpad Prismを使用して分析した。

10

【0364】

実施例8：水素 / 重水素交換マスマススペクトロメトリーを使用するHER3エピトープマッピング

材料

D₂O緩衝液を、25 mM TBS(pH 7.5) / 500 mM NaClを重水(Sigma)に溶解することにより調製した。還元溶液は、50 mMホルメート緩衝液(pH 4)、500 mM TCEPであり、クエンチング溶液0.5%(v/v)トリフルオロ酢酸(TFA)の水溶液であった。緩衝液は0.25%ギ酸 / 10%メタノール / 10%エチレングリコールの水溶液であり、緩衝液Bは0.25%ギ酸のアセトニトリル溶液であった。全化学物質をSigmaから購入し、HPLCグレード溶媒をFisher Scientificから購入した。

20

【0365】

液体取扱いおよびクロマトグラフィー

自動化水素 - 重水素交換マスマススペクトロメトリー(HDX MS)実験を、Wales et al., (2006) Anal. Chem. 78:1005-1014)に記載の方法および装置を元に設計した。要約すると、全液体取扱い操作は、2に維持された冷蔵筐体中に入れられたPal HTS液体ハンドラー(LEAP Technologies)を使用した。6ポート注入バルブおよび洗浄ステーションを液体ハンドラーレール上に設置し、クロマトグラフシステムへのサンプル注入およびシリンジ洗浄を容易にした。クロマトグラフシステムは、さらに10ポートバルブ、2.1 mm x 30 mm Porosymeペプシンカラム(Applied Biosystems)、逆相0.5 mm x 2 mm C₁₈キャプトラップカートリッジ(Michrom Bioresources)および分析のカラム(100 µm x ~ 60 mm, Kinetex 2.6 µm C₁₈, Phenomenex)として自己充填エレクトロスプレーエミッターから成った。10ポートバルブ頭部、トラップカートリッジおよび分析のカラムを、アルミニウムから構築された別の筐体に入れ、peltier stackにより-5に維持した。バルブおよびカラムを、サンプルをマスマススペクトロメーター(LTQ-Orbitrap, Thermo Scientific)のエレクトロスプレーイオン化(ESI)源に導入する前に直列タンパク質消化、ペプチド脱塩および逆相クロマトグラフィーを可能にするよう設計した。

30

【0366】

走査に必要な流体ストリームは2個の別々のHPLCポンプにより提供した。最初のHPLC(Surveyor MSポンプ, Thermo Scientific)は緩衝液Aを125 µL / 分の定常流速で送達し、10ポートバルブをとおしてマウントされた逆相トラップカートリッジ上への固定化ペプシンカートリッジを介するサンプル送達に使用した。充填および脱塩後、10ポートバルブを、逆相トラップカートリッジから分析のカラムを通りマスマススペクトロメーターのイオン源への勾配ポンプ(AQUITY UPLC, Waters)の助けを借りたサンプルの溶出に切り替えた。固定化酵素カートリッジを勾配溶出中の消耗のために単離した。勾配ポンプは、0 ~ 40%移動相Bを35分、5 µL / 分および40 ~ 95%移動相Bを5 µL / 分で10分の直線状勾配セグメントを送達した。ポンプからの勾配流は、10ポートバルブで、実際の流れがトラップカートリッジおよび分析のカラムを通る勾配溶出が~ 1 µL / 分であるように受動的スプリッターで分けた。全クロマトグラフ工程は、洗浄および平衡化工

40

50

程を含み、70分の長さであった。

【0367】

マスペクトロメトリー

オンライン消化で得られたタンパク分解性フラグメントの同定を目的として、数個のデータ依存性MS/MS実験を行った。これらの獲得のために、直列MSスペクトルをLTQ-OrbitrapハイブリッドマスペクトロメーターのLTQアナライザーで獲得した。前駆体マス選択は、Orbitrapアナライザーで獲得したMS走査に基づいた。重水素化レベル決定を目的とした一段階MS獲得を、60,000の分解能で、Orbitrap(m/z 400~2000にわたり)アナライザーで獲得した。

【0368】

タンパク質およびタンパク質：Fab複合体の製造

HER3タンパク質を、50 µg HER3タグを25mM TBS(pH 7.5)/500 mM NaClで希釈し、最終体積50 µLとすることにより製造した。タンパク質：Fab複合体を、50 µg HER3タグを、1:1モル比で試験するFabと混合することにより製造した。次いでタンパク質：Fab混合物を最終体積50 µLに25mM TBS(pH 7.5)/500 mM NaClで希釈した。

【0369】

タンパク質：Fab複合体を調製し、少なくとも2時間、4℃でインキュベートした。4個のサンプル、希釈剤、クエンチおよび還元溶液を含む96ウェルプレートで、各実験開始前に液体ハンドラーに充填した。オン-交換実験のために、50 µLのHER3またはHER3：Fab複合体を150 µL D₂O緩衝液で希釈した。混合物を200 µL還元緩衝液で1分処理することにより還元し、600 µLのクエンチ緩衝液でクエンチングした。全液体取り扱い工程後の総体積は~1 mLであった。混合したら、クエンチした溶液をクロマトグラフィシステムに注入し、そこで自動的に消化され、分離され、LCMSにより分析された。サンプルとコントロールの重水素化の平均変化を、サンプルとコントロールの重水素取り込みレベルの差異として計算した。

【0370】

データ処理

Orbitrap RAWファイルを、社内プログラム(RawXtract)を使用してm/z XMLファイルに変換した。続いて、直列MS獲得をSEQUEST(Yates Lab, Scripps Research Institute, La Jolla, CA)を使用して検索し、検索結果を自動的にDTASelect 2.0 (Yates Lab, Scripps Research Institute, La Jolla, CA)を使用してフィルタリングした。ペプチド配列同定を使用して、社内書いたプログラムを使用して、各同定配列について一オンクロマトグラムを自動的に抽出し、クロマトグラフピークを通した平均スペクトルを作成した。平均スペクトルを平滑化し、重心中心化(centroided)した。レベルの重水素取り込みを、重水素化サンプルと非重水素化参照の質量差異として取った。処理データを手動で確認し、自動化処理工程の不正確さおよび誤差を調節した。重水素取り込みレベルを、各ペプチドにわたり重水素含量を非局在化することにより、タンパク質配列の各残基に割り当てた(すなわち、観察された重水素化レベルをペプチドのアミノ酸数で割った)。残基が1個を超えるペプチドによりカバーされるならば、該残基を覆う全ペプチドの標準化重水素取り込みを平均化した。

【0371】

実施例9：ヒトHER3/MOR09823 FabおよびヒトHER3/MOR09825 Fab複合体のX線結晶学的構造決定

本実施例は、それぞれ3.2 および3.4 Å分解能で決定するMOR09823のFabフラグメントおよびMOR09825のFabフラグメントに結合する完全長HER3の結晶構造を示す。タグ付ヒトHER3を、PBS(pH 7.3)で平衡化したHiLoad 26/60 Superdex 200 PrepGradeカラム(GE Healthcare)でさらに精製した。大腸菌発現MOR09823およびMOR09825 Fabを、細胞をリゾチームで溶解し、His₆タグ付FabフラグメントをHisTrap_HP (GE Healthcare)カラムに捕捉することにより単離した。MOR09823 Fabフラグメントを、2

10

20

30

40

50

5 mM Tris (pH 7.5)、150 mM NaCl で平行化したSuperdex 75 16/60カラム (GE Healthcare)でのゲル濾過クロマトグラフィーによりさらに精製した。

【0372】

HER3 Fab複合体を、過剰のFabとタグ付HER3を、1.3 ~ 1.8 : 1のモル比(濃度は、HER3およびFabそれぞれ0.9および1.4 (mg/ml) \times 1 cm⁻¹の計算された励起係数を使用して280 nmの吸光度から計算)で混合することにより調製し、複合体を25 mM Tris (pH 7.5)、150 mM NaClで平衡化したSuperdex 200 10/300カラム (GE Healthcare)で精製した。ピークフラクションをSDS-PAGEおよびLCMSで分析した。各複合体について、ほぼ等モル比でHER3およびFabのいずれも含むフラクションを溜め、濃縮した。HER3/MOR09823結晶を、293 Kで座滴蒸気拡散により、150 nM HER3/MOR09823複合体および150 nMのリザーバー溶液(100 mM クエン酸ナトリウム pH 5.6、20 % PEG 4000および20 % イソプロパノール)を含む液滴から成長させた。結晶をさらに8 % グリセロールを含むリザーバー溶液に移し、液体窒素で急速冷凍した。HER3/MOR09825結晶を、293 Kで、150 nM HER3/MOR09825複合体および150 nMのリザーバー溶液(100 mM Bis-tris pH 6.5、16 % PEG 10,000)を含む液滴から座滴蒸気拡散により成長させた。結晶を、100 mM Bis-tris pH 6.5、18 % PEG 10,000および22 % グリセロールに移し、液体窒素で急速冷凍した。

【0373】

データをビームライン17-IDでAdvanced Photon Source(Argonne National Laboratory)で回収した。HER3/MOR09823 Fab複合体データを処理し、HKL2000(HKL Research Inc)を空間群I222でセル直径a = 124.16、b = 139.44、c = 180.25を使用して3.2 で良好な統計値で見積もった。HER3/MOR09823 Fab構造を、検索モデルとしてFabフラグメントおよび公開されたHER3 ECD構造1mb6を使用して、Phaser(McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674)を使用した分子置換により解析した。1分子のHER3/MOR09823 Fab複合体を非対称単位に含む最終モデルをCOOT(Emsley & Cowtan(2004) Acta Cryst. 60:2126-2132)に構築し、結合長および結合角それぞれ0.010 および1.37°のrmsdで、BUSTER(Global Phasing, LTD)を使用して、それぞれ19.0 および24.5 %のRおよびR_{free}値に精密化した。PyMOL(Schroedinger, LLC)で同定したMOR09823 Fabの任意の原子から5 以内に原子を含むHER3の残基を表11および12に列記する。HER3/MOR09825 Fab複合体データを処理し、自己PROC(Global Phasing, LTD)を空間群I222でセル直径a = 124.23、b = 140.94、c = 180.25を使用して3.4 で良好な統計値で見積もった。HER3/MOR09825 Fab構造を、検索モデルとしてHER3/MOR09823 Fab構造を使用して(McCoy et al., (2007) J. Appl. Cryst. 40:658-674)を使用して分子置換した。1分子のHER3/MOR09825 Fab複合体を非対称単位あたりに含む最終モデルをCOOT(Emsley & Cowtan(2004) Acta Cryst. 60:2126-2132)に構築し、結合長および結合角それぞれ0.009 および1.21°のrmsdで、BUSTER(Global Phasing, LTD)を使用して、それぞれ18.8および24.9 %のRおよびR_{free}値に精密化した。PyMOL(Schroedinger, LLC)で同定したMOR09825 Fabの任意の原子から5 以内に原子を含むHER3の残基を表13および14に列記する。

【0374】

実施例10: ホスホ-HER3インビトロ細胞アッセイ

MCF-7細胞を、DMEM/F12、15 mM HEPES、L-グルタミン、10 % FCSに、およびSK-Br-3をマッコイ5a、10 % FCS、1.5 mM L-グルタミン中で一般的に維持した。完全培地で増殖させたサブコンフルエントMCF7またはSK-Br-3細胞をaccutase(PAA Laboratories)で回収し、適当な増殖培地に最終濃度5 × 10⁵ 細胞/mLで再懸濁した。次いで100 μLの細胞懸濁液を96ウェル平底プレート(Nunc)の角ウェルに添加し、最終密度5 × 10⁴ 細胞/ウェルとした。MCF7細胞を約3時間付着させ、培地を0.5 % FBS含有飢餓培地に交換した。全プレートを次いで一夜、37 でインキュベートし、適当な濃度のHER3抗体(適当な培地で希釈)で80分、37 で処理した。MCF7

10

20

30

40

50

細胞を 50 ng/mL ニューレグリン 1 - 1 EGF ドメイン (R&D Systems) で最終 20 分処理して、HER3 リン酸化を刺激した。全培地を穏やかに吸引し、細胞を 1 mM CaCl₂ および 0.5 mM MgCl₂ (Gibco) 含有氷冷 PBS で洗浄した。細胞を 50 µL 氷冷溶解緩衝液 (20 mM Tris (pH 8.0) / 137 mM NaCl / 10 % グリセロール / 2 mM EDTA / 1 % NP-40 / 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、アプロチニン (10 µg/mL) / ロイペプチン (10 µg/mL)) で洗浄し、氷上で振盪しながら 30 分インキュベートした。ライセートを次いで回収し、1800 g で 15 分、4 で遠心して、細胞細片を除去した。20 µL のライセートを予め調製した捕捉プレートに添加した。

【0375】

HER3 捕捉プレートを、炭素プレート (Mesoscale Discovery) を使用して、一夜、4 で 20 µL の PBS で希釈した 4 µg/mL MAB3481 捕捉抗体 (R&D Systems) でコーティングし、続いて 3 % ウシ血清アルブミンの 1 × Tris 緩衝液 (Mesoscale Discovery) / 0.1 % Tween-20 で遮断することにより調製した。HER3 を、プレートを室温で 1 時間振盪し、ライセートを吸引し、ウェルを 1 × Tris 緩衝液 (Mesoscale Discovery) / 0.1 % Tween-20 で洗浄することによりライセートから捕捉した。リン酸化 HER3 を、室温で 1 時間振盪しながらインキュベートすることにより 1 % BSA / 1 × Tris / 0.1 % Tween-20 中に調製した 0.75 µg/mL ビオチニル化抗ホスホチロシン抗体 (R&D Systems) で検出した。ウェルを 1 × Tris / 0.1 % Tween-20 で 4 回洗浄し、ビオチニル化タンパク質を 1 % BSA / 1 × Tris / 0.1 % Tween-20 で希釈した S タグ標識ストレプトアビジン (Mesoscale Discovery) と 1 時間、室温でインキュベートすることにより検出した。各ウェルを吸引し、1 × Tris / 0.1 % Tween-20 で 4 回洗浄し、20 µL の Read 緩衝液 T と界面活性剤 (Mesoscale Discovery) を添加し、シグナルを Mesoscale Sector Imager を使用して定量した。抗体 MOR06391 または MOR03207 は、アイソタイプコントロールとしてシグナル伝達実験に組み込んだ。

