

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-6705  
(P2010-6705A)

(43) 公開日 平成22年1月14日(2010.1.14)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K 45/00	Z N A		4 B 02 4
<b>A61K 39/395</b> (2006.01)	A 61 K 39/395	D		4 C 08 4
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A 61 P 35/00			4 C 08 5
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K 37/02			4 C 08 6
<b>A61K 35/74</b> (2006.01)	A 61 K 35/74	D		4 C 08 7
審査請求 未請求 請求項の数		83	O L 外国語出願 (全 84 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2008-155676 (P2008-155676)	(71) 出願人	508178490 アトラス・アンティボディーズ・アクチボラゲット A t l a s A n t i b o d i e s A B スウェーデン、エスエー-106 91ス トックホルム、アルバノヴァ・ウニヴェル シテーツセントルム	
(22) 出願日	平成20年6月13日 (2008.6.13)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄	
特許法第30条第1項適用申請有り ロイヤル・インス ティュート・オブ・テクノロジー発行 ヨーン・レフ プロム 博士論文 (バイオテクノロジー) Staph ylococcal surface display for protein engineering and characterization 西暦20 07年12月14日発行		(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏	
		(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子	
		(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗	
				最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER2サブセット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 HER2の細胞外ドメイン2および3からの37以下の連続アミノ酸残基のサブセット、特にアミノ酸配列LQVFおよび/またはESFDGDを含むサブセットと選択的に相互作用できる親和性リガンドの提供。

【解決手段】 ブドウ球菌プロテインAおよびそのドメイン、リポカリン、アンキリンリピートドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性Tリンパ球関連抗原4、プロテアーゼ阻害剤、PDZドメイン、ペプチドアプタマー、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタッフ、フィプロネクチンIII型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群から選択される骨格に由来するタンパク質リガンド。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

HER2の細胞外ドメイン2および3(配列番号7)からの37以下の連続アミノ酸残基のサブセットと選択的に相互作用することができる親和性リガンドであって、該サブセットがアミノ酸配列LQVF(配列番号8)および/またはESFDGD(配列番号9)を含む、親和性リガンド。

**【請求項 2】**

前記サブセットが26アミノ酸残基以下である、請求項1に記載の親和性リガンド。

**【請求項 3】**

前記サブセットが配列番号11および15-20からなる群から選択される、請求項2に記載の親和性リガンド。 10

**【請求項 4】**

前記サブセットが21アミノ酸残基以下である、請求項2に記載の親和性リガンド。

**【請求項 5】**

前記サブセットがLQVF(配列番号8)および/またはLPESFDGD(配列番号11)を含む、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 6】**

前記サブセットが10アミノ酸残基以上である、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 7】**

前記サブセットが8アミノ酸残基以下である、請求項1～5のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 8】**

前記サブセットが配列番号6のアミノ酸1-37の配列である、請求項1に記載の親和性リガンド。

**【請求項 9】**

培養物中におけるヒト乳癌細胞の増殖を、HER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができない親和性リガンドに比して20-100%阻害する、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 10】**

ヒト乳癌細胞がBT474乳癌細胞である、請求項9に記載の親和性リガンド。

**【請求項 11】**

500 ng/mlの濃度にて増殖を阻害する、請求項9～10のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 12】**

100 nM未満のEC50にてサブセットと結合する、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 13】**

医薬として用いるための、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 14】**

HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象を処置するための、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

**【請求項 15】**

前記対象が、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、前記親和性リガンドとは異なる治療用抗体によって処置されている、請求項14に記載の親和性リガンド。

**【請求項 16】**

HER2の過剰発現を特徴とする障害が癌であり、該癌が前記治療用抗体に対して耐性を生じたものである、請求項15に記載の親和性リガンド。

**【請求項 17】**

10

20

30

40

50

HER2の過剰発現を特徴とする障害が癌である、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

【請求項 1 8】

癌が、乳癌、扁平上皮癌、肺癌、例えば小細胞または非小細胞肺癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、外陰癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、例えば結腸癌、子宮内膜細胞腫、唾液腺癌、腎臓癌、甲状腺癌、ウィルムス腫瘍、膀胱癌、子宮内膜癌、腎臓の癌、頭頸部癌、胃癌、食道癌および前立腺癌からなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の親和性リガンド。

【請求項 1 9】

癌が、乳癌、肺癌、膵臓癌、結腸直腸癌およびウィルムス腫瘍からなる群から選択される、請求項 1 8 に記載の親和性リガンド。

【請求項 2 0】

癌が乳癌である、請求項 1 9 に記載の親和性リガンド。

【請求項 2 1】

癌が転移性乳癌である、請求項 2 0 に記載の親和性リガンド。

【請求項 2 2】

抗体またはそのフラグメントまたは誘導体である、前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド。

【請求項 2 3】

ブドウ球菌プロテインAおよびそのドメイン、リポカリン、アンキリンリピートドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性Tリソ球関連抗原4、プロテアーゼ阻害剤、PDZドメイン、ペプチドアブタマー、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミスタット、フィブロネクチンIII型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群から選択される骨格に由来するタンパク質リガンドである、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の親和性リガンド。

【請求項 2 4】

オリゴヌクレオチド分子である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の親和性リガンド。

【請求項 2 5】

前記請求項のいずれかに記載の親和性リガンド、およびHER2の細胞外ドメイン2および3(配列番号7)からの73以下の連続アミノ酸残基の第2のサブセットと選択的に相互作用することができる第2の親和性リガンドを含む組成物であって、該第2のサブセットが配列番号12、配列番号13および/または配列番号14のアミノ酸配列を含む、組成物。

【請求項 2 6】

第2のサブセットが配列番号21-35からなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

第2のサブセットが50アミノ酸残基以下である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

第2のサブセットが16アミノ酸残基以下である、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

第2のサブセットが配列番号4の配列のアミノ酸39-111である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

培養物中におけるヒト乳癌細胞の増殖を、HER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができない親和性リガンドに比して20~100%阻害する、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 3 1】

ヒト乳癌細胞がBT474 乳癌細胞である、請求項 3 0 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

500 ng/mlの濃度にて増殖を阻害する、請求項 3 0 ~ 3 1 のいずれかに記載の組成物。

10

20

30

40

50

**【請求項 3 3】**

第2の親和性リガンドが100 nM未満のEC50にて第2のサブセットと結合する、請求項25～32のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 3 4】**

第2の親和性リガンドが、抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体である、請求項25～33のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 3 5】**

第2の親和性リガンドが、ブドウ球菌プロテインAおよびそのドメイン、リポカリーン、アンキリンリピートドメイン、セルロース結合ドメイン、クリスタリン、緑色蛍光タンパク質、ヒト細胞毒性Tリンパ球関連抗原4、プロテアーゼ阻害剤、PDZドメイン、ペプチドアプタマー、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、テンダミstatt、フィブロネクチンIII型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群から選択される骨格に由来するタンパク質リガンドである、請求項25～33のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 3 6】**

第2の親和性リガンドがオリゴヌクレオチド分子である、請求項25～33のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 3 7】**

請求項1～24のいずれかに記載の親和性リガンドまたは請求項25～36のいずれかに記載の組成物、およびHER2に対するチロシンキナーゼ阻害剤を含む組成物。

**【請求項 3 8】**

医薬として使用するための、請求項25～37のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 3 9】**

HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象を処置するための、請求項25～38のいずれかに記載の組成物。

**【請求項 4 0】**

前記対象が、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、前記親和性リガンドおよび第2の親和性リガンドとは異なる治療用抗体によって処置されている、請求項39に記載の組成物。

**【請求項 4 1】**

HER2の過剰発現を特徴とする障害が癌であり、該癌が前記治療用抗体に耐性を生じたものである、請求項40に記載の組成物。

**【請求項 4 2】**

HER2の細胞外ドメイン2および3(配列番号7)からの37以下の連続アミノ酸残基からなり、アミノ酸配列LQVF(配列番号8)および/またはESFDGD(配列番号9)を含む、単離ポリペプチド。

**【請求項 4 3】**

26アミノ酸残基以下からなる、請求項42に記載のポリペプチド。

**【請求項 4 4】**

配列番号11および15-20からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる、請求項42～43のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 4 5】**

21アミノ酸残基以下からなる、請求項42～44のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 4 6】**

アミノ酸配列LQVF(配列番号8)および/またはLPESFDGD(配列番号11)を含む、請求項42～45のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 4 7】**

10アミノ酸残基以上からなる、請求項42～46のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 4 8】**

8アミノ酸残基以下からなる、請求項42～46のいずれかに記載のポリペプチド。

**【請求項 4 9】**

10

20

30

40

50

配列LQVFを含む場合に、LQVFのC末端側に隣接する2以下のアミノ酸を有する、請求項42～48のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項50】

配列番号6の配列のアミノ酸1-37からなる、請求項42に記載のポリペプチド。

【請求項51】

抗原として使用するための、請求項42～50のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項52】

免疫化において抗原として使用するための、請求項42に記載のポリペプチド。

【請求項53】

治療用抗体の調製において使用するための、請求項42～52のいずれかに記載のポリペプチド。 10

【請求項54】

抗原としての、請求項42～53のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

【請求項55】

免疫化のための、請求項42～53のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

【請求項56】

免疫化がヒトでない哺乳動物の免疫化である、請求項55に記載の使用。

【請求項57】

治療用抗体の調製における、請求項42～53のいずれかに記載のポリペプチドの使用。 20

【請求項58】

HER2の過剰発現を特徴とする障害を処置するための治療用親和性リガンドの選択または精製における、請求項42～53のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

【請求項59】

治療標的としての、請求項42～53のいずれかに記載のポリペプチドの使用。

【請求項60】

医薬としての、請求項1～24のいずれかに記載の親和性リガンドの使用。

【請求項61】

HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象を処置するための医薬の製造における、請求項1～24のいずれかに記載の親和性リガンドの使用。 30

【請求項62】

前記対象が、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができ、前記親和性リガンドとは異なる治療用抗体によって処置されている、請求項61に記載の使用。

【請求項63】

HER2の過剰発現を特徴とする障害が癌であり、該癌が前記治療用抗体に耐性を生じたものである、請求項62に記載の使用。

【請求項64】

HER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための親和性リガンドを同定する方法であって、以下の工程を含む方法： 40

a) 請求項35～45のいずれかに記載のポリペプチドを、結合を可能とする条件において、推定の親和性リガンドと接触させる工程；および

b) 推定の親和性リガンドが該ポリペプチドと結合するか否かを決定する工程。

【請求項65】

障害が癌であり、さらに以下の工程を含む、請求項64に記載の方法：

c) 推定の親和性リガンドが、癌細胞、例えばBT474乳癌細胞の増殖を阻害するか、または該癌細胞のアポトーシスを誘導するか否かを決定する工程。

【請求項66】

クローンを產生する方法であって、以下の工程を含む方法：

50

a) 請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載のサブセットを含む抗原により免疫化された哺乳動物から得られる、該サブセットと選択的に相互作用することができる抗体をコードするDNAを含む細胞を提供する工程；および

b) 該細胞を骨髄腫細胞と融合させて少なくとも 1 つのクローンを得る工程。

【請求項 6 7】

さらに以下の工程を含む、請求項 6 6 に記載の方法：

a') 哺乳動物を抗原により免疫化する工程、

ここで工程a') は工程a) に先行する。

【請求項 6 8】

以下の工程をさらに含む、請求項 6 6 ~ 6 7 のいずれかに記載の方法：

c) 前記サブセットと選択的に相互作用することができる抗体を発現する、工程b) からのクローンを選択する工程。

【請求項 6 9】

工程a) の抗原が、請求項 4 2 ~ 5 3 のいずれかに記載のポリペプチドからなる、請求項 6 6 ~ 6 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 0】

さらに以下の工程を含む、請求項 6 9 に記載の方法：

c) 前記抗原と選択的に相互作用することができる抗体を発現する、工程b) からのクローンを選択する工程。

【請求項 7 1】

さらに以下の工程を含む、請求項 6 6 ~ 7 0 のいずれかに記載の方法：

d) 工程b) において得られる、または工程c) において選択されるクローンを提供し、該クローンからのDNAであって、該クローンにより発現される、前記サブセットと選択的に相互作用する抗体の少なくとも一部をコードするDNAを、ヒト抗体産生DNAと統合させる工程；および

e) 工程d) からの統合されたDNAを細胞に組み込み、HER2の過剰発現を特徴とする障害を処置するための治療用抗体の発現のためのクローンを得る工程。

【請求項 7 2】

HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象を処置する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 2 4 のいずれかに記載の親和性リガンドまたは請求項 2 5 ~ 4 1 のいずれかに記載の組成物を対象に投与することを含む方法。

【請求項 7 3】

HER2に対するチロシンキナーゼ阻害剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記処置が前外科的処置である、請求項 7 2 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 5】

前記処置が手術後の処置である、請求項 7 2 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 6】

前記対象が、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、前記親和性リガンドとは異なる治療用抗体によって処置されている、請求項 7 2 ~ 7 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 7】

HER2の過剰発現を特徴とする障害が癌であり、該癌が前記治療用抗体に対する耐性を生じたものである、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

HER2の過剰発現を特徴とする障害が癌である、請求項 7 2 ~ 7 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 9】

癌が、乳癌、扁平上皮癌、肺癌、例えば小細胞または非小細胞肺癌、膵臓癌、膠芽腫、

10

20

30

40

50

子宮頸癌、卵巣癌、外陰癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、例えば結腸癌、子宮内膜細胞腫、唾液腺癌、腎臓癌、甲状腺癌、ウィルムス腫瘍、膀胱癌、子宮内膜癌、腎臓の癌、頭頸部癌、胃癌、食道癌および前立腺癌からなる群から選択される、請求項78に記載の方法。

【請求項80】

癌が、乳癌、肺癌、肺臓癌、結腸直腸癌およびウィルムス腫瘍からなる群から選択される、請求項79に記載の方法。

【請求項81】

癌が乳癌である、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

癌が転移性乳癌である、請求項81に記載の方法。

【請求項83】

容器、請求項1～24のいずれかに記載の親和性リガンドまたは請求項25～41のいずれかに記載の組成物を含む、該容器内の組成物、および該容器上のまたは該容器に結合した標識、を含む製造品であって、該標識が、該組成物がHER2の過剰発現を特徴とする障害を処置するために用いることができることを示す、製造品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般に、細胞外ドメインHER2のアミノ酸サブセット、かかるサブセットを標的とする抗体、および関連する方法および使用、例えば、治療方法および使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

HER2

ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2またはerbB-2)は、膜貫通受容体チロシンキナーゼのファミリーである、上皮増殖因子受容体ファミリー(EGFR、HER2、HER3、HER4)のメンバーである。これらの受容体は、全体的に40-50%の配列同一性を有し、同様のドメインを有する。それらは全て、細胞外リガンド結合ドメイン、単一の、膜を貫通する部分、および細胞内チロシンキナーゼおよび調節ドメインを含む。

【0003】

30

HER2関連障害

上皮増殖因子受容体ファミリーのメンバーは、様々な癌の種類、例えば、上皮性悪性腫瘍における腫瘍細胞増殖を促進することが分かっている。HER2は様々なヒト細胞腫において研究されており、多数の腫瘍において、特に乳腺、肺、肺臓および結腸直腸癌、およびウィルムス腫瘍において、さらに卵巣、膀胱、子宮内膜、腎臓、頭頸部、胃、食道および前立腺癌において、上方制御されることが見出されている(Menard et al (2001) Annals of Oncology 12 (Suppl. 1) S15-S19)。

【0004】

癌

癌は、西欧諸国における疾患および死亡の最も一般的な要因のひとつである。一般に、ほとんどの型の癌において、罹患率は年齢と共に増加する。一般健康状態の向上によりヒト集団はより長い生存を続けているので、癌はより多くの個体に影響し得る。最も一般的な種類の癌の要因は依然として大部分は未知であるが、環境要因(食事、タバコの煙、UV照射など)ならびに遺伝的要因(「癌遺伝子」、例えば、p53、APC、BRCA1、XPなどにおける生殖細胞系列変異)と、癌発症の危険性との連関が認識されている個体が増加している。

40

【0005】

癌は本質的に細胞疾患であり、網状の細胞成長および非社会的挙動を行う形質転換細胞集団として定義されてはいるものの、癌の定義は細胞生物学的観点から全く十分になされていない。悪性の形質転換は、不可逆的な遺伝子の変化に基づく悪性表現型への移行を表

50

す。これは公式には立証されていないが、悪性の形質転換は、1つの細胞において起こり、後にそれを起源として腫瘍が発生すると考えられている（「癌のクローニング」ドグマ）。発癌とは癌が生じる過程であり、一般に、最終的に悪性腫瘍の成長を引き起こす複数の事象を含むと理解されている。この複数段階の過程は、いくつかの律速段階、例えば、突然変異の付加およびおそらくエピジェネティックな事象も含み、前癌性増殖の段階の後の癌形成を引き起こす。この段階的な変化において、細胞分裂、非社会的挙動および細胞死を決定する重要な調節経路におけるエラー（突然変異）の蓄積が起こる。これらのそれぞれの変化により、周囲の細胞と比較して、成長においてダーウィン的な選択優位性が与えられ、これにより腫瘍細胞集団の網状の成長が起こり得る。悪性腫瘍は必然的に、形質転換した腫瘍細胞自身だけでなく、支持的な間質として働く周囲の正常細胞も構成要素となる。この動員された癌間質は、形質転換した腫瘍細胞に、継続する腫瘍成長に必要なシグナルを供給するよう協力して作用する、結合組織、血管および様々な他の正常細胞、例えば、炎症細胞からなる。

10

#### 【0006】

最も一般的な形態の癌は体細胞に起こり、主に、上皮由来、例えば、前立腺、乳腺、大腸、尿路上皮および皮膚性であり、後に造血系を起源とする癌、例えば、白血病およびリンパ腫、神経外胚葉、例えば、悪性神経膠腫、および軟部組織腫瘍、例えば、肉腫が起こる。

20

#### 【0007】

##### 乳癌

乳癌は、2番目に最も一般的な形態の世界的な癌であり、圧倒的に女性において最も頻繁に起こる癌である。Parkinらが表したGLOBOCAM 2002データベースのデータにより、2002年には115万の新しい症例が、および同期間に41万の死亡例が明らかにされている（Parkin DM et al. (2005) CA Cancer J Clin 55, 74-108）。早期の段階に発見された場合、予後は、先進国で生活する患者において比較的良好であり、一般に発展途上国の57%に対して73%の5年生存率を有する。罹患率は緩やかに増加しており、先進諸国の女性の約9人に1人が寿命中に乳癌になると考えられている。外来性ホルモンへの曝露を含む、雌性ステロイドホルモンに関する生活様式の変化は、乳癌の発症の危険性に影響するが、これらの要因は病因のほんの一部分を占めるに過ぎず、予防処置の利益は低いと考えられている。死亡率の減少は、マンモグラフィー検診による早期発見および現代の全身的補助（adjuvant）療法の使用によるものである。

30

#### 【0008】

##### 癌の処置および治療

癌の処置には、例えば、手術、放射線治療、化学療法、標的療法、免疫治療、ホルモン療法および血管新生阻害剤が含まれる。

#### 【0009】

標的療法の例は治療用抗体による処置（抗体治療）であり、例えば選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）や通常全身的処置である化学療法とは対照的に、腫瘍細胞を標的とするので魅力的な方法であり得る。

40

#### 【0010】

##### 乳癌の処置

乳房保存手術と術後放射線治療を組み合わせた乳房保存治療は、1970年代後期に導入されてから、女性が主に選択する処置となっており、腫瘍の根本的な切除と良好な美容的仕上がりが両立できる。それでもやはり、乳房切除術は、一部の患者、すなわち小さな乳房に大きな腫瘍（> 4 cm）を有する、または多巣性／多中心性疾患を有する女性において好ましい。

#### 【0011】

腋窩切開は主に診断目的に行われ、少なくとも10のリンパ節の摘出により感度97-98%の良好な病期ガイダンスが得られる（Axelsson CK et al. (1992) Eur J Cancer 28A:1415-8; Recht A and Houlihan MJ (1995) Cancer 6(9):1491-1512）。しかしながら、原発

50

性癌の処置において最小の手術を方向性とする次の段階は、高率で合併症を伴う腋窩リンパ節摘出の代わりに腋窩リンパ節のマッピングを行うセンチネルリンパ節の生検技術の導入であった。この技術は、乳腺から腋窩へのほとんどのリンパ液ははじめに1つ（または数個）のリンパ節（センチネルリンパ節）を通過するという、このリンパ節の分析が腋窩リンパ節の状態の十分な指標となり得ることを支持する知見の結果として導入された（Veronesi U et al. (2003) *New Engl J Med* 349 (6) : 546-53）。

#### 【0012】

全身的疾患としての乳癌、すなわち、局所領域治療後に処置の失敗を意味し得る、診断時に散在する微小転移の存在としての乳癌の概念は、1970年代に、内分泌療法および化学療法を含む、補助的な無作為的試行の道を開いた。補助的な多剤化学療法は、リンパ節の状態に關係なく再発の危険性の高いホルモン受容体陰性患者に対する標準的な処置である。全生存率および無再発生存率の両方に対する有利な効果が、特に閉経前の患者において実証されている（EBCTCG (1998) *Lancet* 352(9132): 930-42）。ホルモン応答性疾患、すなわち、エストロゲン受容体（ER）および／またはプロゲステロン受容体（PR）陽性疾患を有する患者に対して、補助的多剤化学療法は、内分泌療法と組合せて、連続的な化学-内分泌療法として行われてきた。また、補助的化学療法は一般に無月経を誘発し、細胞毒性に加えて内分泌の副次的影響を引き起こす（Pagani O et al. (1998) *Eur J Cancer* 34 (5):632-40）。

#### 【0013】

内分泌治療は、年齢、段階および閉経期状態に關係なく、ホルモン受容体陽性腫瘍を有する患者に推奨されている。

#### 【0014】

閉経期前のホルモン応答性の患者において、手術または放射線照射による卵巣の消失、またはLHRHアゴニストによる卵巣の抑制は、効果的な補助的処置の様式である（Emens LA and Davidson NA (2003) *Clin Ca Res* (1 Pt 2): 468S-94S）。閉経後の患者において、エストロゲンの主な供給源は卵巣における合成からではなく乳腺を含む末端組織におけるアンドロステンジオンからエストロンおよびエストラジオールへの変換からであるので、卵巣の消失には意味がない。

#### 【0015】

タモキシフェンはERに対してアゴニスト効果を有する選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）であり、そのため閉経前および閉経後の女性における進行性乳癌に対する処置に適している。最初の手術の後の補助的処置としてタモキシフェンを5年間用いると、ER陽性（ER+）腫瘍を有する患者の乳癌死亡率が、リンパ節の状態に關係なく、明らかに減少する（EBCTCG (1998) *Lancet* 351(9114):1451-67）。タモキシフェンは心臓脈管疾患に対して保護的な効果を有する一方、子宮内膜のERに対するアゴニスト効果のために子宮内膜の癌が発症する危険性が増大する（EBCTCG (2005) *Lancet* 365(9472):1687-717）。

#### 【0016】

アロマターゼ阻害剤（AI）はアロマターゼを阻害することにより機能し、この酵素はアンドロゲンをエストロゲンに変換する。AIは、視床下部および脳下垂体を通して、アンドロゲンの産生を増大するよう卵巣を刺激するので、閉経前の女性の処置に適していない。AIは、閉経後の女性に対する補助的処置として、単独にてまたはタモキシフェン処置の後に用いることができ、死亡率を顕著に減少させることを示しており、おそらく単独で用いるとなお減少するであろう（Howell A et al. (1995) *Lancet* 345(8941):29-30; Ellis M J and Rigden CE (2006) *Curr Med Res Opin* 22(12):2479-87; Coates AS et al. (2007) *J Clin Oncol* 25(5):486-92）。しかしながら、この治療は比較的新しく、長期の副作用は未だ完全には知られていないが（Buzdar A et al. (2006) *Lancet Oncol* 7(8):633-43）、最も重要なものは心臓脈管の合併症および骨粗しょう症である。

#### 【0017】

新しく開発された純粋な抗エストロゲン薬、例えば、ERを完全にブロックするフルベス

10

20

30

40

50

トラントは、現在、進行性乳癌のみに用いられ、補助療法には用いられていない (Rutqvist LE (2004) Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 18(1): 81-95)。

#### 【0018】

補助的な内分泌療法はホルモン受容体陰性の乳癌においては意味がないが、いくつかの研究では、いくつかのER陰性の (ER-)、すなわちER 陰性の (ER -) 腫瘍がタモキシフェン処置に反応することが示されている (EBCTCG (1998) Lancet 351:1451-1467)。