【0376】

実施例 11: ホスホ-Akt (S473) インビトロ細胞アッセイ

完全培地で増殖したサブコンフルエント SK-Br-3 および BT-474 細胞を accutase (PAA Laboratories) で回収し、適当な増殖培地に最終濃度 5×10^5 細胞/mL で再懸濁した。100 µL の細胞懸濁液を、次いで 96 ウェル平底プレート (Nunc) の各ウェルに添加し、最終密度 5×10^4 細胞/ウェルとした。全プレートを、次いで、一夜、37 でインキュベートし、適当な濃度の HER3 抗体 (適当な培地で希釈) で 80 分、37 で処理した。全培地を穏やかに吸引し、細胞を 1 mM CaCl₂ および 0.5 mM MgCl₂ (Gibco) 含有氷冷 PBS で洗浄した。細胞を 50 µL 氷冷溶解緩衝液 (20 mM Tris (pH 8.0) / 137 mM NaCl / 10 % グリセロール / 2 mM EDTA / 1 % NP-40 / 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム / アプロチニン (10 µg/mL) / ロイペプチン (10 µg/mL)) の添加により溶解し、氷上で振盪しながら 30 分インキュベートした。次いで、ライセートを回収し、1800 g で 15 分、4 で遠心して、細胞細片を除去した。20 µL のライセートを、3 % BSA / 1 × Tris / 0.1 % Tween-20 で予め遮断した多スポット 384 ウェルホスホ-Akt 炭素プレート (Mesoscale Discovery) に添加した。プレートを室温で 2 時間、振盪しながらインキュベートし、ライセートを吸引し、ウェルを 1 × Tris 緩衝液 (Mesoscale Discovery) / 0.1 % Tween-20 で 4 回洗浄した。リン酸化 Akt を、1 % BSA / 1 × Tris / 0.1 % Tween-20 で 50 倍希釈した 20 µL のスルホタグ抗ホスホ-Akt (S473) 抗体 (Mesoscale Discovery) で、振盪しながら室温で 2 時間インキュベートすることにより検出した。ウェルを 1 × Tris / 0.1 % Tween-20 で 4 回洗浄し、20 µL の Read 緩衝液 T と界面活性剤 (Mesoscale Discovery) を添加し、シグナルを Mesoscale Sector Imager を使用して定量した。抗体 MOR06391 または MOR03207 をシグナル伝達実験にアイソタイプコントロールとして包含させた。

【0377】

実施例 12: 細胞株増殖アッセイ

SK-Br-3 細胞を 10 % ウシ胎児血清の添加により修飾したマッコイで一般的に培養し、B

10

20

30

40

50

T-474細胞を、10% FBS 添加 DMEM で培養した。サブコンフルエント細胞をトリプシン処理し、PBS で洗浄し、増殖培地で 5×10^4 細胞/mL に希釈し、96 ウェル透明底黒色プレート (Costar 3904) に 5000 細胞/ウェルの密度で平板培養した。細胞を一夜、37 °C でインキュベートし、適当な濃度の HER3 抗体 (典型的最終濃度の 10 または 1 $\mu\text{g/mL}$) を添加した。プレートを 6 日間インキュベーターに戻し、CellTiter-Glo を使用して細胞生存能を評価した。100 μL の CellTiter-Glo 溶液を各ウェルに添加し、室温で穏やかに振盪しながら 10 分インキュベートした。発光の量を SpectraMax プレートリーダー (Molecular Devices) を使用して決定した。各抗体で得られた増殖阻害の程度を各 HER3 抗体で得られた発光価を標準的アイソタイプ対照抗体 (MOR06391) と比較することにより計算した。

10

【0378】

増殖アッセイのために、MCF-7細胞を、4mM L-グルタミン / 15mM HEPES / 10% FBS 含有 DMEM / F12 (1:1) で一般的に培養した。サブコンフルエント細胞をトリプシン処理し、PBS で洗浄し、4mM L-グルタミン / 15mM HEPES / 10 $\mu\text{g/mL}$ ヒトトランスフェリン / 0.2% BSA 含有 DMEM / F12 (1:1) で 1×10^5 細胞/mL に希釈した。細胞を 96 ウェル透明底黒色プレート (Costar) に 5000 細胞/ウェルの密度で平板培養した。適当な濃度の HER3 抗体 (典型的最終濃度の 10 または 1 $\mu\text{g/mL}$) を次いで添加した。10 ng/mL の NRG1 - 1 EGF ドメイン (R&D Systems) も適当なウェルに添加して、細胞増殖を刺激した。プレートを 6 日間インキュベーターに戻し、CellTiter-Glo を使用して細胞生存能を評価した。各抗体で得られた増殖阻害の程度を背景 (ニューレグリンなし) 発光価を減産し、各抗 HER3 抗体で得られた価を標準的アイソタイプ対照抗体 (MOR06391) と比較することにより計算した。

20

【0379】

実施例 13: リガンド遮断細胞アッセイ

10% FBS および 1 $\mu\text{g/mL}$ インスリン (Sigma) 添加 MEM で培養した MCF-7 細胞を濯ぎ、小体積の FACS max 細胞解離緩衝液 (Genlantis) に回収し、5 mL の FACS 緩衝液 (PBS / 1% FBS / 0.1% ナトリウムアジド) を添加した。細胞密度を計算し、最終濃度 1×10^6 細胞/mL に調節した。100 μL の細胞懸濁液を 96 ウェルプレートの各ウェルに添加し、細胞を遠心分離 (220 g、3 分、4 °C) によりペレット化した。細胞ペレットを FACS 緩衝液 (典型的最終抗体濃度範囲 100 ~ 0.1 nM) で希釈した 100 μL の適当な試験抗体に再懸濁し、プレートを氷上で 45 分インキュベートした。リガンド遮断抗体 MAB3481 (R&D Systems) を、ポジティブコントロール。細胞を染色緩衝液で 2 回洗浄し、FACS 緩衝液で希釈した 10 nM NRG1 - 1 EGF ドメイン (R&D Systems) を添加し、氷上で 45 分インキュベートした。細胞を染色緩衝液で 2 回洗浄し、結合ニューレグリンを、細胞を 10 nM 抗ヒト NRG1 - 1 EGF ドメイン抗体 (R&D Systems) と氷上で 45 分インキュベートすることにより検出した。細胞を染色緩衝液で 2 回洗浄し、氷上で 45 分、FACS 緩衝液で 1 / 500 希釈した PE 結合抗ヤギ抗体 (Jackson ImmunoResearch) とインキュベートした。次いで細胞を遠心分離によりペレット化し、ペレットを 200 μL FACS 緩衝液に再懸濁した。各サンプルを定量するために、10,000 生存細胞を LSR II フローサイトメーター (BD Biosciences) で計数し、細胞表面結合ニューレグリン量を平均チャネル蛍光の測定により検出した。

30

40

【0380】

実施例 14: リガンド遮断生化学的アッセイ

本方法は、HER3 / 抗体複合体がニューレグリンに結合する能力の試験における表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づくバイオセンサー (BiacoreTM、GE Healthcare, Uppsala, Sweden) の有用性に基づく。

BiacoreTM は、結合相互作用の検出および測定に表面プラズモン共鳴 (SPR) の減少を使用する。典型的 Biacore 実験において、相互作用分子の一つ (ニューレグリン) をマトリクス上に固定化し、一方相互作用パートナー (HER3) を表面上を流す。結合相互作用は、センサー表面上の質量増加およびセンサー表面の近傍の培地の屈折指数の対応する直

50

接変化をもたらす。屈折指数またはシグナルの変化を共鳴単位(R.U.)で記録する。複合体の会合および解離によるシグナル変化を非浸潤性方法で、連続的におよびリアルタイムにモニターし、その結果をセンサーグラムとして記録する。

【0381】

ここに記載する全実験の実施にBiacore™ T100(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を使用した。センサー表面調整および相互作用解析を25で行った。緩衝液およびBiacore試薬をGE Healthcareから購入した。10mM HEPES、pH7.4 / 150mM NaCl、0.05% P20、0.5% BSA含有ランニング緩衝液をアッセイをとおして使用した。

【0382】

NRG-1 1細胞外ドメイン(R&D Systems)を、氷上で45分、5:1モル比のEZ-結合スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン(Pierce)とインキュベートした。過剰のエタノールアミン添加により反応停止させ、非共役ビオチンを、ビオチニル化-NRGから脱塩スピンカラム(Zeba)を使用して除去した。ビオチニル化-NRGを、約3000R.U.のssDNA-ストレプトアビジン(Biotin CAPtureキット)と予め固定化したセンサーチップCAPで捕捉し、ニューレグリン表面密度を400~600R.U.の範囲とした。参照フローセルを、ssDNA-ストレプトアビジンのみがフローセル表面に存在するように、注入工程からビオチニル化-NRGを除いて作製した。

【0383】

HER3 / 抗体複合体を、10nMヒトHER3-Fcを適当な試験抗体の濃度を増加させながら(0~50nM)、15分、室温でインキュベートして産生し、Biacore™と10でインキュベートした。相互作用解析を、参照およびニューレグリン表面上のHER3 / 抗体複合体を180秒間、流速60μL / 分で連続して注入することにより行った。複合体解離を、180秒間、流速60μL / 分でモニターした。表面再生を各分析サイクルの最後に、120秒間の8Mグアニジン:1M NaOH(3:1)注入、続く120秒間の30%アセトニトリル / 0.25M NaOHの流速30μL / 分での注入を使用して行った。

【0384】

実施例15: インビボPD試験

BxPC3およびBT-474細胞を培養し、雌無胸腺nu/nu Balb/Cマウス(Harlan Laboratories)に実施例16および17に記載のとおりインプラントした。

腫瘍が適当なサイズになったら、動物を腫瘍品質について試験した。潰瘍化腫瘍の動物または液体で満たされた腫瘍の動物を試験から除外した。残りの動物に、静脈内に、側方尾静脈注射により抗体を投与した。一定時点で、動物をCO₂窒息により屠殺し、全血液を心臓穿刺により回収し、1.5mLエプENDORF採取チューブに入れた。腫瘍組織を直ぐに摘出し、ねじ蓋付ポリプロピレンサンプルチューブに入れ、液体窒素で急速冷凍した。組織を、ライセートを調製するまで-80で貯蔵した。

【0385】

実施例16: インビボBT-474有効性試験

BT-474細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清含有DMEMで、インプラント時まで抗生物質無しで培養した。

細胞接種1日前、雌無胸腺nu/nu Balb/Cマウス(Harlan Laboratories)に、皮下的に徐放性17-エストラジオールペレット(Innovative Research of America)をインプラントし、血清エストロゲンレベルを維持した。17-エストラジオールペレットインプラント1日後、5×10⁶細胞を同所性に、第四乳房脂肪パッドに、ハンクス平衡塩溶液中50%無フェノールレッドマトリゲル(BD Biosciences)を含む懸濁液として注射した。懸濁液での細胞を含む総注入体積は200μLであった。細胞インプラント20日後、腫瘍体積約200mm³の動物を有効性試験に参加させた。一般に、1群あたり計10匹動物を有効性試験に参加させた。

【0386】

単剤試験のために、動物に、MOR10701またはMOR10703を側方尾静脈注射により、静脈内に投与した。初期負荷量 40 mg/kg を第一投与量として与えた。初期投与の後、動物に、20 mg/kg で、試験の間隔日スケジュールとした。組み合わせ試験のために、動物に MOR10701 または MOR10703 (20 mg/kg、iv、q 2 d) および最適以下のトラスツマブ (1 mg/kg、iv、2 q w) 投与量を投与した。

【0387】

試験期間中、腫瘍体積を、週に2回ノギス測定することにより測定した。処置/対照(T/C)値パーセントを次の式を使用して計算した：

$$T > 0 \text{ であるならば、} \% T / C = 100 \times T / C$$

式中

T = 試験最終日の薬剤処置群の平均腫瘍体積；

T = 試験最終日の薬剤処置群の平均腫瘍体積 - 投与開始日の薬剤処置群の平均腫瘍体積；

C = 試験最終日の対照群の平均腫瘍体積；および

C = 試験最終日の対照群の平均腫瘍体積 - 薬剤処置群の投与開始日の対照群の平均腫瘍体積。

【0388】

体重を週に2回測定し、投与量を体重で調節した。体重変化%を $(BW_{\text{現在}} - BW_{\text{初期}}) / (BW_{\text{初期}}) \times 100$ で計算した。データを、処置開始日からの体重変化パーセントとして示す。

全データは、平均 ± 平均の標準誤差 (SEM) で示した。デルタ腫瘍体積および体重を統計学的分析に使用した。群間比較を、一方向 ANOVA と、続く事後 Tukey により行った。全統計学的評価について、レベルの有意性を $p < 0.05$ と設定した。媒体対照群と比較した有意性を報告する。

【0389】

実施例 17：インビボ BxPC3 有効性試験

BxPC3 細胞を、10% 熱不活性化ウシ胎児血清含有 RPMI-1640 培地で、インプラント時まで抗生物質なしでインキュベートした。

雌無胸腺 nu/nu Balb/C マウス (Harlan Laboratories) に、 1.0×10^6 細胞を、50% リン酸緩衝化食塩水と 50% マトリゲル中の混合物で皮下的にインプラントした。懸濁液での細胞を含む総注人体積は 200 μ L であった。腫瘍が約 200 mm³ の大きさになったら、動物を有効性試験に参加させた。一般に、1 群あたり計 10 匹動物を有効性試験に参加させた。異常な腫瘍増殖特徴を示すならば、動物を除外した。

動物に、側方尾静脈注射を介して静脈内投与した。初期負荷量 40 mg/kg を第一投与量として与えた。初期投与の後、動物に、20 mg/kg で、試験の間隔日スケジュールとした (25 日間、処置下)。腫瘍体積および T/C 値を先に詳述したとおり計算した。