#### 【0019】

Her2遺伝子は、全ての乳癌の約20%に、および低分化性の乳癌の70%までにおいて過剰発現している (Berger MS et al. (1988) Cancer Res 48(5):1238-43; Borg A et al. (1990) Cancer Res 50(14): 4332-7)。HER2の状態は主にIHCによってルーチン的に評価され得、中程度の発現の場合は、遺伝子増幅の状態は蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) 分析により測定され得る。HER2の過剰な発現または遺伝子増幅は一般に、予後不良と関係する。HER2の過剰発現と内分泌療法に対する耐性の関係を支持する実験データが示されている (Shou J et al. (2004) J Natl Cancer Inst 96(12):926-35)。しかしながら、臨床データは一貫していない (Borg A et al. (1994) Cancer Lett 81(2):137-44、De Placido S et al. (2003) Clin Ca Res 9(3):1039-46、Ryden L et al. (2005) J Clin Oncol 23(21):4695-704)。

10

#### 【0020】

乳癌は全く不均一な疾患であり、その性質の理解は進んでいるにもかかわらず、利用可能な処置の選択肢は未だ完全には満足されていない。

20

#### 【発明の概要】

#### 【0021】

##### 発明の開示

本発明の一局面の目的は、HER2の細胞外ドメインからのアミノ酸残基のサブセットを提供することである。本発明の他の局面の目的は、そのサブセットと相互作用することができる親和性リガンド、およびかかる親和性リガンドを含む組成物を提供することである。本発明の特定の他の局面のさらなる目的は、そのサブセットを標的、例えば治療のための標的として利用する使用および方法を提供することである。

#### 【0022】

本発明は添付の特許請求の範囲によって規定する。

30

#### 【0023】

従って、本発明の第一の局面として、HER2の細胞外ドメイン2および3 (配列番号7) からの37以下の連続アミノ酸残基のサブセットと選択的に相互作用することができる親和性リガンドを提供する。ここでそのサブセットはアミノ酸配列LQVF (配列番号8) および/またはESFDGD (配列番号9) を含む。

#### 【0024】

本明細書の開示の文脈において、「HER2の細胞外ドメイン2および3」は、配列番号9のアミノ酸残基からなるHER2配列の一部を意味する。

#### 【0025】

さらに、本明細書の開示のにおいて、「HER2の細胞外ドメイン2および3からの連続アミノ酸残基」は、配列番号9のアミノ酸配列の連続的な部分を意味する。

40

#### 【0026】

また、本明細書の開示の文脈において、「アミノ酸のサブセットとの選択的相互作用」は、サブセットに含有されるアミノ酸との選択的相互作用を意味する。例えば、アミノ酸のサブセットと選択的に相互作用することができる親和性リガンドは、サブセットのアミノ酸からなるフラグメントと選択的に相互作用可能であり得、そのフラグメントは、溶液中に遊離してまたは固定化されて、例えばビーズに結合して存在し得る。また、かかるフラグメントは相互作用の検出のためのレポーター部分と結合していてもよい。別の例として、「アミノ酸のサブセットと選択的に相互作用することができる親和性リガンド」は、サブセットがより長いポリペプチドに含まれる場合を意味し得、ただし、親和性リガンド

50

はサブセットのアミノ酸残基と相互作用し、周辺アミノ酸残基とは相互作用しないことが確認されていることを条件とする。

#### 【0027】

本明細書の開示の文脈において、例えば親和性リガンドの、その標的または抗原との、「特異的」または「選択的」相互作用は、その相互作用が、特異的相互作用と非特異的相互作用との区別、または選択的相互作用と非選択的相互作用との区別が意味のあるものとなるようなものであることを意味する。2つのタンパク質間の相互作用は、場合により解離定数により測定される。解離定数は2分子間の結合（または親和性）の強さを表す。典型的には、抗体とその抗原間の解離定数は $10^{-7} \sim 10^{-11}$  Mである。しかしながら、高特異性には必ずしも高親和性が必要ではない。相手方に対して（モーラー範囲の）低親和性の分子は、非常に高い親和性を有する分子と同程度に特異的であることが示されている。本発明の場合には、特異的または選択的相互作用は、天然または加工された生物学的液体の組織サンプルまたは液体サンプル中の他のタンパク質の存在下において、与えられた条件下にて、特異的タンパク質、標的タンパク質またはそのフラグメントの存在および／または量を決定するのに、特定の方法を用いることができる程度を意味する。言い換えると、特異性または選択性は、関連するタンパク質同士を区別する能力である。特異的および選択的は、場合により、本明細書において互換的に用いられる。例えば、抗体の特異性または選択性は、タンパク質アレイ機構およびウェスタンプロットをそれぞれ用いて分析を行う下記の実施例の4節におけるように決定し得る。特異性および選択性の決定は、Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5:4327-4337にも記載されている。

10

20

30

40

50

#### 【0028】

この本発明の第一の局面は、HER2の細胞外ドメイン2および3内のアミノ酸配列からなるポリペプチド、特に配列LQVF（配列番号8）および／またはESFDGD（配列番号9）を含むポリペプチド、と結合する親和性リガンドが、ヒト乳癌細胞に対する増殖阻害効果を有することを本発明者らが発見したことに基づいているが、これに限定されない。

#### 【0029】

26アミノ酸（配列番号16）、およびより短いフラグメントのポリペプチドフラグメントが、増殖阻害効果を示す抗体と相互作用することが見出された。

#### 【0030】

従って、この第一の局面の実施形態において、本サブセットは30アミノ酸以下、例えば、26アミノ酸残基以下からなり得る。さらに、本サブセットは、例えば、21アミノ酸残基以下、例えば、16アミノ酸残基以下、例えば、12アミノ酸残基以下、例えば、9アミノ酸残基以下、例えば、8アミノ酸残基以下からなり得る。

#### 【0031】

親和性リガンドとサブセット間の十分な相互作用には、いくつかの場合、様々な長さのアミノ酸配列を必要とし得る。従って、この第一の局面の実施形態において、サブセットは、6アミノ酸以上、例えば、8アミノ酸以上、例えば、10アミノ酸以上からなり得る。

#### 【0032】

下記の実施例に示すように、増殖阻害効果を有する抗体を產生する免疫化は、C末端の最後の4アミノ酸がLQVFである抗原（配列番号1）を用いて行った。従って、この第一の局面の実施形態において、サブセットが配列LQVFを含む場合、そのサブセットはLQVFのC末端側に2アミノ酸以下を有する、例えば、LQVFのC末端側にアミノ酸を有さない。

#### 【0033】

多くのフラグメント（配列番号11および15-20）は、増殖阻害効果を示す抗体、すなわちmsAb-Cと相互作用することが見出された（実施例、3節を参照）。従って、この第一の局面の実施形態において、本サブセットは配列番号11および15-20からなる群から選択され得る。

#### 【0034】

この第一の局面のさらなる実施形態において、本サブセットは配列LQVFを含み得る。かかる実施形態において、本サブセットは配列番号16および20からなる群から選択され得る

。配列番号16および20はLQVFを含む。

【0035】

この第一の局面の他の実施形態において、本サブセットは配列ESFDGDPを含み得る。かかる実施形態において、本サブセットは配列番号11および15-19からなる群から選択され得る。配列番号11および15-19はESFDGDPを含む。

【0036】

この第一の局面の実施形態において、本サブセットは配列PESFDGD（配列番号10）またはLPESFDGD（配列番号11）を含み得る。

【0037】

この第一の局面の実施形態において、本サブセットは配列番号6のアミノ酸1-37の配列であり得る。

【0038】

下記の実施例の5節にてさらに説明されているように、本発明者らは、本発明の抗体が乳癌の増殖を阻害し得ることを見出した。従って、この第一の局面の実施形態において、親和性リガンドは培養物中においてヒト乳癌細胞の増殖を阻害し得る。例えば、本親和性リガンドは、HER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができない親和性リガンド、例えばHER2の細胞内ドメインと選択的に相互作用することができる抗体、に対して、培養物中におけるヒト乳癌細胞の増殖を20-100%、例えば、30-100%阻害し得る。かかる相対的な増殖阻害の値を得る測定を実施すること、およびかかる測定を特定の場合に適合させることは、当業者の能力の範囲内である。

【0039】

例として、相対的な阻害の測定は、特定の濃度の本親和性リガンドを、ヒト乳癌細胞、例えば、BT474乳癌細胞の第1培養物に加え、そしてHER2の細胞内ドメインと選択的に相互作用することができる同じ濃度の抗体、例えば、HPA001383（Atlas Antibodies、Sweden）を、同じ種類のヒト乳癌細胞の第2培養物に加えることにより行うことができる。特定の時間、例えば、4日間インキュベーションした後、それぞれの培養物中の細胞数を計測する。第2の培養物中の細胞数は参照数とみなし、本親和性リガンドの増殖阻害値を、その参照値に対して計算する。つまり、参照値が100細胞であり、第1の培養物が70細胞を含有する場合、増殖阻害は $(100-70) / 100 = 30\%$ である。下記の実施例の5節も参照のこと。

【0040】

従って、ヒト乳癌細胞は、例えばBT474乳癌細胞であり得る。さらに、増殖阻害は、例えば500 ng/mlの濃度における増殖阻害であり得る。

【0041】

下記の実施例の4cおよび4e節にさらに説明しているように、本発明者らは、本発明の抗体が低濃度にてそれらの標的と結合し得ることを見出した。従って、この第一の局面の実施形態において、本親和性リガンドは、100 nM未満、例えば、50 nM未満、例えば、20 nM未満、例えば、10 nM未満のEC50にてサブセットと結合し得る。かかるEC50の測定は、例えば下記の実施例の4cおよび4e節に従って行うことができる。

【0042】

この第一の局面の実施形態において、本親和性リガンドは抗体またはそのフラグメントまたは誘導体であり得る。かかる抗体は例えば本明細書の実施例に従って作製することができる。

【0043】

この第一の局面による親和性リガンドの例は下記に示す（「親和性リガンド」）。

【0044】

第一の局面の第一の形態として、医薬として使用するための第一の局面による親和性リガンドを提供する。

【0045】

HER2の過剰発現を特徴とする多数の障害が存在し、HER2の細胞外ドメインと結合する親

10

20

30

40

50

和性リガンドは、かかる障害の進行を処置するまたは進行に影響を与えるための医薬として用いられ得る。

【0046】

従って、第一の局面の第二の構成として、HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象の処置のため、第一の局面による親和性リガンドを提供する。第一の局面における、HER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は下記に記載している（「HER2障害」）。

【0047】

抗HER2抗体により処置される癌患者において、その癌はしばしば抗HER2抗体に対して耐性を生じることが報告されている。結果として、HER2の細胞外ドメインの、その抗HER2抗体とは別の部分を標的とする親和性リガンドが、かかる癌を有する患者のさらなる処置に適する可能性がある。

【0048】

従って、第一の局面の第二の構成の実施形態において、対象は、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、本親和性リガンドとは異なる治療用抗体により処置されていてもよい。

【0049】

さらに、かかる実施形態において、HER2の過剰発現を特徴とする障害は、例えば治療用抗体に耐性を生じた癌、例えば乳癌、例えば転移性乳癌であり得る。

【0050】

例えば、HER2と選択的に相互作用することができる治療用抗体は、トラスツズマブまたはペルツズマブであり得る。

【0051】

本発明の第二の局面として、第一の局面による親和性リガンド、およびHER2の細胞外ドメイン2および3（配列番号7）の73以下の連続アミノ酸残基の第2のサブセットと選択的に相互作用することができる第2の親和性リガンド、を含む組成物を提供する。ここで第2のサブセットは配列番号12、配列番号13および/または配列番号14のアミノ酸配列を含む。

【0052】

この第二の局面は、HER2の細胞外ドメイン2および3の2つの異なる部分を標的とする抗体の組み合わせが、1つの部分のみを標的とする抗体よりも高い増殖阻害効果が生じ得るという、発明者らの洞察に基づいているが、これに限定されない。このことは下記の実施例の5d-f節にてさらに議論されている。

【0053】

第二の局面による第2の親和性リガンドの例は、下記に示す（「親和性リガンド」）。

【0054】

第二の局面の実施形態において、第2のサブセットは、配列番号21-35からなる群のアミノ酸配列から選択され得る。

【0055】

さらに、第二の局面の実施形態において、第2のサブセットは、50アミノ酸残基以下、例えば、45アミノ酸残基以下、例えば、40アミノ酸残基以下、例えば、35アミノ酸残基以下、例えば、30アミノ酸残基以下、例えば、25アミノ酸残基以下、例えば、20アミノ酸残基以下、例えば、16アミノ酸残基以下であり得る。

【0056】

また、第二の局面の実施形態の第2のサブセットは、例えば8アミノ酸残基以上、例えば、10アミノ酸残基以上であり得る。

【0057】

第二の局面の実施形態において、第2のサブセットは配列番号4の配列のアミノ酸39-111からなり得る。

【0058】

10

20

30

40

50

下記の実施例の5d-f節においてさらに説明しているように、本発明者らは、本発明の抗体の組み合わせが乳癌の増殖を阻害し得ることを見出した。従って、第二の局面の実施形態において、本組成物は、培養物中におけるヒト乳癌細胞の増殖を阻害し得る。例えば、本組成物は、HER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができない親和性リガンド、例えばHER2の細胞内ドメインと選択的に相互作用することができる抗体、に対して、培養物中におけるヒト乳癌細胞の増殖を20-100%、例えば、30-100%阻害し得る。かかる相対的な増殖阻害値を得る測定を実施すること、およびかかる測定を特定の場合に適合させることは、当業者の能力の範囲内である。ヒト乳癌細胞は例えばBT474乳癌細胞であり得る。さらに、増殖の阻害は、例えば500 ng/ml濃度における増殖の阻害であり得る。

【0059】

10

相対的な阻害の測定の例は、第一の局面の文脈において上記に記載している。

【0060】

下記の実施例の4cおよび4e節においてさらに説明されているように、本発明者らは、本発明の抗体が低濃度においてそれらの標的と結合し得ることを示した。従って、第二の局面の実施形態において、第2の親和性リガンドは、100 nM未満、例えば、50 nM未満、例えば、20 nM未満、例えば、10 nM未満のEC50によって第2のサブセットと結合し得る。かかるEC50の測定は、例えば下記の実施例の4cおよび4e節に従って行うことができる。

【0061】

第二の局面の実施形態において、第2の親和性リガンドは、抗体またはそのフラグメントまたは誘導体であり得る。かかる抗体は、例えば本明細書の実施例に従って作製することができる。第二の局面の第2の親和性リガンドに適する他の種類の親和性リガンドは、下記に記載する。

20

【0062】

第一の局面による親和性リガンド、または第二の局面による組成物の効果を強化するおよび/または延長するために、または耐性の発生に対抗するために、本親和性リガンドまたは組成物は、HER2に対して標的化されたチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせ得る。従って、第二の局面の別形態として、以下を含む組成物を提供する：第一の局面による親和性リガンドまたは第二の局面による組成物；およびHER2に対するチロシンキナーゼ阻害剤。HER2に対するチロシンキナーゼ阻害剤は、例えばラパチニブ、ゲフィチニブまたはエルチニブであり得る。

30

【0063】

第二の局面の第一の構成として、医薬として使用するための、第二の局面による組成物を提供する。

【0064】

HER2の過剰発現を特徴とする多くの障害があり、HER2の細胞外ドメインと結合する親和性リガンドを含む組成物は、かかる障害の進行を処置するまたは進行に影響を与えるための医薬として用いられ得る。

【0065】

従って、第二の局面の第二の構成として、HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象の処置のための、第二の局面による組成物を提供する。第二の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に記載する（「HER2障害」）。

40

【0066】

上述のように、抗HER2抗体により処置される癌患者において、その癌は、抗HER2抗体に耐性を生じ得ることが報告されている。結果として、HER2の細胞外ドメインの、その抗HER2抗体とは別の部分を標的とする抗体を含む組成物は、かかる癌を有する患者のさらなる処置に適する可能性がある。

【0067】

従って、第二の局面の第二の構成の実施形態において、対象は、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、本親和性リガンドおよび/または第

50

2の親和性リガンドとは異なる治療用抗体により処置されてもよい。

【0068】

さらに、かかる実施形態において、HER2の過剰発現を特徴とする障害は、例えば、治療用抗体に対して耐性を生じた癌、例えば乳癌、例えば転移性乳癌であり得る。

【0069】

例えば、HER2と選択的に相互作用することができる治療用抗体は、トラスツズマブまたはペルツズマブであり得る。

【0070】

本発明の第三の局面として、HER2の細胞外ドメイン2および3(配列番号7)からの37以下の連続アミノ酸残基からなり、アミノ酸配列LQVF(配列番号8)および/またはESFDGD(配列番号9)を含む単離ポリペプチドを提供する。

10

【0071】

この本発明の第三の局面は、HER2の細胞外ドメインの特定の部分が、例えば治療の標的として特に興味深く、かかる部分を含むまたはかかる部分からなるフラグメントは治療手段の產生、選択または精製のために用いられ得るという、本発明者らの洞察に基づくが、これに限定されない。

【0072】

26アミノ酸(配列番号16)のポリペプチドフラグメント、およびより短いフラグメント、例えば、21アミノ酸(配列番号19)のフラグメントは、増殖阻害効果を示す抗体と相互作用することが見出された。

20

【0073】

従って、第三の局面の実施形態において、本ポリペプチドは、31アミノ酸残基以下、例えば、26アミノ酸残基以下、例えば、21アミノ酸残基以下、例えば、16アミノ酸残基以下、例えば、12アミノ酸残基以下、例えば、9アミノ酸残基以下、例えば、8アミノ酸残基以下からなり得る。

【0074】

親和性リガンド、例えば第一の局面の親和性リガンドと、本ポリペプチドとの間の十分な相互作用には、いくつかの場合において、様々な長さのアミノ酸配列が必要とされ得る。従って、第三の局面の実施形態において、ポリペプチドは、6アミノ酸以上、例えば、8アミノ酸以上、例えば、10アミノ酸以上からなり得る。

30

【0075】

下記の実施例の1および2節において示すように、増殖阻害効果を有する抗体を產生する免疫化は、C末端の最後の4アミノ酸がLQVFである抗原(配列番号1)を用いて行った。従って、第三の局面の実施形態において、本ポリペプチドは配列LQVFを含む場合、LQVFのC末端側に2以下のアミノ酸を有する、例えば、LQVFのC末端側にアミノ酸を有さない。

【0076】

多数のフラグメント(配列番号11および15-20)が、増殖阻害効果を示す抗体、すなわちmsAb-Cと相互作用することが見出された(実施例の3節を参照)。従って、第三の局面の実施形態において、本ポリペプチドは、配列番号11および15-20の配列からなる群から選択され得る。

40

【0077】

第三の局面のさらなる実施形態において、本ポリペプチドは配列LQVF(配列番号8)を含み得る。かかる実施形態において、本ポリペプチドは配列番号16および20の配列からなる群から選択され得る。配列番号16および20はLQVFを含む。

【0078】

第三の局面の他の実施形態において、本ポリペプチドは配列ESFDGDP(配列番号9)を含み得る。かかる実施形態において、本ポリペプチドは、配列番号11および15-19からなる群から選択され得る。

【0079】

第三の局面の他の実施形態において、本ポリペプチドは配列PESFDGD(配列番号10)ま

50

たはLPESFDGD（配列番号11）を含み得る。

【0080】

第三の局面の実施形態において、本ポリペプチドは配列番号6のアミノ酸1-37の配列からなり得る。それはLQVFで終わる配列番号6のサブ配列である。

【0081】

第三の局面の一構成として、抗原、例えば免疫化のための抗原、例えばヒトではない哺乳動物の免疫化のための抗原として使用するための第三の局面によるポリペプチドを提供する。

【0082】

これに関連する構成として、治療用抗体、例えばHER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための治療用抗体の調製において使用するための、第三の局面によるポリペプチドを提供する。第三の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に示す（「HER2障害」）。

【0083】

本発明の第四の局面として、抗原、例えば免疫化のための抗原、例えば、ヒトではない哺乳動物の免疫化のための抗原としての、第三の局面によるポリペプチドの使用を提供する。

【0084】

第三の局面によるポリペプチドが抗原として用いられる使用および方法は、下記にさらに記載する。

【0085】

第四の局面の第一の構成として、治療用抗体、例えば、治療用モノクローナル抗体、例えば、治療用キメラまたはヒト化モノクローナル抗体の調製における、第三の局面によるポリペプチドの使用を提供する。

【0086】

例として、モノクローナル抗体は、本ポリペプチドにより免疫化されたマウスからの脾臓細胞と骨髄腫細胞とを融合させることにより作製し得る。さらに、ウサギB細胞もこの目的に用いられ得る。

【0087】

次いで、この細胞の混合物を希釈し、クローンを単一の親細胞から増殖させることができる。次いで種々のクローンにより分泌された抗体を、ポリペプチドに結合するそれらの能力および最も高い生産性について試験し、次に、安定なクローンを培養培地において高容量にまで増殖させ得る。

【0088】

例えば、安定なクローンからのモノクローナルマウス抗体の結合部分をコードするDNAを、ヒト抗体を產生するDNAと統合させることができる。次いで哺乳類細胞の培養物を用いてこのDNAを発現させ、半マウスおよび半ヒト抗体を產生させることができる。マウス抗体部分の大きさによって、キメラ抗体またはヒト化抗体について言及する。別の実施例として、よりヒト様の抗体を產生するために遺伝的に操作されたマウスを用い得る。

【0089】

そのようにヒト抗体產生DNAと統合させる理由、または遺伝的に操作されたマウスを使用する理由は、ヒト免疫系であるが故にその抗体を外来物質として認識することを避けるためである。

【0090】

次いで、これらのキメラ抗体またはヒト化抗体は、例えばHER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための、治療用抗体として用いられ得る。

【0091】

第四の局面の第二の構成として、HER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための治療用親和性リガンドの選択または精製のための、第三の局面によるポリペプチドの使用を提供する。第四の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に記載

10

20

30

40

50

する（「HER2障害」）。

【0092】

第四の局面による治療用親和性リガンドの例は、下記に示す（「親和性リガンド」）。

【0093】

例えば、かかる使用には、本ポリペプチドが固定された固体支持体上における親和性精製が含まれ得る。その固体支持体は例えばカラム内に配置し得る。さらに、使用には、第三の局面によるポリペプチドに特異性を有する親和性リガンドを、そのポリペプチドが固定化された可溶性マトリックスを用いて選択することが含まれ得る。かかる可溶性マトリックスは、例えばデキストランマトリックス、例えば表面プラズモン共鳴装置、例えばBiacore（商標）の装置において用いるためのデキストランマトリックスであり得、その選択は、例えば、多数の潜在的な親和性リガンドの、固定されたポリペプチドに対する親和性をモニターすることを含み得る。

10

【0094】

第四の局面の第三の構成として、第三の局面によるポリペプチドの治療標的としての使用を提供する。

【0095】

第五の局面として、親和性リガンドの使用を提供する。

【0096】

第五の局面の第一の構成として、第五の局面による親和性リガンドの医薬としての使用を提供する。

20

【0097】

第五の局面の第二の構成として、HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象を処置するための医薬の製造における、第一の局面による親和性リガンドの使用を提供する。第五の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に記載する（「HER2障害」）。

【0098】

第五の局面の第二の構成の実施形態において、対象は、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、本親和性リガンドとは異なる治療用抗体によって処置されていてもよい。

30

【0099】

また、第五の局面の第二の構成の実施形態において、HER2の過剰発現を特徴とする障害は、その治療用抗体に耐性を生じた癌、例えば乳癌、例えば転移性乳癌であり得る。

【0100】

第五の局面の第一および第二の構成の対象は、さらに、第一の局面の第一および第二の構成の文脈において上述している。

【0101】

本発明の第六の局面として、HER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための親和性リガンドを同定する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

a) 第三の局面によるポリペプチドを、結合を可能にする条件において推定の親和性リガンドと接触させる工程；および

40

b) 推定の親和性リガンドがそのポリペプチドと結合するか否かを決定する工程。

【0102】

第六の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に記載する（「HER2障害」）。

【0103】

さらに、第六の局面による親和性リガンドの例は、下記に記載する（「親和性リガンド」）。

【0104】

第六の局面は、HER2の細胞外ドメインの同定された標的配列に対応するタンパク質フラグメントが、治療用親和性リガンドの同定または選択に有用であり得るという、本発明者

50

らの洞察に基づいているが、これに限定されない。

【0105】

障害が癌、例えば乳癌である第六の局面の実施形態において、本方法はさらに以下の工程を含み得る：

c) 推定の親和性リガンドが、癌細胞、例えば乳癌細胞、例えばBT474乳癌細胞の増殖を阻害する、またはそれらのアポトーシスを誘導するか否かを決定する工程。

【0106】

例えば、工程c)の判断基準は、推定の親和性リガンドが、HER2の細胞内部分を標的とする抗体に対して、増殖を20%以上、例えば30%以上阻害することであり得る。例えば、推定の親和性リガンドは、250または500 ng/mlの濃度において増殖を阻害しうる。

10

【0107】

かかる決定は、例えば、下記の実施例の5節におけるように行われ得る。

【0108】

第六の局面の第一の構成として、HER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための、1以上の親和性リガンドを同定する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する：

a) 第三の局面によるポリペプチドを、1以上の推定の親和性リガンドと接触させる工程；および

b) そのポリペプチドと結合する親和性リガンドを同定する工程。

【0109】

第六の局面の第二の構成として、クローン、例えば、HER2の過剰発現を特徴とする障害を処置するための治療用抗体を発現するクローンを產生する方法であって、以下を含む方法を提供する：

a) 第一の局面によるサブセットを含む抗原により免疫化された哺乳動物から得られた、そのサブセットと選択的に相互作用することができる抗体をコードするDNAを含む細胞を提供する；および

b) それらの細胞を骨髄腫細胞と融合させ、少なくとも1つのクローンを得る。

20

【0110】

本明細書の開示の文脈において、「クローン」は、共通の祖先を共有する（同じ母親細胞に由来することを意味する）同一細胞群を意味する。

30

【0111】

例えば、工程b)は培養を含み得る。

【0112】

第六の局面の第二の構成の実施形態において、本方法はさらに以下の工程を含む：

a') 哺乳動物を抗原により免疫化する工程、

ここで、工程a')は工程a)に先行する。

【0113】

例えば、工程a)の哺乳動物はヒトではない哺乳動物であり得る。

【0114】

さらに、工程a)において提供する細胞は、例えば脾臓細胞であり得る。また、工程a)の哺乳動物は、例えばマウスであり得る。結果として、工程a)において提供する細胞は、例えばマウスからの脾臓細胞であり得る。

40

【0115】

あるいは、工程a)において提供する細胞は、例えばB細胞であり得る。さらに、工程a)の哺乳動物は、例えばウサギであり得る。結果として、工程a)において提供する細胞は、例えばウサギB細胞であり得る。

【0116】

第六の局面の第二の構成の実施形態において、本方法は以下の工程をさらに含み得る：

c) 工程b)からの、本サブセットと選択的に相互作用することができる抗体を分泌するクローンを選択する工程。

【0117】

50

さらに、第六の局面の第二の構成の実施形態において、抗原は第三の局面によるポリペプチドからなり得る。かかる実施形態において、その方法が工程c)を含む場合、その抗原と選択的に相互作用することができる抗体を分泌するクローニングを選択する。

【0118】

また、第二の局面の実施形態において、本方法は以下の工程をさらに含み得る：

d) 工程b)において得られるクローニング、または工程c)において選択されたクローニングを提供し、そのクローニングにより発現された、サブセットと選択的に相互作用する抗体の少なくとも一部をコードする、クローニングからのDNAを、ヒト抗体を産生するDNAと統合する工程；および

e) 工程d)からの統合したDNAを細胞に組み込み、HER2の過剰発現を特徴とする障害の処置のための治療用抗体を発現するためのクローニングを得る工程。

10

【0119】

例えば、工程e)は培養を含み得る。

【0120】

工程e)のクローニングは、例えば哺乳類細胞株であり得る。工程e)のクローニングにより発現された治療用抗体は、例えばキメラまたはヒト化抗体であり得る。

【0121】

本発明の第七の局面として、HER2の過剰発現を特徴とする障害を有する、または有する疑いのある哺乳類対象を処置する方法であって、有効量の第一の局面による親和性リガンドまたは第二の局面による組成物を対象へ投与することを含む方法を提供する。

20

【0122】

第七の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に記載する（「HER2障害」）。

【0123】

第七の局面の実施形態において、本方法はHER2に対するチロシンキナーゼ阻害剤を対象に投与することをさらに含み得る。

【0124】

さらに、第七の局面の実施形態において、その処置は前外科的処置であり得る。結果として、例えば、乳癌を有する疑いのある対象、または乳癌再発の危険性が高い対象、または乳癌手術の予定のある対象を、第七の局面によって処置し得る。

30

【0125】

あるいは、第七の局面の実施形態において、その処置は手術後の処置であり得る。

【0126】

第七の局面の実施形態において、対象は、HER2、例えばHER2の細胞外ドメインと選択的に相互作用することができる、本親和性リガンドとは異なる治療用抗体により処置されていてもよい。かかる治療用抗体は例えばトラスツズマブまたはペルツズマブであり得る。

【0127】

第七の局面の実施形態において、HER2の過剰発現を特徴とする障害は、治療用抗体に耐性を生じた癌、例えば乳癌であり得る。

【0128】

本発明の第八の局面として、容器、第一の局面による親和性リガンドまたは第二の局面による組成物を含む、その容器中の組成物、およびその容器上の、または容器と結合した標識、を含む製造品であって、該標識が、該組成物がHER2の過剰発現を特徴とする障害を処置するために用いることができることを示す製造品を提供する。

40

【0129】

第八の局面におけるHER2の過剰発現を特徴とする種々の障害の例は、下記に示す（「HER2障害」）。

【0130】

本発明の第九の局面として、第二の局面の第2の親和性リガンドである親和性リガンドを提供する。

50

## 【0131】

第九の局面の一構成として、HER2の過剰発現を特徴とする障害を処置するための第九の局面による親和性リガンドを提供する。

## 【0132】

## 親和性リガンド

本発明の上記の局面の様々な実施形態による親和性リガンド、例えば、第一の局面の親和性リガンドおよび第二の局面の第2の親和性リガンドは、あらゆる種類の親和性リガンドであり得る。

## 【0133】

そうではあるが、本明細書の開示の文脈において有用であることが証明され得るかかる親和性リガンドの例を下記に示す。

## 【0134】

このように、上記の局面のいくつかの実施形態において、親和性リガンドは、抗体、それらのフラグメントおよびそれらの誘導体、すなわちイムノグロブリン骨格 (scaffold) に基づく親和性リガンドからなる群から独立して選択され得る。例えば、抗体は単離され得、および/または単一特異性であり得る。抗体は、ネズミ、ウサギ、ヒトおよび他の抗体、ならびに別の種からの配列を含むキメラ抗体、例えば、部分的ヒト化抗体、例えば、部分的ヒト化マウス抗体などの、あらゆる起源のモノクローナルおよびポリクローナル抗体を含む。ポリクローナル抗体は選択した抗原による動物の免疫化により產生され、一方、規定の特異性のモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilsteinにより開発されたハイブリドーマ技術を用いて產生することができる (Kohler G and Milstein C (1976) Eur. J. Immunol. 6:511-519)。抗体フラグメントおよび誘導体は、インタクトなイムノグロブリンタンパク質の、重鎖の第一定常ドメイン (CH1)、軽鎖の定常ドメイン (CL)、重鎖の可変ドメイン (VH) および軽鎖の可変ドメイン (VL) からなるFabフラグメント；2つの可変抗体ドメインVHおよびVLからなるFvフラグメント (Skerra A and Pluckthun A (1988) Science 240:1038-1041)；フレキシブルペプチドリンカーにより一緒に連結した2つのVHおよびVLドメインからなる単鎖Fvフラグメント (scFv) (Bird RE and Walker BW (1991) Trends Biotechnol. 9:132-137)；ベンズ・ジョーンズダイマー (Stevens FJ et al. (1991) Biochemistry 30:6803-6805)；ラクダ重鎖ダイマー (Hamers-Casterman C et al. (1993) Nature 363:446-448) および単一可変ドメイン (Cai X and Garen A (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:6280-6285；Masat L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:893-896)、および、例えばテンジクザメ (nurse shark) からの新たな抗原受容体 (NAR) (Dooley H et al. (2003) Mol. Immunol. 40:25-33) および可変重鎖ドメインに基づくミニボディー (minibody) (Skerra A and Pluckthun A (1988) Science 240:1038-1041) のような單一ドメイン骨格を含む。

## 【0135】

抗体、ならびにそれらのフラグメントおよび誘導体は、治療用途における親和性リガンドの伝統的な選択を表す。しかしながら、当業者は、選択的結合リガンドのハイスループットな作製および低コストの產生システムの要望が増加しているため、新しい生体分子多様性技術がこの十年間に開発されてきたことを知っている。これにより、例えば治療用途における結合リガンドとして有用であり得、イムノグロブリンの代わりに、またはイムノグロブリンと一緒に用いることができる、イムノグロブリンおよび非イムノグロブリン起源の両方の新たな種類の親和性リガンドの作製が可能となった。

## 【0136】

親和性リガンドの選択に必要な生体分子の多様性は、複数の可能性ある骨格 (scaffold) 分子の1つの組み合わせ操作 (combinatorial engineering) により創出し得、次いで特異的および/または選択的親和性リガンドを適切な選択プラットフォームを用いて選択する。骨格分子は、イムノグロブリンタンパク質起源 (Bradbury AR and Marks JD (2004) J. Immunol. Meths. 290:29-49)、非イムノグロブリンタンパク質起源 (Nygren PA and Skerra A (2004) J. Immunol. Meths. 290:3-28)、またはオリゴヌクレオチド起源 (G

10

20

30

40

50

old L et al. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64:763-797 ) であり得る。

【 0 1 3 7 】

多数の非イムノグロブリンタンパク質骨格が、新たな結合タンパク質の開発における支持構造物として用いられてきた。関連HER2サブセットに対する親和性リガンドを作製するのに有用な、かかる構造物の非限定的な例には、ブドウ球菌 (staphylococcal) プロテインAおよびそのドメインおよびこれらのドメインの誘導体、例えばプロテインZ (Nord K et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:772-777) ; リポカリン (Beste G et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1898-1903) ; アンキリンリピートドメイン (Binz HK et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 332:489-503) ; セルロース結合ドメイン (CBD) (Smith GP et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 277:317-332 ; Lehtio J et al. (2000) *Proteins* 41:3 10 16-322) ; クリスタリン (Fiedler U and Rudolph R、国際公開第01/04144号パンフレット) ; 緑色蛍光タンパク質 (GFP) (Peelle B et al. (2001) *Chem. Biol.* 8:521-534) ; ヒト細胞毒性Tリンパ球関連抗原4 (CTLA-4) (Hufnagel SE et al. (2000) *FEBS Lett.* 475:225-231 ; Irving RA et al. (2001) *J. Immunol. Meth.* 248:31-45) ; プロテアーゼ阻害剤、例えば、結び目 (Knottin) タンパク質 (Wentzel A et al. (2001) *J. Bacteriol.* 183:7273-7284 ; Baggio R et al. (2002) *J. Mol. Recognit.* 15:126-134) およびクニツツ (Kunitz) ドメイン (Roberts BL et al. (1992) *Gene* 121:9-15 ; Dennis MS and Lazarus RA (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22137-22144) ; PDZドメイン (Schneider S et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:170-175) ; ペプチドアプタマー、例えばチオレドキシン (Lu Z et al. (1995) *Biotechnology* 13:366-372 ; Klevenz B et al. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1993-1998) ; ブドウ球菌ヌクレアーゼ (Norman TC et al. (1999) *Science* 285:591-595) ; テンダミスタット (tendamistat) (McConnell SJ and Hoess RH (1995) *J. Mol. Biol.* 250:460-479 ; Li R et al. (2003) *Protein Eng.* 16:65-72) ; フィブロネクチンIII型ドメインに基づくトリネクチン (trinectin) (Koide A et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151 ; Xu L et al. (2002) *Chem. Biol.* 9:933-942) ; およびジンクフィンガー (Bianchi E et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 247:154-160 ; Klug A (1999) *J. Mol. Biol.* 293:215-218 ; Segal DJ et al. (2003) *Biochemistry* 42:2137-2148) がある。 20

【 0 1 3 8 】

非イムノグロブリンタンパク質骨格の上述の例は、新たな結合特異性の創出に用いる単一の無作為化ループを提供する骨格タンパク質、タンパク質表面から突出している側鎖が新規な結合特異性の創出のために無作為化されている強固な二次構造を有するタンパク質骨格、および新規な結合特異性の創出に用いる非連続の高頻度可変性ループ領域を示す骨格を含む。 30

【 0 1 3 9 】

非イムノグロブリンタンパク質に加え、オリゴヌクレオチドも親和性リガンドとして用いられ得る。アプタマーまたはデコイと呼ばれる一本鎖核酸は、詳細に明らかにされた三次元構造に折りたたまれ、高親和性および高特異性にてこれらの標的と結合する (Ellington AD and Szostak JW (1990) *Nature* 346:818-822 ; Brody EN and Gold L (2000) *J. Biotechnol.* 74:5-13 ; Mayer G and Jenne A (2004) *BioDrugs* 18:351-359)。オリゴヌクレオチドリガンドはRNAまたはDNAであり得、広範囲の標的分子の種類に結合し得る。 40

【 0 1 4 0 】

上述の骨格構造のいずれかの変異体のプールからの所望の親和性リガンドの選択において、選択された標的タンパク質に対する新たな特異的リガンドの単離に、多数の選択プラットフォームが利用できる。選択プラットフォームには、限定しないが、ファージディスプレイ (Smith GP (1985) *Science* 228:1315-1317) 、リボソームディスプレイ (Hanes J and Pluckthun A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4937-4942) 、酵母ツーハイブリッド系 (Fields S and Song O (1989) *Nature* 340:245-246) 、酵母ディスプレイ (Gai SA and Wittrup KD (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17:467-473) 、mRNA ディスプレイ (Roberts RW and Szostak JW (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-12 50

302)、細菌ディスプレイ (Daugherty PS (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17:474-480、Kronqvist N et al. (2008) *Protein Eng Des Sel* 1-9、Harvey BR et al. (2004) *PNAS* 101(25):913-9198)、ミクロビーズディスプレイ (Nord O et al. (2003) *J Biotechnol* 106:1-13、国際公開第01/05808号パンフレット)、SELEX (試験管内進化法 (System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) ) (Tuerk C and Gold L (1990) *Science* 249:505-510) およびタンパク質フラグメント相補性アッセイ (PCA) (Remy I and Michnick SW (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5394-5399) が含まれる。

【0141】

このように、上記の局面の実施形態において、親和性リガンドは、独立して、上記のタンパク質骨格のいずれか、またはオリゴヌクレオチド分子、に由来する非イムノグロブリン親和性リガンドであり得る。

【0142】

HER2障害

上記の局面 (一から八の局面) の実施形態において、HER2の過剰発現を特徴とする障害は癌であり得る。

【0143】

さらに、上記の局面の実施形態において、癌は、乳癌、扁平上皮癌、肺癌、例えば、小細胞または非小細胞肺癌、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、外陰癌、肝臓癌、肝細胞癌、結腸直腸癌、例えば結腸癌、子宮内膜細胞腫、唾液腺癌、腎臓 (kidney) 癌、甲状腺癌、ウィルムス腫瘍、膀胱癌、子宮内膜癌、腎臓の (renal) 癌、頭頸部癌、胃癌、食道癌および前立腺癌からなる群から選択され得る。

【0144】

例えば、癌は、乳癌、肺癌、膵臓癌、結腸直腸癌およびウィルムス腫瘍からなる群から選択され得る。

【0145】

Her2遺伝子は、全ての乳癌の約20%において、低分化性の乳癌の70%までにおいて過剰発現することが報告されている。また、乳癌対象、例えば転移性乳癌を有する対象における抗HER2処置の効率性はよく研究されている。

【0146】

従って、上記の局面の実施形態において、HER2の過剰発現を特徴とする障害は乳癌であり得る。例えば、乳癌は転移性乳癌であり得る。

【図面の簡単な説明】

【0147】

【図1】図1は親和性精製および特異性解析を示す。1aは一連の選択的親和性精製のための機構の計画図を示す。完全抗原に対するポリクローナル抗体 (配列番号1) を4つの特定集団に分け、C末端画分 (Ab-C)、中間画分 (Ab-M)、N末端画分 (Ab-N) および最後に完全抗原カラムを連結して可能性ある構造のエピトープ (Ab-S) を収集した。1bは、Luminexビーズアレイシステムを用いた、精製した全ての画分に対して高特異性を表した100タンパク質標的による結合特異性の分析を示す。全ての相互作用の有意性をこの表にまとめている。1cは、精製した単一特異性抗体の相対的な親和性の推定に用いたLuminexビーズアレイ競合アッセイを示す。単一特異的抗体およびビーズ表面上に固定された完全抗原 (配列番号1) 間の相互作用を、競合タンパク質フラグメントとして増加していく濃度の可溶性完全抗原 (配列番号1) を用いて検証した。

【図2】図2はBT474細胞の蛍光励起細胞分取 (Fluorescence Activated Cell Sorting) の結果を示す。非標識化細胞 (1a) およびAb-Intra (1b)、Ab-866 (1c)、Ab-N (1d)、Ab-M (1e)、Ab-C (1f)、Ab-S (1g) およびトラスツズマブ (1h) により標識化した細胞の蛍光を、それぞれ評価した。非標識化細胞に対して高い蛍光に富む集団が、msAb-866、msAb-N およびmsAb-Cについて観察され、細胞結合を示しており、一方、msAb-intraまたはmsAb-Mについては有意な蛍光の豊富さは観察されなかった。

【図3】図3は、BT474細胞を増加していく量のmsAb-866により処置した用量反応実験を示

10

20

30

40

50

す。

【図4】図4は、500ng/mlのmsAb-Intra、msAb-M、msAb-N、msAb-C、msAb-CNM、msAb-866およびmsAb-NCをそれぞれ用いた、BT474細胞の増殖阻害実験を示す。示した「効果」の値は、msAb-Intraにより処置した結果との相対値である。msAb-N、msAb-C、msAb-CNM、msAb-866およびmsAb-NCは、14%～39%の細胞増殖阻害効果を示した。

【図5】図5は、500ng/mlのmsAb-M、msAb-Intra、msAb-N、トラスツズマブ、msAb-CおよびmsAb-866をそれぞれ用いた、BT474細胞の増殖阻害実験を示す。示した「効果」の値は、msAb-Intraにより処置した結果との相対値である。

【発明を実施するための形態】

【0148】

HER2に対する単一特異性抗体の作製、ならびにそれらの様々なHERフラグメントとの相互作用および癌細胞に対する影響の研究

1. 抗原の作製

a) 材料および方法

EnsEMBL遺伝子ID ENSG00000141736によってコードされた標的タンパク質の適切なフラグメントを、生物情報学的ツールを用いて、ヒトゲノム配列を鑄型として選択した (Lindskog M et al (2005) *Biotechniques* 38:723-727、EnsEMBL、www.ensembl.org)。そのフラグメントを、HER2タンパク質（配列番号2；EnsEMBLエントリー番号ENSP00000269571）のアミノ酸274-400（配列番号1）に対応する127アミノ酸長フラグメントの產生のための鑄型として用いた。そのタンパク質フラグメントを、生じる親和性試薬の望まれない交差反応性を最小化し、かつ依然として、立体構造のエピトープの形成および細菌系における効果的な発現が可能である適切なサイズであるように、他のヒトタンパク質に対して低配列類似性を有する独特的配列からなるように設計した。

【0149】

EnsEMBLエントリー番号ENST00000269571（配列番号3）のヌクレオチド1058-1438を含有するHER2遺伝子転写物のフラグメントを、Superscript（商標）One-Step RT-PCR増幅キットを用いて、Platinum（登録商標）Taq（Invitrogen）を用いヒトトータルRNAパネル（Human Total RNA Panel IV、BD Biosciences Clontech）を鑄型として単離した。フランкиング制限部位NotIおよびAsclIを、発現ベクターへのインフレームクローニングが可能なPCR増幅プライマー（フォワードプライマー：TACAACACAGACACGTTGAG、ビオチン化リバースプライマー：AAACACTTGGAGCTGCTCTG）によって、フラグメントへ導入した。得られたビオチン化PCR産物を、Dynabeads M280ストレプトアビシン（Dynal Biotech）（Larsson M et al (2000) *J. Biotechnol.* 80:143-157）上に固定化し、固体支持体上においてNotI-AsclI消化（New England Biolabs）によるNot-AsclI消化にかけ、固定化金属イオンクロマトグラフィー（IMAC）精製のためのヘキサヒスチジルタグおよび連鎖球菌プロテインGからの免疫強化アルブミン結合タンパク質（ABP）からなるN末端二重親和性タグとともにインフレームにpAff8cベクター（Larsson M et al、上記を参照）へライゲートし（Sjölander A et al (1997) *J. Immunol. Methods* 201:115-123；Stahl Sら (1999) の、「Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation」（バイオプロセス技術の百科事典：発酵、生体触媒現象およびバイオ分離法）」（Fleckinger MCおよびDrew SW編）John Wiley and Sons Inc.、New York、pp 49-63）、大腸菌（*E. coli*）BL21(DE3)細胞（Novagen）へ形質転換した。クローンの配列は、TemplatePhi D NAシークエンシング増幅キット（GE Healthcare、Uppsala、Sweden）を用いて、製造者の推奨に従い、増幅したプラスミドDNAのダイ・ターミネーターサイクルシークエンシングにより検証した。

【0150】

発現ベクターを内部に持つBL21(DE3)細胞を、5g/lの酵母エキス（yeast extract）（Merck KGaA）および50mg/lのカナマイシン（Sigma-Aldrich）を補足した30g/lのトリプシン大豆プロス（tryptic soy broth）（Merck KGaA）100mlに、同じ培養培地における一晩培養物1mlを加えることにより播種した。細胞培養物を、1リットルの振盪フラスコ

10

20

30

40

50

において37 および150 rpmにて600 nmの光学密度が0.5-1.5に達するまでインキュベートした。次いでイソプロピル- -D-チオガラクトピラノシド (Apollo Scientific) を終濃度1mMになるように加えてタンパク質発現を誘導し、25 、150 rpmにて一晩インキュベーションを続けた。細胞を2400 gの遠心分離により収穫し、ペレットを5 ml溶解緩衝液 (7 mM塩酸グアニジン、47 mM Na2HPO4、2.65 mM NaH2PO4、10 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、20 mM - メルカプトエタノール ; pH = 8.0) に再懸濁し、2時間、37 、150 rpmにてインキュベートした。35300 gにて遠心分離した後、変性可溶化タンパク質を含有する上清を収集した。

#### 【 0 1 5 1 】

ASPEC XL4 (商標) (Gilson) 上にて自動化タンパク質精製法 (Steen J et al (2006) Protein Expr. Purif. 46:173-178) を用いて、Talon (登録商標) 金属 (Co2+) アフィニティー樹脂 (BD Biosciences Clontech) 1 mlを含むカラム上において固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー (IMAC) によって、His6-タグ化融合タンパク質を精製した。変性洗浄緩衝液 (6M塩酸グアニジン、46.6 mM Na2HPO4、3.4 mM NaH2PO4、300 mM NaCl、pH 8.0-8.2) 20 mlにより樹脂を平衡化した。次いで明澄になった (clarified) 細胞ライセートをカラムに加えた。その後、樹脂を最小量の洗浄緩衝液31.5 mlにより洗浄し、溶出緩衝液 (6 M尿素、50 mM NaH2PO4、100 mM NaCl、30 mM 酢酸、70 mM酢酸Na、pH 5.0) 2.5 mlにおいて溶出させた。溶出した物質を500、700および1300 μlの3つのプールに分画した。抗原を含有する700 μl画分、ならびにプールした500および1300 μl画分をさらなる使用のために保存した。

#### 【 0 1 5 2 】

抗原画分をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; 1.9 mM NaH2PO4、8.1 mM Na2HPO4、154 mM NaCl) により尿素の終濃度が1 Mになるように希釈し、7500 Daの分子量カットオフを有するVivapore 10/20 ml concentrator (Vivascience AG) を用いてタンパク質濃度を増加させる濃縮工程にかけた。タンパク質濃度を牛血清アルブミンスタンダードによるビシンコニン酸 (BCA) 微量検定プロトコール (bicinchoninic acid (BCA) micro assay protocol) (Pierce) を用いて製造者の推奨に従って測定した。タンパク質の質をProtein 50または200 assay (Agilent Technologies) を用いてBioanalyzer装置上にて解析した。