【0390】

実施例 18：ホスホ - Akt (S473) インビボ PD アッセイ

約 50 mm³ 凍結腫瘍 (例えば BT-474 または BXP-3) 組織を氷上で融解し、ホスファターゼ (Roche) およびプロテアーゼ阻害剤 (Roche) を含む 100 ~ 300 μ L の T - P E R 緩衝液 (Pierce) を各サンプルに添加した。溶解緩衝液の添加体積は、腫瘍サンプルのサイズによった。組織を 1.5 mL 乳棒 (Fisher Scientific) で破壊し、得られた懸濁液を氷上で 15 分インキュベートして、一夜、-80 °C で凍結した。サンプルを融解し、15 分、13000 g、4 °C で遠心分離して、上清タンパク質濃度を B C A アッセイ (Thermo Scientific) で定量した。組織上清を溶解緩衝液 (Mesoscale Discovery) で希釈し、25 μ g を、予め遮断溶液 - A (Mesoscale Discovery) で遮断した多スポット 96 ウェルホスホ - Akt 炭素プレート (Mesoscale Discovery) に添加した。プレートを室温で 1 時間、振盪しながらインキュベートし、ライセートを吸引し、ウェルを T r i s 洗浄緩衝液 (Mesoscale Discovery) で 4 回洗浄した。リン酸化 Akt を、抗体希釈緩衝液で希釈した 25 μ L のスルホタグ抗ホスホ - Akt (S473) 抗体 (Mesoscale Discovery) を使用して、室温で 1 時間振盪

10

20

30

40

50

しながらインキュベートすることにより検出した。ウェルをT r i s 洗浄緩衝液で4回洗浄し、150 μ LのRead緩衝液T (界面活性剤含有)(Mesoscale Discovery)を添加し、シグナルをMesoscale Sector Imagerを使用して定量した。

【0391】

実施例19：ホスホH E R 3 (Y1197)インビボP D アッセイ

約50 mm³凍結腫瘍(例えばBXP-3)組織を氷上で融解し、ホスファターゼ(Roche)およびプロテアーゼ阻害剤(Roche)を含む100~300 μ LのT - P E R 緩衝液(Pierce)を各サンプルに添加した。組織を1.5 mL乳棒(Fisher Scientific)を使用して破壊し、得られた懸濁液を、氷上で15分インキュベートし、一夜、-80℃で凍結した。サンプルを融解し、15分、13000 g、4℃で遠心分離して、上清タンパク質濃度をB C A アッセイ(Thermo Scientific)で定量した。組織上清を溶解緩衝液で希釈し、予め4 μ g/mL MA B3481(R&D Systems)で一夜被覆し、3%ミルクで遮断した多スポット96ウェル炭素プレート(Mesoscale Discovery)に150 μ gを添加した。プレートを室温で2時間、振盪しながらインキュベートし、ライセートを吸引し、ウェルをT r i s 洗浄緩衝液(Mesoscale Discovery)で4回洗浄した。リン酸化H E R 3 は、遮断緩衝液で1/8000希釈した抗H E R 3 pY1197と結合させた。室温で1時間インキュベーション後、ウェルをT r i s 洗浄緩衝液で洗浄し、抗pY1197抗体を、遮断緩衝液で1/1000希釈したSタグ標識抗ウサギ抗体(Mesoscale Discovery)で、振盪しながら室温で1時間インキュベートすることにより検出した。ウェルをT r i s 洗浄緩衝液で4回洗浄し、150 μ Lの1/4希釈Read緩衝液T (界面活性剤含有)(Mesoscale Discovery)を添加し、シグナルをMesoscale Sector Imagerを使用して定量した。

10

20

【0392】

実施例20：インビトロ薬剤組み合わせ試験

H E R 3 標的抗体が標的治療剤と組み合わせる能力を試験するために、MOR09825またはMOR10703をトラスツマブ、ラパチニブ、BEZ235、BKM120、BYL719、RAD001、エルロチニブおよびセツキシマブと細胞生存能アッセイで組み合わせた。約1000~1500のSK-B r-3(マッコイ)、MDA-MB-453(R P M I)、FaDu(E M E M)またはL3.3(R P M I)細胞を、2%F B Sを添加した適当な培養培地で384ウェルプレートに播種し、一夜、37℃で付着させた。適当な薬剤組み合わせ(ラパチニブ、BKM120およびBYL719の典型的最終薬剤濃度は3 μ M~13 nM範囲; RAD001は27 nM~0.0041 nM; エルロチニブ1 μ M~0.0025 nM範囲; M O R 1 0 7 3 1 0 0 nM~0.01 nM範囲; セツキシマブ100 nM~0.0015 nM; およびトラスツマブ300 nM~0.046 nM範囲)を、続いて、各プレートが各薬剤の用量応答曲線を二次元マトリクスで含むようにウェルに添加した。プレートを3~6日間インキュベータに戻し、CellTiter-Gloを使用して細胞生存能を評価した。CellTiter-Glo溶液を各ウェルに添加し、室温で穏やかに振盪しながら10分インキュベートした。発光の量をSpectraMaxプレートリーダー(Molecular Devices)を使用して決定した。各組み合わせで得た増殖阻害の程度を計算し、組み合わせ活性をLoewe加算性モデルを使用して強調した。

30

【0393】

実施例21：L3.3細胞におけるインビボ薬剤組み合わせ試験

40

脾臓L3.3細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清含有D M E M 培地でインプラント時まで培養した。雌F o x n 1ヌードマウス(Harlan Laboratories)に、皮下的に3 \times 10⁶細胞を無F B SのD M E M中でインプラントした。懸濁液中の細胞を含む総注人体積は100 μ Lであった。細胞インプラント12日後、動物を有効性試験に参加させ、全群平均腫瘍体積約100 mm³であった。一般に、群あたり計8匹の動物を試験に参加させた。異常な腫瘍増殖特徴を示すならば、動物を除外した。

動物に、MOR10703を側方尾静脈注射により、20 mg/kg、隔日スケジュールで試験中静脈内に投与した(14日間、処置下)。エルロチニブを50 mg/kg(P O)で毎日単剤またはMOR10703との組み合わせで投与した。腫瘍体積およびT/C価を先に詳述したとおり計算した。

50

【 0 3 9 4 】

結果および考察

まとめると、これらの結果は、一群の抗体が H E R 3 のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基の立体構造エピトープに結合し、H E R 3 を不活性または閉鎖立体構造で安定化させることを示す。これらの抗体の結合はリガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも阻害する。これらの抗体はまた H E R 3 リガンドと同時に結合する。

【 0 3 9 5 】

(i) 親和性決定

抗体親和性を、上記のとおり溶液平衡タイトレーション (S E T) により決定した。結果を表 9 に要約し、MOR10701のタイトレーション曲線の例を図 1 に示す。データは、ヒト、カニクイザル、ラットおよびマウス H E R 3 と密接に結合する多くの抗体が同定されたことを示す。

【表 3 1】

表 9 : 溶液平衡タイトレーション (S E T) により決定した抗 H E R 3 I g G の K_D 値。Hu (ヒト)、Cy (カニクイザル)、Mu (マウス) および ra (ラット)

MOR#	S E T K_D (pM)			
	hu HER3-Tag	cy HER3-Tag	mu HER3-Tag	ra HER3-Tag
09823	9	4	2	1 1
09824	3	3	2	7
09825	2 5	5 6	2 4	9 6
09974	3 5 0	2 0 0	1 2 0	n. d.
10701	4	4	6	1 0
10702	3	3	5	6
10703	2 6	2 3	2 0	4 0
12609	1 0	n. d	n. d	n. d
12610	3 7	n. d	n. d	n. d
10703 N52S	5 7	n. d	n. d	n. d
10703 N52G	6 0	n. d	n. d	n. d
10703_A50V_N52S	1 6	n. d	n. d	n. d
10703_A50V_N52G	2 2	n. d	n. d	n. d
10701 R55G	1 8	n. d	n. d	n. d
10701 R55K	1 1	n. d	n. d	n. d

【 0 3 9 6 】

(ii) SK-Br-3細胞 E C₅₀ 決定

同定した抗体が H E R 3 発現細胞と結合する能力を、H E R 2 増幅細胞株 SK-Br-3 の結合についての E C₅₀ 値計算により決定した (図 2 および表 1 0 参照)。

【表 3 2】

表 1 0 : SK-Br-3細胞に対する抗HER3 I g GのFACS EC₅₀ 価。n. d.(測定せず)

MOR #	SK-Br-3 FACS EC ₅₀ (pM)
0 9 8 2 3	6 3 0
0 9 8 2 4	3 2 4
0 9 8 2 5	8 3 9
0 9 9 7 4	n. d.
1 0 7 0 1	n. d.
1 0 7 0 2	n. d.
1 0 7 0 3	2 4 5 4

10

【 0 3 9 7】

(iii) H E R 3 ドメイン 結合

抗 H E R 3 抗体のサブセットを、E L I S A アッセイにおいてヒト H E R 3 の多様な細胞外ドメインと結合する能力について特徴づけした。これを達成するために、H E R 3 の細胞外ドメインをその 4 個の構成的ドメインに分割し、これらのドメインの種々の組み合わせを上記のとおりクローン化し、発現し、非依存性タンパク質として精製した。この戦略を使用して、下記ドメインは可溶性タンパク質としての産生に成功した：ドメイン 1 および 2 (D 1 - 2)、ドメイン 2 (D 2)、ドメイン 3 および 4 (D 3 - 4) およびドメイン 4 (D 4)。多くの内部的に産生されたマウス抗ヒト H E R 3 抗体(8 D 7、1 F 5 および 8 P 2)も、各単離ドメインの完全性を証明するためにポジティブコントロールとして試験した。

20

【 0 3 9 8】

図 3 に示すとおり、MOR09823 および MOR09825 はいずれも H E R 3 細胞外ドメインと十分に結合するが、単離ドメインへの結合は、これらの抗体でのこのアッセイではほとんど見られなかった。この結合パターンについていくつかの可能な説明がある：

a) MOR09823 および MOR09825 は、ドメイン境界に伸びる直線状エピトープと結合し、それゆえに、ドメインが単離タンパク質として発現されたとき、結合エピトープはなくなる可能性がある。

30

b) MOR09823 および MOR09825 は、複数ドメインを架橋する非直線状エピトープと結合し得る。結果として、H E R 3 の成分単位への分離は結合部位を破壊し得る。

c) H E R 3 の形状 / 立体構造は、H E R 3 の完全長細胞外ドメインのみがこの形状 / 立体構造と適合するように、H E R 3 に対する MOR09823 および MOR09825 の結合の成分であり、一方単離ドメインはこの立体構造を完全に想定できない。

【 0 3 9 9】

(vi) 水素 / 重水素交換マスペクトロメトリーを使用した H E R 3 エピトープマッピング

H E R 3 エピトープを、さらに MOR09823、MOR09824、MOR09825 および MOR09974 の F a b バージョンの存在下および非存在下で HER3 ECD の HDX-MS 分析により探索した。図 4 A は、結合 F a b 非存在下で、約 6 9 % の HER3 ECD 配列が、少なくとも 1 ペプチドにより被覆されたことを示す。被覆内のギャップは、おそらく、これらの領域内の残基のグリコシル化またはシステイン富領域のジスルフィド結合の不十分な還元により、これは特にドメイン 2 で明白である。興味深いことに各 F a b が個々の保護パターンを示すが、強い保護の 1 領域が MOR09823、MOR09824、MOR09825 および MOR09974 で一貫して見られ(図 4 B 参照)、これらの高度に関連する抗体ファミリーが H E R 3 に同一方法で結合することを示す。最強保護は、ドメイン 2 残基 2 6 9 ~ 2 8 6 (TFQLEPNPHTKYQYGGVC)(配列番号 1 4 6)で見られ、この近傍の残基が m A b 結合に重要である可能性を示す。F a b 保護残基の公開された H E R 3 結晶構造(Cho & Leahy, (2002) Science 297:1330-1333)への位置づけは、残基

40

50

269～286がドメイン2内の機能的に重要な - ハルピンループ内および近位であることを強調する(図4C参照)。

【0400】

(vii) H E R 3 / MOR09823結晶構造

H E R 3細胞外ドメインに結合するMOR09823 Fabフラグメントの3.2 分解能x線結晶構造を解析し、さらに関連抗体のこのファミリーにより認識されるH E R 3エピトープを規定した(図5A参照)。さらに、ヒトH E R 3に結合するMOR09825 Fabフラグメントの3.4 構造も解決した。両MOR09823/HER3およびMOR09825/HER3結晶構造において、H E R 3は係留(不活性)立体構造である(図5A、B、CおよびD参照)。この立体構造は、ドメイン2の ハルピン二量体化ループが仲介するドメイン2と4の顕著な相互作用界面により特徴付けられる。観察されたH E R 3立体構造は、H E R 3結晶構造をニューレグリン非存在下細胞外ドメインとして公表したCho et al. (Cho & Leahy, (2002), Science 297:1330-1333)により先に記載されたものに類似する。ニューレグリンがH E R 3を活性化できるため、H E R 3の係留立体構造は不活性であると推定される。類似の係留立体構造は、関連E G F RファミリーメンバーH E R 4(Bouyain et al., (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:15024-15029)およびH E R 1(Ferguson et al., (2003) Molec. Cell 11:507-517)が結晶化されているときにも観察されている。

【0401】

不活性(係留)状態でのH E R 3のドメイン1と4の空間的相関は伸長(活性)状態と顕著に異なる。この知見は、関連E G F RファミリーメンバーH E R 2およびリガンド結合H E R 1の結晶構造に基づき(Cho et al., (2003) Nature 421:756-760; Ogiso et al., (2002) Cell 110:775-787; Garrett et al., (2002) Cell 110:763-773)、この両方は伸長(活性)状態である。伸長状態で、ドメイン2 ハルピン二量体化ループは4との阻害相互作用から放たれ、二量体化パートナータンパク質と自由に相互作用する。それゆえに、ドメイン2 ハルピン二量体化ループは、係留(不活性)状態維持および伸長状態でのE G F受容体二量体化の両方に機能的に重要であり、細胞内キナーゼドメインの活性化をもたらす。MOR09823/HER3およびMOR09825/HER3結晶構造(図5参照)は、それゆえに、MOR09823およびMOR09825がいずれもH E R 3の不活性立体構造の安定化により機能することを示唆する。

【0402】

結晶構造はまた、MOR09823およびMOR09825により認識されるH E R 3エピトープが、ドメイン2および4の両者からの残基を含む非直線状エピトープであることも確認する(図5CおよびD、表11、12、13および14参照)。高度に関連する抗体このファミリーにより認識されるH E R 3エピトープは、それゆえに、