#### 【 0 1 5 3 】

##### b) 結果

HER2遺伝子の長転写物 (配列番号3) のヌクレオチド1058-1438に対応し、標的タンパク質HER2 (配列番号2) のアミノ酸274-400からなるペプチド (配列番号1) をコードする遺伝子フラグメントを、ヒトRNAプールから、そのタンパク質フラグメントに特異的なプライマーを用いてRT-PCRにより成功裡に単離した。

#### 【 0 1 5 4 】

正しいアミノ酸配列をコードするクローンを同定し、大腸菌における発現により、正しいサイズの単一のタンパク質を產生し、次いで固定化金属イオンクロマトグラフィーを用いて精製した。溶出したサンプルを尿素の終濃度が1 Mになるように希釈し、サンプルを1 mlに濃縮した後、タンパク質フラグメントの濃度を測定すると8.593 mg/mlであり、純度分析によると99.5%の純度であった。

#### 【 0 1 5 5 】

##### 2. 抗体の作製

##### a) 材料および方法

上記のようにして得られた精製HER2フラグメントを抗原として用い、国の指針に従ってウサギを免疫化した (スウェーデン許認可番号A 84-02)。ウサギを一次免疫化としてフロイント完全アジュバント中の抗原200 μgを筋肉内投与して免疫化し、4週間の間隔を置いてフロイント不完全アジュバント中の抗原100 μgにより3回追加免疫した。

#### 【 0 1 5 6 】

免疫化動物からの抗血清を、3工程の免疫親和性に基づくプロトコールにより精製した (Agaton C et al (2004) J. Chromatogr. A 1043:33-40 ; Nilsson P et al (2005) Prot

10

20

30

40

50

eomics 5:4327-4337)。第1の工程において、総量7 mlの抗血清を10×PBS～終濃度1×PBS (1.9 mM NaH2PO4、8.1 mM Na2HPO4、154 mM NaCl)により緩衝し、0.45 μmポアサイズフィルター (Acrodisc (登録商標)、Life Science) を用いてろ過し、pAff8cベクターから発現された二重親和性タグタンパク質His6-ABP (ヘキサヒスチジルタグおよびアルブミン結合タンパク質タグ) と結合した、N-ヒドロキシスクシニミド活性化Sepharose (商標) 4 Fast Flow (GE Healthcare) 5 mlを含有するアフィニティーカラムに適用し、抗原タンパク質フラグメントについて上記した同じ方法により精製した。第2の工程において、二重親和性タグHis6-ABPに対する抗体が枯渇したフロースルーを、免疫化のための抗原として用いたHER2タンパク質フラグメント (配列番号1) と結合した1 ml Hi-Trap NHS-activated HPカラム (GE Healthcare) に流速0.5 ml/分にて流した。His6-ABPタンパク質およびそのタンパク質フラグメント抗原を、製造者の推奨の通りにNHS活性化マトリックスと結合させた。非結合物質を1×PBST (1×PBS、0.1% Tween20、pH 7.25) により洗い流し、捕獲された抗体を、低pHグリシン緩衝液 (0.2 Mグリシン、1 mM EGTA、pH 2.5) を用いて溶出させた。溶出した抗体画分を溶出の直後に自動的に収集し、関連する画分をプールし、1M Tris-HClおよび10×PBSを用いてpH 7.25に調整した。プールした画分をmsAb-866と名付けた。

10

## 【0157】

## b) 結果

下記の3b節を参照のこと。

## 【0158】

20

## 3. 領域特異的抗体の作製

## a) 材料および方法

EnsEMBL遺伝子ID ENSG00000141736 (EnsEMBL、www.ensembl.org) によってコードされた標的タンパク質の3つのフラグメントを、免疫化のために用いたタンパク質フラグメント (配列番号1) との適切なオーバーラップについて選択した。HER2タンパク質 (配列番号2; EnsEMBLエントリー番号ENSP00000269571) のアミノ酸236-363 (配列番号4)、347-492 (配列番号5) および364-530 (配列番号6) に対応するこれらの3つのタンパク質フラグメントを、上記の免疫化のために用いたタンパク質フラグメント (配列番号1) と類似の方法にて產生した。

30

## 【0159】

2a) に記載のものと同じ免疫化からの生の血清10 mlをPBS中にて緩衝し、滅菌濾過し、上記と同じプロトコールを用いてタグ特異的His6-ABP抗体から枯渇させた (Larsson et al., 2006)。枯渇したフロースルー抗体を、以下の順番で連続的に連結された4つのアフィニティーカラム (1 ml HiTrapカラムを有するAkta Explorer (GE Health Care AB) システム) を用いて親和性精製した: C末端 (配列番号6)、中間 (配列番号5)、N末端 (配列番号4) および完全抗原カラム (配列番号1) (図1a)。抗体を流速0.5 ml/分にてカラムに流し、非結合物質を20カラム体積の洗浄緩衝液により洗い流した。結合した抗体を低pH下において別々に溶離させた後、250ul画分ずつに分画した (Larsson et al., 2006)。溶出直後に、関連画分をプールし、1M Tris-HClおよび10×PBSを用いてpH 7.25に調整した。後の実験を妨げないようにグリセリンまたはNaN3は加えなかった。それぞれのカラムからプールした画分をそれぞれ以下のように名付けた: C末端カラムから溶出した抗体 (配列番号6) をmsAb-Cと名付け、中間のカラムから溶出した抗体 (配列番号5) をmsAb-Mと名付け、N末端から溶出した抗体 (配列番号4) をmsAb-Nと名付け、完全抗原カラムから溶出した抗体 (配列番号1) をmsAb-Sと名付けた。

40

## 【0160】

## b) 結果

免疫化のために用いたタンパク質フラグメントのC末端、中間およびN末端部分にそれぞれ対応する特異的タンパク質配列、ならびに完全抗原フラグメント (配列番号1) を含む4つの短いアフィニティーカラムを、選択的アフィニティークロマトグラフィーが可能なように連続的に結合させた。この方法により、抗原特異的抗体を以下の4つの個別の抗

50

体集団へと分ける分離ができた：msAb-N（集団の18%）、msAb-M（集団の35%）、msAb-C（集団の39%）、msAb-S（集団の8%）（図1a）。

【0161】

4. 親和性精製の検証

a) タンパク質アレイ

親和性精製抗体画分の特異性および選択性を、タンパク質アレイ構成において、免疫化に用いたタンパク質フラグメント（配列番号1）およびそれにオーバーラップするタンパク質フラグメント（配列番号4-6）を含む抗原自体に対する結合分析、および92の他のヒトタンパク質フラグメントに対する結合分析により分析した（Nilsson P et al (2005) Proteomics 5:4327-4337）。タンパク質フラグメントを0.1 M尿素および1×PBS（pH 7.4）中40 μg/mlまで希釈し、それぞれ50 μlを96ウェルスポットプレートのウェルに移した。タンパク質フラグメントをpin-and-ring arrayer (Affymetrix 427) を用いてエポキシスライド（SuperEpoxy、TeleChem）上に二複製ずつスポットし、固定化した。スライドを1×PBS中に洗浄し（5分）、次いで表面を30分間ブロックした（SuperBlock（登録商標）、Pierce）。接着性16ウェルシリコンマスク（adhesive 16-well silicone mask）（Schleicher & Schuell）をそのガラスに適用し、単一特異性抗体を加え（1×PBSTに約50 ng/mlとなるよう1:5000に希釈）、シェーカー上にて60分間インキュベートした。アフィニティータグ特異的IgY抗体を、各スポットにおけるタンパク質の量を定量化するために単一特異性抗体とともに、共インキュベーションした。スライドを1×PBSTおよび1×PBSにより2回、各10分間洗浄した。二次抗体（Alexa 647とコンジュゲートしたヤギ抗ウサギ抗体、およびAlexa 555とコンジュゲートしたヤギ抗ニワトリ抗体、Molecular Probes）を1×PBSTにおいて30 ng/mlになるよう1:60000に希釈し、60分間インキュベートした。はじめのインキュベーションと同じ洗浄手順を行った後、スライドを遠心力で脱水し、スキャンした（G2565BA array scanner、Agilent）；その後、画像を画像分析ソフトウェア（Gene Pix 5.1、Axon Instruments）を用いて定量化した。

【0162】

b) サスペンションビーズアレイ

さらに、特異性、選択性および相対的親和性をLuminexサスペンションビーズアレイシステムを用いて分析した。結合特異性のマルチプレックスな分析を、先に報告されているように行った（Schwenk et al., 2007）。短く説明すると、免疫化に用いた抗原（配列番号1）およびサブ精製抗原に用いた3つのフラグメント（配列番号4-6）、1つのHisABPフラグメントおよび1つの抗ウサギIgG抗体を含む98のタンパク質フラグメントに対応する100のビーズIDの抗体希釈物およびビーズ混合物をPBSTにおいて調製した。msAb希釈物45 μlをビーズ5 μlに加え、96ウェルプレート（Corning）において混合しながら60分間インキュベートした。次に、R-フィコエリトリン標識化抗ウサギIgG抗体（0.5 μg/ml、Jackson ImmunoResearch）25 μlを加え、最後に60分間インキュベーションした。

【0163】

c) マルチプレックスな競合アッセイ

競合タンパク質フラグメントの連続希釈をPBST中に調製し、msAb-866、msAb-N、msAb-MおよびmsAb-Cの溶液と1:1の割合にて混合した。インキュベーションは全体積50 μlにて攪拌しながら60分間行った。次に、msAb-PrEST溶液を各ウェルにつきビーズ混合物5 μlを含む第2のプレートに移した。60分後、R-フィコエリトリン標識化抗ウサギIgG抗体（0.5 μg/ml、Jackson ImmunoResearch）25 μlを加え、さらに60分間インキュベートした。独立して3回繰り返して行い、それらの平均値をデータ分析に用いた。4つのパラメーターのロジスティックな関数を競合曲線に適合するように選択し、EC50値を計算し、相対的な結合の質を比較する。競合についての測定として、得られた曲線をそれらの形および標準誤差よりも高い数値であるべき推定EC50値について観察した。

【0164】

d) 懸濁アレイの読み取りおよびデータ分析

測定をLuminex LX200計測手段を用いてLuminex IS 2.3ソフトウェアにより行った。各

10

20

30

40

50

実験についてビーズIDにつき100事象をカウントし、相互作用を示すために平均蛍光強度(MFI)を選択した。データ分析およびグラフ表示を、R(統計学的コンピュータ計算およびグラフィックスのための言語および環境)(a language and environment for statistical computing and graphics)(Ihaka and Gentleman, 1996)により行った。

【0165】

e) 結果

親和性精製後の抗体特異性および選択性を検証するために、タンパク質マイクロアレイ分析を平面アレイおよびLuminexサスペンションビーズアレイ技術を用いて行った。分析により、His6-tagおよびABP-tagに対する抗体が成功裡に枯渇していることを確認し(結果は示さず)ならびに、高特異性抗体が、固定された他のタンパク質フラグメントとの非特異的相互作用の可能性の低さを有することを確かめた(図1b)。

10

【0166】

タンパク質アレイの各スポットにおいてタンパク質の量を定量化するために、一次および二次抗体の組み合わせを有する2色の色素標識システムを用いた。メンドリ(hen)において作製されたタグ特異的IgY抗体を、Alexa 555蛍光色素により標識化した二次ヤギ抗メンドリ抗体により検出した。ウサギmsAbのアレイ上のその抗原への特異的結合を、蛍光性Alexa 647標識化ヤギ抗ウサギ抗体により検出した。それぞれのタンパク質フラグメントを2複製ずつスポットした。平面およびサスペンションビーズアレイを用いたそのタンパク質アレイの分析により、親和性精製された单一特異性抗体; HER2に対するmsAb-866、msAb-N、msAb-M、msAb-C、msAb-Sは、正しいタンパク質フラグメントに対して高度に選択的であること、および分析した他の全てのタンパク質フラグメントに対して非常に低いバックグラウンドを有することが示された。さらに、单一特異性抗体とビーズ上の固定化完全抗原(配列番号1)タンパク質フラグメント間の相互作用を、増加していく濃度の可溶性完全抗原(配列番号1)競合者タンパク質フラグメントを用いて検証する競合アッセイを用いて、相対的な親和性を測定した(図1c、表1)。免疫化に用いたタンパク質フラグメント(配列番号1)に結合したビーズと抗体; msAb-866(1.9 nM)、msAb-N(4.5 nM)、msAb-M(0.7 nM)およびmsAb-C(1.2 nM)との相互作用を可溶性タンパク質フラグメント(配列番号1)により検証すると、低ナノモーラー範囲において明らかな親和性が、それらの抗体について測定された。

20

【0167】

【表1】

表1: 相対的親和性	
タンパク質フラグメント	EC50
Ab-866	1.9 nM
Ab-C	1.2 nM
Ab-M	0.7 nM
Ab-N	4.5 nM

30

【0168】

40

5. 細胞の研究

a) 細胞培養物

BT474乳癌細胞をアメリカン・タイプ・カルチャーラー・コレクション(ATCC、Manassas、VA)から購入し、10%FCSおよび1%ウシインスリンを補足したRPMIにおいて維持し、37、5%CO<sub>2</sub>の湿気のある環境に保持した。

【0169】

b) 細胞結合アッセイ

細胞をトリプシン処理により培養皿から遊離させ、遠心分離し、PBS:HSA(1%ヒト血清アルブミンを補足したPBS pH 7.2)に再懸濁し、カウントした。96ウェルプレートにおいて、150000細胞を、抗体(msAb-N、msAb-M、msAb-CおよびmsAb-866)0.35 μgにより反

50

応体積75  $\mu$ lにて室温において45分間標識化した。洗浄剤として2×100  $\mu$ l PBS : HSAを用いて非結合抗体を洗い流した。次いで、Alexa 488とコンジュゲートした二次ヤギ抗ウサギモノクローナル抗体 (Invitrogen) 0.35  $\mu$ gを用いて反応体積75  $\mu$ lにて45分間室温にて抗体を標識化した。細胞をPBS : HSA 2×100  $\mu$ lにて洗浄し、サンプルチューブ中に最終体積が150ulになるように再懸濁した。抗体のBT474細胞との結合能を、FL-1 (488 nmでの励起) にて蛍光放出を測定するBD FACS Vantage SE flowcytometer (BD Biosciences) を用いて蛍光励起細胞分取により評価した。HER2の細胞内部分 (HPA001383、Atlas Antibodies AB、Sweden) を標的とする等モル量のウサギ單一特異性抗体 (msAb-intra) を陰性対照として用い、細胞を二次抗体のみにより標識化した。トラスツズマブ (Herceptin、Roche) を陽性細胞標識対照として用い、Alexa 488ヤギ抗ヒトモノクローナル抗体 (Invitrogen) を二次試薬として用いた。

10

## 【0170】

## c) 用量反応研究

BT474細胞を24ウェル皿に $5 \times 10^4$ 細胞 / ウェルにて播種した。24時間後、1 ng/ml ~ 1000 ng/mlの範囲の濃度のmsAb-866の3複製の希釈において細胞を処理した。PBS pH 7.2により処理した細胞を対照として用いた。5日後、細胞をトリプシン処理し、それぞれ3回カウントした。増殖阻害を、非処置培養物に対する細胞の百分率として算出した。

## 【0171】

## d) 第1の増殖阻害の研究

0日目にBT474細胞を24ウェル皿に $5 \times 10^4$ 細胞 / ウェルにて播種した。2つの抗体の再構成ミックスを、3b)において得られた画分の比率を用いて作製した：msAb-NおよびmsAb-Cは18:39の比で混合し、msAb-NCと名付けた；msAb-N、msAb-MおよびmsAb-Cは18:35:39の比で混合し、msAb-NMCと名付けた。24時間後、細胞をmsAb-866、msAb-N、msAb-M、msAb-C、msAb-NCおよびmsAb-NMCの3複製の希釈物において最終抗体濃度500 ng/mlを用いて処理した。msAb-intraおよびPBS pH 7.2を対照として用いた。5日後、細胞をトリプシン処理し、それぞれ3回カウントした。増殖阻害を、対照抗体msAb-intraにより処理した培養物に対する細胞の百分率として算出した。

20

## 【0172】

## e) 第2の増殖阻害の研究

1日目に、BT474細胞を、 $5 \times 10^4$ 細胞 / ウェルにて、msAb-866、msAb-Cおよびトラスツズマブの希釈物とともに、最終抗体濃度500 ng/mlを用いて3複製分播種した。msAb-intraおよびPBS pH 7.2を対照として用いた。4日後、細胞をトリプシン処理し、それぞれ3回カウントした。増殖阻害を、対照抗体msAb-intraにより処理した培養物に対する細胞の百分率として算出した。

30

## 【0173】

## f) 結果

msAb-866、msAb-NおよびmsAb-Cにより標識化したBT474細胞の蛍光励起細胞分取は、非標識化細胞に対して高い蛍光に富む集団を示し、これは細胞結合を示しており、一方msAb-intraまたはmsAb-Mについては有意な蛍光の豊富さは見られなかった(図2)。

40

## 【0174】

BT474細胞をmsAb-866により処理する用量反応研究において、5日目に、細胞増殖に対して有意に影響する臨界抗体濃度250-500ng/mlが見られた(図3)。

## 【0175】

500ng/mlのそれぞれの抗体を用いるBT474細胞の第1の増殖阻害の研究において、msAb-Mは1%の増殖阻害効果を示し、msAb-Nは14%の増殖阻害効果を示し、msAb-Cは30%の増殖阻害効果を示し、msAb-NMCは33%の増殖阻害効果を示し、msAb-866は36%の増殖阻害効果を示し、msAb-NCは39%の増殖阻害効果を示した(図4)。

## 【0176】

結果として、Ab-NおよびAb-Cの両方が単独で実質的効果を示した。Ab-NおよびAb-Cを含む組み合わせも、実質的な効果を示した。さらに、本発明者らは、高い効果(30%以上)

50

を示した抗体サンプルは全てAb-Cを含んでいることに注目した。

【0177】

また、Ab-CおよびAb-Nの両方を含有するサンプルは一般に、Ab-CまたはAb-Nのいずれか単独と比較して高い効果を示した。

【0178】

最も高い効果は、Ab-CおよびAb-Nを含有するサンプルにおいて観察された。

【0179】

500ng/mlのそれぞれの抗体を用いるBT474細胞の第2の増殖阻害の研究において、4日目に、msAb-intraと比較して、Ab-866は約41%、Ab-Cは約26%、トラスツズマブは約18%、Ab-Nは約5%の増殖阻害効果を示した（図5）。 10

【0180】

さらに、本発明者らは、Ab-CおよびAb-866がこの構成において、HER2の細胞外ドメインを標的とする承認された治療用抗体であるトラスツズマブ（Herceptin）よりも高い効果を示したことに注目した。これは、配列番号6のアミノ酸1-37のHER2サブセットを標的とする抗体、または、配列番号6のアミノ酸1-37のHER2サブセットおよび配列番号4のアミノ酸39-111のHER2サブセットを標的とするそれぞれの抗体を含む組成物は、HER2の過剰発現を特徴とする障害の処置に用いられ得ることを示している。

【0181】

最も高い効果は、Ab-CおよびAb-Nの両方を含有するAb-866において観察された。

【0182】

6. 細菌ディスプレイを用いるエピトープマッピング

a) ブドウ球菌ディスプレイベクターへのライプラリーのサブクローニング

大腸菌株RR1 M15 (Ruther, U. pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. Nucleic. Acids Res. 10, 5765-5772 (1982)) を、プラスミド構成のための宿主株として用いた。新たな制限部位 (Pmel) を含有する遺伝子フラグメントを、BamHI およびSalI (New England Biolabs, Beverly, MA) により消化された後に報告されているブドウ球菌ベクター-pSCXm (Wernerus, H. & Stahl, S. Vector engineering to improve a staphylococcal surface display system. FEMS Microbiol Lett 212, 47-54 (2002).) にライゲートすることにより、新たなブドウ球菌ベクター、pSCEM1を作製した。N末端FLAG配列を有するHER2-ECDの増幅のための鋳型を得た。遺伝子フラグメントをPCRにより増幅し (9.6 ml、プールした)、無作為なフラグメントを作製するため、50ml Falconチューブ中において氷上にてマイクロチップ (microtip) を用いて60分間超音波処理した (21% の振幅、一定の超音波処理)。その後サンプルをCentricon Plus 20 column (CO 10 kDa ; Millipore, Billerica, MA) を用いて限外濾過により濃縮した。濃縮したフラグメントを平滑末端化し、T4 DNAポリメラーゼおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼ (New England Biolabs) を製造者の推奨に従って加えてフラグメントをリン酸化した。その後、平滑末端化した遺伝子フラグメントを、T4 DNA Ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いてPmel (New England Biolabs) により消化したブドウ球菌ディスプレイベクター、pSCEM1へライゲートした。ライプラリーを、電気的形質転換受容性である (electrocompetent) スタフィロコッカス・カルノスス (S. carnosus) TM300 (Gotz, F. Staphylococcus carnosus: a new host organism for gene cloning and protein production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19, 49S-53S (1990)) に、先に報告されているように (Lofblom, J., Kronqvist, N., Uhlen, M., Stahl, S. & Wernerus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: Staphylococcus carnosus as model organism. J Appl Microbiol 102, 736-747 (2007)) 形質転換し、15% グリセリン中、-80 にて保存した。 30

【0183】

b) 細胞標識化および蛍光励起細胞分取 (FACS)

Sc:HER2-1ibまたはSc:Ephrin-B3-1ibのアリコート (少なくとも10倍のライプラリーサイズ) を、20 µg/mlのクロラムフェニコールを含むTSB+Y (トリプシン大豆プロス + 酵母

10

20

30

40

50

エキス) 100 ml に播種し、37 、 150 rpm にて一晩増殖させた。16時間後、10<sup>7</sup> 細胞を、0.1% Pluronic (登録商標) F108 NF Sufactant (PBSP; BASF Corporation, Mount Olive, NJ) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) 1 ml により洗浄した。細胞を遠心分離 (3500 × g, 4 、 6 分) によりペレット化し、抗体 (すなわちエピトープマッピングに用いる抗体; 典型的には約 100 nM の濃度) を含有する PBSP 100 μl に再懸濁し、緩やかに混合しながら平衡結合に達するまで室温にて 1 時間インキュベートした。その後、細胞を氷冷した PBSP 1 ml により洗浄し、次いで 4 μg/ml の Alexa Fluor (登録商標) 488 ヤギ抗ウサギ IgG または 4 μg/ml の Alexa Fluor (登録商標) 488 ヤギ抗マウス IgG (Invitrogen) および 25 nM の Alexa Fluor (登録商標) 647 HSA コンジュゲートを含有する PBSP 1 ml において、暗中、氷上にて 1 時間インキュベーションした。氷冷した PBSP 1 ml における最後の洗浄工程の後、細胞を分別する前に氷冷した PBSP 300 μl に再懸濁した。細胞を FACS Vantage SE (BD Biosciences, San Jose, CA) フローサイトメーターを用いて分別した。細胞を B2 培地 (Lofblom, J., Kronqvist, N., Uhlen, M., Stahl, S. & Wernerus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *J Appl Microbiol* 102, 736-747 (2007)) 0.5 ml に直接分別し、10 μg/ml のクロラムフェニコールを含有する血液寒天基礎培地 (blood agar base) (Merck) プレート上に広げ、37 にて 24 時間インキュベートした。最後のラウンドにおいて、細胞を半固体培地を含有する 96 ウェルプレートの個々のウェルに分別し、コロニーを形成させた。

#### 【 0 1 8 4 】

DNA シークエンシングおよび BLAST アライメント

それぞれのコロニーの一部を PCR のために 96 ウェルプレートの 2 つの別のウェルに移した。ブドウ球菌ディスプレイベクターの挿入領域を、2 つの別のプライマー対を用いて PCR により増幅し、フォワード末端およびリバース末端のそれぞれにビオチン分子を含有する 2 つの PCR 産物が得られた。それぞれの挿入物の両方の末端における 10 サイクルのピロシークエンシングを、PSQ (商標) 96 HS instrument (Biotage AB, Uppsala, Sweden) を用いて製造者の指示書に従って行った。エピトープ配列を BLAST を用いて抗原配列にマッピングした (Altschul et al, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 147:195-197, (1990))。

#### 【 0 1 8 5 】

c) HER2 (ENSP00000269571 の aa 27-653 または bp 317-2196 ENST00000269571) の細胞外ドメインの DNA を、ベクター pAY593 を鑄型として用いて PCR により増幅した。増幅した DNA を超音波処理によって様々な長さに切片化し (おおよそ 50-350 bp) 、次いでブドウ球菌ディスプレイベクター (pSCEM1) にライゲートし、スタフィロコッカス・カルノススに形質転換し、約 30000 の形質転換体を得た。インフレームフラグメントの DNA フラグメントがペプチドとしてブドウ球菌表面上にディスプレイされた。抗体および蛍光標識化二次試薬とともにインキュベーションした後、陽性および陰性細胞を、エピトープおよび非エピトープ揭示細胞を単離するために、フローサイトメトリーを用いて別々に分別した。単離した細胞をピロシークエンシングにより配列決定し、その配列を最後にエピトープの同定のために HER2 抗原とアライメントした。表面発現レベルのリアルタイムモニタリングを含む二重標識化戦略を用い、ポリクローナル抗体のエピトープマッピングにおいて重要ないくつかの利点が得られた (Lofblom, J., Wernerus, H. & Stahl, S. Fine affinity discrimination by normalized fluorescence activated cell sorting in staphylococcal surface display. *FEMS Microbiol Lett* 248, 189-198 (2005))。第 1 に、発現レベルによる結合シグナルの標準化が可能となり、これにより細胞と細胞の差異が有意に減少し、異なるエピトープ集団の識別が可能となる。第二に、表面上にディスプレイされた非結合ペプチドを決定する平行したアッセイも可能となり、これによりマッピングの分解能がさらに増大する。

#### 【 0 1 8 6 】

msAb-866 に特異的な 4 つのエピトープ (配列番号 8 および配列番号 12-14) を確認した。エピトープマッピングの第 2 ラウンドを msAb-C について行い、1 つのさらなるエピトープ

10

20

30

40

50

(配列番号11)が明らかになった。

【0187】

本出願において参照された、出版物、DNAまたはタンパク質データエントリ、および特許を含むがこれらに限定されない引用物は全て、参考により本明細書に組み込まれる。

【0188】

このように記載した本発明と同じものが多くの方法において変化し得ることは明らかであろう。かかる変化は本発明の精神および範囲から逸脱しているとは見なされず、また当業者には明らかであろうかかる修飾は全て添付の特許請求の範囲内に含まれることを意図している。

【図1】

1/5

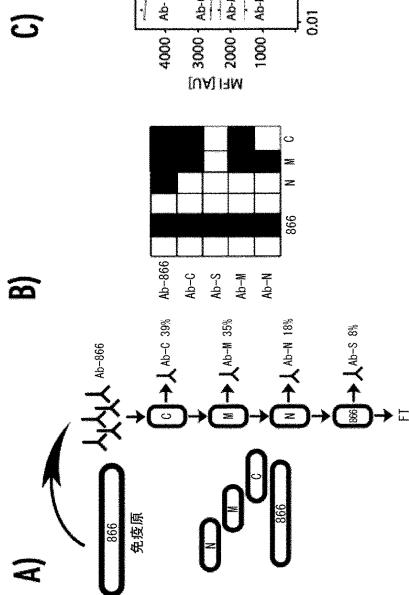


FIGURE 1

BT 474 フローサイтомトリー ヒストグラム

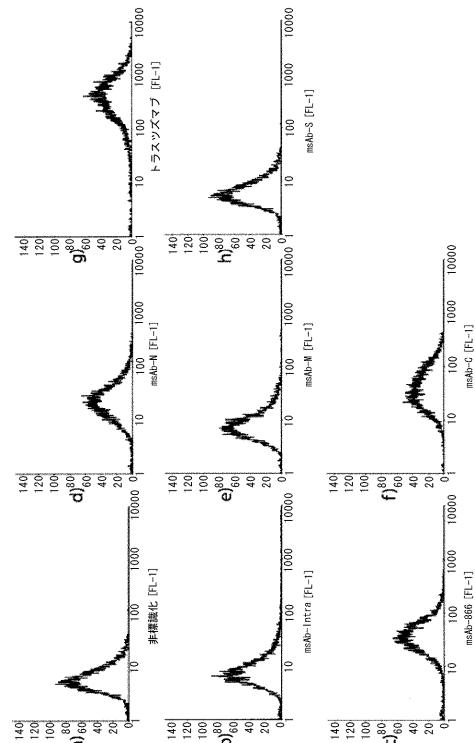


FIGURE 2

【図2】

2/5

【図3】

3/5

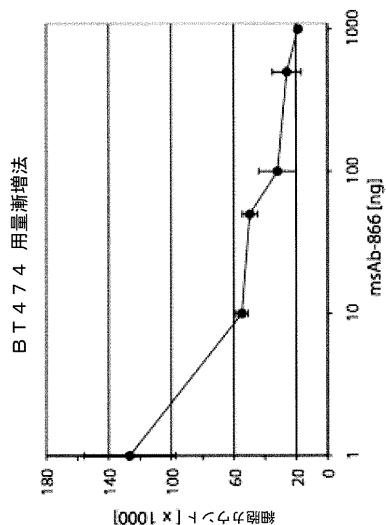


FIGURE 3

【図4】

4/5

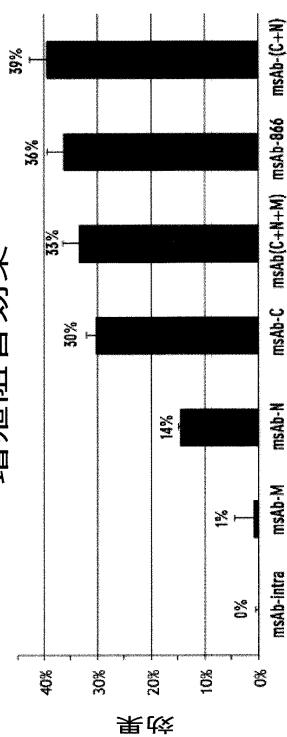


FIGURE 4

【図5】

5/5

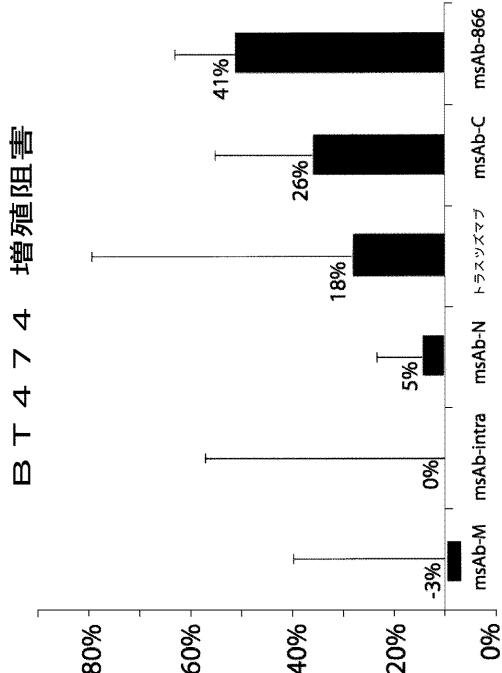


FIGURE 5

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 31/7088 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7088	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06	
<b>C 0 7 K 5/11 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
<b>C 0 7 K 7/06 (2006.01)</b>	C 0 7 K 5/11	
<b>C 0 7 K 7/08 (2006.01)</b>	C 0 7 K 7/06	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 0 7 K 7/08	
<b>C 0 7 K 14/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 14/00	

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 マティアス・ウーレン

スウェーデン、エスエー-182 79ストックストンド、ヴィッラヴェーゲン13番

(72)発明者 ヨハン・ロックバリイ

スウェーデン、エスエー-117 50ストックホルム、アンデッシュ・レイメッッシュ・ヴェーグ  
15番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA80 CA01 GA11 HA01

4C084 AA02 AA17 AA20 DC22 NA14 ZB262

4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 DD63 DD88 EE01

4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

4C087 AA01 AA02 BC70 CA16 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20 EA28 EA50 FA74

【外國語明細書】

1

## HER2 SUBSETS

### Field of the Invention

The present invention generally relates to amino acid subsets of the extracellular domain HER2, antibodies targeting such subsets and related methods and uses, such as therapeutic methods and uses.

5

### Background

#### *HER2*

10 The human epidermal growth factor receptor 2 (HER2 or erbB-2) is a member of the epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4) a family of transmembrane receptor tyrosine kinases. These receptors have an over all sequence identity between 40-50% and have similar domains. They all contain an extracellular ligand-binding domain, a single, transmembrane span, and intracellular tyrosine kinase and regulatory 15 domains.

#### *HER2 related disorders*

20 Members of the epidermal growth factor receptor family have been found to promote tumor cell proliferation in a variety of cancer types, such as epithelial malignancies. HER2 has been studied in a variety of human carcinomas and have been found upregulated in a number of tumors, in particular in breast, lung, pancreatic and colorectal cancer and Wilm's tumor, but also in ovarian, bladder, endometrial, renal, head and neck, gastric, 25 esophageal, and prostate cancer (Ménard et al (2001) Annals of Oncology 12 (Suppl. 1) S15-S19.

#### *Cancer*

30 Cancer is one of the most common causes of disease and death in the western world. In general, incidence rates increase with age for most forms of cancer. As human populations continue to live longer, due to an increase of the general health status, cancer may affect an increasing number of individuals. The cause of most common cancer types is still largely unknown, although there is an increasing body of knowledge providing a link between

environmental factors (dietary, tobacco smoke, UV radiation etc) as well as genetic factors (germ line mutations in "cancer genes" such as p53, APC, BRCA1, XP etc) and the risk for development of cancer.

No definition of cancer is entirely satisfactory from a cell biological point of view, despite the fact that cancer is essentially a cellular disease and defined as a transformed cell population with net cell growth and anti-social behavior. Malignant transformation represents the transition to a malignant phenotype based on irreversible genetic alterations. Although this has not been formally proven, malignant transformation is believed to take place in one cell, from which a subsequently developed tumor originates (the "clonality of cancer" dogma). Carcinogenesis is the process by which cancer is generated and is generally accepted to include multiple events that ultimately lead to growth of a malignant tumor. This multi-step process includes several rate-limiting steps, such as addition of mutations and possibly also epigenetic events, leading to formation of cancer following stages of precancerous proliferation. The stepwise changes involve accumulation of errors (mutations) in vital regulatory pathways that determine cell division, asocial behavior and cell death. Each of these changes may provide a selective Darwinian growth advantage compared to surrounding cells, resulting in a net growth of the tumor cell population. A malignant tumor does not only necessarily consist of the transformed tumor cells themselves but also surrounding normal cells which act as a supportive stroma. This recruited cancer stroma consists of connective tissue, blood vessels and various other normal cells, e.g., inflammatory cells, which act in concert to supply the transformed tumor cells with signals necessary for continued tumor growth.

The most common forms of cancer arise in somatic cells and are predominantly of epithelial origin, e.g., prostate, breast, colon, urothelial and skin, followed by cancers originating from the hematopoietic lineage, e.g., leukemia and lymphoma, neuroectoderm, e.g., malignant gliomas, and soft tissue tumors, e.g., sarcomas.

#### *Breast cancer*

Breast cancer is the second most common form of cancer worldwide and by far the most frequent cancer of women. Data from the GLOBOCAM 2002 database presented by Parkin *et al.* reveal 1.15 million new cases in 2002 and 0.41 million deaths during the same period (Parkin DM *et al.* (2005) CA Cancer J Clin 55, 74-108). If detected at an early stage, the prognosis is

relatively good for a patient living in a developed country, with a general five-year survival rate of 73%, compared to 57% in a developing country. The incidence is slowly increasing and about one in every nine women in the developed world is believed to get breast cancer in her lifetime. Although

5 lifestyle changes related to female steroid hormones, including exposure to exogenous hormones, affect the risk of developing breast cancer, these factors only make up for a small fraction of the etiology, and the benefit of preventive manipulation is believed to be low. The decreased mortality is due to earlier detection by mammography screening and the use of modern  
10 adjuvant systemic treatment.

#### *Cancer treatment and therapy*

Cancer treatments include, for example, surgery, radiation therapy, chemotherapy, targeted therapies, immunotherapy, hormonal therapy and  
15 angiogenesis inhibitors.

An example of a targeted therapy is treatment with therapeutic antibodies (antibody therapy), which may be an attractive approach as it targets tumor cells, in contrast to e.g. selective estrogen receptor modulators (SERMs) and chemotherapies which are normally are systemic treatments.

#### *Treatment of breast cancer*

Since its introduction in the late seventies, breast-conserving therapy, combining breast conserving surgery and postoperative radiotherapy, has become the primary treatment of choice in women where radical removal of  
25 the tumor can be combined with a good cosmetic result. Mastectomy is still preferable in some patients, i.e., women with small breasts, large tumors (> 4 cm) or multifocal/multicentric disease.

Axillary dissection is primarily performed for diagnostic purposes and removal of at least 10 lymph nodes gives a good staging guidance with 97-  
30 98% sensitivity (Axelsson CK *et al.* (1992) Eur J Cancer 28A:1415-8; Recht A and Houlihan MJ (1995) Cancer 6(9):1491-1512). However, the next step towards minimal surgery in the treatment of primary cancer has been the introduction of the sentinel node biopsy technique with mapping of axillary lymph nodes instead of axillary lymph node clearance, which is associated  
35 with a high complication rate. This technique was introduced as a consequence of the knowledge that most of the lymphatic drainage to the axilla from the breast initially passes through one (or a few) lymph node(s) -

the sentinel node(s) - supporting that analysis of this lymph node may be a sufficient indicator of axillary node status (Veronesi U *et al.* (2003) *New Engl J Med* 349(6): 546-53.)

The concept of breast cancer as a systemic disease, i.e., the presence of disseminating micro-metastases at the time of diagnosis that may explain treatment failure after locoregional therapy, paved the way for adjuvant randomized trials in the 1970s, including endocrine therapy and chemotherapy. Adjuvant polychemotherapy is standard treatment for hormone-receptor negative patients with high risk of recurrence, irrespective of nodal status. A beneficial effect on both overall- and relapse-free survival has been demonstrated, especially in premenopausal patients (EBCTCG (1998) *Lancet* 352(9132): 930-42). For patients with hormone-responsive disease, i.e., estrogen receptor (ER) and/or progesterone receptor (PR) positive disease, adjuvant polychemotherapy has been delivered in combination with endocrine therapy as sequential chemo-endocrine therapy. Also, adjuvant chemotherapy generally induces amenorrhea, causing a secondary endocrine effect in addition to the cytotoxic (Pagani O *et al.* (1998) *Eur J Cancer* 34(5):632-40).

Endocrine therapy is recommended for patients with hormone receptor positive tumors irrespective of age, stage and menopausal status.

In hormone-responsive premenopausal patients, ovarian ablation by surgery or irradiation, or ovarian suppression by LHRH agonists are efficient adjuvant treatment modalities (Emens LA and Davidson NA (2003) *Clin Ca Res* (1 Pt 2): 468S-94S). In postmenopausal patients, ovarian ablation has no place, since the primary source of estrogen is not from ovarian synthesis but from the conversion of androstenedione to estrone and estradiol in peripheral tissues including the breast.

Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator (SERM) with an agonistic effect on the ER, making it a suitable treatment for advanced breast cancer in both pre- and postmenopausal women. Five years of tamoxifen as adjuvant treatment after primary surgery clearly reduces the breast cancer mortality in patients with ER positive (ER+) tumors, irrespective of lymph node status (EBCTCG (1998) *Lancet* 351(9114):1451-67). While tamoxifen has a protective effect against cardiovascular disease, the risk of developing endometrial cancer is increased, due to an agonistic effect on the ER in the endometrium (EBCTCG (2005) *Lancet* 365(9472):1687-717)

Aromatase inhibitors (AIs) function by inhibiting aromatase, the enzyme converting androgens into estrogens. AIs are not suitable for treatment of premenopausal women, as it stimulates the ovaries to an increased androgen production through the hypothalamus and pituitary gland.

- 5 AIs can be given as adjuvant treatment to postmenopausal women, either alone or following tamoxifen treatment and they have been shown to significantly reduce the mortality, possibly even more if given alone (Howell A et al. (1995) Lancet 345(8941):29-30; Ellis MJ and Rigden CE (2006) Curr Med Res Opin 22(12):2479-87; Coates AS et al. (2007) J Clin Oncol 25(5):486-92). However, this therapy is relatively new and the long-term side effects are not yet fully known (Buzdar A et al. (2006) Lancet Oncol 7(8):633-43), but the most important are cardiovascular complications and osteoporosis.
- 10

- 15 Newly developed pure anti-estrogens such as fulvestrant, which completely blocks the ER, are currently only used in advanced breast cancer and not in the adjuvant setting (Rutqvist LE (2004) Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 18(1): 81-95).

- 20 Adjuvant endocrine therapy has no place in hormone receptor negative breast cancer, although some studies indicate that some ER negative (ER-), i.e., ER $\alpha$  negative (ER $\alpha$ -), tumors respond to tamoxifen treatment (EBCTCG (1998) Lancet 351:1451-1467).

- 25 The Her2 gene is overexpressed in about 20% of all, and in up to 70% of lowly differentiated, breast cancers (Berger MS et al. (1988) Cancer Res 48(5):1238-43; Borg Å et al. (1990) Cancer Res 50(14): 4332-7). HER2 status may be assessed routinely, primarily by IHC and in cases with moderate expression, gene amplification status may be determined by fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis. HER2 overexpression or gene amplification is commonly associated with a poor prognosis. Experimental data in support of a relationship between HER2 overexpression and resistance to endocrine 30 treatment have been presented (Shou J et al. (2004) J Natl Cancer Inst 96(12):926-35). However, clinical data are not consistent (Borg Å et al. (1994) Cancer Lett 81(2):137-44, De Placido S et al. (2003) Clin Ca Res 9(3):1039-46, Rydén L et al. (2005) J Clin Oncol 23(21):4695-704).

- 35 Breast cancer is a truly heterogeneous disease and despite the increasing understanding of its nature, the available treatment options are still not fully satisfying.

Disclosure of the invention

It is an object of an aspect of the present disclosure to provide subsets of amino acid residues from the extracellular domain of HER2. Objects of other aspects of the present disclosure are to provide affinity ligands capable of interaction with the subsets and compositions comprising such affinity ligands. Further objects of certain other aspects of the present disclosure are to provide uses and methods utilizing the subsets as targets, e.g. for therapeutic purposes.

The present invention is defined by the appending claims.

Thus, as a first aspect of the present disclosure, there is provided an affinity ligand capable of selective interaction with a subset of 37 consecutive amino acid residues or less from extracellular domains 2 and 3 of HER2 (SEQ ID NO:7), said subset comprising the amino acid sequence LQVF (SEQ ID NO:8) and/or ESFDGD (SEQ ID NO:9).

In the context of the present disclosure, "extracellular domains 2 and 3 of HER2" refers to the part of the HER2 sequence which consists of the amino acid residues of SEQ ID NO:9.

Further, in the context of the present disclosure, "consecutive amino acid residues from extracellular domains 2 and 3 of HER2" refers to a continuous part of the amino acid sequence of SEQ ID NO:9.

Also, in the context of the present disclosure, "selective interaction with a subset of amino acids" refers to selective interaction with the amino acids contained in the subset. For example, an affinity ligand capable of selective interaction with a subset of amino acids may be capable of selective interaction with a fragment consisting of the amino acids of the subset, which fragment may be present free in solution or immobilized, e.g. bound to a bead. Also, such fragment may be bound to reporter moieties for detection of interaction. As another example, "affinity ligand capable of selective interaction with a subset of amino acids" may refer to the case wherein the subset is comprised in a longer polypeptide, provided that it is established that the affinity ligand interacts with the amino acid residues of the subset and not the surrounding amino acid residues.

In the context of the present disclosure, "specific" or "selective" interaction of e.g., an affinity ligand with its target or antigen means that the interaction is such that a distinction between specific and non-specific, or between selective and non-selective, interaction becomes meaningful. The

5 interaction between two proteins is sometimes measured by the dissociation constant. The dissociation constant describes the strength of binding (or affinity) between two molecules. Typically the dissociation constant between an antibody and its antigen is from  $10^{-7}$  to  $10^{-11}$  M. However, high specificity does not necessarily require high affinity. Molecules with low affinity (in the

10 molar range) for its counterpart have been shown to be as specific as molecules with much higher affinity. In the case of the present disclosure, a specific or selective interaction refers to the extent to which a particular method can be used to determine the presence and/or amount of a specific protein, the target protein or a fragment thereof, under given conditions in the

15 presence of other proteins in a tissue sample or fluid sample of a naturally occurring or processed biological fluid. In other words, specificity or selectivity is the capacity to distinguish between related proteins. Specific and selective are sometimes used interchangeably in the present description. For example, the specificity or selectivity of an antibody may be determined as in

20 Examples, section 4, below, wherein analysis is performed using a protein array set-up and a western blot, respectively. Specificity and selectivity determinations are also described in Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5:4327-4337.

This first aspect of the present invention is based on, but not limited to, the inventors have found that affinity ligands binding to polypeptides consisting of amino acid sequences within extracellular domains 2 and 3 of HER2, in particular polypeptides comprising the sequences LQVF (SEQ ID NO:8) and/or ESFDGD (SEQ ID NO:9), have a growth inhibiting effect on human breast cancer cells.

30 A polypeptide fragment of 26 amino acids (SEQ ID NO:16), and shorter fragments, have been found to interact with antibodies exhibiting a growth inhibiting effect.

Accordingly, in embodiments of the first aspect, the subset may consist of 30 amino acids or less, such as 26 amino acid residues or less. Further, the subset may for example consist of 21 amino acid residues or less, such as 16 amino acid residues or less, such as 12 amino acid residues or less, 5 such as 9 amino acid residues or less, such as 8 amino acid residues or less.

A sufficient interaction between the affinity ligand and the subset may in some cases require amino acid sequences of various lengths. Accordingly, in embodiments of the first aspect, the subset may consist of 6 amino acids or more, such as 8 amino acids or more, such as 10 amino acids or more.

10 As shown in Examples below, the immunization yielding the antibodies having a growth inhibiting effect was performed using an antigen (SEQ ID NO:1) in which the last four amino acids at the C-terminal end were LQVF. Accordingly, in embodiments of the first aspect, if the subset comprises the sequence LQVF, it has 2 amino acids or less on the C-terminal side of LQVF, 15 such as no amino acids on the C-terminal side of LQVF.

A number of fragments (SEQ ID NO:11 and 15-20) have been found to interact with antibodies exhibiting a growth inhibiting effect, i.e. msAb-C (see Examples, section 3). Accordingly, in embodiments of the first aspect, said subset may be selected from the group consisting of SEQ ID NO:11 and 15-

20 20.

In further embodiments of the first aspect, the subset may comprise the sequence LQVF. In such embodiments, the subset may be selected from the group consisting of SEQ ID NO:16 and 20. SEQ ID NO:16 and 20 comprises LQVF.

25 In other embodiments of the first aspect, the subset may comprise the sequence ESFDGDP. In such embodiments, the subset may be selected from the group consisting of SEQ ID NO:11 and 15-19. SEQ ID NO:11 and 15-19 comprises ESFDGDP.

30 In embodiments of the first aspect, the subset may comprise the sequence PESFDGD (SEQ ID NO:10) or LPESFDGD (SEQ ID NO:11).

In embodiments of the first aspect, the subset may be the sequence of amino acids 1-37 of SEQ ID NO:6.

As further explained in Examples, section 5, below, the inventors have found that antibodies of the present disclosure may inhibit growth of breast cancer. Accordingly, in embodiments of the first aspect, the affinity ligand may inhibit growth of human breast cancer cells in culture. For example, the 5 affinity ligand may inhibit growth of human breast cancer cells in culture by 20-100%, such as by 30-100%, relative an affinity ligand not capable of selective interaction with the extracellular domain of HER2, such as an antibody capable of selective interaction with the intracellular domain of HER2. It is within the capabilities of the skilled artisan to perform 10 measurements yielding such relative growth inhibition value and to adapt the such measurements to a specific case.

As an example, the measurement of a relative inhibition may be performed by adding a certain concentration of the affinity ligand to a first culture of human breast cancer cells, such as BT474 breast cancer cells, and 15 the same concentration of an antibody capable of selective interaction with the intracellular domain of HER2, such as HPA001383 (Atlas Antibodies, Sweden), to a second culture of the same type of human breast cancer cells. After a certain time of incubation, such as 4 days, the number of cells in the respective culture is counted. The number of cells in the second culture is 20 considered as the reference, and the growth inhibition value of the affinity ligand is calculated relative that reference. That is, if the reference is 100 cells and the first culture contained 70 cells, the growth inhibition is  $(100-70)/100 = 30\%$ . See also Examples, Section 5, below.