ドメイン2: 残基265～277、315

ドメイン4残基: 571、582～584、596～597、600～602、609～615

と規定される。

【0403】

ドメイン2および4の両者のMOR09823またはMOR09825による結合は、結果として、H E R 3の係留立体構造を安定化させ、そのシグナル伝達能力と拮抗する。

結晶構造で観察されたMOR09823 / MOR09825結合モードは、我々の他のエピトープマッピング試験と一致する。具体的に、E L I S Aドメイン結合実験は、MOR09823およびMOR09825の親和性は、単離ドメイン(例えばD1、D1-D2、D3またはD3-D4フラグメント)のいずれよりもインタクトH E R 3細胞外タンパク質で有意に大きいことを証明する(図3参照)。また、抗体認識エピトープの一部としてドメイン2 ハルピンを同定するHER3 HDX-MSデータ(図4B参照)とも一致する。最後に、両結晶構造は、H E R 1のドメイン1および3に準じて位置づけされているH E R 3のリガンド結合表面(Ogiso et al., (2002) Cell, 110:775-787; Garrett et al., (2002) Cell, 110:763-773)が、MOR09823またはMOR09825結合により占拠されないことを示す(図5B参照)。これは、MOR09823もMOR09825も、ニュー

レグリンのMCF7細胞を遮断しない(図9参照)およびBiacore試験でHER3/MOR09823複合体が固定化ニューレグリンと結合できる(図10参照)との我々の発見と一致する。

【0404】

【表33】

表11: MOR09823 Fab重鎖とヒトHER3の相互作用。Fab VH残基は、その直線状アミノ酸配列(配列番号15)に基づき番号付けする。HER3残基はNP_001973に基づき番号付けする。示すHER3残基は、MOR09823 Fab中の原子の5 Å以内に少なくとも1個の原子を有する。

MOR09823 Fab			ヒトHER3		
残基	番号	鎖	残基	番号	ドメイン
S e r	30	VH	P r o	276	2
S e r	31	VH	P r o	274	2
			A s n	275	2
			P r o	276	2
T y r	32	VH	P r o	276	2
			H i s	277	2
A l a	33	VH	A s n	266	2
			L e u	268	2
S e r	35	VH	L e u	268	2
V a l	50	VH	L e u	268	2
			T h r	269	2
G l y	52	VH	G l u	273	2
			T h r	269	2
A l a	53	VH	G l u	273	2
			P r o	274	2
V a l	54	VH	G l u	273	2
T y r	58	VH	P r o	583	4
			A s p	571	4
			H i s	584	4
			T h r	269	2
			G l n	271	2
A s n	73	VH	A s n	315	2
S e r	74	VH	A s n	315	2
T r p	98	VH	L e u	268	2
			L y s	267	2
			A s n	266	2
A s p	100	VH	A l a	596	4
			L y s	597	4
			P r o	276	2
			H i s	277	2
G l u	101	VH	L y s	267	2
			L y s	597	4
P h e	103	VH	L e u	268	2

【0405】

【表 3 4】

表 1 2 : MOR09823 Fab 軽鎖とヒト HER 3 の相互作用。F a b VL 残基はその直線状アミノ酸配列(配列番号 1 4)に基づき番号付けする。HER 3 残基は NP_001973 に基づき番号付けする。示す HER 3 残基は、MOR09823 Fab 中の原子の 5 Å 以内に少なくとも 1 個の原子を有する。

MOR09823 Fab			ヒト HER 3		
残基	番号	鎖	残基	番号	ドメイン
G l n	2 7	VL	A r g	6 1 1	4
			G l u	6 0 9	4
G l y	2 8	VL	A r g	6 1 1	4
			P r o	6 1 2	4
I l e	2 9	VL	P r o	6 1 2	4
S e r	3 0	VL	P r o	6 1 2	4
			C y s	6 1 3	4
			H i s	6 1 4	4
			G l u	6 1 5	4
A s n	3 1	VL	G l u	6 1 5	4
			C y s	6 1 3	4
T r p	3 2	VL	L y s	2 6 7	2
			T y r	2 6 5	2
			P r o	6 1 2	4
			C y s	6 1 3	4
			I l e	6 0 0	4
			L y s	6 0 2	4
T y r	4 9	VL	L y s	5 9 7	4
G l y	6 6	VL	G l u	6 1 5	4
S e r	6 7	VL	H i s	6 1 4	4
			G l u	6 1 5	4
G l n	8 9	VL	L e u	2 6 8	2
T y r	9 1	VL	L y s	2 6 7	2
			L e u	2 6 8	2
			P h e	2 7 0	2
S e r	9 2	VL	P h e	2 7 0	2
			L y s	6 0 2	4
			P r o	6 1 2	4
S e r	9 3	VL	P h e	2 7 0	2
			G l u	6 0 9	4
P h e	9 4	VL	P h e	2 7 0	2
			L e u	2 6 8	2
			G l y	5 8 2	4
			P r o	5 8 3	4
T h r	9 6	VL	L e u	2 6 8	2

【 0 4 0 6 】

【表 3 5】

表 1 3 : MOR09825 Fab重鎖とヒトHER 3の相互作用。F a b V H残基は、その直線状アミノ酸配列(配列番号 5 1)に基づき番号付けする。H E R 3残基はNP_001973に基づき番号付けする。示すH E R 3残基は、MOR09825 Fab中の原子の 5 Å以内に少なくとも 1 個の原子を有する。

MOR09825 Fab			ヒトHER 3		
残基	番号	鎖	残基	番号	ドメイン
S e r	3 0	VH	A s n	3 1 5	2
S e r	3 1	VH	P r o	2 7 4	2
			P r o	2 7 6	2
T y r	3 2	VH	P r o	2 7 6	2
			H i s	2 7 7	2
A l a	3 3	VH	A s n	2 6 6	2
			T h r	2 6 9	2
S e r	3 5	VH	L e u	2 6 8	2
T r p	4 7	VH	L e u	2 6 8	2
A l a	5 0	VH	L e u	2 6 8	2
A s n	5 2	VH	G l u	2 7 3	2
			G l n	2 7 1	2
			T h r	2 6 9	2
S e r	5 3	VH	G l u	2 7 3	2
			P r o	2 7 4	2
G l n	5 4	VH	G l u	2 7 3	2
			P r o	2 7 4	2
S e r	5 7	VH	G l n	2 7 1	2
T y r	5 9	VH	P r o	5 8 3	4
			A s p	5 7 1	4
			H i s	5 8 4	4
			T h r	2 6 9	2
			G l n	2 7 1	2
A s n	7 4	VH	A s n	3 1 5	2
T r p	9 9	VH	L e u	2 6 8	2
			L y s	2 6 7	2
			A s n	2 6 6	2
A s p	1 0 1	VH	A l a	5 9 6	4
			L y s	5 9 7	4
			P r o	2 7 6	2
			H i s	2 7 7	2
G l u	1 0 2	VH	L y s	2 6 7	2
			L y s	5 9 7	4
P h e	1 0 4	VH	L e u	2 6 8	2

【 0 4 0 7 】

【表 3 6】

表 1 4 : MOR09825 Fab 軽鎖とヒト HER 3 の相互作用。F a b V L 残基は、その直線状アミノ酸配列(配列番号 5 0)に基づき番号付けする。H E R 3 残基は NP_001973 に基づき番号付けする。示す H E R 3 残基は、MOR09825 Fab の原子の 5 Å 以内に少なくとも 1 個の原子を有する。

MOR09825 Fab			ヒト HER 3		
残基	番号	鎖	残基	番号	ドメイン
G l n	2 7	V L	A r g	6 1 1	4
G l y	2 8	V L	A r g	6 1 1	4
			P r o	6 1 2	4
I l e	2 9	V L	P r o	6 1 2	4
S e r	3 0	V L	P r o	6 1 2	4
			C y s	6 1 3	4
			H i s	6 1 4	4
			G l u	6 1 5	4
A s n	3 1	V L	G l u	6 1 5	4
			H i s	6 1 4	4
			C y s	6 1 3	4
T r p	3 2	V L	L y s	2 6 7	2
			T y r	2 6 5	2
			P r o	6 1 2	4
			C y s	6 1 3	4
			I l e	6 0 0	4
			L y s	6 0 2	4
T y r	4 9	V L	L y s	5 9 7	4
G l y	6 6	V L	G l u	6 1 5	4
S e r	6 7	V L	H i s	6 1 4	4
			G l u	6 1 5	4
G l n	8 9	V L	L e u	2 6 8	2
T y r	9 1	V L	L y s	2 6 7	2
			L e u	2 6 8	2
			P h e	2 7 0	2
S e r	9 2	V L	P h e	2 7 0	2
			L y s	6 0 2	4
			P r o	6 1 2	4
			A r g	6 1 1	4
S e r	9 3	V L	P h e	2 7 0	2
			G l u	6 0 9	4
P h e	9 4	V L	P h e	2 7 0	2
			G l y	5 8 2	4
			P r o	5 8 3	4
T h r	9 6	V L	L e u	2 6 8	2

【 0 4 0 8】

MOR09823 / MOR09825 結晶構造の目視は、H E R 3 残基 L y s 2 6 7 および L e u 2 6 8 が種々の抗体 C D R と複数相互作用を形成することを強調し、抗体結合に重要である可能性を示唆した。結果として、抗体結合におけるその影響を評価するために、L y s 2 6 7

10

20

30

40

50

および/またはL e u 2 6 8をアラニンに変異し、発現し、得られた組み換えタンパク質を精製した。E L I S A結合アッセイは、L y s 2 6 7またはL e u 2 6 8のいずれかの変異がMOR10703のH E R 3への結合をなくすことを示し(図5 F)、両残基がH E R 3エピトープの必須部分であることを示唆し、それゆえに、MOR09823/MOR09825とH E R 3の相互作用の提案された相互作用を支持する。

【0409】

(viii) 細胞シグナル伝達阻害

抗H E R 3抗体のリガンド依存性H E R 3活性における影響を確認するために、MCF7細胞をI g Gとインキュベートし、ニューレグリンで刺激した。阻害曲線例を図6 Aに示し、表15に要約する。抗H E R 3抗体のH E R 2-仲介H E R 3活性化への影響はH E R 2増幅細胞株SK-Br-3を使用してまた試験した(図6 Bおよび表15)。

【0410】

【表37】

表15: MCF7およびSK-Br-3細胞におけるp H E R 3 I C₅₀および抗H E R 3 I g Gの阻害価の程度

MOR #	MCF7 p H E R 3		SK-Br-3 p H E R 3	
	I C ₅₀ (pM)	%阻害	I C ₅₀ (pM)	%阻害
09823	181	89	56	59
09824	103	91	110	64
09825	399	80	169	66
09974	3066	69	1928	67
10701	n. d.	n. d.	370	74
10702	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
10703	333	80	167	69
12609	5	86	241	71
12610	126	84	192	75

【0411】

H E R 3活性阻害が下流細胞シグナル伝達A k tに影響するか否かを決定するために、リン酸化も、抗H E R 3抗体後にH E R 2増幅細胞において測定した(図7および表16参照)。

【表38】

表16: SK-Br-3 BT-474およびMCF7細胞におけるp A k t (S⁴⁷³) I C₅₀および抗H E R 3 I g Gの阻害価の程度。

MOR #	SK-Br-3 pAkt		BT-474 pAkt	MCF7 pAkt	
	I C ₅₀ (pM)	%阻害	%阻害	I C ₅₀ (pM)	%阻害
09823	55	92	57	n. d.	n. d.
09824	62	93	46	n. d.	n. d.
09825	156	91	69	294	79
09974	814	85	n. d.	n. d.	n. d.
10701	n. d.	n. d.	59	n. d.	n. d.
10702	n. d.	n. d.	55	n. d.	n. d.
10703	70	89	62	449	79

【0412】

要約すると、MOR09823、MOR09824、MOR09825、MOR09974、MOR10701、MOR10702、MOR107

03、MOR12609およびMOR12610は、各々、リガンド依存性およびリガンド非依存性方法の両方で細胞性H E R 3 活性を阻害できる。

【 0 4 1 3 】

(ix) 増殖阻害

MOR09823、MOR09824、MOR09825、MOR09974、MOR10701、MOR10702およびMOR10703が全てH E R 3 活性および下流シグナル伝達を阻害するため、リガンド依存性および非依存性インビトロ細胞増殖を遮断する能力について試験した(データ例を図8に示し、表17に要約する)。試験した抗H E R 3 抗体は、全て有効な細胞増殖阻害剤であった。

【表39】

表17: SK-Br-3、BT-474およびMCF7細胞における10 μ g/ml抗H E R 3 I g Gで処置後の増殖阻害。

MOR #	%阻害		
	SK-Br-3	BT-474	MCF7
0 9 8 2 3	3 9	3 9 . 8	8 2
0 9 8 2 4	3 3	3 6 . 8	8 2
0 9 8 2 5	4 1	3 7 . 2	6 3
0 9 9 7 4	3 5	n. d.	2 0
1 0 7 0 1	n. d.	4 3 . 6	n. d.
1 0 7 0 2	n. d.	4 3 . 8	n. d.
1 0 7 0 3	3 5	4 1 . 6	8 1

【 0 4 1 4 】

(x) リガンド遮断評価

記載した抗H E R 3 抗体がリガンド結合を遮断する能力を、ニューレグリンのMOR09823またはMOR09825のいずれかで予め処理したMCF7細胞への結合を試験することにより評価した。MOR09823またはMOR09825の存在は、ニューレグリンがMCF7細胞に結合する能力に顕著な影響を有しないが、実験で使用したポジティブコントロール(Mab3481)は、ニューレグリン結合を大いに妨害することができた(図9参照)。これらの結果は、MOR09823がドメイン2および4と結合し、一方H E R 3 のニューレグリンとの相互作用の主接触点はドメイン1および3に重荷群発すると仮説だてられているため、結晶構造と一致する。ニューレグリンがH E R 3 の不活性立体構造と結合できることを考慮して(Kani et al., (2005) Biochemistry 44: 15842-15857)、MOR09823およびMOR09825が、シグナル伝達に必要なH E R 3 ドメイン再配列を阻止または受容体二量体化を阻止することにより機能する可能性が高い。

【 0 4 1 5 】

(xi) リガンド遮断評価(生化学)