Accordingly, the human breast cancer cells may for example be BT474 25 breast cancer cells. And further, the growth inhibition may for example be a growth inhibition at a concentration of 500 ng/ml.

As further explained in Examples, sections 4c and 4e, below, the inventors have shown that antibodies of the present disclosure may bind their targets at a low concentration. Accordingly, in embodiments of the first 30 aspect, the affinity ligand may binds the subset with an EC50 of less than 100 nM, such as less than 50 nM, such as less than 20 nM, such as less than 10 nM. Such EC50-measurements may for example be performed according to Examples, section 4c and 4e, below.

In embodiments of the first aspect, the affinity ligand may be an antibody or fragment or derivative thereof. Such antibodies may for example be generated according the Example sections of the present disclosure.

Examples of affinity ligands according to the first aspect are given 5 below ("Affinity ligands").

As a first configuration of the first aspect, there is provided an affinity ligand according to the first aspect for use as a medicament.

There are a number of disorders characterized by the overexpression of HER2, and affinity ligands binding the extracellular domain of HER2 may 10 be used as a medicament for treating or affecting the progression of such disorders.

Accordingly, as a second configuration of the first aspect, there is provided an affinity ligand according to the first aspect for treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized 15 by the overexpression of HER2. Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the first aspect are discussed below ("HER2 disorders").

It has been reported that in cancer patients treated with an anti-HER2 antibody, the cancer frequently develops resistance to the anti-HER2 20 antibody. Consequently, an affinity ligand targeting another part of the extracellular domain of HER2 than the anti-HER2 antibody may be suitable for further treatment of patients having such cancers.

Accordingly, in embodiments of the second configuration of the first aspect, the subject may have been treated by a therapeutic antibody capable 25 of selective interaction with HER2, such as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is different from the affinity ligand.

Further, in such embodiments, the disorder characterized by the overexpression of HER2 may for example be a cancer, such as a breast cancer, e.g., a metastatic breast cancer, that have developed resistance to 30 the therapeutic antibody.

For example, the therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2 may be trastuzumab or pertuzumab.

As a second aspect of the present invention, there is provided a composition comprising an affinity ligand according to the first aspect and a second affinity ligand capable of selective interaction with a second subset of 73 consecutive amino acid residues or less from extracellular domains 2 and 5 3 of HER2 (SEQ ID NO:7), said second subset comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 and/or SEQ ID NO:14.

This second aspect is based on, but not limited to, the inventors' insight of that a combination of antibodies targeting two different parts of extracellular domains 2 and 3 of HER2 may result in a greater growth 10 inhibiting effect than antibodies targeting only one of the parts. This is further discussed in Examples, section 5d-f, below.

Examples of second affinity ligands according to the second aspect are given below ("Affinity ligands").

In embodiments of the second aspect, the second subset may be 15 selected from the amino acid sequences of the group consisting of SEQ ID NO:21-35.

Further, in embodiments of the second aspect, the second subset may be 20 50 amino acid residues or less, such as 45 amino acid residues or less, such as 40 amino acid residues or less, such as 35 amino acid residues or less, such as 30 amino acid residues or less, such as 25 amino acid residues or less, such as 20 amino acid residues or less, such as 16 amino acid residues or less.

Also, the second subset of the embodiments of the second aspect may 25 for example be 8 amino acid residues or more, such as 10 amino acid residues or more.

In embodiments of the second aspect, the second subset may consist of amino acids 39-111 of the sequence SEQ ID NO:4.

As further explained in Examples, section 5d-f, below, the inventors have found that combinations of antibodies of the present disclosure may 30 inhibit growth of breast cancer. Accordingly, in embodiments of the second aspect, the composition may inhibit growth of human breast cancer cells in culture. For example, the composition may inhibit growth of human breast cancer cells in culture by 20-100%, such as by 30-100%, relative an affinity

ligand not capable of selective interaction with the extracellular domain of HER2, such as an antibody capable of selective interaction with the intracellular domain of HER2. It is within the capabilities of the skilled artisan to perform measurements yielding such relative growth inhibition value and to 5 adapt the such measurements to a specific case. The human breast cancer cells may for example be BT474 breast cancer cells. And further, the growth inhibition may for example be a growth inhibition at a concentration of 500 ng/ml.

As an example of the measurement of a relative inhibition is described 10 above in connection with the first aspect.

As further explained in Examples, sections 4c and 4e, below, the inventors have shown that antibodies of the present disclosure may bind their targets at a low concentration. Accordingly, in embodiments of the second aspect, the second affinity ligand may binds the second subset with an EC50 15 of less than 100 nM, such as less than 50 nM, such as less than 20 nM, such as less than 10 nM. Such EC50-measurements may for example be performed according to Examples, sections 4c and 4e, below.

In embodiments of the second aspect, the second affinity ligand may 20 be an antibody or fragment or derivative thereof. Such an antibody may for example be generated according the Example sections of the present disclosure. Other types of affinity ligands suitable for the second affinity ligand of the second aspect are discussed below.

In order to strengthen and/or prolong the effect of an affinity ligand according to the first aspect or a composition according to the second aspect 25 or to counteract the development of resistance, the affinity ligand or composition may be combined with a tyrosine kinase inhibitor targeted against HER2. Accordingly, as a variant of the second aspect, there is provided a composition comprising: an affinity ligand according to the first aspect or a composition according to the second aspect; and a tyrosine kinase inhibitor against HER2. The tyrosine kinase inhibitor against HER2 30 may for example be lapatinib, gefitinib or erlotinib.

As a first configuration of the second aspect, there is provided an composition according to the second aspect for use as a medicament.

There are a number of disorders characterized by the overexpression of HER2, and compositions comprising affinity ligands binding the extracellular domain of HER2 may be used as a medicament for treating or affecting the progression of such disorders.

5 Accordingly, as a second configuration of the second aspect, there is provided an composition according to the second aspect for treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2. Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the second aspect are discussed  
10 below ("HER2 disorders").

As mentioned above, it has been reported that in cancer patients treated with an anti-HER2 antibody, the cancer may develop resistance to the anti-HER2 antibody. Consequently, a composition comprising antibodies targeting other parts of the extracellular domain of HER2 than the anti-HER2  
15 antibody may be suitable for further treatment of patients having such cancers.

Accordingly, in embodiments of the second configuration of the second aspect, the subject may have been treated by a therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, such as the extracellular domain of HER2,

20 which therapeutic antibody is different from the affinity ligand and/or the second affinity ligand.

Further, in such embodiments, the disorder characterized by the overexpression of HER2 may for example be a cancer, such as a breast cancer, e.g., a metastatic breast cancer, that have developed resistance to  
25 the therapeutic antibody.

For example, the therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2 may be trastuzumab or pertuzumab.

As a third aspect of the present disclosure, there is provided an isolated polypeptide consisting of 37 consecutive amino acid residues or less from extracellular domains 2 and 3 of HER2 (SEQ ID NO:7) and comprising the amino acid sequence LQVF (SEQ ID NO:8) and/or ESFDGD (SEQ ID NO:9).

This third aspect of the present disclosure is based on, but not limited to, the inventors' insight of that certain parts of the extracellular domain of HER2 is particularly interesting, e.g. as a therapeutic target, and that fragments comprising or consisting of such parts may be utilized for 5 production, selection or purification of therapeutic means.

A polypeptide fragment of 26 amino acids (SEQ ID NO:16), and shorter fragments, such as a fragment of 21 amino acids (SEQ ID NO:19), have been found to interact with antibodies exhibiting a growth inhibiting effect.

Accordingly, in embodiments of the third aspect, the polypeptide may 10 consist of 31 amino acid residues or less, such as 26 amino acid residues or less, such as 21 amino acid residues or less, such as 16 amino acid residues or less, such as 12 amino acid residues or less, such as 9 amino acid residues or less, such as 8 amino acid residues or less.

A sufficient interaction between an affinity ligand, such as an affinity 15 ligand of the first aspect, and the polypeptide may in some cases require amino acid sequences of various lengths. Accordingly, in embodiments of the third aspect, the polypeptide may consist of 6 amino acids or more, such as 8 amino acids or more, such as 10 amino acids or more.

As shown in Examples, sections 1 and 2, below, the immunization 20 yielding the antibodies having a growth inhibiting effect was performed using an antigen (SEQ ID NO:1) in which the last four amino acids at the C-terminal end were LQVF. Accordingly, in embodiments of the third aspect, if the polypeptide comprises the sequence LQVF, it has 2 amino acids or less on the C-terminal side of LQVF, such as no amino acids on the C-terminal side 25 of LQVF.

A number of fragments (SEQ ID NO:11 and 15-20) have been found to 30 interact with antibodies exhibiting a growth inhibiting effect, i.e. msAb-C (see Examples, section 3). Accordingly, in embodiments of the third aspect, the polypeptide may be selected from the group consisting of the sequences SEQ ID NO:11 and 15-20.

In further embodiments of the third aspect, the polypeptide may comprise the sequence LQVF (SEQ ID NO:8). In such embodiments, the

polypeptide may be selected from the group consisting of sequences SEQ ID NO:16 and 20. SEQ ID NO:16 and 20 comprises LQVF.

5 In other embodiments of the third aspect, the polypeptide may comprise the sequence ESFDGDP (SEQ ID NO:9). In such embodiments, the polypeptide may be selected from the group consisting of SEQ ID NO:11 and 15-19.

10 In other embodiments of the third aspect, the polypeptide may comprise the sequence PESFDGD (SEQ ID NO:10) or LPESFDGD (SEQ ID NO:11).

15 In embodiments of the third aspect, the polypeptide may consist of the sequence of amino acids 1-37 of SEQ ID NO:6. That is a subsequence of SEQ ID NO:6 ending with LQVF.

15 As a configuration of the third aspect, there is provided a polypeptide according to the third aspect for use as an antigen, such as an antigen for an immunization, e.g. of a mammal not being a human.

20 As a related configuration thereof, there is provided a polypeptide according to the third aspect for use in the preparation of therapeutic antibodies, e.g. therapeutic antibodies for treatment of disorders characterized by overexpression of HER2. Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the third aspect are discussed below ("HER2 disorders").

25 As a fourth aspect of the present disclosure, there is provided a use of a polypeptide according to the third aspect as an antigen, such as an antigen for an immunization, e.g., an immunization of a mammal not being a human.

25 Uses and methods wherein a polypeptide according to the third aspect is used as an antigen are further discussed below.

30 As a first configuration of the fourth aspect, there is provided the use of a polypeptide according to the third aspect in the preparation of a therapeutic antibody, such as therapeutic monoclonal antibody, e.g., a therapeutic chimeric or humanized monoclonal antibody.

As an example, monoclonal antibodies may be made by fusing the spleen cells from a mouse that has been immunized with the polypeptide with myeloma cells. Further, rabbit B-cells may also be used for this purpose.

This mixture of cells may then be diluted, and clones may be grown from single parent cells. The antibodies secreted by the different clones may then be tested for their ability to bind to polypeptide and the most productive, and subsequently, a stable clone may be grown in culture medium to a high 5 volume.

For example, the DNA that encodes the binding portion of the monoclonal mouse antibodies from the stable clone may be merged with human antibody producing DNA. Mammalian cell cultures may then be used to express this DNA and produce half-mouse and half-human antibodies.

10 Depending on the size of the mouse antibody part, one talks about chimeric antibodies or humanized antibodies. As another example, mice genetically engineered to produce more human-like antibodies may be involved.

One reason for such merging with human antibody producing DNA or involvement of genetically engineered mice is to avoid that the human 15 immune system hence recognizes the antibodies as foreign.

These chimeric antibodies or humanized antibodies may then be used as therapeutic antibodies, e.g. for treatment of disorders characterized by overexpression of HER2.

As a second configuration of the fourth aspect, there is provided the 20 use of a polypeptide according to the third aspect for the selection or purification of an therapeutic affinity ligand for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2. Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the fourth aspect are discussed below ("HER2 disorders").

25 Examples of therapeutic affinity ligands according to the fourth aspect are given below ("Affinity ligands").

For example, such use may comprise affinity purification on a solid support onto which the polypeptide has been immobilized. The solid support may for example be arranged in a column. Further, the use may comprise 30 selection of affinity ligands having specificity for a polypeptide according to the third aspect using a soluble matrix in which the polypeptide has been immobilized. Such soluble matrix may for example be a dextran matrix, e.g., for use in a surface plasmon resonance instrument, such as Biacore™

instrument, and the selection may for example comprise monitoring the affinity for the immobilized polypeptide of a number of potential affinity ligands.

As a third configuration of the fourth aspect, there is provided the use 5 of a polypeptide according to the third aspect as a therapeutic target.

As a fifth aspect, there are provided uses of the affinity ligand.

As a first configuration of the fifth aspect, there is provided the use an affinity ligand according to the first aspect as a medicament.

As a second configuration of the fifth aspect, there is provided the use 10 of an affinity ligand according to first aspect for the manufacture of a medicament for treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2. Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the fifth aspect are discussed below ("HER2 disorders").

15 In embodiments of the second configuration of the fifth aspect, the subject may have been treated by an therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, such as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is different from the affinity ligand.

Also, in embodiments of the second configuration of the fifth aspect, 20 the disorder characterized by the overexpression of HER2 may be a cancer, such as a breast cancer, e.g., a metastatic breast cancer, that has developed resistance to the therapeutic antibody.

The subject-matter of the first and second configuration of the fifth 25 aspect is further discussed above in connection with the first and second configuration of the first aspect.

As a sixth aspect of the present disclosure, there is provided a method for identification of an affinity ligand for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2, comprising the steps of:

30 a) contacting a polypeptide according the third aspect with a putative affinity ligand in conditions that enable binding; and  
b) determining whether the putative affinity ligand binds to the polypeptide.

Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the sixth aspect are given below ("HER2 disorders").

Further, examples of affinity ligands according to the sixth aspect are given below ("Affinity ligands").

5 This sixth aspect is based on, but not limited to, the inventors' insight of that protein fragments corresponding to the identified target sequences of the extracellular domain of HER2 may be useful for identification or selection of therapeutic affinity ligands.

In embodiments of the sixth aspect wherein the disorder is a cancer, 10 such as a breast cancer, the method may further comprise the step:

c) determining whether the putative affinity ligand inhibits growth or induces apoptosis of cancer cells, such as breast cancer cells, e.g., BT474 breast cancer cells.

For example, the criterion of step c) may be that the putative affinity 15 ligand inhibits growth by 20 % or higher, such as 30 % or higher, as compared to an antibody targeting the intracellular part of HER2. For example, the putative affinity ligand may inhibit growth at a concentration of 250 or 500 ng/ml.

Such determination may for example be performed as in Examples, 20 section 5, below.

As a first configuration of the sixth aspect, there is provided a method for identification of one or more affinity ligands for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2, comprising the steps of:

a) contacting a polypeptide according to the third aspect 25 with one or more putative affinity ligands; and  
b) identifying affinity ligands that bind to the polypeptide.

As a second configuration of the sixth aspect, there is provided a method for producing a clone, e.g., expressing a therapeutic antibody for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2,

30 comprising:

a) providing cells obtained from a mammal which has been immunized with an antigen comprising a subset according to the first

aspect, which cells comprise DNA encoding an antibody capable of selective interaction with the subset; and

b) fusing said cells with myeloma cells to obtain at least one clone.

5 In the context of the present disclosure, "a clone" refers to a group of identical cells that share a common ancestry, meaning are derived from the same mother cell.

For example, step b) may comprise culturing.

10 In embodiments of the second configuration of the sixth aspect, the method further comprises the step:

a') immunizing the mammal with the antigen,  
wherein step a') precedes step a).

For example, the mammal of step a) may be a mammal not being a human.

15 Further, the cells provided in step a) may for example be spleen cells. Also, the mammal of step a) may for example be a mouse. Consequently, the cells provided in step a) may for example be spleen cells from a mouse.

Alternatively, the cells provided in step a) may for example be B-cells. Further, the mammal of step a) may for example be a rabbit. Consequently, 20 the cells provided in step may for example by rabbit B-cells.

In embodiments of the second configuration of the sixth aspect, the method may further comprise the step:

c) selecting a clone from step b) which secretes antibodies capable of selective interaction with the subset.

25 Further, in embodiments of the second configuration of the sixth aspect, the antigen may consist of a polypeptide according to the third aspect. In such embodiments, a clone which secretes antibodies capable of selective interaction with the antigen is selected, if the method comprises step c).

Also, in embodiments of the second aspect, the method may further 30 comprise the step:

d) providing a clone obtained in step b) or selected in step c), and merging DNA from the clone, which DNA encodes at least the

part of an antibody expressed by the clone that selectively interacts with the subset, with human antibody producing DNA; and

5 e) incorporating the merged DNA from step d) in cells to obtain a clone for expression of a therapeutic antibody for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2.

For example, step e) may comprise culturing.

The clone of step e) may for example be a mammalian cell line. The therapeutic antibodies expressed by the clone of step e) may for example be chimeric or humanized antibodies.

10 As a seventh aspect of the present disclosure, there is provided a method of treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2, comprising administrating an effective amount of an affinity ligand according to the first aspect or a composition according to the second aspect to the subject.

15 Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the seventh aspect are discussed below ("HER2 disorders").

20 In embodiments of the seventh aspect, the method may further comprise administrating a tyrosine kinase inhibitor against HER2 to the subject.

25 Further, in embodiments of the seventh aspect, the treatment may be a pre-surgical treatment. Consequently, e.g., a subject suspected of having a breast cancer or having a high risk of breast cancer recurrence or a subject having a breast cancer surgery scheduled may be treated according to the seventh aspect.

Alternatively, in embodiments of the seventh aspect, the treatment may be a post-surgical treatment.

In embodiments of the seventh aspect, the subject may have been treated by a therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, 30 such as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is different from the affinity ligand. Such therapeutic antibody may for example be trastuzumab or pertuzumab.

In embodiments of the seventh aspect, the disorder characterized by the overexpression of HER2 may be a cancer, such as a breast cancer, that has developed resistance to the therapeutic antibody.

As an eighth aspect of the present invention, there is provided an article of manufacture, comprising a container, a composition within the container comprising an affinity ligand according to the first aspect or a composition according to the second aspect and a label on or associated with the container that indicates that said composition can be used for treating a disorder characterized by the overexpression of HER2.

Examples of different disorders characterized by the overexpression of HER2 according to the eighth aspect are discussed below ("HER2 disorders").

As an ninth aspect of the present disclosure, there is provided an affinity ligand, which is the second affinity ligand of the second aspect.

As a configuration of the ninth aspect, there is provided the affinity ligand according to the ninth aspect for treatment of a disorder characterized of overexpression of HER2.

#### *Affinity ligands*

The affinity ligands according to the various embodiments of the above aspects of the present disclosure, such as the affinity ligand of the first aspect and the second affinity ligand of the second aspect, may be any type of affinity ligands.

Nevertheless, examples of such affinity ligands that may prove useful in the context of the present disclosure are given below.

Thus, in some embodiments of the above aspects, the affinity ligands may be independently selected from the group consisting of antibodies, fragments thereof and derivatives thereof, i.e., affinity ligands based on an immunoglobulin scaffold. For example, the antibodies may be isolated and/or mono-specific. Antibodies comprise monoclonal and polyclonal antibodies of any origin, including murine, rabbit, human and other antibodies, as well as chimeric antibodies comprising sequences from different species, such as partly humanized antibodies, e.g., partly humanized mouse antibodies. Polyclonal antibodies are produced by immunization of animals with the antigen of choice, whereas monoclonal antibodies of defined specificity can be produced using the hybridoma technology developed by Köhler and

Milstein (Köhler G and Milstein C (1976) *Eur. J. Immunol.* 6:511-519).

Antibody fragments and derivatives comprise Fab fragments, consisting of the first constant domain of the heavy chain (CH1), the constant domain of the light chain (CL), the variable domain of the heavy chain (VH) and the variable domain of the light chain (VL) of an intact immunoglobulin protein; Fv fragments, consisting of the two variable antibody domains VH and VL (Skerra A and Plückthun A (1988) *Science* 240:1038-1041); single chain Fv fragments (scFv), consisting of the two VH and VL domains linked together by a flexible peptide linker (Bird RE and Walker BW (1991) *Trends Biotechnol.* 9:132-137); Bence Jones dimers (Stevens FJ *et al.* (1991) *Biochemistry* 30:6803-6805); camelid heavy-chain dimers (Hamers-Casterman C *et al.* (1993) *Nature* 363:446-448) and single variable domains (Cai X and Garen A (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:6280-6285; Masat L *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:893-896), and single domain scaffolds like

e.g., the New Antigen Receptor (NAR) from the nurse shark (Dooley H *et al.* (2003) *Mol. Immunol.* 40:25-33) and minibodies based on a variable heavy domain (Skerra A and Plückthun A (1988) *Science* 240:1038-1041).

Antibodies, as well as their fragments and derivatives, represent the traditional choice of affinity ligands in therapeutic applications. However,

those of skill in the art know that, due to the increasing demand of high throughput generation of selective binding ligands and low cost production systems, new biomolecular diversity technologies have been developed during the last decade. This has enabled a generation of novel types of affinity ligands of both immunoglobulin as well as non-immunoglobulin origin that may be useful as binding ligands in e.g. therapeutic applications and can be used instead of, or together with, immunoglobulins.

The biomolecular diversity needed for selection of affinity ligands may be generated by combinatorial engineering of one of a plurality of possible scaffold molecules, and specific and/or selective affinity ligands are then selected using a suitable selection platform. The scaffold molecule may be of immunoglobulin protein origin (Bradbury AR and Marks JD (2004) *J. Immunol. Meths.* 290:29-49), of non-immunoglobulin protein origin (Nygren PÅ and Skerra A (2004) *J. Immunol. Meths.* 290:3-28), or of an oligonucleotide origin (Gold L *et al.* (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64:763-797).

A large number of non-immunoglobulin protein scaffolds have been used as supporting structures in development of novel binding proteins. Non-limiting examples of such structures, useful for generating affinity ligands

against the relevant HER2 subsets are staphylococcal protein A and domains thereof and derivatives of these domains, such as protein Z (Nord K *et al.*

(1997) *Nat. Biotechnol.* 15:772-777); lipocalins (Beste G *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1898-1903); ankyrin repeat domains (Binz HK *et al.*

5 (2003) *J. Mol. Biol.* 332:489-503); cellulose binding domains (CBD) (Smith

GP *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 277:317-332; Lehtiö J *et al.* (2000) *Proteins*

41:316-322);  $\gamma$  crystallines (Fiedler U and Rudolph R, WO01/04144); green

fluorescent protein (GFP) (Peelle B *et al.* (2001) *Chem. Biol.* 8:521-534);

human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) (Hufton SE *et*

10 *al.* (2000) *FEBS Lett.* 475:225-231; Irving RA *et al.* (2001) *J. Immunol. Meth.* 248:31-45); protease inhibitors, such as Knottin proteins (Wentzel A *et al.*

(2001) *J. Bacteriol.* 183:7273-7284; Baggio R *et al.* (2002) *J. Mol. Recognit.*

15 15:126-134) and Kunitz domains (Roberts BL *et al.* (1992) *Gene* 121:9-15;

Dennis MS and Lazarus RA (1994) *J. Biol. Chem.* 269:22137-22144); PDZ

20 domains (Schneider S *et al.* (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:170-175); peptide

aptamers, such as thioredoxin (Lu Z *et al.* (1995) *Biotechnology* 13:366-372;

Klevenz B *et al.* (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1993-1998); staphylococcal

nuclease (Norman TC *et al.* (1999) *Science* 285:591-595); tendamistats

(McConell SJ and Hoess RH (1995) *J. Mol. Biol.* 250:460-479; Li R *et al.*

25 (2003) *Protein Eng.* 16:65-72); trinectins based on the fibronectin type III

domain (Koide A *et al.* (1998) *J. Mol. Biol.* 284:1141-1151; Xu L *et al.* (2002)

Chem. Biol. 9:933-942); and zinc fingers (Bianchi E *et al.* (1995) *J. Mol. Biol.*

247:154-160; Klug A (1999) *J. Mol. Biol.* 293:215-218; Segal DJ *et al.* (2003)

Biochemistry 42:2137-2148).

25 The above-mentioned examples of non-immunoglobulin protein scaffolds include scaffold proteins presenting a single randomized loop used for the generation of novel binding specificities, protein scaffolds with a rigid secondary structure where side chains protruding from the protein surface are randomized for the generation of novel binding specificities, and scaffolds

30 exhibiting a non-contiguous hyper-variable loop region used for the generation of novel binding specificities.