MOR09823およびニューレグリンがH E R 3 と同時に結合できるか否かを探索するために、生化学的アッセイを、BiacoreTM方法を使用して確立した。相互作用解析を、ピオチニル化ニューレグリンをBiacoreTM センサーチップC A P (GE Healthcare)上に、Biotin CAPtureキット(GE Healthcare)を使用して捕捉することにより行った。H E R 3 複合体を、ヒトH E R 3 - F cとMOR09823、105.5(Thermo Scientific)またはヒトI g Gのいずれかの濃度を増やしながらいんキュベートして産生した。実施したH E R 3 / 抗体複合体を参照を越えて注入し、活性表面およびH E R 3 とニューレグリンの相互作用が観察された。

【 0 4 1 6 】

コントロールI g GはH E R 3 / ニューレグリン複合体形成に影響しなかったが、105.5はH E R 3 がニューレグリンと結合する能力を顕著に阻害することが観察され、リガンド遮断抗体としてのその記載が確認された(図10)。対照的に、H E R 3 / MOR09823複合

体はニューレグリンと結合でき、MOR09823がリガンド結合を阻止しないことが証明された。興味深いことに、R U 価の用量依存性増加が、MOR09823/HER3複合体を注入したとき観察された。このデータは、ニューレグリン、HER3およびMOR09823を含む三量体複合体がチップ表面上に産生されることを示す。この三量体複合体が形成される能力は、MOR09823結合がHER3のリガンド結合部位を占拠しないためにHER3/MOR09823結晶構造から予測され、ニューレグリンおよびMOR09823の結合が相互排他的ではないことを示唆する。

【0417】

他の態様において、抗体またはそのフラグメントはHER3のドメイン2およびドメイン4の両者に結合し、HER3リガンド、例えばニューレグリンの同時結合の遮断がない。理論を述べる必要はないが、HER3のドメイン2およびドメイン4のいずれにも結合する抗体またはそのフラグメント、HER3上のリガンド結合部位を遮断することなくHER3を不活性立体構造に保持する可能性が高い。それゆえに、HER3リガンド(例えば、ニューレグリン)は、HER3と抗体と同時に結合できる。

【0418】

本発明の抗体またはそのフラグメントは、HER3のリガンド依存性および非依存性活性化の両者をリガンド結合を妨げることなく阻止する。これは次の理由から有利であると考えられる：

(i) 治療抗体は、各腫瘍型が各機構により誘導されるため、HER3活性化の一機構(すなわちリガンド依存性またはリガンド非依存性)を標的とする抗体よりも広域の腫瘍に臨床的有用性を有する。

(ii) 治療抗体は、HER3活性化の両機構が同時に関与する腫瘍型に有用である。HER3活性化の一機構(すなわちリガンド依存性またはリガンド非依存性)を標的とする抗体はこれらの腫瘍型にほとんど効果がないかまったく効果がない

(iii) リガンド結合を妨げることなくHER3のリガンド依存性活性化を阻害する抗体の効果は、リガンドの濃度増加に悪影響を与える可能性が低い。これは、極めて高濃度のHER3リガンドにより駆動される腫瘍型における効果の上昇または耐性がHER3リガンドの上方制御により仲介されるとき薬物耐性傾向の減少に反映される。

(iv) 不活性形態の安定化によりHER3活性化を阻害する抗体は、HER3活性化の代替機構により駆動される薬物耐性の傾向が低い。

結果として、本発明の抗体は、既存の治療抗体が臨床的に無力である状態の処置に使用し得る。

【0419】

(xii) HER3活性のインビボ阻害および腫瘍増殖に対する影響

記載の抗HER3抗体のインビボ活性を決定するために、MOR09823をBxPC-3およびBT-74腫瘍モデルで試験した。MOR09823は、腫瘍pHER3レベルの顕著な減少により証明されたとおりHER3活性を阻害することが証明された(図11)。HER3のシグナル伝達下流は、BxPC-3およびBT-474の両者におけるpAktレベル減少により証明されたとおり、同様に阻害された(図11)。HER2駆動BT-474有効性試験において、反復MOR1070処置は、腫瘍増殖74%阻害を生じ(図12A参照)、一方MOR10703は83%阻害を生じた。BxPC3腫瘍増殖モデルにおいて、MOR10701およびMOR10703のいずれもリガンド駆動腫瘍増殖阻害に極めて有効であった(図13参照)。

【0420】

(xiii) インビトロ薬剤組み合わせおよび細胞増殖における影響

腫瘍細胞増殖がしばしば複数シグナル伝達経路により駆動されるため、我々は、MOR09823またはMOR10703と種々の標的剤の組み合わせが細胞増殖遮断に有効であるか否かを評価した。選択した標的剤は主にHER2(トラスツマブ、ラパチニブ)、EGFR(セツキシマブ、エルロチニブ)、PI3K/mTOR(BEZ235)、PI3K(BKM120)、PIK3CA(BYL719)およびmTOR(RAD001)を阻害するものであり、なぜならこれらの標的がヒト腫瘍で通常活性化されているからである。アイソボログラム分析(図14参照)は、MOR09823

およびMOR10703がトラスツマブ、ラパチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、BEZ235、BK M120、BYL719およびRAD001と相乗的薬剤組み合わせを示すことを示した。このデータは、HER3シグナル伝達障害が、受容体チロシンキナーゼ群またはPI3Kシグナル伝達経路を標的とする阻害剤で特に有益であることを示唆する。

【0421】

(xiv)インビボMOR10703薬剤組み合わせ

インビトロでの受容体チロシンキナーゼ標的剤と組み合わせたHER3阻害のため、インビボでMOR10701またはMOR10703とトラスツマブおよびエルロチニブの組み合わせに影響を評価した。BT-474異種移植片(図15A参照)において、MOR10701またはMOR10703(20 mg/kg)と最適以下のトラスツマブ(1 mg/kg)の組み合わせは腫瘍緩解を起こすのに十分であった(それぞれ%T/C = -50および-37)。L3.3膀胱異種移植片において、MOR10703(20 mg/kg)と毎日のエルロチニブ(50 mg/kg)の組み合わせは腫瘍静止をもたらした(%T/C = 3、図15B参照)。両モデルにおいて、2剤の組み合わせはいずれかの薬剤単独よりも顕著に有効であり、HER3標的抗体とErbbB標的剤の組み合わせの我々の先のインビトロでの知見を支持する。

要約すると、この抗体のファミリーがHER3の不活性立体構造を安定化する特有の能力は、HER3がリガンド依存性または非依存性方法で活性化されているモデルにおいてインビボで顕著な有効性をもたらす。さらに、この抗体のファミリーによるHER3阻害は、多種多様な標的治療剤との組み合わせで有益であると考えられる。

【0422】

実施例22：良性前立腺肥大(BPH)、女性化乳房および子宮内膜症のためのHER3抗体

実験法

約9週齢の性的成熟IGS Wistar Hannoverラットに、静脈内注射により、1週間2回スケジュールで30、75および200 mg/kg MOR10703を投与した。13週間の投与期間完了後、各投与群からの10匹のラットを屠殺し、主臓器をさらなる分析のために採取した。さらに、200 mg/kg投与群からの6匹のラットをMOR10703から10週間回復させて、何らかの観察される変化の可逆性を決定するために屠殺した。動物屠殺後、臓器重量を秤量して、10%中性緩衝化ホルマリンで固定化した。組織切片を調製し、顕微鏡的試験で評価した。

【0423】

結果

雄ラットにおいて、前立腺重量減少が全投与量で見られ、これは前立腺および精嚢の分泌低下と相関した(表18)。これらの効果は、10週間の回復後可逆性であった。絶対平均対コントロールの差は次のとおりであった：30 mg/kg：-31%、75 mg/kg：-40%および200 mg/kg：-35%。ほとんど中程度または顕著な乳腺萎縮が全投与量の雄で観察され、これは10週間回復後非可逆性であった。この変化は、雄乳腺で見られる通常豊富な腺房および小葉発達の非存在により特徴付けられた。コントロールと対照的に、希薄な小管要素が全処置雄の乳腺に存在した。

【表 4 0】

表 1 8. 雄ラットの臓器重量におけるMOR10703関連差異

性別	雄			
投与量(mg/kg)	0	3 0	7 5	2 0 0
試験数	1 0	1 0	1 0	1 0
体重平均(g)	4 1 2	3 9 0	3 9 2	3 9 7
(差異%)	(-)	- 5	- 4	- 4
脳重量平均(g)	2. 1	2. 1	2. 1	2. 1
(差異%)	(-)	- 3	- 3	- 1
前立腺				
絶対平均(g)	0. 9	0. 6 ^c	0. 6 ^c	0. 6 ^c
(差異%)	(-)	- 3 1	- 4 0	- 3 5
体重相対 ^b (%)	0. 2 2	0. 1 6 ^c	0. 1 4 ^c	0. 1 5 ^c
(差異%)	(-)	- 2 8	- 3 8	- 3 3
脳重量に対する	4 3	3 1	2 7 ^c	2 8 ^c
相対				
(差異%)	(-)	- 2 9	- 3 8	- 3 5

10

^a 群平均の差異%として示す(差異%)。

20

^b 相対的。^c 群平均の統計学的分析に基づき、値は対照群と有意差がある。

【 0 4 2 4】

雌において、子宮重量減少が全投与量で観察され、これは10週間回復後可逆性であった(表19)。絶対平均対コントロール差は30mg/kg:-24%、75mg/kg:-27%および200mg/kg:-19%であった。子宮腺上皮の重度の低下として観察される子宮内膜萎縮は30mg/kg/日の全投与量で処置終了時に見られる子宮重量減少と相関した。これは、10週間回復後わずかに可逆性であり、腺上皮量は増加するものの、コントロール動物ほど多くはなかった。他の生殖臓器:卵巣、輸卵管、子宮頸および膣は、観察され得る周期段階の顕著な差異を考慮して、正常範囲内であると考えられた。

30

【表 4 1】

表 1 9. 雌ラットにおける臓器重量のMOR10703関連差異

性別	雌			
投与量(mg/kg)	0	3 0	7 5	2 0 0
試験数	1 0	1 0	1 0	1 0
体重平均(g)	2 3 7	2 4 6	2 3 9	2 4 1
(差異%)	(-)	- 4	- 1	- 2
脳重量平均(g)	1. 9	2. 0	1. 9	2. 0
(差異%)	(-)	- 1	- 1	- 2
子宮				
絶対平均(g)	0. 4 8	0. 3 6 ^c	0. 3 5 ^c	0. 3 9
(差異%)	(-)	- 2 4	- 2 7	- 1 9
体重相対 ^b (%)	0. 2 0	0. 1 5 ^c	0. 1 5 ^c	0. 1 6
(差異%)	(-)	- 2 6	- 2 7	- 2 1
脳重量に対する	2 5	1 8 ^c	1 8 ^c	2 0 ^c
相対				
(差異%)	(-)	- 2 9	- 3 8	- 3 5

40

^a 群平均の差異%として示す(差異%)。

50

^b 相対的。

^c 群平均の統計学的分析に基づき、値は対照群と有意差がある。実際の有意性レベルおよび使用した試験データ表を意味する。

【 0 4 2 5 】

考察

良性前立腺肥大(BPH)は、高齢男性に一般的な疾患であり、尿道の圧迫を起こし、排尿および膀胱問題に至る前立腺の非新生物拡大により特徴付けられる{Mahapokai1 W, van Sluijs FJ & Schalken JA. 2000 Prostate Cancer and Prostatic Diseases 3, 28-33}。BPHの解剖的または顕微鏡的証拠が60~70歳の男性の約55%の剖検で存在する。前立腺の経尿道的切除は長年処置選択肢である。結果として、BPHは、高齢男性の外科的介入の最も一般的な理由の一つである。処置の低浸潤性方法は次のものを含む：

(i) アルファ1-ブロッカー(ドキサゾシン、ブラゾシン、タムスロシン、テラゾシンおよびアルフゾシン)は、高血圧の処置にも使用される一群の薬である。これらの薬物は膀胱頸部および前立腺の筋肉を弛緩させ、排尿を容易にする。

(ii) フィナステリドおよびデュタステライドは、アンドロゲンレベルを下げ、そうして前立腺のサイズを小さくし、尿流速を上げ、BPHの症状を軽減する。症状改善が観察されるまで3~6ヶ月間かかり得る。フィナステリドおよびデュタステライドの使用と関連する潜在的副作用は性欲低下と不能を含む。

【 0 4 2 6 】

実験の章での結果は、初めて、BPHがニューレグリン依存性適応症であることを証明した。本知見はまたMOR10703が、性的成熟ラットでホルモンレベルに影響することなく前立腺サイズを顕著に減少させることも示し、MOR10703がBPHの処置に有用であることを示唆する。

【 0 4 2 7 】

BPH治療剤としてMOR10703および他のHER3抗体をさらに試験するために、一次ヒトBPH外科的標本を、無胸腺マウスまたはラットに移植し、Her3抗体の効果をモデルを使用して試験し得る(Otto U et al. Urol Int 1992; 48: 167 -170)。あるいは、BPHの側面を5-アンドロスタン-3, 17-ジオールとエストラジオールの長期投与を介して去勢イヌに誘発し、HER3抗体をこれらのイヌモデルで試験できる(Walsh PC, Wilson JD. J Clin Invest 1976; 57: 1093 - 1097)。

【 0 4 2 8 】

女性化乳房の物理的顕在化は、男性での乳房拡大であり、通常両側の乳房で起こるが、片方のみのこともあり、非対称的または一側性女性化乳房として知られる。女性化乳房の原因は通常次のものである：

(i) テストステロン対エストロゲン比を不均衡にする高エストロゲンレベル。

(ii) 前立腺癌またはBPH処置に使用したアンドロゲンアンタゴニストまたは抗アンドロゲン。これらの薬物はテストステロンを抑制するが、テストステロン抑制により、エストロゲンが上昇し始める。

【 0 4 2 9 】

多くの治験薬が現在試験されているが、現在女性化乳房で承認された処置はない。結果として、女性化乳房は乳房組織の外科的切除により処置される。男性乳腺のMOR10703誘発不可逆性萎縮の観察は、女性化乳房の処置に有益であり得ることを示す。

【 0 4 3 0 】

ヒト女性化乳房の処置におけるMOR10703および他のHER3抗体をさらに試験するために、女性化乳房のトランスジェニックマウスモデルを使用できる。これらのモデルは、マウス乳腺にヒトアロマターゼを発現させることにより開発され、ヒト女性化乳房の多くの面を再現する(Li et al., Endocrinology 2002;143:4074-4083; Tekmal et al., Cancer Res 1996;56:3180-318)。

【 0 4 3 1 】

MOR10703および他のHER3抗体はまた、子宮の裏側(子宮内膜)からの細胞が子宮腔外

10

20

30

40

50

に出現し、増殖する婦人科学的状態である子宮内膜症の処置についても試験する。子宮内膜症の主であるが、普遍的ではない症状は、種々の顕性化での骨盤痛である。子宮内膜症の根底の原因は十分に特徴付けられていないが、エストロゲン存在に依存性であると考えられる。雌マウスにおけるMOR10703誘発子宮内膜萎縮が子宮重量を減少させたため、子宮内膜症処置に使用し得る。MOR10703および他のHER3抗体の子宮内膜症に対する効果をさらに試験するために、正常循環および卵巣摘出無胸腺マウスまたは循環非肥満糖尿病性(NOD) - 重症複合免疫不全(SCID)マウスに増殖期のヒト子宮内膜を腹腔を移植し、これらのSCIDマウスをモデルとして使用できるGrummer et al., 2001. Human Reproduction; 16; 1736-1743)。

【0432】

10

実施例23：食道癌のためのHER3抗体を評価するためのインビトロ試験
インビトロ食道薬剤組み合わせ試験

HER3標的抗体が標的治療剤と組み合わせる能力を試験するために、細胞生存能アッセイにおいてMOR10703をセツキシマブまたはBYL719と組み合わせた。約1000~1200のKYSE140およびKYSE180細胞を、2%FBSを添加した適当な培養培地で384ウェルプレートに播種し、一夜、37℃で付着させた。適当な薬剤組み合わせ(BYL719の典型的最終薬剤濃度は2.8μM~3.8nM範囲；セツキシマブは93nM~0.13nM範囲；MOR10703は100nM~4.1nM範囲)を、続いて、各プレートが各薬剤の用量応答曲線を二次元マトリクスで含むようにウェルに添加した。処置細胞を、続いて96~120時間インキュベートした。薬剤処置の最後に、CellTiter-Gloを各ウェルに添加して細胞を溶解し、発光シグナルをEnvisionプレートリーダーを使用して記録した。各組み合わせで得た増殖阻害の程度を計算し、組み合わせ活性をLoewe加算性モデルを使用して強調した。

20

【0433】

食道インビトロ薬剤組み合わせおよび細胞増殖に対する影響

腫瘍細胞増殖がしばしば複数シグナル伝達経路により駆動されるため、MOR10703とセツキシマブまたはBYL719の組み合わせを評価して、食道癌細胞株の増殖遮断に有益であるかを評価した。選択した標的剤は主にEGFR(セツキシマブ)およびPI3K(PI3KCA(BYL719)を阻害するものであり、なぜならこれらの標的が通常ヒト腫瘍で活性化されているからである。アイソボログラム分析(図16参照)は、MOR10703がセツキシマブおよびBYL719と相乗的薬剤組み合わせを示すことを示した。このデータは、HER3シグナル伝達の阻害が、標的受容体チロシンキナーゼ群またはPI3Kシグナル伝達経路を標的とする阻害剤で特に有益であることを示唆する。

30

【0434】

実施例24：食道癌に対するHER3抗体を評価するためのインビボ試験

インビボでのHER3標的抗体が標的治療剤と組み合わせる能力を試験するために、MOR10703をセツキシマブまたはBYL719と組み合わせ、2種のインビボ異種移植片モデルで試験した。

【0435】

(i) インビボKYSE140異種移植片

KYSE140細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地で、抗生物質なしでインプラント時まで培養した。KYSE140細胞を指数関数的増殖で収獲した。PBS/マトリゲル(50:50)と混合した1千万個の細胞をSCID-Beigeマウスの上部右脇腹に皮下的にインプラントした。28日目、腫瘍を測定し、腫瘍体積約200mm³の動物を有効性試験に参加させた。一般に、1群あたり計10匹動物を有効性試験に参加させた。単剤および組み合わせ試験のために、動物にMOR10703またはセツキシマブを側方尾静脈注射を介して静脈内投与した。BYL719を0.5%メチルセルロース中に製剤し、経口強制喫食により投与した。

40

【0436】

(ii) インビボKYSE180異種移植片

KYSE180細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清含有RPMI 1640培地で、抗生物質なしで

50

インプラント時まで培養した。KYSE180細胞を指数関数的増殖で収穫した。500万個の細胞をヌードマウスの上部右脇腹に皮下的にインプラントした。18日目、腫瘍を測定し、腫瘍体積約200mm³の動物を有効性試験に参加させた。一般に、1群あたり計10匹動物を有効性試験に参加させた。単剤および組み合わせ試験のために、動物にMOR10703またはセツキシマブを側方尾静脈注射を介して静脈内投与した。BYL719を0.5%メチルセルロース中に製剤し、経口強制喫食により投与した。

【0437】

(iii) インビボ一次食道異種移植片

ヒト食道一次腫瘍をマウスで継代した。腫瘍サイズが約150mm³の大きさになったとき、動物を有効性試験に参加させた。単剤および組み合わせ試験のために、動物にMOR10703またはセツキシマブを側方尾静脈注射を介して静脈内投与した。BYL719を0.5%メチルセルロース中に製剤し、経口強制喫食により投与した。

【0438】

H E R 3 のインビボ阻害および食道腫瘍増殖に対する効果

記載の抗H E R 3抗体のインビボ活性を決定するために、MOR10703をKYSE140およびKYSE180食道腫瘍モデル、ならびに2種の一次食道腫瘍モデル、CHES007およびCHES015で試験した。KYSE140およびKYSE180インビボモデルの両方で、単剤MOR10703処置は腫瘍増殖を有効に阻害することが証明された(図17)。KYSE180において、MOR10703およびBYL719の組み合わせは顕著な腫瘍緩解の誘発に十分であった。これらの知見は一次食道腫瘍モデルまで拡張され、ここで、MOR10703とセツキシマブまたはBYL719の組み合わせはまた強力な腫瘍緩解を誘発した(図18)。まとめて、これらのデータは、H E R 3標的抗体とE G F RまたはP I 3 K標的剤の組み合わせの利益の我々の先のインビトロの知見をさらに支持する。

【0439】

実施例25：胃癌におけるBYL719と組み合わせたH E R 3を評価するためのインビボ試験
インビボで胃癌においてH E R 3標的抗体が標的治療剤と組み合わせる能力を評価するために、MOR10703をBYL719と組み合わせ、インビボ異種移植片モデルで試験した。

【0440】

(i) インビボN C I - N87異種移植片

N C I - N87細胞を、10%熱不活性化F C S、2mM L - グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム添加4.5g/l グルコース含有D M E M培養培地でインプラント時まで増殖した。N C I - N87腫瘍を、 $8 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞(50%v/vマトリゲル含有H B S S中)を皮下的に注射することにより確立した。10日目に、腫瘍を測定し、約250mm³の腫瘍体積の動物を有効性試験に参加させた。単剤および組み合わせアームのために、動物に、側方尾静脈注射を介してMOR10703を静脈内に投与した。BYL719を0.5%メチルセルロース中に製剤し、経口強制喫食により投与した。

【0441】

N87胃腫瘍増殖に対する組み合わせ処置の効果

食道腫瘍で見られるとおり、MOR10703およびBYL719の組み合わせは顕著で、N87胃腫瘍モデルにおいて長期の腫瘍緩解を示し、H E R 3標的抗体とP I 3 K標的剤の組み合わせの利益をさらに支持する(図19参照)。

【0442】

実施例26：

頭頸部扁平上皮細胞癌(S C C H N)におけるセツキシマブと組み合わせたH E R 3の評価のためのインビボ試験

インビボでS C C H NにおいてH E R 3標的抗体が標的治療剤と組み合わせる能力を評価するために、MOR10703をセツキシマブと組み合わせ、インビボ異種移植片モデルで試験した。

【0443】

(i) インビボA 2 5 3異種移植片

10

20

30

40

50

A 2 5 3 細胞を、1 0 % 熱不活性化ウシ胎児血清含有 D M E M で、抗生物質なしでインプラント時まで培養した。A 2 5 3 細胞を指数関数的増殖で収穫した。2 0 0 μ l P B S 中 5 0 0 万個の細胞をヌードマウスの上右脇腹に皮下的にインプラントした。2 5 日目、腫瘍を測定し、腫瘍体積約 2 0 0 mm³ の動物を有効性試験に参加させた。一般に、1 群あたり計 9 匹の動物を有効性試験に参加させた。単剤および組み合わせ試験のために、動物に MOR10703 または セツキシマブ を側方尾静脈注射を介して静脈内投与した。

【 0 4 4 4 】

A253 SCCHN 腫瘍増殖に対する組み合わせ処置の効果

A253 SCCHN モデルにおいて、MOR10703 または セツキシマブ のいずれも単剤として腫瘍静止をもたらした。MOR10703 と セツキシマブ の組み合わせは有意により活性であり、腫瘍緩解をもたらした (図 2 0 参照)。

10

【 0 4 4 5 】

まとめると、これらの結果は、単剤としての MOR10703 が腫瘍増殖可能であることを示す。結果はまた、MOR10703 を他の受容体チロシンキナーゼ群または P I 3 K シグナル伝達経路を標的とする阻害剤と組み合わせたとき、腫瘍緩解に対する相乗効果も示す。

【 0 4 4 6 】

引用による取り込み

ここに引用した全ての参考文献は、特許、特許出願、論文、教科書などおよびそれらの中の引用文献を含み、その全体を引用により本明細書に包含させる。

【 0 4 4 7 】

20

等価物

上の明細書は当業者が本発明を実施するのに十分であると考えられる。上の記載および実施例は、本発明のある種の好ましい態様を詳述し、発明者らにより最良の態様と考慮されるものを記載する。しかしながら、いかに詳細な記載が上に記載されていたとしても、本発明は多くの方法で実施でき、本発明は添付する特許請求の範囲およびその均等物に従い解釈されるべきであることは認識される。

本発明は、以下の態様を包含する。

[1]

食道における H E R 3 発現レベル増加により特徴付けられる障害を処置する方法であって：

30

食道で H E R 3 発現が上昇している患者を選択し；そして

H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、該抗体またはそのフラグメントが H E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより該障害を処置する、方法。

[2]

障害が食道癌およびパレット食道癌から成る群から選択される、上記 [1] に記載の方法。

[3]

40

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、上記 [1] に記載の方法。

[4]

抗体またはフラグメントが生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤される、上記 [1] に記載の方法。

[5]

さらに他の治療剤を含む、上記 [4] に記載の方法。

[6]

他の治療剤が H E R 1 阻害剤、H E R 2 阻害剤、H E R 3 阻害剤、H E R 4 阻害剤、m

50

T O R 阻害剤および P I 3 キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、上記 [5] に記載の方法。

[7]

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標)/セツキシマブ、ベクティビックス(登録商標)/パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標)/ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標)/トシル酸ラパチニブ、タルセバ(登録商標)/エルロチニブ H C l (OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択される H E R 1 阻害剤；ペルツズマブ、トラスツマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ/タイケルブ(登録商標)から選択される H E R 2 阻害剤；MM-121、MM-111、IB4C3、2DID12(U3 Pharma AG)、AM G888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)および H E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択される H E R 3 阻害剤；および H E R 4 阻害剤である、上記 [6] に記載の方法。

10

[8]

他の治療剤がテムシロリムス/トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス/デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス/アフィニトール(登録商標)から成る群から選択される m T O R 阻害剤である、上記 [6] に記載の方法。

[9]

他の治療剤がGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択される P I 3 キナーゼ阻害剤である、上記 [6] に記載の方法。

20

[1 0]

胃癌の処置であって：

胃癌を有する患者を選択し；そして

H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、該抗体またはそのフラグメントが H E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより胃癌を処置する、方法。

[1 1]

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、上記 [1 0] に記載の方法。

30

[1 2]

抗体またはフラグメントが生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤される、上記 [1 0] に記載の方法。

[1 3]

さらに他の治療剤を含む、上記 [1 2] に記載の方法。

[1 4]

他の治療剤が H E R 1 阻害剤、H E R 2 阻害剤、H E R 3 阻害剤、H E R 4 阻害剤、m T O R 阻害剤および P I 3 キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、上記 [1 3] に記載の方法。

40

[1 5]

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標)/セツキシマブ、ベクティビックス(登録商標)/パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標)/ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標)/トシル酸ラパチニブ、タルセバ(登録商標)/エルロチニブ H C l (OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択される H E R 1 阻害剤；ペルツズマブ、トラスツマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ/タイケルブ(登録商標)から選択される H E R 2 阻害剤；MM-121、MM-111、IB4C3、2DID12(U3 Pharma AG)、AM G888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)および H E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択される H E R 3 阻害剤；および H E R 4 阻害剤で

50

ある、上記 [1 4] に記載の方法。

[1 6]

他の治療剤がテムシロリムス／トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス／デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス／アフィニトール(登録商標)から成る群から選択される m T O R 阻害剤である、上記 [1 4] に記載の方法。

[1 7]

他の治療剤がGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択される P I 3 キナーゼ阻害剤である、上記 [1 4] に記載の方法。

[1 8]

頭頸部癌の処置方法であって：

10

頭頸部癌を有する患者を選択し；そして

H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、該抗体またはそのフラグメントが H E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより頭頸部癌を処置する、方法。

[1 9]

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、上記 [1 8] に記載の方法。

[2 0]

20

抗体またはフラグメントが生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤される、上記 [1 8] に記載の方法。

[2 1]

さらに他の治療剤を含む、上記 [2 0] に記載の方法。

[2 2]

他の治療剤が H E R 1 阻害剤、H E R 2 阻害剤、H E R 3 阻害剤、H E R 4 阻害剤、m T O R 阻害剤および P I 3 キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、上記 [2 1] に記載の方法。

[2 3]

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標)／セツキシマブ、ベクティピックス(登録商標)／パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標)／ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標)／トシル酸ラパチニブ、タルセバ(登録商標)／エルロチニブ H C 1 (OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択される H E R 1 阻害剤；ペルツズマブ、トラスツマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ／タイケルブ(登録商標)から選択される H E R 2 阻害剤；MM-121、MM-111、IB4C3、2D1D12(U3 Pharma AG)、AM G888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)および H E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択される H E R 3 阻害剤；および H E R 4 阻害剤である、上記 [2 2] に記載の方法。