In addition to non-immunoglobulin proteins, oligonucleotides may also be used as affinity ligands. Single stranded nucleic acids, called aptamers or decoys, fold into well-defined three-dimensional structures and bind to their target with high affinity and specificity (Ellington AD and Szostak JW (1990) *Nature* 346:818-822; Brody EN and Gold L (2000) *J. Biotechnol.* 74:5-13; Mayer G and Jenne A (2004) *BioDrugs* 18:351-359). The oligonucleotide

ligands can be either RNA or DNA and can bind to a wide range of target molecule classes.

For selection of the desired affinity ligand from a pool of variants of any of the scaffold structures mentioned above, a number of selection platforms are available for the isolation of a specific novel ligand against a target protein of choice. Selection platforms include, but are not limited to, phage display (Smith GP (1985) *Science* 228:1315-1317), ribosome display (Hanes J and Plückthun A (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:4937-4942), yeast two-hybrid system (Fields S and Song O (1989) *Nature* 340:245-246), yeast display (Gai SA and Wittrup KD (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17:467-473), mRNA display (Roberts RW and Szostak JW (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-12302), bacterial display (Daugherty PS (2007) *Curr Opin Struct Biol* 17:474-480, Kronqvist N *et al.* (2008) *Protein Eng Des Sel* 1-9, Harvey BR *et al.* (2004) *PNAS* 101(25):913-9198), microbead display (Nord O *et al.* (2003) *J Biotechnol* 106:1-13, WO01/05808), SELEX (System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk C and Gold L (1990) *Science* 249:505-510) and protein fragment complementation assays (PCA) (Remy I and Michnick SW (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:5394-5399).

Thus, in embodiments of the above aspects, the affinity ligands may be independently be a non-immunoglobulin affinity ligand derived from any of the protein scaffolds listed above, or an oligonucleotide molecule.

#### *HER2 disorders*

In embodiments of the above aspects (aspects one to eight), the disorder characterized by the overexpression of HER2 may be a cancer.

Further, in embodiments of the above aspects, the cancer may be the selected from the group consisting of breast cancer, squamous cell carcinoma, lung cancer, such as small cell or non-small cell lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, vulval cancer, liver cancer, hepatoma, colorectal cancer, such as colon cancer, endometrial carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, thyroid cancer, Wilm's tumor, bladder cancer, endometrial cancer, renal cancer, head and neck cancer, gastric cancer, esophageal cancer and prostate cancer.

For example, the cancer may be selected from the group consisting of breast cancer, lung cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer and Wilm's tumor.

5 The Her2 gene ha been reported to be overexpressed in about 20% of all, and in up to 70% of lowly differentiated, breast cancers. Also, the efficiency of anti-HER2 treatment of breast cancer subjects, e.g. subjects having metastatic breast cancer, have been well studied.

10 Accordingly, in embodiments of the above aspects, the disorder characterized by the overexpression of HER2 may be a breast cancer. For example, the breast cancer may be a metastatic breast cancer.

#### Brief description of the figures

Figure 1 shows affinity purification and specificity analyses.

15 1a shows a schematic drawing of the setup for serial selective affinity purification. Polyclonal antibodies raised against the full antigen (SEQ ID NO:1) were split into four specific populations, an C-terminal fraction (Ab-C), a middle fraction (Ab-M), an N-terminal fraction (Ab-N) and finally a full antigen column were connected to collect possible structural epitops (Ab-S).

20 1b shows analysis of binding specificity using a Luminex bead array system with 100 protein targets revealed high specificity for all purified fractions. All interactions of significance are summarized in this table.

25 1c shows a Luminex bead array competition assay used for estimation of relative affinities of the mono-specific antibodies purified. The interaction between mono-specific antibody and the full antigen (SEQ ID NO:1) immobilized on the bead surface was challenged using an increasing concentration of soluble full antigen (SEQ ID NO:1) as competitor protein fragment.

30 Figure 2 shows the result of Fluorescence Activated Cell Sorting of BT474 cells. Fluorescence of unlabeled cells (1a) and cells labeled with Ab-Intra (1b), Ab-866 (1c), Ab-N (1d), Ab-M (1e), Ab-C (1f), Ab-S (1g) and trastuzumab (1h), were evaluated respectively. Enriched populations with higher fluorescence over unlabeled cells were observed for msAb-866, msAb-N and msAb-C indicating cell binding, whereas no significant enrichment in fluorescence was seen for msAb-intra or msAb-M.

35 Figure 3 shows a dose-response study where BT474 cells were treated with an increasing amount of msAb-866.

Figure 4 shows a growth inhibition study of BT474 cells using 500ng/ml of msAb-Intra, msAb-M, msAb-N, msAb-C, msAb-CNM, msAb-866 and msAb-NC, respectively. The presented "Effect" values are relative treated with msAb-Intra, msAb-N, msAb-C, msAb-CNM, msAb-866 and msAb-NC showed between 14% and 39% cell growth inhibition effect.

Figure 5 shows a growth inhibition study of BT474 cells using 500ng/ml of msAb-M, msAb-Intra, msAb-N, trastuzumab, msAb-C and msAb-866, respectively. The presented "Effect" values are relative treated with msAb-Intra.

10

Generation of mono-specific antibodies against HER2 and studies of their interaction with various HER fragments and impact on cancerous cells

1. Generation of antigen

15 a) Materials and methods

A suitable fragment of the target protein encoded by the EnsEMBL Gene ID ENSG00000141736 was selected using bioinformatic tools with the human genome sequence as template (Lindskog M et al (2005) Biotechniques 38:723-727, EnsEMBL, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). The fragment was used as template for the production of a 127 amino acid long fragment corresponding to amino acids 274-400 (SEQ ID NO:1) of the HER2 protein (SEQ ID NO:2; EnsEMBL entry no. ENSP00000269571). The protein fragment was designed to consist of a unique sequence with low sequence similarity to other human proteins, to minimize unwanted cross reactivity of generated affinity reagents, and still be of a suitable size to allow formation of conformational epitopes and allow efficient expression in bacterial systems.

A fragment of the HER2 gene transcript containing nucleotides 1058–1438 of EnsEMBL entry number ENST00000269571 (SEQ ID NO:3), was isolated using Superscript™ One-Step RT-PCR amplification kit with

30 Platinum® Taq (Invitrogen) and a human total RNA pool panel as template (Human Total RNA Panel IV, BD Biosciences Clontech). Flanking restriction sites NotI and Ascl were introduced into the fragment through the PCR amplification primers to allow in-frame cloning into the expression vector (forward primer: TACAACACAGACACGTTGAG, biotinylated reverse primer: AACACTTGGAGCTGCTCTG). Resulting biotinylated PCR product was immobilized onto Dynabeads M280 Streptavidin (Dynal Biotech) (Larsson M et al (2000) J. Biotechnol. 80:143-157) and subjected to Not-Ascl digestion

(New England Biolabs) on solid support by NotI-Ascl digestion, ligated into the pAff8c vector (Larsson M et al, *supra*) in frame with a N-terminal dual affinity tag consisting of a hexahistidyl tag for immobilized metal ion chromatography (IMAC) purification and an immunopotentiating albumin binding protein (ABP) from streptococcal protein G (Sjölander A et al (1997) *J. Immunol. Methods* 201:115-123; Ståhl S et al (1999) *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (Fleckinger MC and Drew SW, eds) John Wiley and Sons Inc., New York, pp 49-63), and transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells (Novagen). The sequences of the clones were verified by dye-terminator cycle sequencing of plasmid DNA amplified using TempliPhi DNA sequencing amplification kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's recommendations.

BL21(DE3) cells harboring the expression vector were inoculated in 100 ml 30 g/l tryptic soy broth (Merck KGaA) supplemented with 5 g/l yeast extract (Merck KGaA) and 50 mg/l kanamycin (Sigma-Aldrich) by addition of 1 ml of an overnight culture in the same culture medium. The cell culture was incubated in a 1 liter shake flask at 37 °C and 150 rpm until the optical density at 600 nm reached 0.5-1.5. Protein expression was then induced by addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (Apollo Scientific) to a final concentration of 1 mM, and the incubation was continued overnight at 25 °C and 150 rpm. The cells were harvested by centrifugation at 2400 g, and the pellet was re-suspended in 5 ml lysis buffer (7 M guanidine hydrochloride, 47 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.65 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 mM β-mercaptoethanol; pH = 8.0) and incubated for 2 hours at 37 °C and 150 rpm. After centrifugation at 35300 g, the supernatant containing the denatured and solubilized protein was collected.

The His6-tagged fusion protein was purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) on columns with 1 ml Talon® metal (Co<sup>2+</sup>) affinity resin (BD Biosciences Clontech) using an automated protein purification procedure (Steen J et al (2006) *Protein Expr. Purif.* 46:173-178) on an ASPEC XL4™ (Gilson). The resin was equilibrated with 20 ml denaturing washing buffer (6 M guanidine hydrochloride, 46.6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8.0-8.2). Clarified cell lysates were then added to the column. Thereafter, the resin was washed with a minimum of 31.5 ml washing buffer prior to elution in 2.5 ml elution buffer (6 M urea, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 30 mM acetic acid, 70 mM Na-acetate, pH

5.0). The eluted material was fractioned in three pools of 500, 700 and 1300  $\mu$ l. The 700  $\mu$ l fraction, containing the antigen, and the pooled 500 and 1300  $\mu$ l fractions were stored for further use.

5 The antigen fraction was diluted to a final concentration of 1 M urea  
with phosphate buffered saline (PBS; 1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  
154 mM NaCl) followed by a concentration step to increase the protein  
concentration using Vivapore 10/20 ml concentrator with molecular weight cut  
off at 7500 Da (Vivascience AG). The protein concentration was determined  
using a bicinchoninic acid (BCA) micro assay protocol (Pierce) with a bovine  
10 serum albumin standard according to the manufacturer's recommendations.  
The protein quality was analyzed on a Bioanalyzer instrument using the  
Protein 50 or 200 assay (Agilent Technologies).

b) Results

15 A gene fragment corresponding to nucleotides 1058–1438 of the long  
transcript (SEQ ID NO:3) of the HER2 gene and encoding a peptide (SEQ ID  
NO:1) consisting of amino acids 274-400 of the target protein HER2 (SEQ ID  
NO:2) was successfully isolated by RT-PCR from a human RNA pool using  
primers specific for the protein fragment.

20 A clone encoding the correct amino acid sequence was identified, and,  
upon expression in *E. coli*, a single protein of the correct size was produced  
and subsequently purified using immobilized metal ion chromatography. After  
dilution of the eluted sample to a final concentration of 1 M urea and  
concentration of the sample to 1 ml, the concentration of the protein fragment  
25 was determined to be 8.593 mg/ml and was 99.5 % pure according to purity  
analysis.

2. Generation of antibodies

a) Materials and methods

30 The purified HER2 fragment as obtained above was used as antigen to  
immunize a rabbit in accordance with the national guidelines (Swedish permit  
no. A 84-02). The rabbit was immunized intramuscularly with 200  $\mu$ g of  
antigen in Freund's complete adjuvant as the primary immunization, and  
boosted three times in four weeks intervals with 100  $\mu$ g antigen in Freund's  
35 incomplete adjuvant.

Antiserum from the immunized animal was purified by a three-step  
immunoaffinity based protocol (Agaton C et al (2004) *J. Chromatogr. A*

1043:33-40; Nilsson P et al (2005) Proteomics 5:4327-4337). In the first step, 7 ml of total antiserum was buffered with 10x PBS to a final concentration of 1x PBS (1.9 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 154 mM NaCl), filtered using a 0.45 µm pore-size filter (Acrodisc®, Life Science) and applied to an affinity column containing 5 ml N-hydroxysuccinimide-activated Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) coupled to the dual affinity tag protein His6-ABP (a hexahistidyl tag and an albumin binding protein tag) expressed from the pAff8c vector and purified in the same way as described above for the antigen protein fragment. In the second step, the flow-through, depleted of antibodies against the dual affinity tag His6-ABP, was loaded at a flow rate of 0.5 ml/min on a 1 ml Hi-Trap NHS-activated HP column (GE Healthcare) coupled with the HER2 protein fragment used as antigen for immunization (SEQ ID NO:1). The His6-ABP protein and the protein fragment antigen were coupled to the NHS activated matrix as recommended by the manufacturer. Unbound material was washed away with 1x PBST (1x PBS, 0.1 % Tween20, pH 7.25), and captured antibodies were eluted using a low pH glycine buffer (0.2 M glycine, 1 mM EGTA, pH 2.5). The eluted antibody fraction was collected automatically, immediately after elution, relevant fractions were pooled and pH adjusted to 7.25 using 1M Tris-HCl and 10xPBS. The pooled fractions was denoted msAb-866.

b) Results

See section 3b below.

25 3. Generation of region specific antibodies

a) Materials and methods

Three fragments of the target protein encoded by the EnsEMBL Gene ID ENSG00000141736 (EnsEMBL, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) were selected for suitable overlaps with the protein fragment used for immunization (SEQ ID NO:1). These three protein fragments, corresponding to amino acids 236-363 (SEQ ID NO:4), 347-492 (SEQ ID NO:5) and 364-530 (SEQ ID NO:6) of the HER2 protein (SEQ ID NO:2; EnsEMBL entry no. ENSP00000269571), were produced in analogous way to the protein fragment used for immunization (SEQ ID NO:1) as described above.

35 10 ml raw serum from the same immunization as described in 2a) was buffered in PBS, sterile filtered and depleted from Tag-specific His6-ABP antibodies using same protocol as above (Larsson et al., 2006). Depleted

flow-through antibodies were affinity purified using an Äkta Explorer (GE Health Care AB) system with four serially connected affinity 1ml HiTrap columns in the following order, C-terminal (SEQ ID NO:6), middle (SEQ ID NO:5), N-terminal (SEQ ID NO:4) and full antigen column (SEQ ID NO:1) (Fig 5 1a). Antibodies were loaded on to the columns at a speed of 0.5 ml/min, unbound material was washed away with 20 column volumes of washing buffer. Bound antibodies were fractionated into 250ul fractions after separate elution under low pH (Larsson et al., 2006). Immediately after elution relevant fractions were pooled and pH adjusted to 7.25 using 1M Tris-HCl and 10 10xPBS. No glycerol or NaN3 was added in order to not interfere with subsequent studies. The pooled fractions from respective column were denoted respectively: antibodies eluted from C-terminal column (SEQ ID NO:6) were denoted msAb-C, antibodies eluted from middle column (SEQ ID NO:5) were denoted msAb-M, antibodies eluted from, N-terminal (SEQ ID NO:4) were denoted msAb-N and antibodies eluted from full antigen column (SEQ ID NO:1) were denoted msAb-S.

b) Results

In brief four affinity columns with specific protein sequence 20 corresponding to the C-terminal, middle and N-terminal part, respectively, of the protein fragment used for immunization as well as the full antigen fragment (SEQ ID NO:1) were serially coupled to enable selective affinity chromatography. The method enabled separation of the antigen specific antibodies to be split into four distinct antibody populations: msAb-N (18% of 25 the population), msAb-M (35% of the population), msAb-C (39% of the population), msAb-S (8% of the population) (Fig 1a).

4. Validation of affinity purification

a) Protein arrays

30 The specificity and selectivity of the affinity purified antibody fraction were analyzed by binding analysis against the antigen itself, including the protein fragment used for immunization (SEQ ID NO:1) and protein fragments overlapping it (SEQ ID NO:4-6), and against 92 other human protein fragments in a protein array set-up (Nilsson P et al (2005) Proteomics 5:4327-35 4337). The protein fragments were diluted to 40 µg/ml in 0.1 M urea and 1x PBS (pH 7.4) and 50 µl of each were transferred to the wells of a 96-well spotting plate. The protein fragments were spotted in duplicate and

immobilized onto epoxy slides (SuperEpoxy, TeleChem) using a pin-and-ring arrayer (Affymetrix 427). The slide was washed in 1x PBS (5 min) and the surface was then blocked (SuperBlock®, Pierce) for 30 minutes. An adhesive 16-well silicone mask (Schleicher & Schuell) was applied to the glass before 5 the mono-specific antibodies were added (diluted 1:5000 in 1x PBST to appr. 50 ng/ml) and incubated on a shaker for 60 min. Affinity tag-specific IgY antibodies were co-incubated with the mono-specific antibodies in order to quantify the amount of protein in each spot. The slide was washed with 1x PBST and 1x PBS twice for 10 min each. Secondary antibodies (goat anti- 10 rabbit antibody conjugated with Alexa 647 and goat anti-chicken antibody conjugated with Alexa 555, Molecular Probes) were diluted 1:60000 to 30 ng/ml in 1x PBST and incubated for 60 min. After the same washing procedure, as for the first incubation, the slide was spun dry and scanned (G2565BA array scanner, Agilent); thereafter images were quantified using 15 image analysis software (GenePix 5.1, Axon Instruments).

b) Suspension bead arrays

In addition, specificity, selectivity and relative affinities were analyzed using a Luminex suspension bead array system. Multiplexed analysis of 20 binding specificities was performed as previously described (Schwenk et al., 2007). In short, antibody dilutions and a bead mixture of 100 bead IDs corresponding to 98 protein fragments, including the antigen used for immunization (SEQ ID NO:1) and the three fragments used for sub-purification antigens(SEQ ID NO:4-6), one HisABP fragment and one anti- 25 rabbit IgG antibody were prepared in PBST. 45 µl of msAb dilutions were added to 5 µl of beads and incubated for 60 min under constant mixing in a 96 well plate (Corning). Subsequently, 25 µl of R-Phycoerythrin labeled anti-rabbit IgG antibody (0.5 µg/ml, Jackson ImmunoResearch) or were added for a final incubation of 60 min.

30

c) Multiplexed competition assays

Serial dilutions of competitor protein fragments were prepared in PBST and mixed at a 1:1 ratio with solutions of msAb-866, msAb-N, msAb-M and msAb-C. Incubation took place in a total volume of 50 µl for 60 min under 35 permanent mixing. Subsequently, the msAb-PrEST solutions were transferred to a second plate containing 5 µl of bead mixtures per well. After 60 min 25 µl of R-Phycoerythrin labeled anti-rabbit IgG antibody (0.5 µg/ml, Jackson

ImmunoResearch) were added incubated for another 60 min. Three independent replicates were performed and average values of those were used for data analysis. A four parameter logistical function was chosen for fitting competition curves to calculate EC50 values and to compare relative 5 binding qualities. As a measure for competition, resulting curves were observed upon their shape and their estimated EC50 values that had to be of a greater number value than the standard error.

d) Suspension array read-out and data analysis

10 Measurements were performed using Luminex LX200 instrumentation with Luminex IS 2.3 software. For each experiment 100 events per bead ID were counted and the median fluorescence intensity (MFI) of was chosen to display interactions. Data analysis and graphical representations were performed with R, a language and environment for statistical computing and 15 graphics (Ihaka and Gentleman, 1996).

e) Results

To validate antibody specificity and selectivity after affinity purification, a protein microarray analysis was performed using both planar arrays and 20 Luminex suspension bead array technology. The analysis validated a successful depletion of antibodies directed against His6-tag and ABP-tag (results not shown) as well as ensured highly specific antibodies possessing low potential unspecific interactions with other protein fragments immobilized (Fig 1b).

25 To quantify the amount of protein in each spot of the protein array, a two-color dye labeling system was used, with a combination of primary and secondary antibodies. Tag-specific IgY antibodies generated in hen were detected with a secondary goat anti-hen antibody labeled with Alexa 555 fluorescent dye. The specific binding of the rabbit msAb to its antigen on the 30 array was detected with a fluorescently Alexa 647 labeled goat anti-rabbit antibody. Each protein fragment was spotted in duplicates. The protein array analysis using planar and suspension bead array showed that the affinity purified mono-specific antibodies; msAb-866, msAb-N, msAb-M, msAb-C, ms-Ab-S against HER2, were highly selective to the correct protein fragments 35 and have a very low background to all other protein fragments analyzed. In addition relative affinities were determined using a competition assay, where the interaction between mono-specific antibody and immobilized full antigen

(SEQ ID NO:1) protein fragment on bead is challenged using an increasing concentration of soluble full antigen (SEQ ID NO:1) competitor protein fragment (Fig 1c, table 1). An apparent affinity in the low nanomolar range was determined for antibodies; msAb-866 (1.9 nM), msAb-N (4.5 nM), msAb-M (0.7 nM) and msAb-C (1.2 nM), when their interaction to beads coupled to protein fragment used in immunization (SEQ ID NO:1) was challenged with soluble protein fragment (SEQ ID NO:1).

Table 1: Relative affinities	
Protein fragment	EC50
Ab-866	1.9 nM
Ab-C	1.2 nM
Ab-M	0.7 nM
Ab-N	4.5 nM

10 5. Cell study

a) Cell Culture

BT474 breast cancer cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and maintained in RPMI supplemented with 10% FCS and 1% Bovine Insulin and kept in 37°C at 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere.

b) Cell binding assay

Cells were released from culture dish by trypsinization, centrifuged and resuspended in PBS:HSA (PBS pH 7.2 supplemented with 1% Human Serum Albumin) and counted. 150000 cells were labelled for 45min with 0.35 microgram antibody (msAb-N, msAb-M, msAb-C and msAb-866) in a reaction volume of 75 microlitre in a 96-wellplate in room temperature. Unbound antibodies was washed away using 2x100 microlitre PBS:HSA as washing agent. This was followed by antibody labelling using 0.35 microgram secondary goat anti-rabbit monoclonal antibody (Invitrogen) conjugated to Alexa 488 in a reaction volume of 75 microlitre for 45min at room temperature. Cells were washed in PBS:HSA 2x 100 microlitre and resuspended in a sample tube to a final volume of 150ul. Ability for antibodies to bind BT474 cells was evaluated by fluorescence activated cell sorting using a BD FACS Vantage SE flowcytometer (BD Biosciences) measuring fluorescence emission at FL-1 (excitation at 488 nm). Equimolar amounts of

5 rabbit mono-specific antibody (msAb-intra) targeting the intracellular part of HER2 (HPA001383, Atlas Antibodies AB, Sweden) was used as negative control along with cells labelled only with secondary antibodies. Trastuzumab (Herceptin, Roche) was used as positive cell labeling control using Alexa 488 goat anti-human monoclonal antibodies (Invitrogen) as secondary reagent.

c) Dose-Response Studies

10 BT474 cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well dishes. After 24 h, cells were treated in triplicate dilutions of msAb-866 in concentrations ranging from 1 ng/ml to 1000 ng/ml. Cells treated with PBS pH 7.2 was used as control. After 5 days, cells were trypsinized and counted three times each. Growth inhibition was calculated as percentage of cells compared with untreated cultures.

15 d) First growth inhibition study

BT474 cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well dishes at day 0. Two reconstitution mixes of antibodies were made using fraction ratios obtained in 3b): msAb-N and msAb-C were mixed at 18:39 ratio denoted msAb-NC; and msAb-N, msAb-M and msAb-C were mixed at a 18:35:39 ratio denoted msAb-NMC. After 24h, cells were treated in triplicate dilutions of msAb-866, msAb-N, msAb-M, msAb-C, msAb-NC and msAb-NMC using a final antibody concentration of 500 ng/ml. msAb-intra and PBS pH 7.2 were used as controls. After 5 days, cells were trypsinized and counted three times each. Growth inhibition was calculated as percentage of cells as compared to cultures treated with the control antibody msAb-intra.

e) Second growth inhibition study

30 BT474 cells were seeded at day 1 in triplicates at  $5 \times 10^4$  cells/well together with dilutions of msAb-866, msAb-C, and Trastuzumab using a final antibody concentration of 500 ng/ml. msAb-intra and PBS pH 7.2 were used as controls. After 4 days, cells were trypsinized and counted three times each. Growth inhibition was calculated as percentage of cells as compared to cultures treated with the control antibody msAb-intra.

35 f) Results

The Fluorescence Activated Cell Sorting of BT474 cells labeled with msAb-866, msAb-N and msAb-C showed an enriched population with higher

fluorescence over unlabeled cells, indicating cell binding whereas no significant fluorescence enrichment was seen for msAb-intra or msAb-M (Fig 2).

5 A critical antibody concentration of 250-500ng/ml for significant influence on cell growth was seen at day 5 in the dose-response study treating BT474 cells with msAb-866 (Fig 3).

10 In the first growth inhibition study of BT474 cells using 500ng/ml of respective antibody, msAb-M showed 1% growth inhibition effect, msAb-N showed 14% growth inhibition effect, msAb-C showed 30% growth inhibition effect, msAb-NMC showed 33% growth inhibition effect, msAb-866 showed 36% growth inhibition effect, msAb-NC showed 39 % growth inhibition effect (Fig 4).