30

[2 4]

40

他の治療剤がテムシロリムス／トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス／デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス／アフィニトール(登録商標)から成る群から選択される m T O R 阻害剤である、上記 [2 2] に記載の方法。

[2 5]

他の治療剤がGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択される P I 3 キナーゼ阻害剤である、上記 [2 2] に記載の方法。

[2 6]

良性前立腺肥大の処置方法であって：

良性前立腺肥大を有する患者を選択し；そして

H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、

50

該抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより良性前立腺肥大を処置する、方法。

[27]

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、上記[26]に記載の方法。

[28]

抗体またはフラグメントが生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤される、上記[26]に記載の方法。

10

[29]

さらに他の治療剤を含む、上記[28]に記載の方法。

[30]

他の治療剤がHER1阻害剤、HER2阻害剤、HER3阻害剤、HER4阻害剤、mTOR阻害剤およびPI3キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、上記[29]に記載の方法。

[31]

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標)/セツキシマブ、ベクティビックス(登録商標)/パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標)/ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標)/トシル酸ラパチニブ(Lapatinib Ditosylate)、タルセバ(登録商標)/エルロチニブHC1(OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択されるHER1阻害剤；ペルツズマブ、トラスツマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ/タイケルブ(登録商標)から選択されるHER2阻害剤；MM-121、MM-111、IB4C3、2DI D12(U3 Pharma AG)、AMG888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)およびHER3を阻害する小分子から成る群から選択されるHER3阻害剤；およびHER4阻害剤である、上記[30]に記載の方法。

20

[32]

他の治療剤がテムシロリムス/トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス/デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス/アフィニトール(登録商標)から成る群から選択されるmTOR阻害剤である、上記[30]に記載の方法。

30

[33]

他の治療剤がGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択されるPI3キナーゼ阻害剤である、上記[30]に記載の方法。

[34]

女性化乳房の処置方法であって：

女性化乳房を有する患者を選択し；そして

HER3受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、該抗体またはそのフラグメントがHER3受容体のドメイン2およびドメイン4内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより女性化乳房を処置する、方法。

40

[35]

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、上記[34]に記載の方法。

[36]

抗体またはフラグメントが生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤される、上記[34]に記載の方法。

[37]

50

さらに他の治療剤を含む、上記 [3 6] に記載の方法。

[3 8]

他の治療剤が H E R 1 阻害剤、H E R 2 阻害剤、H E R 3 阻害剤、H E R 4 阻害剤、m T O R 阻害剤および P I 3 キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、上記 [3 7] に記載の方法。

[3 9]

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標) / セツキシマブ、ベクティビックス(登録商標) / パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標) / ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標) / トシル酸ラパチニブ、タルセバ(登録商標) / エルロチニブ H C 1 (OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択される H E R 1 阻害剤；ペルツズマブ、トラストマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ / タイケルブ(登録商標)から選択される H E R 2 阻害剤；MM-121、MM-111、IB4C3、2DID12(U3 Pharma AG)、AM G888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)および H E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択される H E R 3 阻害剤；および H E R 4 阻害剤である、上記 [3 8] に記載の方法。

10

[4 0]

他の治療剤がテムシロリムス / トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス / デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス / アフィニトール(登録商標)から成る群から選択される m T O R 阻害剤である、上記 [3 8] に記載の方法。

20

[4 1]

他の治療剤がGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択される P I 3 キナーゼ阻害剤である、上記 [3 8] に記載の方法。

[4 2]

子宮内膜症の処置方法であって：

子宮内膜症を有する患者を選択し；そして

H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントを投与することを含み、該抗体またはそのフラグメントが H E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断し、それにより子宮内膜症を処置する、方法。

30

[4 3]

抗体またはそのフラグメントが経口、皮下、腹腔内、筋肉内、脳室内、実質内、髄腔内、頭蓋内、頬側、粘膜、経鼻および直腸投与から成る群から選択される経路により投与される、上記 [4 2] に記載の方法。

[4 4]

抗体またはフラグメントが生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤を含む医薬組成物に製剤される、上記 [4 2] に記載の方法。

[4 5]

さらに他の治療剤を含む、上記 [4 4] に記載の方法。

[4 6]

他の治療剤が H E R 1 阻害剤、H E R 2 阻害剤、H E R 3 阻害剤、H E R 4 阻害剤、m T O R 阻害剤および P I 3 キナーゼ阻害剤から成る群から選択される、上記 [4 5] に記載の方法。

40

[4 7]

他の治療剤がマツズマブ(EMD72000)、アービタックス(登録商標) / セツキシマブ、ベクティビックス(登録商標) / パニツムマブ、mAb 806、ニモツズマブ、イレッサ(登録商標) / ゲフィチニブ、CI-1033(PD183805)、ラパチニブ(GW-572016)、タイケルブ(登録商標) / トシル酸ラパチニブ、タルセバ(登録商標) / エルロチニブ H C 1 (OSI-774)、PKI-166およびTovok(登録商標)から成る群から選択される H E R 1 阻害剤；ペルツズマブ、トラストマブ、MM-111、ネラチニブ、ラパチニブまたはトシル酸ラパチニブ / タイケルブ(登録商

50

標)から選択される H E R 2 阻害剤 ; MM-121、MM-111、IB4C3、2D1D12(U3 Pharma AG)、AM G888(Amgen)、AV-203(Aveo)、MEHD7945A(Genentech)、MOR10703(Novartis)および H E R 3 を阻害する小分子から成る群から選択される H E R 3 阻害剤 ; および H E R 4 阻害剤である、上記 [4 6] に記載の方法。

[4 8]

他の治療剤がテムシロリムス / トーリセル(登録商標)、リダフォロリムス / デフォロリムス、AP23573、MK8669、エベロリムス / アフィニトール(登録商標)から成る群から選択される m T O R 阻害剤である、上記 [4 6] に記載の方法。

[4 9]

他の治療剤がGDC 0941、BEZ235、BMK120およびBYL719から成る群から選択される P I 3 キナーゼ阻害剤である、上記 [4 6] に記載の方法。

10

[5 0]

食道障害の処置用医薬の製造のための、H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用であって、該抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断する、使用。

[5 1]

胃癌の処置用医薬の製造のための、H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用であって、該抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断する、使用。

20

[5 2]

頭頸部癌の処置用医薬の製造のための、H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用であって、該抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断する、使用。

[5 3]

良性前立腺肥大(B P H)の処置用医薬の製造のための、H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用であって、該抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断する、使用。

30

[5 4]

女性化乳房の処置用医薬の製造のための、H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用であって、該抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断する、使用。

[5 5]

子宮内膜症の処置用医薬の製造のための、H E R 3 受容体に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントの使用であって、該抗体またはそのフラグメントがH E R 3 受容体のドメイン 2 およびドメイン 4 内のアミノ酸残基を含む立体構造エピトープと結合し、リガンド依存性シグナル伝達およびリガンド非依存性シグナル伝達のいずれも遮断する、使用。

40

【 図 1 】

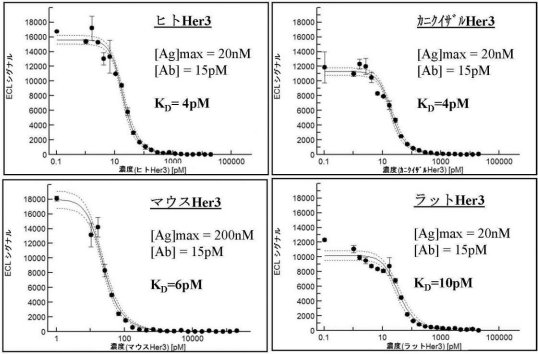


Fig. 1

【 図 2 】

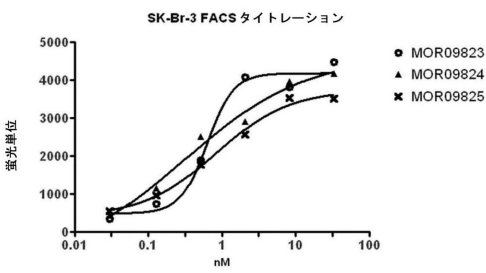


Fig. 2

【 図 3 】

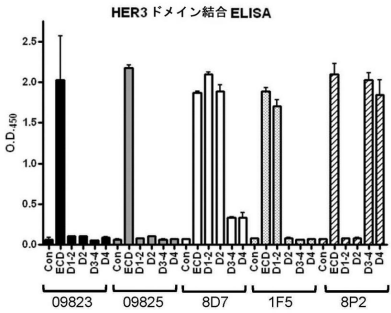


Fig. 3

【 図 4 A 】

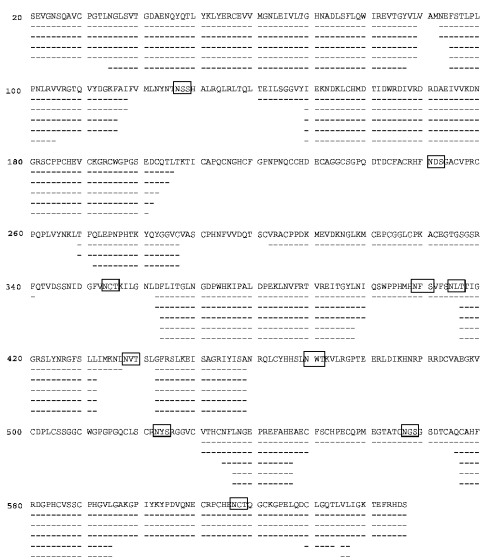


Fig. 4A

【 図 4 B 】

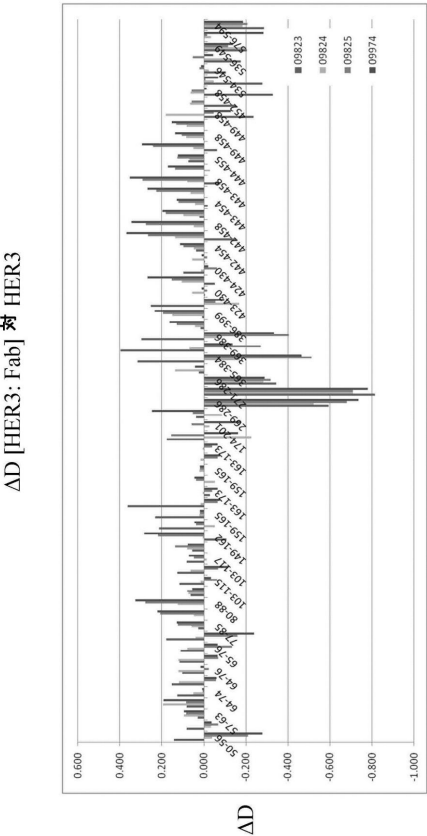


Fig. 4B

【 図 4 C 】

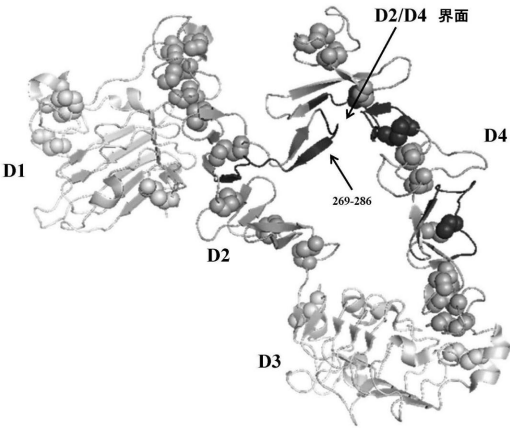
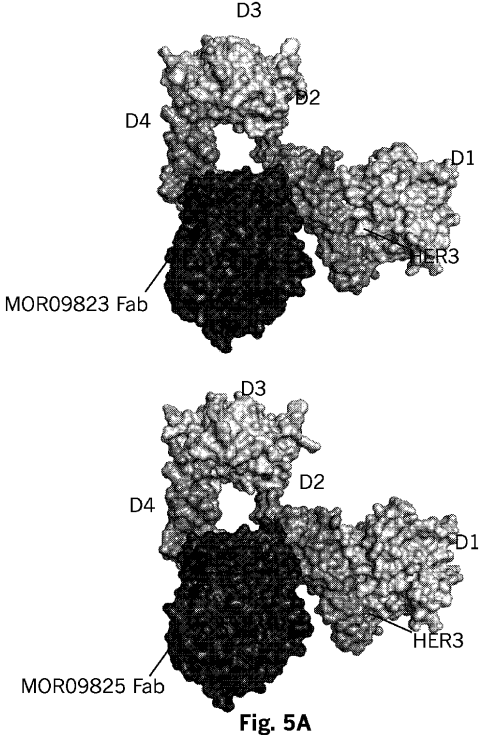


Fig. 4C

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】

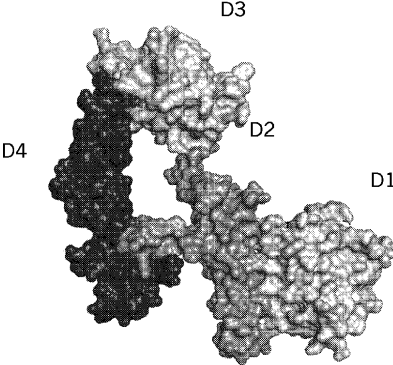
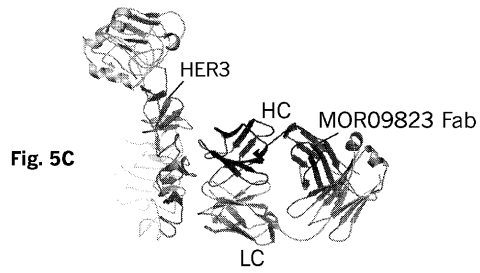
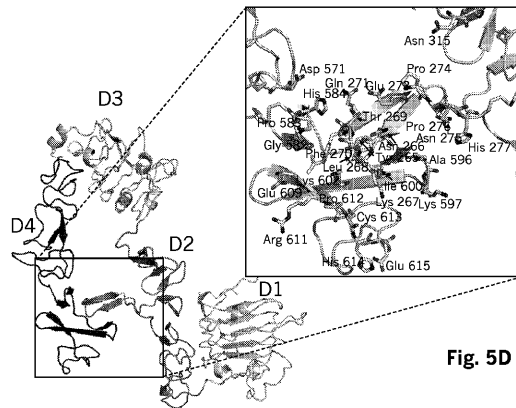