15 Consequently, both Ab-N and Ab-C taken alone showed a substantial effect. Combinations comprising Ab-N and Ab-C also showed a substantial effect. Further, it has been noted by the inventors that all the antibody samples that showed a high effect ( $\geq 30\%$ ) comprised Ab-C.

Also, the samples containing both Ab-C and Ab-N generally showed a higher effect as compared to either Ab-C or Ab-N taken alone.

20 The highest effect was observed for a sample containing Ab-C and Ab-N.

In the second growth inhibition study of BT474 cells at day 4 using 500ng/ml of respective antibody, Ab-866 showed about 41% , Ab-C about 26 %, trastuzumab about 18% and Ab-N about 5 % growth inhibition effect relative to msAb-intra (Fig 5).

25 Further, it has been noted by the inventors that Ab-C and Ab-866 in this setup showed a higher effect than trastuzumab (Herceptin), which is an approved therapeutic antibody targeting the extracellular domain of HER2. This indicates that an antibody targeting the HER2 subset of amino acids 1-37 of SEQ ID NO:6, or a composition comprising antibodies targeting the 30 HER2 subset of amino acids 1-37 of SEQ ID NO:6 and the HER2 subset of amino acids 39-111 of SEQ ID NO:4, respectively, may be used for treatment of disorders characterized by the overexpression of HER2.

35 The highest effect was observed for Ab-866, which contains both Ab-C and Ab-N.

## 6. Epitope mapping using bacterial display

## a) Subcloning of libraries into the staphylococcal display vector

The *E. coli* strain RR1ΔM15(Rüther, U. pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. Nucleic. Acids Res. 10, 5765-5772 (1982)) was used as host strain for plasmid constructions. A new

- 5 staphylococcal vector, pSCEM1, was created by ligating a gene fragment containing a new restriction site (Pmel) to the previously described staphylococcal vector pSCXm (Wernérus, H. & Ståhl, S. Vector engineering to improve a staphylococcal surface display system. FEMS Microbiol Lett 212, 47-54 (2002).) digested with BamHI and Sall (New England Biolabs, 10 Beverly, MA). Template for amplification of HER2-ECD with N-terminal FLAG sequence was obtained. The gene-fragment was amplified by PCR (9.6 ml, pooled) and sonicated (21% amplitude, constant sonication) using a microtip for 60 min in a 50 ml Falcon tube on ice in order to generate random fragments. Samples were thereafter concentrated by ultrafiltration using 15 Centricon Plus 20 column (CO 10 kDa; Millipore, Billerica, MA). Concentrated fragments were blunt-ended and phosphorylated by addition of T4 DNA polymerase and T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) according to the supplier's recommendations. The blunt-ended gene fragments were thereafter ligated using T4 DNA Ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA) into the 20 staphylococcal display vector, pSCEM1, digested with Pmel (New England Biolabs). The library was transformed to electrocompetent *S. carnosus* TM300(Götz, F. *Staphylococcus carnosus*: a new host organism for gene cloning and protein production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19, 49S-53S (1990)) as described previously(Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, 25 S. & Wernérus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. J Appl Microbiol 102, 736-747 (2007)) and stored in 15% glycerol at -80 °C.

## b) Cell labeling and fluorescence-activated cell sorting (FACS)

- 30 An aliquot of Sc:HER2-lib or Sc:Ephrin-B3-lib (at least ten times the library size) was inoculated to 100 ml TSB+Y (Tryptic soy broth + yeast extract) with 20 µg ml-1 chloramphenicol and grown over night at 37 °C and 150 rpm. After 16 hours, 107 cells were washed with 1 ml phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) with 0.1% Pluronic® F108 NF Surfactant (PBSP; BASF Corporation, 35 Mount Olive, NJ). The cells were pelleted by centrifugation (3500xg, 4 °C, 6 min) and resuspended in 100 µl PBSP containing antibody (i.e. the antibody used for epitope mapping; typically at a concentration around 100 nM) and

incubated at room temperature with gentle mixing for 1 hour to reach equilibrium binding. The cells were thereafter washed with 1 ml of ice-cold PBSP followed by incubation in 1 ml PBSP containing 4 µg ml-1 Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG or 4 µg ml-1 Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG

5 (Invitrogen) and 225 nM Alexa Fluor® 647 HSA conjugate for 1 hour on ice in the dark. After a final washing step in 1 ml of ice-cold PBSP, the cells were resuspended in 300 µl of ice-cold PBSP before sorting. Cells were sorted using a FACS Vantage SE (BD Biosciences, San Jose, CA) flow cytometer. The cells were sorted directly into 0.5 ml B2 medium (Löfblom, J., Kronqvist, 10 N., Uhlén, M., Ståhl, S. & Wernérus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism. *J Appl Microbiol* 102, 736-747 (2007)) and spread onto blood agar base (Merck) plates containing 10 µg ml-1 chloramphenicol and incubated at 37 °C for 24 hours. In the last round, cells were sorted into individual wells in 96-well 15 plates, containing semi-solid medium, to form colonies.

#### DNA sequencing and BLAST alignment

Parts of each colony were transferred to two separate wells in 96-well plates for PCR. The insert region of the staphylococcal display vector was amplified by PCR using two distinct primer pairs, yielding two PCR products 20 containing a biotin molecule in the forward end and in the reverse end, respectively. A 10 cycles Pyrosequencing at both ends of each insert was performed according to manufacturer's instructions using a PSQ™ 96 HS instrument (Biotage AB, Uppsala, Sweden). Epitope sequences were mapped to the antigen sequence using BLAST (Altschul et al, Basic local alignment 25 search tool, *J.Mol.Biol.* 147:195-197, (1990)).

c) DNA of the extra cellular domain of HER2 (aa 27-653 of ENSP00000269571 or bp 317-2196 ENST00000269571) was amplified by PCR using vector pAY593 as template. The amplified DNA was fragmentized 30 to various lengths (approximately 50-350 bp) by sonication, followed by ligation into the staphylococcal display vector (pSCEM1) and transformed into *S. Carnosus* yielding around 30000 transformants. In-frame fragments DNA fragments were displayed as peptides on the staphylococcal surface. After incubation with antibody and fluorescently labeled secondary reagents, 35 positive and negative cells were separately sorted using flow cytometry in order to isolate epitope and non-epitope presenting cells. Isolated cells were sequenced by pyrosequencing and sequences finally aligned to the HER2

antigen for identification of epitopes. A dual-labeling strategy with real-time monitoring of the surface expression level was used, providing several advantages important in epitope mapping of polyclonal antibodies(Löfblom, J., Wernérus, H. & Ståhl, S. Fine affinity discrimination by normalized

5 fluorescence activated cell sorting in staphylococcal surface display. FEMS Microbiol Lett 248, 189-198 (2005)). Firstly, it allows for normalization of the binding signal with the expression level, significantly decreasing cell-to-cell variations and making discrimination of different epitope populations possible and secondly, it also allows for a parallel assay to determine non-binding  
10 peptides displayed on the surface increasing the mapping resolution even further.

Four epitopes (SEQ ID NO:8 and SEQ ID NO:12-14) specific for msAb-866 were confirmed . A second round of epitope mapping was undertaken for msAb-C revealing one additional epitope (SEQ ID NO:11).

15 All cited material, including but not limited to publications, DNA or protein data entries, and patents, referred to in this application are herein incorporated by reference.

20 The invention being thus described, it will be obvious that the same may be varied in many ways. Such variations are not to be regarded as a departure from the spirit and scope of the present invention, and all such modifications as would be obvious to one skilled in the art are intended to be included within the scope of the following claims.

## CLAIMS

1. Affinity ligand capable of selective interaction with a subset of 37 consecutive amino acid residues or less from extracellular domains 2 and 3 of 5 HER2 (SEQ ID NO:7), said subset comprising the amino acid sequence LQVF (SEQ ID NO:8) and/or ESFDGD (SEQ ID NO:9).
2. Affinity ligand according to claim 1, wherein said subset is 26 amino acid residues or less.
- 10 3. Affinity ligand according to claim 2, wherein said subset is selected from the group consisting of SEQ ID NO:11 and 15-20.
4. Affinity ligand according to claim 2, wherein said subset is 21 amino 15 acid residues or less.
5. Affinity ligand according to any preceding claim, wherein said subset comprises LQVF (SEQ ID NO:8) and/or LPESFDGD (SEQ ID NO:11).
- 20 6. Affinity ligand according to any preceding claim, wherein said subset is 10 amino acid residues or more.
7. Affinity ligand according to any one of claims 1-5, wherein said subset is 8 amino acid residues or less.
- 25 8. Affinity ligand according to claim 1, wherein said subset is the sequence of amino acids 1-37 of SEQ ID NO:6.
9. Affinity ligand according to any preceding claim, which inhibits 30 growth of human breast cancer cells in culture by 20-100% relative an affinity ligand not capable of selective interaction with the extracellular domain of HER2.

10. Affinity ligand according to claim 9, wherein the human breast cancer cells are BT474 breast cancer cells.

11. Affinity ligand according to any one of claims 9-10, which inhibits 5 growth at a concentration of 500 ng/ml.

12. Affinity ligand according to any one of the preceding claims, which binds the subset with an EC50 of less than 100 nM.

10 13. Affinity ligand according to any one of the preceding claims for use as a medicament.

14. Affinity ligand according to any one of the preceding claims for 15 treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2.

15. Affinity ligand according to claim 14, wherein said subject has been treated by an therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, such as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is 20 different from the affinity ligand.

16. Affinity ligand according to claim 15, wherein said disorder characterized by the overexpression of HER2 is a cancer and said cancer has developed resistance to the therapeutic antibody.

25

17. Affinity ligand according to any one of the preceding claims, wherein the disorder characterized by overexpression of HER2 is a cancer.

18. Affinity ligand according to claim 17, wherein the cancer is selected 30 from the group consisting of breast cancer, squamos cell cancinoma, lung cancer, such as small cell or non-small cell lung cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, vulval cancer, liver cancer, hepatoma, colorectal cancer, such as colon cancer, endometrial carcinoma,

salivary gland carcinoma, kidney cancer, thyroid cancer, Wilm's tumor, bladder cancer, endometrial cancer, renal cancer, head and neck cancer, gastric cancer, esophageal cancer and prostate cancer.

5        19. Affinity ligand according to claim 18, wherein the cancer is selected from the group consisting of breast cancer, lung cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer and Wilm's tumor.

10        20. Affinity ligand according to claim 19, wherein the cancer is breast cancer.

21. Affinity ligand according to claim 20, wherein the cancer is metastatic breast cancer.

15        22. Affinity ligand according to any one of the preceding claims, which is an antibody or a fragment or derivative thereof.

20        23. Affinity ligand according to any one of claims 1-21, which is a protein ligand derived from a scaffold selected from the group consisting of staphylococcal protein A and domains thereof, lipocalins, ankyrin repeat domains, cellulose binding domains,  $\gamma$  crystallines, green fluorescent protein, human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, protease inhibitors, PDZ domains, peptide aptamers, staphylococcal nuclease, tendamistats, fibronectin type III domain and zinc fingers.

25        24. Affinity ligand according to any one of claims 1-21, which is an oligonucleotide molecule.

30        25. A composition comprising an affinity ligand according to any one of the preceding claims and a second affinity ligand capable of selective interaction with a second subset of 73 consecutive amino acid residues or less from extracellular domains 2 and 3 of HER2 (SEQ ID NO:7), said second subset comprising the amino acid sequence SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 and/or SEQ ID NO:14.

26. Composition according to claim 25, wherein the second subset is selected from the group consisting of SEQ ID NO:21-35.
- 5 27. Composition according to claim 25, wherein the second subset is 50 amino acid residues or less.
28. Composition according to claim 27, wherein the second subset is 16 amino acid residues or less.
- 10 29. Composition according to claim 25, wherein the second subset is amino acids 39-111 of the sequence SEQ ID NO:4.
30. Composition according to any one of claims 25-29, which inhibits 15 growth of a human breast cancer cells in culture by 20-100% relative an affinity ligand not capable of selective interaction with the extracellular domain of HER2.
31. Composition according to claim 30, wherein the human breast 20 cancer cells are BT474 breast cancer cells.
32. Composition according to any one of claims 30-31, which inhibits growth at a concentration of 500 ng/ml.
- 25 33. Composition according to any one of claims 25-32, in which the second affinity ligand binds the second subset with an EC50 of less than 100 nM.
- 30 34. Composition according to any one of claims 25-33, in which the second affinity ligand is an antibody or fragment or derivative thereof.
35. Composition according to any one of claims 25-33, in which the second affinity ligand is a protein ligand derived from a scaffold selected from the group consisting of staphylococcal protein A and domains thereof,

lipocalins, ankyrin repeat domains, cellulose binding domains,  $\gamma$  crystallines, green fluorescent protein, human cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, protease inhibitors, PDZ domains, peptide aptamers, staphylococcal nuclease, tendamistats, fibronectin type III domain and zinc fingers.

5

36. Composition according to any one of claims 25-33, in which the second affinity ligand is an oligonucleotide molecule.

10 37. Composition comprising: an affinity ligand according to any one of claims 1-24 or a composition according to any one of claims 25-36; and a tyrosine kinase inhibitor against HER2.

38. Composition according to any one of claims 25-37 for use as a medicament.

15

39. Composition according to any one of claims 25-38 for treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2.

20

40. Composition according to claim 39, wherein said subject has been treated by an therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, such as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is different from the affinity ligand and the second affinity ligand.

25

41. Composition according to claim 40, wherein said disorder characterized by the overexpression of HER2 is a cancer and said cancer has developed resistance to the therapeutic antibody.

30

42. An isolated polypeptide consisting of 37 consecutive amino acid residues or less from extracellular domains 2 and 3 of HER2 (SEQ ID NO:7) and comprising the amino acid sequence LQVF (SEQ ID NO:8) and/or ESFDGD (SEQ ID NO:9).

43. Polypeptide according to claim 42 consisting of 26 amino acid residues or less.

5 44. Polypeptide according to any one of claims 42-43 consisting of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:11 and 15-20.

10 45. Polypeptide according to any one of claims 42-44 consisting of 21 amino acid residues or less.

15 46. Polypeptide according to any one of claims 42-45 comprising the amino acid sequence LQVF (SEQ ID NO:8) and/or LPESFDGD (SEQ ID NO:11).

20 47. Polypeptide according to any one of claims 42-46 consisting of 10 amino acid residues or more.

25 48. Polypeptide according to any one of claims 42-46 consisting of 8 amino acid residues or less.

30 49. Polypeptide according to any one of claims 42-48, which, if it comprises the sequence LQVF, has two amino acids or less flanking the C-terminal side of LQVF.

50. Polypeptide according to claim 42 consisting of amino acids 1-37 of the sequence SEQ ID NO:6.

51. Polypeptide according to any one of claims 42-50 for use as an antigen.

30 52. Polypeptide according to claim 42 for use as an antigen in an immunization.

45

53. Polypeptide according to any one of claims 42-52 for use in the preparation of therapeutic antibodies.

5 54. Use of a polypeptide according to any one of claims 42-53 as an antigen.

10 55. Use of a polypeptide according to any one of claims 42-53 for an immunization.

15 56. Use according to claim 55, wherein the immunization is an immunization of a mammal not being a human.

20 57. Use of a polypeptide according to any one of claims 42-53 in the preparation of a therapeutic antibody.

25 58. Use of polypeptide according to any one of claims 42-53 in the selection or purification of an therapeutic affinity ligand for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2.

60 59. Use of a polypeptide according to any one of claims 42-53 as a therapeutic target.

65 60. Use of an affinity ligand according to any one of claims 1-24 as a medicament.

70 61. Use of an affinity ligand according to any one of claims 1-24 in the manufacture of a medicament for treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2.

75 62. Use according to claim 61, wherein said subject has been treated by an therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, such

as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is different from the affinity ligand.

63. Use according to claim 62, wherein said disorder characterized by  
5 the overexpression of HER2 is a cancer and said cancer has developed  
resistance to the therapeutic antibody.

64. Method for identification of an affinity ligand for treatment of a  
disorder characterized by the overexpression of HER2, comprising the steps  
10 of:

- a) contacting a polypeptide according to any one of claims  
35-45 with a putative affinity ligand in conditions that enable binding;  
and
- b) determining whether the putative affinity ligand binds to  
15 the polypeptide.

65. Method according to claim 64, wherein the disorder is a cancer,  
further comprising the step:

- c) determining whether the putative affinity ligand inhibits  
20 growth or induces apoptosis of cancer cells, such as BT474 breast  
cancer cells.

66. Method for producing a clone comprising the steps of:

- a) providing cells obtained from a mammal which has been  
25 immunized with an antigen comprising a subset according to any one  
of claim 1-24, which cells comprise DNA encoding an antibody  
capable of selective interaction with the subset; and
- b) fusing said cells with myeloma cells to obtain at least one  
clone.

30 67. Method according to claim 66, further comprising the step of:

- a') immunizing the mammal with the antigen,  
wherein step a') precedes step a).

68. Method according to any one of claims 66-67, further comprising the step of:

- c) selecting a clone from step b) which expresses antibodies capable of selective interaction with the subset.

5

69. Method according to any one of claims 66-67, wherein the antigen of step a) consists of a polypeptide according to any one of claims 42-53.

10 70. Method according to claim 69, further comprising the step of:

c) selecting a clone from step b) which expresses antibodies capable of selective interaction with the antigen.

15 71. Method according to any one of claims 66-70, further comprising the step:

d) providing a clone obtained in step b) or selected in step c), and merging DNA from the clone, which DNA encodes at least the part of an antibody expressed by the clone that selectively interacts with the subset, with human antibody producing DNA; and

e) incorporating the merged DNA from step d) in cells to obtain a clone for expression of a therapeutic antibody for treatment of a disorder characterized by the overexpression of HER2.

20 72. Method of treatment of a mammalian subject having, or suspected of having, a disorder characterized by the overexpression of HER2, comprising administrating an effective amount of an affinity ligand according to any one of claims 1-24 or a composition according to any one of claims 25-41 to the subject.

25 73. Method according to claim 72, further comprising administrating a tyrosine kinase inhibitor against HER2 to the subject.

74. Method according to any one of claims 72-73, wherein said treatment is pre-surgical treatment.

75. Method according to any one of claims 72-73, wherein said treatment is post-surgical treatment.

5 76. Method according to any one of claims 72-75, wherein said subject has been treated by an therapeutic antibody capable of selective interaction with HER2, such as the extracellular domain of HER2, which therapeutic antibody is different from the affinity ligand.

10 77. Method according to claim 76, wherein said disorder characterized by the overexpression of HER2 is a cancer and said cancer has developed resistance to the therapeutic antibody.

15 78. Method according to any one of claims 72-77, wherein the disorder characterized by the overexpression of HER2 is a cancer.

79. Method according to claim 78, wherein the cancer is selected from the group consisting of breast cancer, squamos cell carcinoma, lung cancer, such as small cell or non-small cell lung cancer, pancreatic cancer, 20 glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, vulval cancer, liver cancer, hepatoma, colorectal cancer, such as colon cancer, endometrial carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney cancer, thyroid cancer, Wilm's tumor, bladder cancer, endometrial cancer, renal cancer, head and neck cancer, gastric cancer, esophageal cancer and prostate cancer.

25 80. Method according to claim 79, wherein the cancer is selected from the group consisting of breast cancer, lung cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer and Wilm's tumor.

30 81. Method according to claim 80, wherein the cancer is breast cancer.

82. Method according to claim 81, wherein the cancer is metastatic breast cancer.

83. An article of manufacture, comprising a container, a composition within the container comprising an affinity ligand according to any one of claims 1-24 or a composition according to any one of claims 25-41 and a label on or associated with the container that indicates that said composition can be used for treating a disorder characterized by the overexpression of HER2.
- 5

50

## ABSTRACT

- The present invention relates to an affinity ligand capable of selective interaction with a subset of 37 consecutive amino acid residues or less from 5 extracellular domains 2 and 3 of HER2, wherein the subset comprises the amino acid sequence LQVF and/or ESFDGD.

1/5

2/5

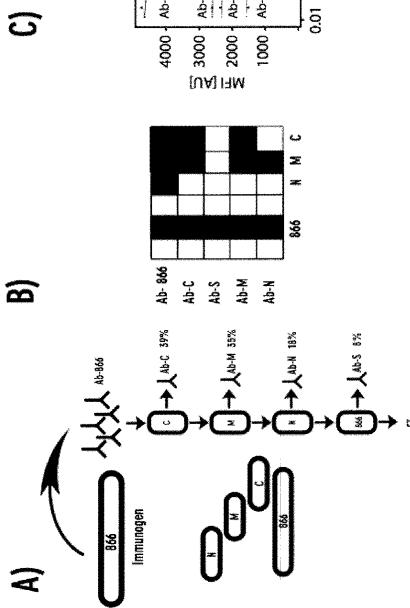


FIGURE 1

## BT474 Flowcytometry Histograms

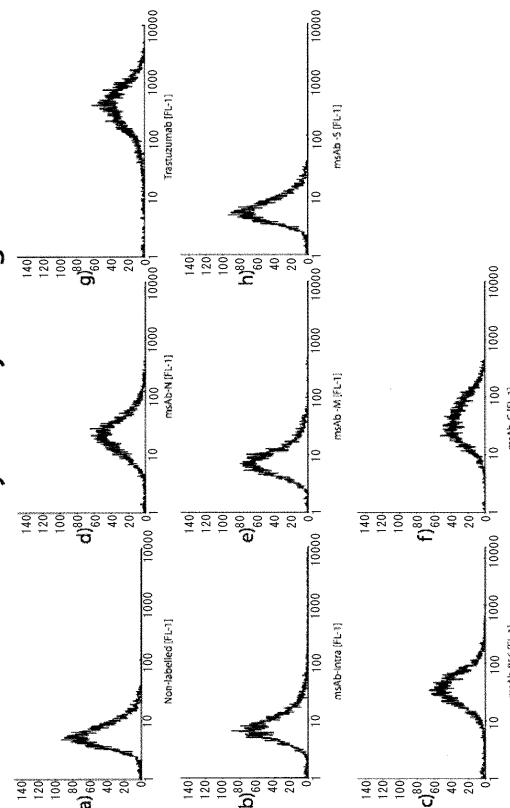


FIGURE 2

3/5

Growth inhibition BT474

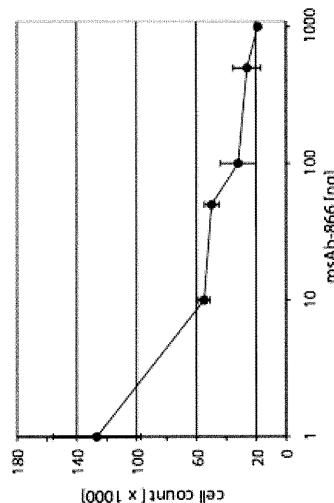


FIGURE 3

## Growth Inhibition Effect

4/5

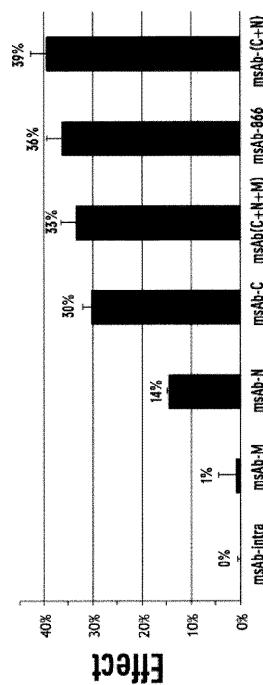


FIGURE 4

## Growth inhibition BT474

5/5

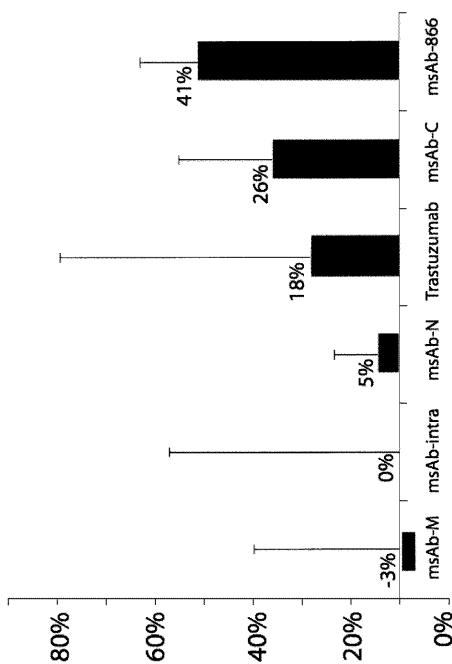


FIGURE 5

【配列表】

2010006705000001.app