Fig. 5B

【図 5 C】



【図 5 D】



【図 5 E】

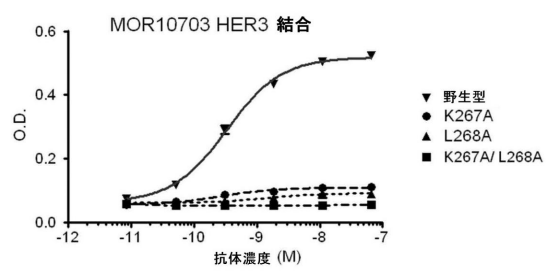


Fig. 5E

【図 6】

Fig. 6A

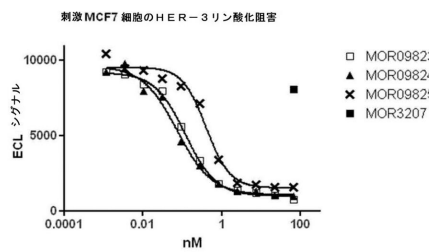
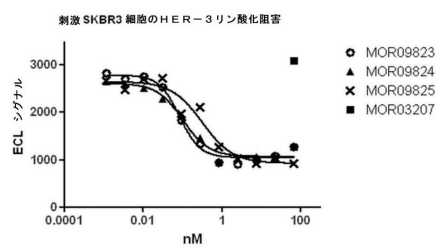


Fig. 6B



【図 7】

Fig. 7A

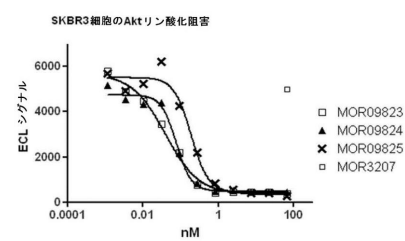
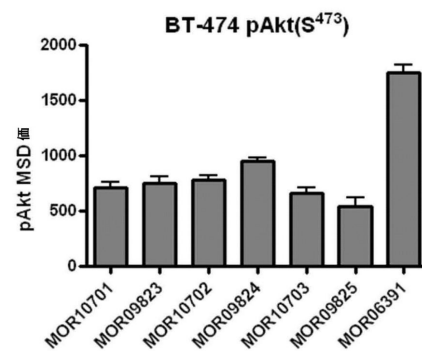


Fig. 7B



【図 8】

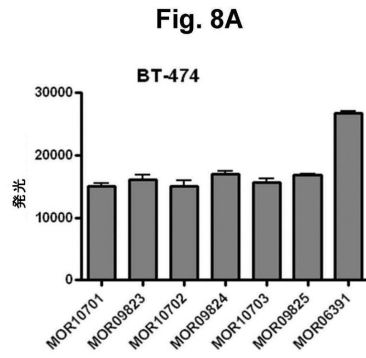
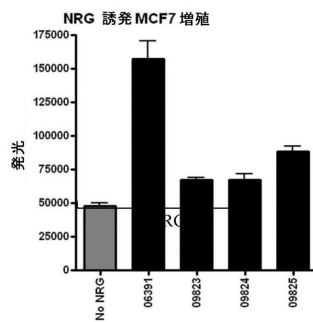


Fig. 8B



【図 9】

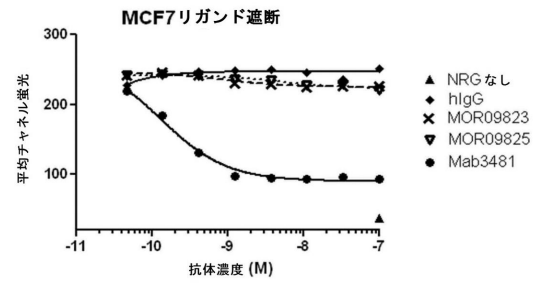


Fig. 9

【図 10】

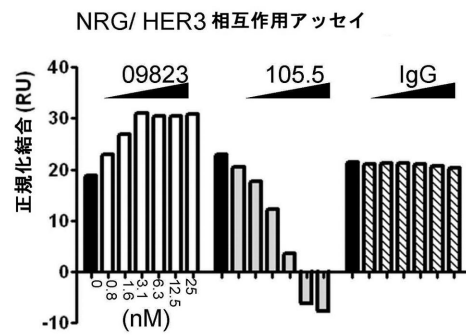


Fig. 10

【図 11】

Fig. 11A

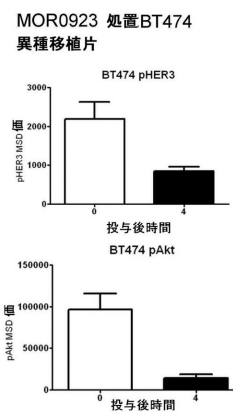
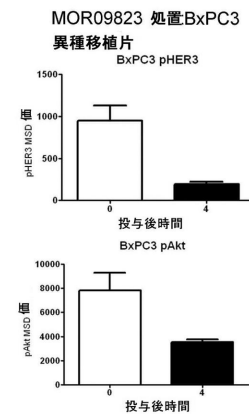
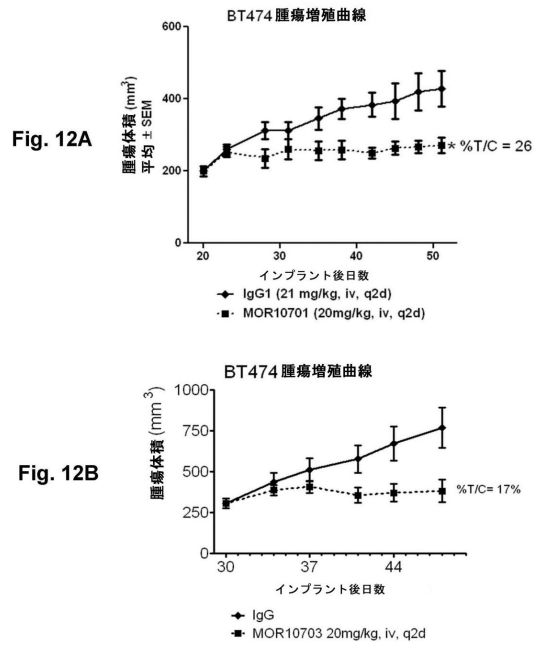


Fig. 11B



【図 1 2】



【図 1 3】

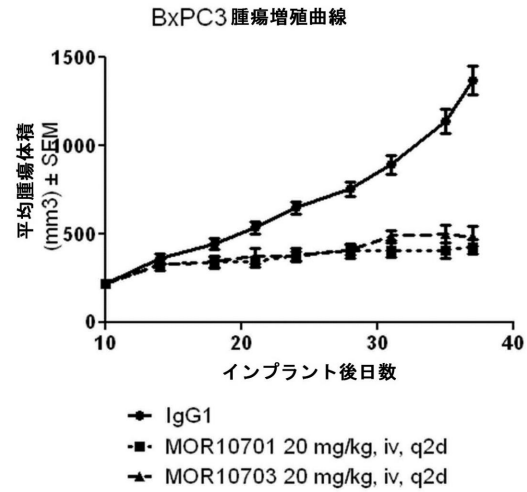


Fig. 13

【図 1 4 - 1】

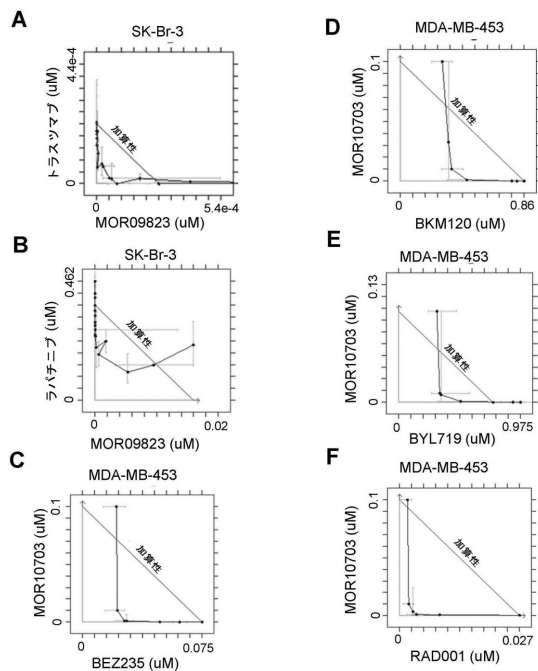


Fig. 14

【図 1 4 - 2】

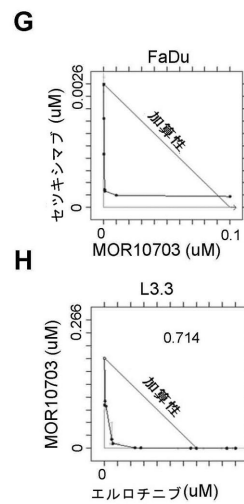


Fig. 14 (cont.)

【図 15】

Fig. 15A

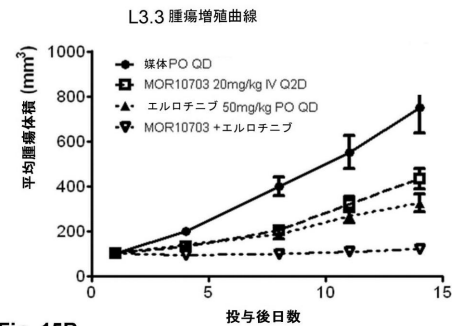
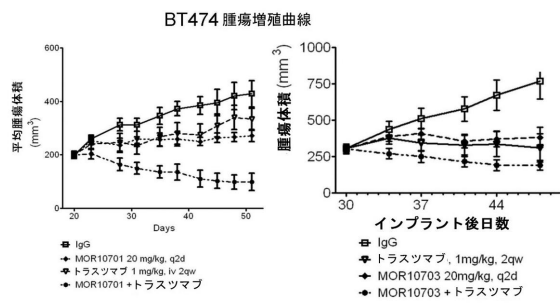


Fig. 15B

【図 16】

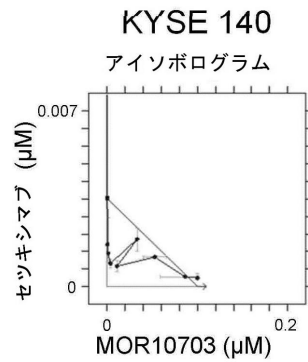


Fig. 16

【図 17】

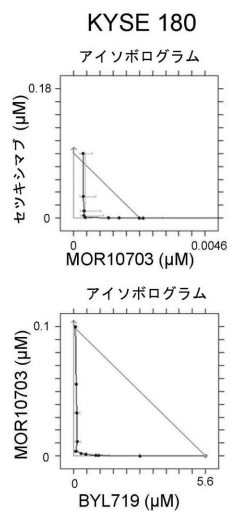


Fig. 17

【図 18】

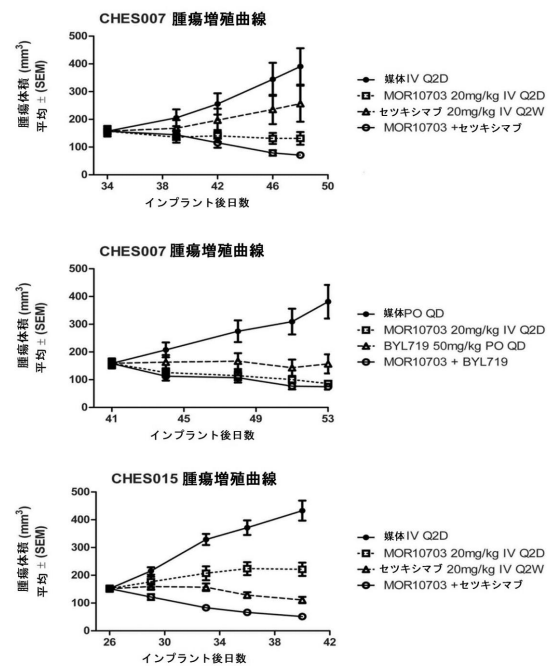


Fig. 18

【図 19】

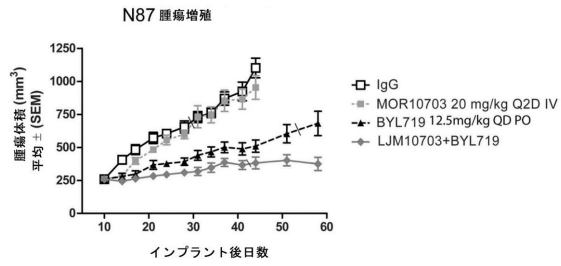


Fig. 19

【図 20】

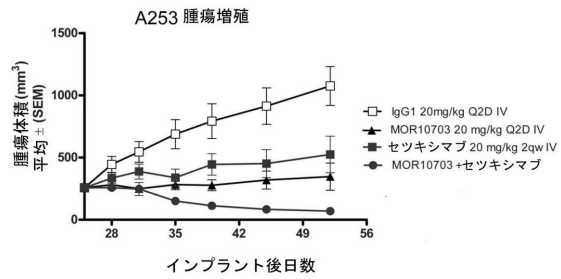


Fig. 20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/436 (2006.01)	A 6 1 K	31/4709
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	A 6 1 K	31/436
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
		C 0 7 K	16/28

- (72)発明者 セス・エッテンバーグ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド
- (72)発明者 アンドリュー・ポール・ガーナー
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド
- (72)発明者 ニコル・ハウプスト
ドイツ 8 2 1 5 2 プラネック、レーナ・クリスト・シュトラッセ 4 8 番、モルフォシス・アクチェ
ンゲゼルシャフト
- (72)発明者 シジョン・フアン
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド
- (72)発明者 クリスチャン・カルステン・ジルヴェスター・クンツ
ドイツ 8 2 1 5 2 プラネック、レーナ・クリスト・シュトラッセ 4 8 番、モルフォシス・アクチェ
ンゲゼルシャフト
- (72)発明者 エリザベス・アン・レイシנגァースプレーグ
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド
- (72)発明者 チン・シェン
アメリカ合衆国 0 2 1 3 9 マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー 2 5
0 番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 4 0 4 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 K 3 1 / 4 3 6
A 6 1 K 3 1 / 4 7 0 9
A 6 1 K 3 1 / 5 1 7
A 6 1 K 4 5 / 0 0

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq