

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6438442号
(P6438442)

(45) 発行日 平成30年12月12日(2018.12.12)

(24) 登録日 平成30年11月22日(2018.11.22)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C O 7 K 16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28	
C O 7 K 16/46	(2006.01)	C O 7 K 16/46	
C O 7 K 19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00	
C O 7 K 14/52	(2006.01)	C O 7 K 14/52	

請求項の数 40 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-177734 (P2016-177734)	(73) 特許権者	507316398
(22) 出願日	平成28年9月12日(2016.9.12)		ゲンマブ エー/エス
(62) 分割の表示	特願2013-511701 (P2013-511701) の分割		デンマーク ディーケイ-1560 コペ ンハーゲン ブイ カルヴェボー ブリッ ゲ 43
原出願日	平成23年5月27日(2011.5.27)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2017-46694 (P2017-46694A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成29年3月9日(2017.3.9)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成28年10月11日(2016.10.11)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/349,182	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成22年5月27日(2010.5.27)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
(31) 優先権主張番号	PA201000468		弁理士 刑部 俊
(32) 優先日	平成22年5月27日(2010.5.27)	(74) 代理人	100142929
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER2エピトープに対するモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、HER2に結合する抗体

- a) それぞれSEQ ID NO : 2、3および4のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域 ;
ならびにそれぞれSEQ ID NO : 6、GASおよびSEQ ID NO : 7のCDR1、CDR2、およびCDR3配列
を含むVL領域 (005) ;
- b) それぞれSEQ ID NO : 9、10および11のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域
 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 13、DASおよびSEQ ID NO : 14のCDR1、CDR2、およびCDR3
配列を含むVL領域 (006) ;
- c) それぞれSEQ ID NO : 16、17および18のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域
 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 20、GASおよびSEQ ID NO : 21のCDR1、CDR2、およびCDR3
配列を含むVL領域 (059) ;
- d) それぞれSEQ ID NO : 23、24および25のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域
 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 27、GASおよびSEQ ID NO : 28のCDR1、CDR2、およびCDR3
配列を含むVL領域 (060) ;
- e) それぞれSEQ ID NO : 30、31および32のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域
 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 34、GASおよびSEQ ID NO : 35のCDR1、CDR2、およびCDR3
配列を含むVL領域 (106) ; ならびに
- f) それぞれSEQ ID NO : 37、38および39のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域

; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 41、GASおよびSEQ ID NO : 42のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVL領域 (111) 。

【請求項 2】

以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、請求項1記載の抗体 :

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ;
- b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (006) ;
- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059) ;
- d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060) ;
- e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106) ; ならびに
- f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111) 。

【請求項 3】

実施例12に記載した通りに判定した場合に、HER2発現A431細胞に対する結合に関して0.80 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 未満の EC_{50} 値を有し、かつ以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1または2記載の抗体 :

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ;
- b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (006) ; ならびに
- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059) 。

【請求項 4】

実施例13に記載した通りに判定した場合に、HER2陽性アカゲザル上皮細胞と特異的に結合し、かつ以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1~3のいずれか一項記載の抗体 :

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ;
- b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (006) ;
- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059) ;
- d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060) ;
- e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106) ; ならびに
- f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111) 。

【請求項 5】

実施例16に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合するが、細胞のリガンド非依存的増殖をF5よりも促進せず、かつ以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1~4のいずれか一項記載の抗体 :

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005)

; ならびに

b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060)。

【請求項 6】

治療用部分と結合体化された場合、実施例17に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞株の少なくとも60%を死滅させ、かつ以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1~5のいずれか一項記載の抗体：

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005)

、

b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)、

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059) 、 ならびに

d) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111))。

【請求項 7】

HER2を発現する腫瘍細胞株が細胞当たり平均約30000個未満のHER2分子を発現し、かつ抗体が以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項6記載の抗体：

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005)

; ならびに

b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)。

【請求項 8】

実施例18に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞株によってトラスツズマブよりも多くの量の抗体が内部移行を受け、かつ抗体が以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体をクロスブロックする、請求項1~7のいずれか一項記載の抗体：

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005)

;

b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (006)) ;

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059)) ;

d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060)) ;

e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106)) ; ならびに

f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111))。

【請求項 9】

ヒト抗体またはヒト化抗体である、請求項1~8のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 10】

二価抗体および/または二重特異性抗体である、請求項1~9のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 11】

キメラ抗体である、請求項1~10のいずれか一項記載の抗体。

【請求項 12】

抗原結合性断片であるか、または完全長抗体である、請求項1~11のいずれか一項記載

10

20

30

40

50

の抗体。

【請求項13】

エフェクター機能欠損性抗体である、請求項1～12のいずれか一項記載の抗体。

【請求項14】

ヒトIgG4の重鎖定常領域における位置409のアルギニンが、リジン、トレオニン、メチオニン、もしくはロイシンで置換されており、かつ/またはヒンジ領域がCys-Pro-Pro-Cys配列を含む、安定化されたヒトIgG4抗体である、請求項13記載の抗体。

【請求項15】

一価抗体である、請求項1～14のいずれか一項記載の抗体。

【請求項16】

一価抗体が、

(i) 請求項1～11のいずれか一項記載の抗体の可変領域または該領域の抗原結合性部分、ならびに

(ii) 免疫グロブリンのC_H領域、またはC_H2領域およびC_H3領域を含むその断片であって、ヒンジ領域に対応する領域、および免疫グロブリンがIgG4サブタイプでない場合にはC_H領域の他の領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_H領域とのジスルフィド結合、または同一のC_H領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を形成しうるアミノ酸残基を全く含まない、C_H領域またはその断片を含む、請求項15記載の抗体。

【請求項17】

(ii)に記載した免疫グロブリンがIgG4サブタイプのものである、請求項16記載の抗体。

【請求項18】

ヒンジ領域全体が欠失するように重鎖が改変されている、請求項17記載の抗体。

【請求項19】

請求項1～17のいずれか一項に定義された抗体の第1の抗原結合領域と、異なる結合特異性を有する第2の抗原結合部位とを含む二重特異性抗体である、請求項1～17のいずれか一項記載の抗体。

【請求項20】

細胞傷害性部分、放射性同位体、薬物またはサイトカインである別の部分と結合体化している、請求項1～19のいずれか一項記載の抗体。

【請求項21】

細胞傷害性部分が、タキソール；サイトカラシンB；グラミシジンD；臭化エチジウム；エメチン；マイトマイシン；エトポシド；テニポシド；ピンクリスチン；ピンブラスチン；コルヒチン；ドキシソルピシン；ダウノルピシン；ジヒドロキシアントラシンジオン；チューブリン阻害剤；ミトキサントロン；ミトラマイシン；アクチノマイシンD；1-デヒドロテストステロン；グルココルチコイド；プロカイン；テトラカイン；リドカイン；プロプラノロール；ピューロマイシン；カリチアマイシン；代謝拮抗物質、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラピン、フルダラピン、5フルオロウラシル、ダカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピンまたはクラドリピン；アルキル化剤、チオテパ、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、カルボプラチン、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、ラケルマイシン（rachelmycin）（CC-1065）；抗生物質、ブレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC）；有糸分裂阻害剤；ジフテリア毒素、ならびにハイブリッド分子、リシン毒素、コレラ毒素、志賀毒素様毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズBowman-Birkプロテアーゼインヒビター、シュードモナス属（Pseudomonas）エキソトキシン、アロリン（alorin）、サボリン、モデシン（modeccin）、ゲラニン（gelanin）、ア

10

20

30

40

50

ブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ (*Aleurites fordii*) タンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) タンパク質、ニガウリ (*Momordica charantia*) インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ (*Saponaria officinalis*) インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン (*Mitogellin*)、レストリクトシン (*Restrictocin*)、フェノマイシン (*Phenomycin*) およびエノマイシン (*Enomycin*) 毒素；リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)；DNアーゼI、ブドウ球菌 (*Staphylococcal*) エンテロトキシンA；ヨウシュヤマゴボウ (*Pokeweed*) 抗ウイルスタンパク質；ジフテリン毒素；ならびにシュードモナス属エンドトキシンからなる群より選択される、請求項20記載の抗体。

【請求項22】

10

マイタンシン、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、ラケルマイシン (CC-1065)、およびモノメチルアウリスチンEからなる群より選択される細胞傷害性部分と結合体化されている、請求項20記載の抗体。

【請求項23】

IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNF α からなる群より選択されるサイトカインと結合体化されている、請求項20記載の抗体。

【請求項24】

放射性同位体と結合体化されている、請求項20記載の抗体。

20

【請求項25】

請求項1~18のいずれか一項に定義された抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。

【請求項26】

請求項1~23のいずれか一項に定義された抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項27】

静脈内または皮下への注射または注入による投与のための、請求項26記載の薬学的組成物。

【請求項28】

30

医薬として用いるための、請求項1~23のいずれか一項記載の抗体。

【請求項29】

癌の治療に用いるための、請求項1~23のいずれか一項記載の抗体。

【請求項30】

癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、請求項29記載の使用のための抗体。

【請求項31】

1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、請求項29~30のいずれか一項記載の使用のための抗体。

40

【請求項32】

癌の治療用の医薬の製造のための、請求項1~23のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項33】

各用量における前記抗体の量が、0.1~100 mg/kgである、請求項32記載の使用。

【請求項34】

前記抗体が、静脈内または皮下への注射または注入による投与のためのものである、請求項32または33記載の使用。

【請求項35】

a) 請求項25記載の宿主細胞を培養する段階、および

b) 抗体を培地から精製する段階

50

を含む、請求項1～23のいずれか一項記載の抗体を作製するための方法。

【請求項36】

試料を、請求項1～23のいずれか一項記載の抗体と、抗体とHER2との複合体の形成を可能にする条件下で接触させる段階、および複合体が形成されたか否かを分析する段階を含む、試料中のHER2の存在を検出するための方法。

【請求項37】

請求項1～23のいずれか一項記載の抗体、およびキットの使用説明書を含む、試料中のHER2の存在を検出するためのキット。

10

【請求項38】

請求項1～23のいずれか一項記載のHER2抗体、および該HER2抗体とHER2との結合を検出するための1種類または複数種の試薬を含む容器を含む、癌を診断するためのキット。

【請求項39】

前記1種類または複数種の試薬が、蛍光タグまたは酵素タグである、請求項38記載のキット。

【請求項40】

前記試薬が、二次もしくは三次の抗体または酵素反応用試薬を含み、該酵素反応が視覚化可能な産物を産生する、請求項38または39記載のキット。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (HER2) に対するモノクローナル抗体およびこのような抗体の使用、特に、癌の治療におけるこのような抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

HER2は185kDa細胞表面受容体型チロシンキナーゼであり、4つの異なる受容体：EGFR/ErbB-1、HER2/ErbB-2、HER3/ErbB-3、およびHER4/ErbB-4を含む上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) ファミリーのメンバーである。EGFRファミリーの4つのメンバーによってホモ二量体およびヘテロ二量体がどちらも形成され、HER2は、他のErbB受容体の好ましくかつ最も強力な二量体化パートナーである (Graus-Porta et al., *Embo J* 1997; 16: 1647-1655; Tao et al., *J Cell Sci* 2008; 121: 3207-3217)。HER2は過剰発現によって活性化することができる、またはリガンド結合によって活性化可能な他のErbBとのヘテロ二量体化によって活性化することができる (Riese and Stern, *Bioessays* 1998; 20: 41-48)。HER2のリガンドは特定されていない。HER2が活性化されると受容体リン酸化が起こり、これによって複数のシグナル伝達経路、例えば、MAPK、ホスホイノシトール3-キナーゼ/AKT、JAK/STAT、およびPKCを介した下流シグナルカスケードが誘発され、最終的に増殖、生存、および分化などの複数の細胞機能が調節される (Huang et al., *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 97-110)。

30

【0003】

腫瘍におけるHER2への関心の多くは乳癌におけるHER2の役割に集中してきた。乳癌では症例の約20%においてHER2過剰発現が報告されており、予後不良と相関づけられている (Reese et al., *Stem Cells* 1997; 15: 1-8; Andrechek et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3444-3449; およびSlamon et al., *Science* 1987; 235: 177-182)。乳癌に加えて、HER2発現は、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸癌、食道癌、および頭頸部の扁平上皮癌を含む他のヒト癌腫型とも関連づけられている (Garcia de Palazzo et al., *Int J Biol Markers* 1993; 8: 233-239; Ross et al., *Oncologist* 2003; 8: 307-325; Osman et al., *J Urol* 2005; 174: 2174-2177; Kapitanovic et al.

50

, Gastroenterology 1997 ; 112 : 1103-1113 ; Turken et al., Neoplasma 2003 ; 50 : 257-261 ; およびOshima et al., Int J Biol Markers 2001 ; 16 : 250-254) 。

【 0 0 0 4 】

トラスツズマブ (Herceptin (登録商標)) はHER2タンパク質ドメインIVに対する組換えヒト化モノクローナル抗体であり、それによって、HER2が大幅に過剰発現している細胞においてリガンド非依存性HER2ホモ二量体化を阻止し、さらに低い程度でHER2と他のファミリーメンバーとのヘテロ二量体化を阻止する (Cho et al., Nature 2003 ; 421 : 756-760 およびWehrman et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ; 103 : 19063-19068) 。HER2発現レベルが中程度の細胞においては、トラスツズマブはHER2/EGFRヘテロ二量体の形成を阻害することが見出された (Wehrman et al., (2006) 、前記 ; Schmitz et al., Exp Cell Res 2009 ; 315 : 659-670) 。トラスツズマブは抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介し、外部ドメインシェディングを阻止する。外部ドメインシェディングが阻止されなければ、HER2過剰発現細胞において切断型常時活性型タンパク質が形成されるだろう。トラスツズマブについては、高レベルのHER2を発現する腫瘍細胞のインビトロ増殖およびインビボ増殖の阻害も報告されている (Nahta and Esteva, Oncogene 2007 ; 26 : 3637-3643において概説されている) 。Herceptin (登録商標) は、化学療法と併用した、または1種類もしくは複数種の化学療法後の単一薬剤として、HER2過剰発現転移乳癌のファーストライン療法および補助療法に認可されている。トラスツズマブはHER2過剰発現乳腺腫瘍患者の20 ~ 50 % にしか有効でないことが見出されており、初期応答者の多くは数ヶ月後に再発する (Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007 ; 5 : 707-717) 。

【 0 0 0 5 】

ペルツズマブ (Omnitarg (商標)) は別のヒト化モノクローナル抗体であり、HER2タンパク質ドメインIIに対して作られ、リガンド誘導性ヘテロ二量体化 (すなわち、リガンドが結合している別のErbBファミリーメンバーとのHER2二量体化) ; 高いHER2発現レベルを厳格に必要としないと報告されている機構を阻害する (Franklin et al., Cancer Cell 2004 ; 5 : 317-328) 。ペルツズマブもADCCを媒介するが、ペルツズマブの主な作用機構はその二量体化の阻止に頼っている (Hughes et al., Mol Cancer Ther 2009 ; 8 : 1885-1892) 。さらに、ペルツズマブは、EGFR/HER2ヘテロ二量体の形成を阻害することによってEGFRの内部移行およびダウンレギュレーションを増強することが見出された。EGFR/HER2ヘテロ二量体の形成が阻害されなければ、EGFRは原形質膜に繋ぎ止められる (Hughes et al., 2009、前記) 。これは、EGFRホモ二量体がEGFR/HER2二量体より効率的に内部移行するという観察と相関する (Pedersen et al., Mol Cancer Res 2009 ; 7 : 275-284) 。報告によれば、ペルツズマブおよびトラスツズマブの補完的な作用機構は、トラスツズマブ前療法の間に行進した患者において併用されると抗腫瘍効果および抗腫瘍効力を強化する (Baselga et al., J Clin Oncol 2010 ; 28 : 1138-1144) 。前治療歴の無いHER2陽性転移乳癌において、この抗体の組み合わせとドセタキセルを評価する第三相試験が行われている。

【 0 0 0 6 】

標的抗体療法を改善する別のアプローチは、細胞傷害性細胞または薬物を抗原発現癌細胞に特異的に送達することによるアプローチである。例えば、いわゆる三機能性抗体は、一方のアームが腫瘍細胞上の抗原を標的とし、他方のアームが、例えば、T細胞上のCD3を標的とする二重特異性抗体である。結合すると、T細胞、腫瘍細胞、およびFcに結合するエフェクター細胞の複合体が形成され、腫瘍細胞が死滅する (Muller and Kontermann, BioDrugs 2010 ; 24 : 89-98) 。エルツマキソマブ (ertumaxomab) は、HER2に対する、このような三機能性抗体の1つであり、HER2発現が低い細胞株において細胞傷害性を誘導し、転移乳癌において第二相臨床開発中である (Jones et al., Lancet Oncol 2009 ; 10 : 1179-1187 およびKiewe et al., Clin Cancer Res 2006 ; 12 : 3085-3091) 。

【 0 0 0 7 】

現在、HER2抗体薬物結合体 (ADC) が臨床開発中である。T-DM1は、真菌毒素マイタンシンと結合体化されたトラスツズマブからなる。第二相試験において、トラスツズマブおよび/またはラパチニブ前療法を含む多数の前治療歴のある患者コホートにおいて応答が報

10

20

30

40

50

告された (Krop et al., J Clin Oncol 2010 (印刷物より先にオンラインで公開された) およびLewis Phillips et al., Cancer Res 2008; 68: 9280-9290)。トラスツズマブ前療法歴のあるHER2陽性局所進行癌患者またはHER2陽性転移乳癌患者において、T-DM1効力および安全性対カペシタピン+ラパチニブを評価する第三相試験が行われている。

【0008】

HER2標的療法に適した抗体の選択には多くの要因が関与するが、抗体結合時にHER2抗体複合体が効率的に内部移行するのであれば、典型的にはADCアプローチに有利である。マウスHER2抗体に関する研究から、ある特定の抗体組み合わせはHER2エンドサイトーシスを誘発することが分かっている (Ben-Kasus et al., PNAS 2009; 106: 3294-9)。ヒトHER2抗体であるF5およびC1は単独で比較的急速に内部移行し、同じエピトープに結合することが報告されている (WO99/55367およびWO2006/116107)。しかしながら、EGFRと比較してHER2の内部移行は少ない。実際には、EGFRホモ二量体はHER2ホモ二量体よりかなり効率的に内部移行する (Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007; 5: 707-717)。EGFR、同様にHER3も、それぞれ、EGFR/HER2ヘテロ二量体およびHER3/HER2ヘテロ二量体を形成することによってHER2のエンドサイトーシスを増大することができる (Baulida et al., J Biol Chem 1996; 271: 5251-5257; Pedersen NM, et al., Mol Cancer Res 2009; 7: 275-84)。

10

【0009】

HER2機能を調節する複雑な機構は、この癌原遺伝子に対する新たなかつ最適化された治療方針をさらに研究する根拠となる。従って、癌などのHER2関連疾患を治療するための効率的かつ安全な製品が依然として必要とされている。

20

【発明の概要】

【0010】

本発明の1つの目的は、医療用途のための非常に特異的かつ有効なモノクローナルHER2抗体を提供することである。本発明の抗体は、当技術分野において記載されている抗体とは異なるHER2結合特性を示す。特に、本発明の抗体は、HER2の異なるセグメントと結合し、そのためそれらは互いにクロスブロック (cross-block) するが、トラスツズマブ、ペルツズマブまたはF5/C1がHER2と結合するのはクロスブロックしない。さらに、公知の抗体とは対照的に、本発明の抗体は、細胞増殖を促進することなくHER2発現細胞内に効率的に内部移行することができる。

30

【0011】

好ましい態様において、本発明の抗体は、完全にヒト型であり、新規エピトープと結合し、かつ/または、ヒト患者における治療用途のための好都合な他の性質を有する。例示的な性質には、ヒトHER2を高レベルまたは低レベルで発現する癌細胞に対する好都合な結合特性、HER2オルソログを発現するアカゲザル上皮細胞に対する特異的結合、HER2との結合後の効率的な内部移行、抗体薬物結合物 (ADC) として投与された場合にHER2を高レベルまたは低レベルで発現する癌細胞を死滅させる高い能力、HER2を発現する癌細胞の増殖に対して実質的なアゴニスト作用がないこと、およびHER2を発現する細胞の有効なADCC媒介性死滅をもたらすこと、ならびに前記の性質の任意の組み合わせが非限定的に含まれる。本発明のこれらの局面および他の局面について、以下でさらに詳細に説明する。

40

【0012】

[本発明1001]

任意で実施例14に記載した通りに判定した場合に、可溶性ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (HER2) に対する参照抗体の結合をブロックするモノクローナル抗体であって、参照抗体が、以下のものからなる群より選択される重鎖可変 (VH) 領域および軽鎖可変 (VL) 領域を含む、モノクローナル抗体:

a) SEQ ID NO: 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 5の配列を含むVL領域 (005)

;

b) SEQ ID NO: 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 12の配列を含むVL領域 (006)

);

50

- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059) ;
- d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060) ;
- e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106) ; ならびに
- f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111) 。

[本発明1002]

(a) ~ (f) における参照抗体のうち少なくとも2つ、好ましくは少なくとも3つの結合をブロックする、本発明1001の抗体。

10

[本発明1003]

(a) ~ (f) における参照抗体の結合をブロックする、本発明1001の抗体。

[本発明1004]

(a) における参照抗体、(f) における参照抗体、またはその両方の結合をブロックする、本発明1001の抗体。

[本発明1005]

参照抗体が固定化されている、本発明1001 ~ 1004のいずれかの抗体。

[本発明1006]

参照抗体の結合を完全にブロックする、本発明1001 ~ 1005のいずれかの抗体。

20

[本発明1007]

参照抗体と同じHER2上のエピトープと結合し、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、前記本発明のいずれかの抗体 :

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ;
- b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (006) ;
- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059) ;
- d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060) ;
- e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106) ;
- f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111) ;
- g) SEQ ID NO : 43の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 44の配列を含むVL領域 (041) ;
- h) SEQ ID NO : 45の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 46の配列を含むVL領域 (150) ;
- i) SEQ ID NO : 47の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 48の配列を含むVL領域 (067) ;
- j) SEQ ID NO : 49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 50の配列を含むVL領域 (072) ;
- k) SEQ ID NO : 51の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 52の配列を含むVL領域 (163) ;
- l) SEQ ID NO : 53の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 54の配列を含むVL領域 (093) ; ならびに
- m) SEQ ID NO : 55の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 56の配列を含むVL領域 (044) 。

30

40

[本発明1008]

50

(a) または (f) における参照抗体と同じHER2上のエピトープと結合する、本発明1007の抗体。

[本発明1009]

以下のものからなる群より選択されるCDR3配列を含むVH領域を含む、前記本発明のいずれかの抗体：

- a) SEQ ID NO : 59、例えばSEQ ID NO : 4、25および32 (005、060、106) から選択される配列；
- b) SEQ ID NO : 62、例えばSEQ ID NO : 11 (006) ；
- c) SEQ ID NO : 65、例えばSEQ ID NO : 18 (059) ；ならびに
- d) SEQ ID NO : 67、例えばSEQ ID NO : 39 (111) 。

10

[本発明1010]

以下のものからなる群より選択されるCDR3配列を含むVH領域を含む抗体：

- a) SEQ ID NO : 59、例えばSEQ ID NO : 4、25および32 (005、060、106) から選択される配列；
- b) SEQ ID NO : 62、例えばSEQ ID NO : 11 (006) ；
- c) SEQ ID NO : 65、例えばSEQ ID NO : 18 (059) ；ならびに
- d) SEQ ID NO : 67、例えばSEQ ID NO : 39 (111) 。

[本発明1011]

以下のものからなる群より選択されるCDR1、CDR2、CDR3配列を含むVH領域を含む、本発明1009または1010の抗体：

20

- a) それぞれSEQ ID NO : 57、58および59、ここで該VH領域は任意でIgHV5-51-1生殖系列に由来する；
- b) それぞれSEQ ID NO : 60、61および62、ここで該VH領域は任意でIgHV3-23-1生殖系列に由来する；
- c) それぞれSEQ ID NO : 63、64および65、ここで該VH領域は任意でIgHV1-18-1生殖系列に由来する；ならびに
- d) それぞれSEQ ID NO : 66、38および67、ここで該VH領域は任意でIgHV1-69-4生殖系列に由来する。

[本発明1012]

以下のものからなる群より選択されるCDR1、CDR2、CDR3配列を含むVH領域を含む、本発明1011の抗体：

30

- a) それぞれSEQ ID NO : 2、3および4 (005) ；
- b) それぞれSEQ ID NO : 23、24および25 (060) ；
- c) それぞれSEQ ID NO : 30、31および32 (106) ；
- d) それぞれSEQ ID NO : 9、10および11 (006) ；
- e) それぞれSEQ ID NO : 16、17および18 (059) ；ならびに
- f) それぞれSEQ ID NO : 37、38および39 (111) 。

[本発明1013]

以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、本発明1012の抗体：

- a) それぞれSEQ ID NO : 2、3および4のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 6、GASおよびSEQ ID NO : 7のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVL領域 (005) ；
- b) それぞれSEQ ID NO : 9、10および11のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 13、DASおよびSEQ ID NO : 14のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVL領域 (006) ；
- c) それぞれSEQ ID NO : 16、17および18のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 20、GASおよびSEQ ID NO : 21のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVL領域 (059) ；
- d) それぞれSEQ ID NO : 23、24および25のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 27、GASおよびSEQ ID NO : 28のCDR1、CDR2、およびCDR3

40

50

配列を含むVL領域（060）；

e) それぞれSEQ ID NO：30、31および32のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：34、GASおよびSEQ ID NO：35のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVL領域（106）；ならびに

f) それぞれSEQ ID NO：37、38および39のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：41、GASおよびSEQ ID NO：42のCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含むVL領域（111）。

[本発明1014]

以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、前記本発明のいずれかの抗体：

a) SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（005）；

b) SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：11の配列を含むVL領域（006）；

c) SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（059）；

d) SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（060）；

e) SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：33の配列を含むVL領域（106）；

f) SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域（111）；

g) SEQ ID NO：43の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：44の配列を含むVL領域（041）；

h) SEQ ID NO：45の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：46の配列を含むVL領域（150）；

i) SEQ ID NO：47の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：48の配列を含むVL領域（067）；

j) SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：50の配列を含むVL領域（072）；

k) SEQ ID NO：51の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：52の配列を含むVL領域（163）；

l) SEQ ID NO：53の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：54の配列を含むVL領域（093）；

m) SEQ ID NO：55の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：56の配列を含むVL領域（044）；ならびに

n) 好ましくは多くとも1個、2個または3個のアミノ酸修飾を有し、より好ましくはアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換、および新たなアミノ酸が図1または2におけるアラインメントされた配列中で同じ位置に、特に対応するコンセンサス配列中で「X」によって示された位置にある置換などを有する、前記のいずれかの抗体の変種。

[本発明1015]

実施例14に記載した通りに判定した場合に、可溶性HER2に対する参照抗体の結合をブロックしないヒト抗体であって、参照抗体がトラスツズマブ、ベルツズマブ、F1およびC5のいずれかのVH配列およびVL配列を含む、ヒト抗体。

[本発明1016]

実施例12に記載した通りに判定した場合に、HER2発現細胞に対する結合に関して0.80 μg/ml未満、好ましくは0.50 μg/ml未満のEC₅₀値を有し、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの抗体：

a) SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（005）

;

b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域 (006) ; ならびに

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059))。

[本発明1017]

実施例13に記載した通りに判定した場合に、HER2陽性アカゲザル上皮細胞と特異的に結合し、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの抗体 :

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) 10

;

b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域 (006)) ;

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059)) ;

d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060)) ;

e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106)) ; ならびに

f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111) 20

)。

[本発明1018]

実施例16に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合するが、細胞のりガンド非依存的増殖をF5よりも促進せず、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの抗体 :

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ; ならびに

b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060))。 30

[本発明1019]

治療用部分、例えば短縮型のシュードモナス-外毒素Aなどと結合体化された場合、実施例17に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞株の少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%を死滅させ、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの抗体 :

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) 、

b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060) 、 40

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059))、 ならびに

d) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111))。

[本発明1020]

HER2を発現する腫瘍細胞株が細胞当たり平均約30000個未満のHER2分子を発現し、かつ抗体が好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1019の抗体 :

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ; ならびに 50

b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)。

[本発明1021]

実施例18に従って判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞株によってトラスツズマブよりも多くの量の抗体が内部移行を受け、かつ抗体が好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む参照抗体をクロスブロックする、前記本発明のいずれかの抗体：

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005)

；

b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域 (006)

）；

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059)

）；

d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (060)

）；

e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域 (106)

）；ならびに

f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域 (111)

）。

[本発明1022]

参照抗体が可溶性HER2に結合するのを完全にブロックし、好ましくは参照抗体と同じエピトープに結合する、本発明1016～1021のいずれかの抗体。

[本発明1023]

二価抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1024]

抗原結合性断片である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1025]

完全長抗体、好ましくはIgG1抗体、特にIgG1、抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1026]

エフェクター機能欠損性抗体、例えば安定化されたヒトIgG4抗体、例えばヒトIgG4の重鎖定常領域における位置409のアルギニンが、リジン、トレオニン、メチオニン、もしくはロイシン、好ましくはリジンで置換されている、および/またはヒンジ領域がCys-Pro-Pro-Cys配列を含む抗体などである、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1027]

一価抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1028]

一価抗体が、

(i) 本発明1001～1025のいずれかの抗体の可変領域または該領域の抗原結合性部分、ならびに

(ii) 免疫グロブリンのC_H領域、またはC_H2領域およびC_H3領域を含むその断片であって、ヒンジ領域に対応する領域、および免疫グロブリンがIgG4サブタイプでない場合にはC_H領域の他の領域、例えばC_H3領域などが、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、同一のC_H領域とのジスルフィド結合、または同一のC_H領域との他の共有結合性もしくは安定な非共有結合性の重鎖間結合を形成しうるアミノ酸残基を全く含まない、C_H領域またはその断片を含む、本発明1027の抗体。

[本発明1029]

段階ii)で言及した免疫グロブリンがIgG4サブタイプのものである、本発明1028の抗体。

[本発明1030]

10

20

30

40

50

ヒンジ領域全体が欠失するように重鎖が改変されている、本発明1029の抗体。

[本発明1031]

前記本発明のいずれかに定義された抗体の第1の抗原結合領域と、ヒトエフェクター細胞、ヒトFc受容体、B細胞受容体、またはHER2の非ブロックングエピトープに対する結合特異性といった異なる結合特異性を有する第2の抗原結合部位とを含む二重特異性抗体である、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1032]

別の部分、例えば細胞傷害性部分、放射性同位体、薬物またはサイトカインなどと結合体化している、前記本発明のいずれかの抗体。

[本発明1033]

細胞傷害性部分が、タキソール；サイトカラシンB；グラミシジンD；臭化エチジウム；エメチン；マイトマイシン；エトボシド；テニボシド；ピンクリスチン；ピンブラスチン；コルヒチン；ドキシソルピシン；ダウノルピシン；ジヒドロキシアントラシンジオン；チュープリン阻害剤、例えばマイタンシンまたはその類似体もしくは誘導体；ミトキサントロン；ミトラマイシン；アクチノマイシンD；1-デヒドロテストステロン；グルココルチコイド；プロカイン；テトラカイン；リドカイン；プロプラノロール；ピューロマイシン；カリチアマイシンまたはその類似体もしくは誘導体；代謝拮抗物質、例えばメトトレキサート、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5フルオロウラシル、ダカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピンまたはクラドリピン；アルキル化剤、例えばメクロレタミン、チオテパ、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、カルボプラチン、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、ラケルマイシン（rachelmycin）（CC-1065）またはそれらの類似体もしくは誘導体；抗生物質、例えばダクチノマイシン、プレオマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC）；有糸分裂阻害剤、例えばモノメチルアウリスタチンEもしくはFまたはそれらの類似体もしくは誘導体；ジフテリア毒素および関連分子、例えばジフテリアA鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子、リシン毒素、例えばリシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素など、コレラ毒素、志賀毒素様毒素、例えばSLT I、SLT II、SLT IIIVなど、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズBowman-Birkプロテアーゼインヒビター、シュードモナス属（*Pseudomonas*）エキソトキシン、アロリン（alorin）、サポリン、モデシン（modeccin）、ゲラニン（gelanin）、アプリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質、例えばPAPI、PAPII、およびPAP Sなど、ニガウリ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaaria officinalis*）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（restrictocin）、フェノマイシン（phenomycin）およびエノマイシン（enomycin）毒素など；リボヌクレアーゼ（RNアーゼ）；DNアーゼI、ブドウ球菌（*Staphylococcal*）エンテロトキシンA；ヨウシュヤマゴボウ（pokeweed）抗ウイルスタンパク質；ジフテリア毒素；ならびにシュードモナス属エンドトキシンからなる群より選択される、本発明1032の抗体。

[本発明1034]

マイタンシン、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、ラケルマイシン（CC-1065）、モノメチルアウリスタチンE、またはそれらのいずれかの類似体、誘導体、もしくはプロドラッグからなる群より選択される細胞傷害性部分と結合体化されている、本発明1032の抗体。

[本発明1035]

IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、

10

20

30

40

50

幹細胞因子、アンセスチムおよびTNF からなる群より選択されるサイトカインと結合体化されている、本発明1032の抗体。

[本発明1036]

放射性同位体と結合体化されている、本発明1032の抗体。

[本発明1037]

SEQ ID NO : 1、5、8、12、15、19、22、26、29、33、36、40、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および56からなる群より選択されるアミノ酸配列のうち1つまたは複数をコードするヌクレオチド配列。

[本発明1038]

ある抗体の機能的に連結した軽鎖の定常領域、重鎖の定常領域、または軽鎖および重鎖の両方をさらにコードする、本発明1037のヌクレオチド配列を含む発現ベクター。 10

[本発明1039]

本発明1001～1031のいずれかに定義された抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。

[本発明1040]

本発明1001～1031のいずれかに定義された抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1041]

本発明1032～1036のいずれかに定義された抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。 20

[本発明1042]

医薬として用いるための、本発明1001～1031のいずれかの抗体。

[本発明1043]

医薬として用いるための、本発明1032～1036のいずれかの抗体。

[本発明1044]

癌の治療に用いるための、本発明1001～1031のいずれかの抗体。

[本発明1045]

癌の治療に用いるための、本発明1032～1036のいずれかの抗体。

[本発明1046]

癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、本発明1044および1045のいずれかの使用のための抗体。 30

[本発明1047]

化学療法剤などの1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、本発明1044～1046のいずれかの使用のための抗体。

[本発明1048]

本発明1046および/または47のさらなる特徴を任意で含む、癌の治療用の医薬の製造のための、本発明1001～1036のいずれかの抗体の使用。

[本発明1049]

HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するための方法であって、それを必要とする個体に対する本発明1001～1036のいずれかの抗体の投与を含む、方法。 40

[本発明1050]

前記抗体が本発明1031～1036のいずれかの特徴を含み、かつ1つまたは複数の腫瘍細胞がHER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を共発現する、本発明1049の方法。

[本発明1051]

a) HER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を共発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、ならびに

b) 本発明1001～1036のいずれかの抗体を該対象に投与する段階を含む、癌を治療するための方法。 50

[本発明1052]

癌が、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍、例えば滑膜肉腫など、および膀胱癌からなる群より選択される、本発明1051の方法。

[本発明1053]

a) 本発明1039の宿主細胞を培養する段階、および

b) 抗体を培地から精製する段階

を含む、本発明1001～1036のいずれかの抗体を作製するための方法。

[本発明1054]

試料を、本発明1001～1036のいずれかの抗体と、抗体とHER2との複合体の形成を可能にする条件下で接触させる段階、および

複合体が形成されたか否かを分析する段階

を含む、試料中のHER2の存在を検出するための方法。

[本発明1055]

本発明1001～1036のいずれかの抗体、および

キットの使用説明書

を含む、試料中のHER2の存在を検出するためのキット。

本発明のこれらの局面および他の局面は下記においてさらに詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】HuMab重鎖可変領域（VH）配列と生殖系列（参照）配列（A～D）とのアラインメント。それぞれのVH配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVH配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示した位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVH配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図1B】HuMab重鎖可変領域（VH）配列と生殖系列（参照）配列（A～D）とのアラインメント。それぞれのVH配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVH配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示した位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVH配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図1C】HuMab重鎖可変領域（VH）配列と生殖系列（参照）配列（A～D）とのアラインメント。それぞれのVH配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVH配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示した位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVH配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図1D】HuMab重鎖可変領域（VH）配列と生殖系列（参照）配列（A～D）とのアラインメント。それぞれのVH配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVH配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示した位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVH配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図2A】HuMab軽鎖可変領域（VL）配列と生殖系列（参照）配列（A～B）とのアラインメント。それぞれのVL配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。図2Aにおいて、全てのVL配列は同じVセグメント（IgKV3-20-01）に由来するが、最も近いJセグメントは抗体間で異なった。コンセンサスVL配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示された位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVL配列において、CDR1配列、CDR2配列、

10

20

30

40

50

およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図2 B】HuMab軽鎖可変領域（VL）配列と生殖系列（参照）配列（A~B）とのアラインメント。それぞれのVL配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVL配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示された位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVL配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図3】実施例12に記載のように確かめられた時の、HER2抗体と、（A）高（AU565）HER2発現細胞株および（B）低（A431）HER2発現細胞株との結合曲線。示したデータは、それぞれの細胞株を対象にした1回の代表的な実験の平均蛍光強度（MFI）である。EC₅₀値はみかけの親和性を示す。

10

【図4】アカゲザル上皮細胞上で発現しているHER2に対するHER2抗体の結合。示したデータは、実施例13に記載の1回の実験の平均蛍光強度（MFI）である。

【図5】HER2抗体のクロム放出（ADCC）アッセイ。HER2抗体とインキュベートした後の、⁵¹Cr標識SK-BR-3細胞のPBMCによって媒介される溶解を示す。示した値は、SK-BR-3細胞を用いた1回の代表的なインビトロADCC実験からの最大パーセント⁵¹Cr放出の平均±標準偏差である。詳細については実施例15を参照されたい。

【図6】未処理細胞（100%に設定した）と比較した、AU565細胞の増殖に対するHER2抗体の効果。示したデータは、3回の独立した実験において測定された、未処理細胞と比較したAU565細胞の増殖パーセント±標準偏差である。詳細については実施例16を参照されたい。

20

【図7】抗-ETA'結合HER2抗体を介したAU565細胞（A）またはA431細胞（B）の死滅を示しているADCアッセイ。（A）示したデータは、非結合体化HER2抗体および抗-ETA'結合HER2抗体で処理したAU565細胞を用いた1つの代表的な実験の平均蛍光強度（MFI）である。（B）示したデータは、非結合体化HER2抗体および抗-ETA'結合HER2抗体で処理したA431細胞を用いた1つの代表的な実験の平均蛍光強度（MFI）である。詳細については実施例17参照。

【図8】抗体はHER2のダウンモジュレーションを誘導した。10 μg/mL抗体との3日間のインキュベーション後にAU565細胞溶解液において発現されたHER2の相対的パーセンテージ。HER2の量をHER2特異的捕捉ELISAを用いて定量し、非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとしてプロットした。示したデータは、3回の実験の平均±標準偏差である。詳細については実施例19参照。

30

【図9】さまざまな単一特異性HER2抗体に関して、Cy5と重複するFITCピクセル強度を示している、HER2抗体（FITC）とリソソームマーカーLAMP1（Cy5）との共存分析。各抗体に関して、3つの異なる画像のLAMP1/Cy5陽性ピクセルにおけるFITCピクセル強度をプロットしている。抗体005は、抗体ハーセプチン（Herceptin）およびペルツズマブと比較して、LAMP1/Cy5陽性区画において、より高いFITCピクセル強度を示している。詳細については実施例20参照。

【図10】フローサイトメトリーを用いて分析した、異なるHER2 ECD構築物をトランスフェクトしたCHO-S細胞に対するHER2抗体の結合。Hu-HER2 = 完全ヒトHER2、Hu-HER2-ch（I）CR1 = ニワトリドメインIを有するhu-HER2、Hu-HER2-ch（II）= ニワトリドメインIIを有するhu-HER2、hu-HER2-ch（III）= ニワトリドメインIIIを有するhu-HER2、およびHu-HER2-ch（IV）= ニワトリドメインIVを有するhu-HER2。示したデータは、1つの代表的な抗体である106の平均蛍光強度（MFI）である。詳細については実施例21参照。

40

【図11 A】雌性CB.17重症複合型免疫不全症（SCID）マウスでのNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルにおけるHER2-HuMab 005のインビボ効果。示したデータは、各群当たりの平均腫瘍サイズ±S.E.M.（n = 各群当たりマウス10匹）（A）である。詳細については実施例22参照。

【図11 B】雌性CB.17重症複合型免疫不全症（SCID）マウスでのNCI-N87ヒト胃癌異種移

50

植モデルにおけるHER2-HuMab 005のインビボ効果。示したデータは、各群当たりの生存（B）である。詳細については実施例22参照。

【発明を実施するための形態】

【0014】

発明の詳細な説明

定義

「HER2」（ErbB-2、NEU、HER-2、およびCD340とも知られる）という用語は、本明細書において用いられる時には、ヒト上皮細胞成長因子受容体2（SwissProt P04626）を指し、腫瘍細胞を含む細胞によって天然に発現されたHER2、またはHER2遺伝子でトランスフェクトされた細胞上に発現されたHER2の任意の変種、アイソフォーム、および種ホモログを含む。種ホモログには、アカゲザルHER2（アカゲザル（*macaca mulatta*）；GenBankアクセッション番号GI：109114897）が含まれる。

10

【0015】

「免疫グロブリン」という用語は、一対が低分子量の軽鎖（L）、一対が重鎖（H）の二対のポリペプチド鎖からなり、4本全てがジスルフィド結合で相互接続されている構造的に関連する糖タンパク質のクラスをいう。免疫グロブリンの構造は詳細に特徴づけられている。例えば、Fundamental Immunology Ch.7（Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.（1989））を参照されたい。簡単に述べると、それぞれの重鎖は、典型的には、重鎖可変領域（本明細書では V_H または VH と省略する）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、 C_{H1} 、 C_{H2} 、および C_{H3} からなる。それぞれの軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域（本明細書では V_L または VL と省略する）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメイン C_L からなる。 V_H 領域および V_L 領域は、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる超可変性領域（または配列が著しく変化し得る、および/もしくは構造が規定されたループの形をとり得る超可変領域）にさらに細分することができ、超可変性領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる保存領域と共に散在している。それぞれの V_H および V_L は、典型的には、3つのCDRおよび4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並べられている（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917（1987）も参照されたい）。特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、本明細書のCDR配列はIMGT規則に従って特定される（Brochet X., Nucl Acids Res. 2008；36：W503-508 およびLefranc MP., Nucleic Acids Research 1999；27：209-212；インターネットhttp://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humaも参照されたい）。しかしながら、抗体配列におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.（1991）に記載の方法によって行うこともできる（本明細書における「Kabatと同様の可変ドメイン残基ナンバリング」、「Kabat位置」、または「Kabatによる」などの句は、このナンバリングシステムをいう）。特に、定常領域におけるアミノ酸のナンバリングの場合、Kabatら、前記によるEUインデックスナンバリングシステムを使用することができる。Kabat残基ナンバリングは、ある特定の抗体について、Kabatによってナンバリングされた「標準」配列と抗体配列との相同性領域でのアラインメントによって決定することができる。

20

30

40

【0016】

本発明の文脈において「抗体」（Ab）という用語は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指し、これらは、代表的な生理学的条件下で、かなり長い半減期、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間以上、約48時間以上、約3日、4日、5日、6日、7日以上など、あるいは他の任意の関連する、機能によって規定された期間（例えば、抗体と抗原との結合に関連する生理学的応答を誘導する、促進する、増強する、および/もしくは調節するのに十分な時間、ならびに/または抗体がエフェクター活性を高めるのに十分な時間）で抗原に特異的

50

に結合する能力を有する。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体 (Ab) の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞 (例えば、エフェクター細胞) および補体系成分、例えば補体活性化の古典経路の第1の成分であるC1qを含む、宿主組織または宿主因子との結合を媒介することができる。HER2抗体はまた、二重特異性抗体、ダイアボディ (diabody)、または類似の分子でもよい (例えば、ダイアボディの説明については、PNAS USA 90 (14), 6444-8 (1993) を参照されたい)。実際には、本発明によって提供される二重特異性抗体、ダイアボディなどは、HER2の一部に加えて、任意の適切な標的に結合することができる。前記のように、本明細書において抗体という用語は、特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、抗原結合断片である抗体断片、すなわち抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体断片を含む。抗体の抗原結合機能は完全長抗体の断片によって果たし得ることも示されている。「抗体」という用語の中に含まれる抗原結合断片の例には、(i) Fab' または Fab 断片、 V_L 、 V_H 、 C_L 、および C_H1 ドメインからなる一価断片、または W02 007059782 (Genmab) に記載の一価抗体; (ii) $F(ab')_2$ 断片、2つの Fab 断片がヒンジ領域でのジスルフィド架橋によって連結された二価断片; (iii) V_H および C_H1 ドメインから本質的になる Fd 断片; (iv) 抗体のシングルアームの V_L および V_H ドメインから本質的になる Fv 断片、(v) V_H ドメインから本質的になり、ドメイン抗体 (Holt et al.; Trends Bio technol. 2003 Nov; 21 (11): 484-90) と呼ばれる、dAb 断片 (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) キャメルド (camelid) または ナノボディ (nanobody) (Revs et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5 (1): 111-24)、ならびに (vii) 単離された相補性決定領域 (CDR) が含まれる。さらに、Fv 断片の2つのドメインである V_L および V_H は別々の遺伝子によってコードされるが、 V_L および V_H 領域が対形成して一価分子 (単鎖抗体または単鎖 Fv (scFv)) と知られる。例えば、Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) および Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) を参照されたい) を形成する1本のタンパク質鎖として作られるのを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて接続されてもよい。このような単鎖抗体は、特に定めのない限り、または文脈によって明らかに示されない限り、抗体という用語の中に含まれる。このような断片は、一般的に、抗体の意味の中に含まれるが、ひとまとめにして、およびそれぞれ独立して、本発明の独特の特徴であり、異なる生物学的な特性および有用性を示す。本発明の文脈における、これらの抗体断片および他の有用な抗体断片は、そのような断片の二重特異性抗体の形態と同様、本明細書においてさらに議論される。抗体という用語は、特に定めのない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAb)、抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体、ならびに任意の公知の技法、例えば酵素切断、ペプチド合成、および組換え技法によって提供される抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体断片 (抗原結合断片) も含むことも理解すべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプを有してよい。

【0017】

本明細書で使用する「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、または IgM) をいう。

【0018】

「一価抗体」という用語は、本発明の文脈では、抗体分子が1種類の抗原分子にしか結合できない、従って、抗原架橋できないことを意味する。

【0019】

「エフェクター機能が欠損している抗体」または「エフェクター機能欠損性抗体」は、1つまたは複数のエフェクター機構、例えば補体活性化もしくは Fc 受容体結合を活性化する能力が大幅に低下しているかまたはその能力が無い抗体をいう。従って、エフェクター機能欠損性抗体は、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) および/もしくは補体依存性細胞傷害 (CDC) を媒介する能力が大幅に低下しているかまたはその能力が無い。このような抗体の一例は IgG4 である。

10

20

30

40

50

【0020】

「HER2抗体」または「抗HER2抗体」とは、抗原HER2に特異的に結合する前記の抗体である。

【0021】

本明細書で使用する「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボで体細胞変異によって導入された変異）を含んでもよい。しかしながら、本明細書で使用する「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことは意図されない。

10

【0022】

本明細書中で使用するヒト抗体は、その抗体がヒト免疫グロブリン配列を用いた系から、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって獲得される場合、特定の生殖系列配列に「由来」し、ここで、選択されたヒト抗体は、アミノ酸配列において、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、または例えば、少なくとも99%同一である。典型的には、特定のヒト生殖系列配列由来のヒト抗体は、重鎖CDR3外では、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と、20個以下のアミノ酸の違い、例えば10個以下のアミノ酸の違い、例えば9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、または5個以下、例えば4個以下、3個以下、2個以下、または1個以下のアミノ酸の違いを示す。

20

【0023】

好ましい態様において、本発明の抗体は単離されている。本明細書で使用する「単離された抗体」は、抗原特異性の異なる他の抗体を実質的に含まない抗体をいうことが意図される（例えば、HER2に特異的に結合する単離された抗体は、HER2以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、HER2のエピトープ、アイソフォーム、または変種に特異的に結合する単離された抗体は、他の関連抗原、例えば他の種に由来する抗原（例えば、HER2の種ホモログ）との交差反応性を有することがある。さらに、単離された抗体は、他の細胞の材料および/または化学物質を実質的に含まないことがある。本発明の1つの態様では、詳細に明らかにされた組成物において、抗原結合特異性の異なる、2種類以上の「単離された」モノクローナル抗体が組み合わせられる。

30

【0024】

2種類以上の抗体の文脈に関して本明細書において用いられる場合、「と競合する」または「と交差競合する」という用語は、2種類以上の抗体がHER2との結合において競合する、例えば、実施例14に記載のアッセイにおいてHER2との結合において競合することを示す。抗体は、好ましくは、実施例14のアッセイを用いて確かめられた時に、1つまたは複数の他の抗体と25%以上競合すれば、1つまたは複数の他の抗体とHER2との結合を「ブロック」または「クロスブロック」し、25%~74%は「部分ブロック」に相当し、75%~100%は「完全ブロック」に相当する。一部の抗体対については、実施例のアッセイにおける競合またはブロッキングは一方の抗体がプレート上にコーティングされ、他方の抗体が競合に用いられた時のみに観察され、逆は同じではない。特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、「と競合する」、「と交差競合する」、「ブロックする」、または「クロスブロックする」という用語は、本明細書において用いられる場合、このような抗体対をカバーすることも意図される。

40

【0025】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面グループからなり、通常、特異的な三次元構造特性ならびに特異的な電荷特性を有する。コンホメーショ

50

ンエピトープおよび非コンホメーションエピトープは、変性溶媒の存在下では前者への結合が失われるが、後者への結合が失われないという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基（エピトープ免疫優性成分とも呼ばれる）、および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例えば特異的に抗原に結合するペプチドによって効果的にブロックされるアミノ酸残基（言い換えると、このアミノ酸残基は、特異的に抗原に結合するペプチドのフットプリント（footprint）の中にある）を含むことがある。

【0026】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、分子組成が1種類しかない抗体分子の調製物をいう。モノクローナル抗体組成物は、ある特定のエピトープに対して結合特異性および親和性を1つしか示さない。従って、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する、結合特異性を1つしか示さない抗体をいう。ヒトモノクローナル抗体は、トランスジェニック非ヒト動物またはトランスクロモソーム非ヒト動物、例えばヒト重鎖トランスジーンおよび軽鎖トランスジーンを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスから得られたB細胞が不死化細胞と融合したハイブリドーマによって作製することができる。

10

【0027】

抗体と所定の抗原との結合に関して本明細書で使用する「結合」という用語は、典型的には、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって、BIAcore 3000機器において、リガンドとして抗原、分析物として抗体を用いて確かめられた時に、約 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M以下、例えば約 10^{-9} M以下、約 10^{-10} M以下、または約 10^{-11} Mまたはさらにそれ未満の K_D に対応する親和性での結合であり、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）との結合の親和性の少なくとも1/10以下、例えば少なくとも1/100以下、例えば少なくとも1/1,000以下、例えば少なくとも1/10,000以下、例えば少なくとも1/100,000以下の K_D に対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性が小さくなる量は抗体の K_D に依存し、その結果、抗体の K_D が非常に低い（すなわち、抗体が高特異性である）場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも小さくなる量は少なくとも1/10,000以下であり得る。

20

【0028】

本明細書で使用する「 k_d 」（ sec^{-1} ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数をいう。この値は、 k_{off} 値とも呼ばれる。

30

【0029】

本明細書で使用する「 k_a 」（ $\text{M}^{-1}\times\text{sec}^{-1}$ ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数をいう。

【0030】

本明細書で使用する「 K_D 」（M）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいう。

【0031】

本明細書で使用する「 K_A 」（ M^{-1} ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数をいい、 k_a を k_d で割ることによって得られる。

【0032】

本明細書で使用する「増殖を阻害する」（例えば、腫瘍細胞などの細胞を指している場合）という用語は、例えば、実施例におけるアッセイによって確かめられた時に、細胞とHER2抗体が接触した時に、HER2抗体と接触していない同じ細胞の増殖と比較して任意の実質的な細胞増殖減少、例えば、細胞培養増殖の少なくとも約10%、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、またはトラスツズマブなどの参照抗体と少なくとも同程度の阻害を含むことが意図される。

40

【0033】

本明細書で使用する「増殖を促進する」（例えば、腫瘍細胞などの細胞を指している場合）という用語は、例えば、実施例におけるアッセイによって確かめられた時に、細胞とHER2抗体が接触した時に、HER2抗体と接触していない同じ細胞の増殖と比較して任意の実

50

質的な細胞増殖増加、例えば、細胞培養増殖の少なくとも約10%、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、またはF5などの参照抗体と少なくとも同程度の促進を含むことが意図される。

【0034】

本明細書で使用する「内部移行」は、HER2抗体に関して用いられた時に、抗体が細胞表面および/または周囲媒体から、例えば、エンドサイトーシスを介してHER2発現細胞に内部移行される任意の機構を含む。抗体の内部移行は、内部移行された抗体の量を測定する直接アッセイ（例えば、実施例18に記載のfab-CypHer5Eアッセイ）、または内部移行された抗体-毒素結合体の作用が測定される間接アッセイ（例えば、実施例17の抗-ETAアッセイ）を用いて評価することができる。

10

【0035】

本発明はまた、実施例の抗体のVL領域、VH領域、または1つもしくは複数のCDRの機能的変種を含む抗体を提供する。HER2抗体に関して用いられるVL、VH、またはCDRの機能的変種は依然として、親抗体の親和性/アピディティおよび/または特異性/選択性の少なくともかなりの部分（少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%以上）を抗体が保持することを可能にする。場合によっては、このようなHER2抗体は、親抗体より高い親和性、選択性、および/または特異性に関連することがある。

【0036】

このような機能的変種は、典型的には、親抗体と大きな配列同一性を保持している。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適アラインメントのために導入される必要のある、ギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた、これらの配列が共有する同一の位置の数の関数（すなわち、%相同性 = 同一の位置の数 / 位置の総数 x 100）である。2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）の中に組み込まれている、E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988) のアルゴリズムを使用し、PAM120ウエイト残基表、12のギャップペナルティ、および4のギャップペナルティを用いて決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970) アルゴリズムを用いて決定することができる。

20

【0037】

例示的な変種には、対応するコンセンサス配列中に「X」で示された1つまたは複数の「変種」アミノ酸位置において、図1および図2に示した親抗体VH配列および/またはVL配列とは異なる変種が含まれる。好ましい変種は、新たなアミノ酸が、図1および図2のアラインメント配列の1つの対応する位置にあるアミノ酸より選択される変種である（CDR配列変種に関する詳細については、表4を参照されたい）。または、もしくはさらに、VH変種、VL変種、またはCDR変種の配列は、主に、保存的置換によって親抗体配列のVH、VL、またはCDRの配列と異なってもよい。例えば、変種における置換の少なくとも10個、例えば、少なくとも9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個、または1個は保存的アミノ酸残基交換である。

30

【0038】

本発明の文脈において、保存的置換は、以下の表に反映されるアミノ酸クラスの中の置換によって定義することができる。

40

【0039】

保存的置換のためのアミノ酸残基クラス

酸性残基	Asp (D) および Glu (E)
塩基性残基	Lys (K), Arg (R), および His (H)
親水性非荷電残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N), および Gln (Q)
脂肪族非荷電残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), および Ile (I)
非極性非荷電残基	Cys (C), Met (M), および Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y), および Trp (W)

10

【0040】

本明細書で使用する「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」という用語は、発現ベクター、例えば本発明の抗体をコードする発現ベクターが導入されている細胞をいうことが意図される。組換え宿主細胞には、例えばトランスフェクトマ（transfectoma）、例えばCHO細胞、HEK293細胞、NS/O細胞、およびリンパ球細胞が含まれる。

【0041】

「トランスジェニック非ヒト動物」という用語は、1つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖のトランスジーンまたはトランスクロモソーム（transchromosome）を含む（動物の天然ゲノムDNAに組み込まれた、または組み込まれていない）ゲノムを有し、完全なヒト抗体を発現することができる非ヒト動物をいう。例えば、トランスジェニックマウスは、HER2抗原および/またはHER2発現細胞で免疫した時にヒトHER2抗体を産生するように、ヒト軽鎖トランスジーンおよびヒト重鎖トランスジーンまたはヒト重鎖トランスクロモソームを有することができる。ヒト重鎖トランスジーンは、トランスジェニックマウス、例えばHuMAbマウス、例えばHCo7、HCo12、もしくはHCo17マウスのようにマウスの染色体DNAに組み込まれてもよく、または、ヒト重鎖トランスジーンは、W002/43478に記載のトランスクロモソームKMマウスのように染色体外に維持されてもよい。さらに大きなヒトAb遺伝子レパートリーを有する類似のマウスにはHCo7およびHCo20が含まれる（例えば、W02009097006を参照されたい）。このようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウス（総称して本明細書において「トランスジェニックマウス」と呼ばれる）は、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを受けることによって、ある特定の抗原に対して、複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、および/またはIgE）を産生することができる。トランスジェニック非ヒト動物はまた、このような特異的抗体をコードする遺伝子を導入することによって、例えばこれらの遺伝子と、動物の乳の中に発現される遺伝子とを機能的に連結することによって、ある特定の抗原に対する抗体を産生するのに使用することもできる。

20

30

【0042】

「治療」とは、症状または疾患状態を緩和する、寛解させる、抑止する、または根絶する（治癒する）目的で、治療活性のある有効量の本発明の化合物を投与することという。

【0043】

「有効量」とは、望ましい治療結果を得るために必要な投与および時間で効果を示す量をいう。HER2抗体の治療的有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体においてHER2抗体が望ましい応答を誘発する能力などの要因に応じて変わることがある。治療的有効量はまた、抗体または抗体部分の治療に有益な作用が毒性作用または有害作用を上回る量でもある。

40

【0044】

「抗イディオタイプ」抗体は、概して抗体の抗原結合部位に結合する独特の決定基を認識する抗体である。

【0045】

本発明のさらなる局面および態様

前記のように、第1の局面において、本発明は、HER2に結合するモノクローナル抗体に

50

関する。

【0046】

本発明のモノクローナル抗体は、例えばKohler et al., Nature 256, 495 (1975) によって初めて述べられたハイブリドーマ法によって産生されてもよく、組換えDNA方法によって産生されてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えばClackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991) に記載の技法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。モノクローナル抗体は任意の適切な供給源から得ることができる。従って、例えばモノクローナル抗体は、関心対象の抗原、例えば表面上に抗原を発現する細胞、または関心対象の抗原をコードする核酸の形をした抗原で免疫したマウスから得られたマウス脾臓B細胞から調製されたハイブリドーマから得られてもよい。モノクローナル抗体はまた、免疫したヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えばラット、イヌ、霊長類などの抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得られてもよい。

10

【0047】

1つの態様において、本発明の抗体はヒト抗体である。HER2に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを用いて作製することができる。このようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウスは、本明細書において、それぞれ、HuMAbマウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスを含み、本明細書において総称して「トランスジェニックマウス」と呼ばれる。

20

【0048】

HuMAbマウスは、再編成されていないヒト重鎖 (μ および δ) 免疫グロブリン配列ならびに 軽鎖免疫グロブリン配列と、内因性 μ 鎖および δ 鎖遺伝子座を不活化する標的変異をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含有する (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994))。従って、このマウスはマウスIgMまたは δ の低発現を示し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランスジーンはクラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgG、モノクローナル抗体を産生する (Lonberg, N. et al. (1994), 前出; Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol.13 65-93 (1995)、およびHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995) に概説)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)、Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) に詳述されている。US5,545,806、US5,569,825、US5,625,126、US5,633,425、US5,789,650、US5,877,397、US5,661,016、US5,814,318、US5,874,299、US5,770,429、US5,545,807、WO98/24884、WO94/25585、WO93/1227、WO92/22645、WO92/03918、およびWO01/09187も参照されたい。

30

【0049】

HCo7、HCo12、HCo17、およびHCo20マウスは、内因性軽鎖 (κ) 遺伝子におけるJKD破壊 (Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993) に記載)、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊 (WO01/14424の実施例1に記載)、およびKCo5ヒト軽鎖トランスジーン (Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) に記載) を有する。さらに、HCo7マウスはHCo7ヒト重鎖トランスジーン (US5,770,429に記載) を有し、HCo12マウスはHCo12ヒト重鎖トランスジーン (WO01/14424の実施例2に記載) を有し、HCo17マウスはHCo17ヒト重鎖トランスジーン (WO01/09187の実施例2に記載) を有し、HCo20マウスはHCo20ヒト重鎖トランスジーンを有する。結果として生じたマウスは、内因性マウス重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座がホモで破壊されたバックグラウンドでヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンおよび軽鎖トランスジーンを発現する。

40

【0050】

50

KMマウス系統では、内因性マウス 軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載のようにホモで破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、WO01/09187の実施例1に記載のようにホモで破壊されている。このマウス系統は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載のように、ヒト 軽鎖トランスジーンであるKCo5を有する。このマウス系統はまた、WO02/43478に記載のように、第14番染色体断片hCF (SC20) からなるヒト重鎖トランスクロモソームも有する。HCo12-BalB/Cマウスは、WO 097006に記載のように、HCo12をKCo5[J/K] (BalB) と交雑することによって作製することができる。

【0051】

これらのトランスジェニックマウスに由来する脾細胞を用いると、周知の技法に従って、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製することができる。

10

【0052】

さらに、本発明のヒト抗体または他の種に由来する本発明の抗体は、当技術分野において周知の技法を用いた、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、および他の技法を含むが、それに限定されるわけではないディスプレイ型技術によって特定することができ、得られた分子は、このような技法が当技術分野において周知のように親和性成熟などのさらなる成熟に供することができる(例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (ファージディスプレイ)、Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (ファージディスプレイ)、Hanes and Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (リボソームディスプレイ)、Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (ファージディスプレイ)、Scott TIBS 17, 241-245 (1992)、Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990)、Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993)、Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992)、Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)、およびUS5,733,743を参照されたい)。非ヒト抗体を作製するためにディスプレイ技術が用いられるのであれば、このような抗体をヒト化することができる。

20

【0053】

1つの局面において、本発明のHER2抗体は、ヒトHER2のドメインIIIと結合する。本発明の発明者らは、抗体005、006、059、060、106および111が、抗-ETA'モデル系において、強化された内部移行、リソソーム分解および毒性を示すことを示している。したがって、いかなる理論にも拘束されないものの、HER2のドメインIIIに対する抗体の結合は抗体の内部移行のために重要と考えられ、それ故に抗体薬物結合体(ADC)にとって有用と考えられる。抗体005、006、059、060、106および111は、HER2のヘテロ二量体化における機能が不明であるHER2ドメインIIIに存在する、あるエピトープを認識する。一方、HER2ドメインIV(ハーセプチンによる結合を受ける)は、HER2のリガンド非依存的ヘテロ二量体化に関与することが報告されており(Juntilla et al., Cancer Cell 2009; 15: 429-440)、HER2ドメインII(ペルツズマブによる結合を受ける)は、HER2のリガンド誘導性ヘテロ二量体化に関与することが報告されている(Landgraf et al., Breast Cancer Research 2007; 9: 202)。本発明者らは、HER2/ErbBヘテロ二量体の形成が、HER2抗体/受容体複合体の十分な内部移行および分解を得るために決定的に重要であるとの仮説を立てている。このため、HER2ヘテロ二量体によって主導される内部移行および分解を利用するHER2抗体は、HER2を標的とする今後のADC治療剤にとって非常に魅力的であるように思われる。特に、HER2を極めて高いレベルでは過剰発現しない腫瘍細胞上でのHER2/ErbBヘテロ二量体の形成は、HER2抗体にADCを送達させるための魅力的なアプローチであると考えられる。

30

40

【0054】

本発明のHER2抗体の1つの局面において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブ、ペルツズマブ、F1およびC5のいずれかのVH配列およびVL配列を含む、任意で固定化された形態の第2の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしない。

50

【 0 0 5 5 】

本発明の抗体の1つの追加的または代替的な局面において、本抗体は、本明細書に記載の新規ヒト抗体の1つまたは複数の、可溶性HER2に対する結合をブロックするかまたはクロスブロックする。

【 0 0 5 6 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域とを含み(005)、好ましくは本抗体は完全に遮断性である。

【 0 0 5 7 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域とを含み(006)、好ましくは本抗体は完全に遮断性である。

【 0 0 5 8 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域とを含み(059)、好ましくは本抗体は完全に遮断性である。

【 0 0 5 9 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含み(060)、好ましくは本抗体は完全に遮断性である。

【 0 0 6 0 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域とを含み(106)、好ましくは本抗体は完全に遮断性である。

【 0 0 6 1 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域とを含み(111)、好ましくは本抗体は完全に遮断性である。

【 0 0 6 2 】

別個および特定の態様において、本抗体は、前記の態様の2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの参照抗体、例えば、抗体005および111、抗体005および006；抗体059および106；抗体006および059；抗体059、106、005および060；抗体006、59、060および111；または抗体059、106、005、060、111および006などの結合をブロックする。

【 0 0 6 3 】

1つの態様において、本抗体は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、可溶性HER2に対する結合に関して、以下のすべてのものと少なくとも25%、好ましくは少なくとも50%競合する：

SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域とを含む、任意で固定化されている参照抗体(005)；

SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域とを含む、任意で固定化されている参照抗体(059)；

SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む、任意で固定化されている参照抗体(060)；

SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域とを含む、任意

10

20

30

40

50

で固定化されている参照抗体（106）；

SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域とを含む、任意で固定化されている参照抗体（111）。

【0064】

1つの態様において、本抗体は、固定化された場合、実施例14に記載した通りに判定した場合に、以下のもの：

SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）；

SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域とを含む抗体（006）；

SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域とを含む抗体（0059）；

SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（0060）；

SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：33の配列を含むVL領域とを含む抗体（0106）；ならびに

SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域とを含む抗体（0111）

からなる群より選択される少なくとも1つの抗体の、可溶性HER2に対する結合をブロックし、

好ましくは、固定化された抗体は完全に遮断性である。

【0065】

1つの態様において、本抗体は、固定化された場合、実施例14に記載した通りに判定した場合に、可溶性HER2に対する結合に関して、前記の態様において定義されたすべての抗体と、25%またはそれ以上、好ましくは50%またはそれ以上競合する。

【0066】

本発明の抗体の1つの局面において、本抗体は、本明細書に記載の新規ヒト抗体の1つまたは複数と、HER2上の同じエピトープに結合する。

【0067】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）と、同じエピトープに結合する。

【0068】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域とを含む抗体（006）と、同じエピトープに結合する。

【0069】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域とを含む抗体（0059）と、同じエピトープに結合する。

【0070】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（0060）と、同じエピトープに結合する。

【0071】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：33の配列を含むVL領域とを含む抗体（0106）と、同じエピトープに結合する。

【0072】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域とを含む抗体（0111）と、同じエピトープに結合する。

【0073】

1つの態様において、本抗体は、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの抗体と、同じエピトープに結合する：

a) SEQ ID NO：43の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：44の配列を含むVL領域とを含む抗

10

20

30

40

50

体 (041)

b) SEQ ID NO : 45の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 46の配列を含むVL領域とを含む抗体 (150)、ならびに

c) SEQ ID NO : 47の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 48の配列を含むVL領域とを含む抗体 (067) ;

d) SEQ ID NO : 49の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 50の配列を含むVL領域とを含む抗体 (072) ;

e) SEQ ID NO : 51の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 52の配列を含むVL領域とを含む抗体 (163) ;

f) SEQ ID NO : 53の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 54の配列を含むVL領域とを含む抗体 (093) ;

g) SEQ ID NO : 55の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 56の配列を含むVL領域とを含む抗体 (044)。

【 0 0 7 4 】

本発明の抗体の別の追加的または代替的な局面において、本抗体はHER2と結合し、かつ、本明細書に記載の新規抗体と類似するかまたは同一である配列を含むVH CDR3、VH領域および/またはVL領域の配列を含む。

【 0 0 7 5 】

1つの態様において、本抗体は、以下のものからなる群より選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR3領域を含む :

SEQ ID NO : 59、例えばSEQ ID NO : 4、25、32の配列 (005、060、106)、ここで任意でVH領域がIgHV5-51-1生殖系列に由来する ;

SEQ ID NO : 62、例えばSEQ ID NO : 11の配列 (006)、ここで任意でVH領域がIgHV3-23-1生殖系列配列に由来する ;

SEQ ID NO : 65、例えばSEQ ID NO : 18の配列 (059)、ここで任意でVH領域がIgHV1-18-1生殖系列配列に由来する ; または

SEQ ID NO : 67、例えばSEQ ID NO : 39の配列 (111)、ここで任意でVH領域がIgHV1-69-4生殖系列配列に由来する。

【 0 0 7 6 】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 59のアミノ酸配列を含むVH CDR3領域を含み、式中、X1 = Q、HまたはL ; X2 = R、A、TまたはK ; X3 = G ; X4 = D ; X5 = Rまたは無し ; X6 = Gまたは無し ; X7 = YまたはF ; X8 = YまたはD ; X9 = Y、FまたはH ; X10 = Y、D、S、FまたはN ; X11 = MまたはL ; およびX12 = VまたはIであり ; 好ましくは、式中、X1 = Q、X2 = RまたはA ; X5 = X6 = 無し ; X7 = YまたはF ; X8 = Y ; X9 = F ; X10 = Y ; およびX12 = Vである。1つの特定の態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 59のアミノ酸配列を含むVH CDR3領域を含み、式中、X1 = Q、X2 = RまたはA ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = YまたはF ; X8 = Y ; X9 = F ; X10 = Y ; およびX12 = Vである。1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 59のアミノ酸配列を含むVH CDR3領域を含み、式中、X1 = Q、X2 = K ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = F ; X8 = Y ; X9 = X10 = F ; X11 = L ; およびX12 = Vである ; またはX1 = Q、X2 = A ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = X8 = Y ; X9 = Y ; X10 = N ; X11 = M ; およびX12 = Vである ; またはX1 = Q、X2 = K ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = X8 = Y ; X9 = H ; X10 = Y ; X11 = L ; およびX12 = Vである ; またはX1 = Q、X2 = K ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = Y ; X8 = Y ; X9 = F ; X10 = N ; X11 = L ; およびX12 = Vである ; またはX1 = Q、X2 = R ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = Y ; X8 = Y ; X9 = F ; X10 = N ; X11 = L ; およびX12 = Vである ; またはX1 = Q、X2 = R ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = Y ; X8 = Y ; X9 = X10 = F ; X11 = L ; およびX12 = Iである ; またはX1 = Q、X2 = A ; X3 = G ; X4 = D、X5 = X6 = 無し ; X7 = X8 = Y ; X9 = Y ; X10 = N ; X11 = M ; およびX12 = Vである。

【 0 0 7 7 】

1つの態様において、本抗体は、図1に示すように、抗体041、150、067、072、163または093のうち1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖系列に由来

10

20

30

40

50

する。

【 0 0 7 8 】

1つの態様において、本抗体は、以下のものからなる群より選択されるVH領域を含む：

- a) SEQ ID NO : 57、58および59のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えば、
 a . SEQ ID NO : 2、23および30から選択されるCDR1配列；3、24および31から選択されるCDR2配列；ならびに4、25および32から選択されるCDR3配列（005、060、106）、
 b . それぞれSEQ ID NO : 2、3および4のCDR1、CDR2およびCDR3配列（005）、
 c . それぞれSEQ ID NO : 23、24および25のCDR1、CDR2およびCDR3配列（060）、
 d . それぞれSEQ ID NO : 32、33および34のCDR1、CDR2およびCDR3配列（106）、
 ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖系列に由来する；

b) SEQ ID NO : 60、61および62のCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばそれぞれSEQ ID NO : 9、10および11のCDR1、CDR2およびCDR3配列（006）などを含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖系列に由来する；ならびに

c) SEQ ID NO : 63、64および65のCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばそれぞれSEQ ID NO : 16、17および18のCDR1、CDR2およびCDR3配列（059）などを含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖系列に由来する；ならびに

d) SEQ ID NO : 66、38および67のCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばそれぞれSEQ ID NO : 37、38および39のCDR1、CDR2およびCDR3配列（111）などを含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-4生殖系列に由来する。

【 0 0 7 9 】

1つの態様において、本抗体は、前記の態様（a）、（c）または（d）から選択されるVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 68、GASおよびSEQ ID NO : 69のCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 6、20、27、34および41から選択されるCDR1配列、GASであるCDR2、ならびに7、21、28、35および42から選択されるCDR3配列（005、059、060、106、111）などを含むVL領域とを含み、ここで任意でVL領域はIgKV3-20-01生殖系列に由来する。

【 0 0 8 0 】

1つの態様において、本抗体は、前記の態様（b）であるVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 13、DASおよびSEQ ID NO : 14のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含み（006）、ここで任意でVL領域はIgKV3-11-01に由来する。

【 0 0 8 1 】

1つの態様において、本抗体は、それぞれSEQ ID NO : 2、3および4のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 6、GASおよびSEQ ID NO : 7のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（005）。

【 0 0 8 2 】

1つの態様において、本抗体は、それぞれSEQ ID NO : 9、10および11のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 13、DASおよびSEQ ID NO : 14のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（006）。

【 0 0 8 3 】

1つの態様において、本抗体は、それぞれSEQ ID NO : 16、17および18のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 20、GASおよびSEQ ID NO : 21のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（059）。

【 0 0 8 4 】

1つの態様において、本抗体は、それぞれSEQ ID NO : 23、24および25のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 27、GASおよびSEQ ID NO : 28のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（060）。

【 0 0 8 5 】

1つの態様において、本抗体は、それぞれSEQ ID NO : 30、31および32のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 34、GASおよびSEQ ID NO : 35のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（106）。

【 0 0 8 6 】

10

20

30

40

50

1つの態様において、本抗体は、それぞれSEQ ID NO : 37、38および39のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 41、GASおよびSEQ ID NO : 42のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む(111)。

【0087】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = T、およびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = H ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = K、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = F、X8 = Y、X9 = X10 = F、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(041)。

10

【0088】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = H ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = A、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = X8 = Y、X9 = Y、X10 = N、X11 = M、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(150)。

【0089】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = K、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = X8 = Y、X9 = H、X10 = Y、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = P、X4 = RおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(067)。

20

【0090】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = K、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = Y、X8 = Y、X9 = F、X10 = N、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = P、X4 = RおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(072)。

30

【0091】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = R、X2 = IおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = R、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = Y、X8 = Y、X9 = F、X10 = N、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(163)。

【0092】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = R、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = Y、X8 = Y、X9 = X10 = F、X11 = L、およびX12 = Iを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(093)。

40

【0093】

1つの態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 57のCDR1配列、式中、X1 = R、X2 = SおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 58のCDR2配列、式中、X1 = FおよびX2 = D ; ならびにSEQ ID NO : 59のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = A、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = X8 = Y、X9 = Y、X10 = N、X11 = M、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 68のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S

50

; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 69のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む(044)。

【0094】

別個の態様において、本抗体は、以下のものを含む：

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域(005)、

b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域(006)、

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域(059)、

d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域(060)、

e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域(106)、

f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域(111)、

g) SEQ ID NO : 43の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 44の配列を含むVL領域(041)、

h) SEQ ID NO : 45の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 46の配列を含むVL領域(150)、

i) SEQ ID NO : 47の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 48の配列を含むVL領域(067)、

j) SEQ ID NO : 49の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 50の配列を含むVL領域(072)、

k) SEQ ID NO : 51の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 52の配列を含むVL領域(163)、

l) SEQ ID NO : 53の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 54の配列を含むVL領域(093)、

m) SEQ ID NO : 55の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 56の配列を含むVL領域(044)、

n) 好ましくは多くとも1個、2個または3個のアミノ酸修飾を有し、より好ましくはアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換、および新たなアミノ酸が図1または2におけるアラインメントされた配列中で同じ位置に、特に対応するコンセンサス配列中で「X」によって示された位置にある置換などを有する、前記のいずれかの抗体の変種。

【0095】

本発明の抗体の別の局面において、本抗体は、好ましくは実施例14に記載した通りに判定した場合に、本明細書に記載の新規抗体のうち1つまたは複数の、可溶性HER2に対する結合を部分的または完全にクロスブロックし；かつ、実施例12、13、15、16、17および18に記載した通りに判定される1つまたは複数の性質によってさらに特徴づけられる。

【0096】

1つの態様において、HER2抗体は、実施例12に記載した通りに判定した場合に、A431細胞に対する結合に関してトラスツズマブよりも低いEC₅₀値(半値有効濃度)、好ましくは0.80、0.50または0.30 μg/mlよりも低いEC₅₀値を有し、かつ、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域とを含む抗体(005)；

b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域とを含む抗体(006)；ならびに

c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域とを含む抗体(059)。

【 0 0 9 7 】

別個かつ特定のな態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、006、059またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくは、それらと同じエピトープと結合する。

【 0 0 9 8 】

追加的または代替的な態様において、HER抗体は、実施例13に記載した通りに判定した場合に、HER2陽性アカゲザル上皮細胞と特異的に結合し、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの抗体交差をブロックする：

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域とを含む抗体 (005)
- b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域とを含む抗体 (006)
- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域とを含む抗体 (059)
- d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)
- e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域とを含む抗体 (106)
- f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域とを含む抗体 (111)。

10

20

【 0 0 9 9 】

別個かつ特定のな態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、006、059、060、106、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。

【 0 1 0 0 】

追加的または代替的な態様において、HER2抗体は、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合するが、実施例16に記載した通りに判定した場合に、細胞のリガンド非依存的増殖をF5よりも促進せず、増殖を好ましくは30%未満、より好ましくは20%未満しか促進せず、かつ、以下のものから選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域とを含む抗体 (005) ; および
- b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)。

30

【 0 1 0 1 】

別個かつ特定のな態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、060またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。

【 0 1 0 2 】

追加的または代替的な態様において、本抗体は、治療用部分、例えば短縮型のシュードモナス-エキソトキシンAなどと直接的または間接的に結合体化された場合に、実施例17に記載した通りに判定した場合に、AU565細胞、A431細胞、またはAU565細胞およびA431細胞の両方を死滅させることにおいて、トラスツズマブよりも有効である。

40

【 0 1 0 3 】

1つの態様において、結合体化された抗体は、実施例17に記載した通りに判定した場合に、AU565細胞またはA431細胞の少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%を死滅させ、かつ、以下のものから選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

- a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域とを含む抗体 (005)、
- b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)、
- c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域とを含む抗

50

体(059)、ならびに

d) SEQ ID NO: 36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 40の配列を含むVL領域とを含む抗体(111)。

【0104】

別個かつ特定のな態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、060、059、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくは、それらと同じエピトープと結合する。

【0105】

追加的または代替的な態様において、本抗体は、治療用部分と直接的にまたは間接的に結合体化された場合に、好ましくは実施例17に記載した通りに判定した場合に、非結合体化抗体が細胞の死滅を誘導しない濃度で、発現される細胞当たりのHER2コピーの平均量がAU565細胞よりも少ない、例えば、細胞当たりのHER2が平均で約500,000コピーもしくはそれ未満、100,000コピーもしくはそれ未満、または30,000コピーもしくはそれ未満(例えば、実施例12に言及されたように決定した場合に)である腫瘍細胞を死滅させることができる。

10

【0106】

1つの態様において、前記の態様の抗体は、実施例17に記載した通りに判定した場合に、A431細胞の少なくとも80%を死滅させ、かつ、以下のものから選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

a) SEQ ID NO: 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 5の配列を含むVL領域とを含む抗体(005)、ならびに

20

b) SEQ ID NO: 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 26の配列を含むVL領域とを含む抗体(060)。

【0107】

別個かつ特定のな態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、060またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。

【0108】

追加的または代替的な態様において、本抗体は、好ましくは実施例18に従って判定した場合に、トラスツズマブよりも、HER2を発現する腫瘍細胞、例えばAU565細胞などによる内部移行を受け、好ましくは、内部移行を受けるトラスツズマブの量の2倍または3倍を上回る内部移行を受け、かつ、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

30

a) SEQ ID NO: 1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 5の配列を含むVL領域とを含む抗体(005)

b) SEQ ID NO: 8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 11の配列を含むVL領域とを含む抗体(006)

c) SEQ ID NO: 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 19の配列を含むVL領域とを含む抗体(059)

d) SEQ ID NO: 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 26の配列を含むVL領域とを含む抗体(060)

40

e) SEQ ID NO: 29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 33の配列を含むVL領域とを含む抗体(106)

f) SEQ ID NO: 36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO: 40の配列を含むVL領域とを含む抗体(111)。

【0109】

別個かつ特定のな態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、006、059、060、106、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。

【0110】

1つのさらなる態様において、本抗体は、好ましくは実施例に記載した通りに判定した

50

場合に、HER2を発現する腫瘍細胞の増殖をF5よりも促進せず、トラスツズマブよりも、HER2を発現する腫瘍細胞内への内部移行を受ける。

【0111】

抗体形式

本発明は、典型的には、HER2発現腫瘍細胞のリガンド非依存性増殖を有意に促進することなく、HER2発現腫瘍細胞に効率的に結合し、HER2発現腫瘍細胞に内部移行するHER2抗体を提供する。下記のように、特定の用途の望ましい機能特性に応じて、本発明において提供される抗体セットから特定の抗体を選択することができる、および/またはこれらの特性を変えるように、これらの形式を合わせることができる。

【0112】

本発明の抗体はいかなるアイソタイプでもよい。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの望ましいエフェクター機能によって導かれる。例示的なアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4である。ヒト軽鎖定常領域である または のどちらか一方を使用することができる。所望であれば、本発明のHER2抗体のクラスを公知の方法によってスイッチすることができる。例えば、最初にIgMであった本発明の抗体を本発明のIgG抗体にクラススイッチすることができる。さらに、クラススイッチ法を用いて、あるIgGサブクラスを別のIgGサブクラスに、例えば、IgG1からIgG2に変換することができる。従って、本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療用途に合わせて、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変えることができる。1つの態様において、本発明の抗体は、IgG1抗体、例えば、IgG1、

10

20

【0113】

さらなる態様において、本発明の抗体は、例えば、US2009317869に記載のように、もしくはvan Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105 : 350に記載のように抗体産生中に培地に化合物を添加することによって、または、例えば、Yamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87 : 614に記載のようにFUT8ノックアウト細胞を使用することによって、フコースを低減し、従って、ADCCを強化するように糖が操作されている。または、ADCCは、Umaña et al. (1999) Nature Biotech 17 : 176に記載の方法を用いて最適化されてもよい。

【0114】

さらなる態様において、本発明の抗体は、補体活性化を増強するように、例えば、Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100 : 2411に記載のように操作されている。

30

【0115】

1つの態様において、本発明の抗体は、完全長抗体であり、好ましくは、IgG1抗体、特に、IgG1、抗体である。別の態様において、本発明の抗体は抗体断片または単鎖抗体である。

【0116】

抗体断片は、例えば、従来の技法を用いた断片化によって得ることができ、この断片は、抗体全体について本明細書で説明されたものと同じやり方で有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、F(ab')₂断片は、抗体をペプシンで処理することによって作製することができる。ジスルフィド架橋が少なくなるように、得られたF(ab')₂断片をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して、Fab'断片を作製することができる。Fab断片は抗体をパパインで処理することによって得ることができる。F(ab')₂断片はまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介してFab'断片を結合させることによって作製することもできる。抗体断片はまた、組換え細胞において、このような断片をコードする核酸を発現させることによって作製することもできる(例えば、Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)を参照されたい)。このような切断型抗体断片分子を生じるために、F(ab')₂断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、H鎖のC_H1ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列の後に翻訳停止コドンを含んでもよい。

40

【0117】

50

前記で説明したように、1つの態様において、本発明のHER2抗体は、二価抗体である。

【0118】

別の態様において、本発明のHER2抗体は一価抗体である。

【0119】

1つの態様において、本発明の抗体は、例えばUS20080063641 (Genentech) に記載のFab断片もしくは1アーム抗体、または例えばWO2007048037 (Amgen) に記載の一価抗体である。

【0120】

好ましい態様において、一価抗体は、ヒンジ領域が欠失されている、WO2007059782 (Genmab) (参照により本明細書に組み入れられる) に記載の構造を有する。従って、1つの態様において、前記抗体は一価抗体であり、HER2抗体は、以下の段階を含む方法によって構築される：

i) 前記一価抗体の軽鎖をコードする核酸構築物を準備する段階であって、前記構築物が、選択された抗原特異的HER2抗体のVL領域をコードするヌクレオチド配列とIgの定常CL領域をコードするヌクレオチド配列とを含み、前記選択された抗原特異的抗体のVL領域をコードするヌクレオチド配列および前記IgのCL領域をコードするヌクレオチド配列と一緒に機能的に連結され、IgG1サブタイプの場合、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、または動物もしくはヒトに投与された時に、CL領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとジスルフィド結合または共有結合を形成することができるいかなるアミノ酸もCL領域が含有しないように、CL領域をコードするヌクレオチド配列が修飾されている、段階；

ii) 前記一価抗体の重鎖をコードする核酸構築物を準備する段階であって、前記構築物が、選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列とヒトIgの定常CH領域をコードするヌクレオチド配列とを含み、ヒンジ領域に対応する領域、およびIgサブタイプにより必要とされる場合にはCH領域の他の領域、例えばCH3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で、または動物もしくはヒトに投与された時に、ヒトIgのCH領域の同一のアミノ酸配列を含む他のペプチドとのジスルフィド結合、または共有結合もしくは安定した非共有結合による重鎖間結合の形成に参与するいかなるアミノ酸残基も含まないように、CH領域をコードするヌクレオチド配列が修飾されており、前記選択された抗原特異的抗体のVH領域をコードするヌクレオチド配列および前記IgのCH領域をコードするヌクレオチド配列と一緒に機能的に連結されている、段階；

iii) 前記一価抗体を産生するための細胞発現系を準備する段階；

iv) (iii) の細胞発現系の細胞において、(i) および(ii) の核酸構築物を同時発現させることによって、前記一価抗体を産生する段階。

【0121】

同様に、1つの態様において、HER2抗体は、以下を含む一価抗体である：

(i) 本明細書に記載の本発明の抗体の可変領域または該領域の抗原結合部分、ならびに

(ii) ヒンジ領域に対応する領域、および免疫グロブリンがIgG4サブタイプでない場合はC_H領域の他の領域、例えばC_H3領域が、ポリクローナルヒトIgGの存在下で同一のC_H領域とのジスルフィド結合または同一のC_H領域との他の共有結合もしくは安定した非共有結合による重鎖間結合を形成することができるいかなるアミノ酸残基も含まないように修飾されている、免疫グロブリンのC_H領域、またはC_H2領域およびC_H3領域を含むその断片。

【0122】

そのさらなる態様において、一価HER2抗体の重鎖は、ヒンジ全体が欠失されるように修飾されている。

【0123】

別のさらなる態様において、前記一価抗体はIgG4サブタイプであるが、C_H3領域は、以下のアミノ酸置換の1つまたは複数がなされるように修飾されている。

【0124】

CH3変異のナンバリング

10

20

30

40

50

CH3変異の番号付け

KABAT*	EUインデックス G4*	変異
E378	E357	E357A または E357T または E357V または E357I
S387	S364	S364R または S364K
T389	T366	T366A または 366R または T366K または T366N
L391	L368	L368A または L368V または L368E または L368G または L368S または L368T
D427	D399	D399A または D399T または D399S F405A または F405L または F405T または F405D または F405R または F405Q または F405K または F405Y
F436	F405	または F405K または F405Y
Y438	Y407	Y407A または Y407E または Y407Q または Y407K または Y407F
F436 および Y438	F405 および Y407	(F405T および Y407E) または (F405D および Y407E) (D399S および Y407Q) または (D399S および Y407K) または (D399S および Y407E)
D427 および Y438	D399 および Y407	および Y407E)

10

* KABATは、Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) に準拠するアミノ酸ナンバリングを示す。EUインデックスは、Kabat et al., (上記) に概説されたEUインデックスに準拠するアミノ酸ナンバリングを示す。

【0125】

別のさらなる態様において、前記一価抗体の配列は、N結合型グリコシル化のアクセプター部位を含まないように修飾されている。

20

【0126】

本発明のHER2抗体はまた単鎖抗体を含む。単鎖抗体は、重鎖Fv領域および軽鎖Fv領域が接続されているペプチドである。1つの態様において、本発明は、1本のペプチド鎖において、本発明のHER2抗体のFvの重鎖および軽鎖が可動性ペプチドリンカー（典型的には、約10個、12個、15個以上のアミノ酸残基からなる）とつながっている単鎖Fv (scFv) を提供する。このような抗体を作製する方法は、例えばUS4,946,778、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)、Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)、Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)、およびMcCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) に記載されている。単鎖抗体は、1種類のV_HおよびV_Lしか用いられないのであれば一価であり得、2種類のV_HおよびV_Lが用いられるのであれば二価であり得、3種類以上のV_HおよびV_Lが用いられるのであれば多価であり得る。

30

【0127】

1つの態様において、本発明のHER2抗体はエフェクター機能欠損性抗体である。1つの態様において、エフェクター機能欠損性のHER2抗体は、Fabアーム交換を阻止するように修飾されている、安定化されたIgG4抗体である (van der Neut Kofschoten et al. (2007) Science 317 (5844) : 1554-7)。適切な安定化されたIgG4抗体の例は、Kabat et al., のようにEUインデックスで示されたヒトIgG4の重鎖定常領域の位置409にあるアルギニンが、リジン、スレオニン、メチオニン、もしくはロイシン、好ましくはリジンで置換されている抗体 (W02006033386 (Kirin) に記載)、および/またはヒンジ領域がCys-Pro-Pro-Cys配列を含むように修飾されている抗体である。

40

【0128】

1つの態様において、安定化されたIgG4 HER2抗体は、重鎖および軽鎖を含むIgG4抗体であり、前記重鎖は、409に対応する位置に、Lys、Ala、Thr、Met、およびLeuからなる群より選択される残基、ならびに/または405に対応する位置に、Ala、Val、Gly、Ile、およびLeuからなる群より選択される残基を有するヒトIgG4定常領域を含み、前記抗体は、任意で1つまたは複数のさらなる置換、欠失、および/または挿入を含むが、ヒンジ領域にCys-Pro-Pro-Cys配列を含まない。好ましくは、前記抗体は、409に対応する位置にLysもしくはAla残基を含むか、または抗体のCH3領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、もしくはヒトIgG3のCH3領域で置換されている。W02008145142 (Genmab) も参照されたい。

50

【 0 1 2 9 】

なおさらなる態様において、安定化されたIgG4 HER2抗体は、重鎖および軽鎖を含むIgG4抗体であり、前記重鎖は、409に対応する位置に、Lys、Ala、Thr、Met、およびLeuからなる群より選択される残基、ならびに/または405に対応する位置に、Ala、Val、Gly、Ile、およびLeuからなる群より選択される残基を有するヒトIgG4定常領域を含み、前記抗体は、任意で1つまたは複数のさらなる置換、欠失、および/または挿入を含み、ヒンジ領域にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。好ましくは、前記抗体は、409に対応する位置にLysもしくはAla残基を含むか、または抗体のCH3領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、もしくはヒトIgG3のCH3領域で置換されている。

【 0 1 3 0 】

さらなる態様において、エフェクター機能欠損性のHER2抗体は、ADCCなどのエフェクター機能を媒介する能力が低下するように、さらにはエフェクター機能が無くなるように変異されている、非IgG4型、例えばIgG1、IgG2、またはIgG3の抗体である。このような変異は、例えばDall'Acqua WF et al., J Immunol. 177 (2) : 1129-1138 (2006) およびHezar eh M, J Virol. ; 75 (24) : 12161-12168 (2001) に記載されている。

【 0 1 3 1 】

結合体

さらなる態様において、本発明は、治療部分、例えば細胞毒、化学療法薬、サイトカイン、免疫抑制剤、または放射性同位体と結合体化されたHER2抗体を提供する。このような結合体は本明細書において「免疫結合体」と呼ばれる。1種類または複数種の細胞毒を含む免疫結合体は「免疫毒素」と呼ばれる。

【 0 1 3 2 】

細胞毒または細胞傷害剤には、細胞に有害な（例えば、細胞を死滅させる）任意の薬剤が含まれる。本発明の免疫結合体を形成するための適切な治療剤には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド (tenoposide)、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、マイタンシンまたはそれらの類似体もしくは誘導体、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロ-テストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン；カリチアマイシンまたはそれらの類似体もしくは誘導体；代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、フルダラピン、5-フルオロウラシル、デカルバジン (decarbazine)、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピン、クラドリピン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ (thioepa)、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、プスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導体、例えば、カルボプラチン；ならびにデュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、CC-1065 (a.k.a. ラケルマイシン) またはCC-1065の類似体もしくは誘導体）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、プレオマイシン、ダウノルピシン（以前はダウノマイシン）、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン (AMC)）、有糸分裂阻害剤（例えば、チューブリン阻害剤）、例えば、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF、またはドラスタチン10の他の類似体もしくは誘導体；ジフテリア毒素および関連分子（例えば、ジフテリア鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子）、リシン毒素（例えば、リシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素）、コレラ毒素、志賀毒素様毒素 (SLT-I、SLT-II、SLT-III)、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズBowman-Birkプロテアーゼインヒビター、シュードモナス属エキソトキシン、アロリン (alorin)、サポリン、モデシン (modeccin)、ゲラニン (gelanin)、アプリンA鎖、モデシンA鎖、-サルシン (sarcin)、シナアブラギリ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチ

10

20

30

40

50

ン (dianthin) タンパク質、アメリカヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ (momordica charantia) インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ (sapaonaria officinalis) インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン (phenomycin)、およびエノマイシン (enomycin) 毒素が含まれる。他の適切な結合体化分子には、抗菌性/溶解性ペプチド、例えば、CLIP、マガイニン2、メリチン、セクロピン、およびP18 ; リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)、DNアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ヨウシユヤマゴボウ (pokeweed) 抗ウイルスタンパク質、ジフテリン毒素、およびシュードモナス属エンドトキシンが含まれる。例えば、Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) および Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994) を参照されたい。10
本明細書の他の場所で説明されるように本発明のHER2抗体と組み合わせて投与され得る治療剤、例えば、抗癌サイトカインまたはケモカインは、本発明の抗体と結合体化するのに有用な治療部分の候補である。

【0133】

1つの態様において、本発明のHER2抗体は、結合体化された核酸または核酸関連分子を含む。1つのこのような態様において、結合体化される核酸は、細胞傷害性リボヌクレアーゼ、アンチセンス核酸、抑制性RNA分子 (例えば、siRNA分子)、または免疫賦活性核酸 (例えば、免疫賦活性CpGモチーフ含有DNA分子) である。別の態様において、本発明のHER2抗体はアプタマーまたはリボザイムに結合体化される。20

【0134】

1つの態様において、1つまたは複数の放射標識アミノ酸を含むHER2抗体が提供される。放射標識されたHER2抗体は診断目的および治療目的で使用することができる (放射標識分子との結合体化は別の可能性のある特徴である)。ポリペプチドの標識の非限定的な例には、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、および¹²⁵I、¹³¹I、ならびに¹⁸⁶Reが含まれる。

【0135】

1つの態様において、前記抗体は、放射性同位体または放射性同位体含有キレートと結合体化される。例えば、前記抗体は、キレート剤リンカー、例えば、DOTA、DTPA、チウキセタンと結合体化することができる。キレート剤リンカーがあると、抗体と放射性同位体との複合体化が可能になる。前記抗体は同様にまたは代替として、1つまたは複数の放射標識アミノ酸または他の放射標識分子を含んでもよくまたはそれらと結合体化されてもよい。放射標識されたCD74抗体は診断目的および治療目的で使用することができる。放射性同位体の非限定的な例には、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹²⁵I、¹¹¹In、¹³¹I、¹⁸⁶Re、²¹³Bs、²²⁵Ac、および²²⁷Thが含まれる。30

【0136】

HER2抗体はまた、例えば、循環半減期を延ばすために、ポリマーと共有結合することによって化学修飾されてもよい。例示的なポリマーおよびポリマーをペプチドに取り付ける方法は、例えば、US4,766,106、US4,179,337、US4,495,285、およびUS4,609,546に例示されている。さらなるポリマーには、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール (PEG) (例えば、約1,000 ~ 約40,000、例えば、約2,000 ~ 約20,000の分子量を有するPEG) が含まれる。40

【0137】

Hunter et al., Nature 144, 945 (1962)、David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)、Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)、およびNygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982) に記載の方法を含む、HER2抗体を結合体化分子、例えば前記の結合体化分子と結合体化するための、当技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。このような抗体は、他の部分をHER2抗体またはその断片 (例えば、HER2抗体H鎖またはL鎖) のN末端側またはC末端側を化学的に結合体化することによって作製することができる (例えば、Antibody Engineering Handbook, 編集Osamu Kanemitsu, 出版社Chijin Shokan (1994) を参照されたい)。このような結合体化された抗体誘導体はまた、適切な場所にある内部の残基または糖における結合体化によって作製することも50

できる。

【0138】

前記薬剤は、本発明のHER2抗体に直接的または間接的に結合されてもよい。第2の薬剤の間接的な結合の一例は、スペーサー部分を介した、抗体にあるシステイン残基またはリジン残基への結合である。1つの態様において、HER2抗体は、スペーサーまたはリンカーを介して、インピボで活性化されて治療用薬物になることができるプロドラッグ分子と結合体化される。投与後、スペーサーまたはリンカーは、腫瘍細胞関連酵素または他の腫瘍特異的状态によって切断され、これによって活性薬物が形成される。このようなプロドラッグ技術およびリンカーの例は、Syntarga BVらによるW002083180、W02004043493、W02007018431、W02007089149、およびW02009017394に記載されている。適切な抗体-プロドラッグ技術およびデュオカルマイシン類似体は米国特許第6,989,452号 (Medarex) においても見られる。

10

【0139】

1つの態様において、本発明のHER2抗体は、キレート剤リンカー、例えばチウキセタンに取り付けられる。キレート剤リンカーがあると、抗体と放射性同位体との結合体化が可能になる。

【0140】

二重特異性抗体

さらなる局面において、本発明は、本明細書前記に記載の本発明のHER2抗体に由来する第1の抗原結合部位と、例えばヒトエフェクター細胞、ヒトFc受容体、T細胞受容体、B細胞受容体に対する結合特異性またはHER2の非重複エピトープに対する結合特異性といった異なる結合特異性を有する第2の抗原結合部位とを含む、二重特異性分子、すなわち例えば実施例14に記載のように試験された時に、第1の抗原結合部位および第2の抗原結合部位がHER2との結合において互いにクロスブロックしない二重特異性抗体に関する。

20

【0141】

本発明の例示的な二重特異性抗体分子は以下を含む：(i) HER2に対する特異性を有する抗体と、第2の標的に対する特異性を有する別の抗体が結合体化されている2つの抗体；(ii) HER2に特異的な1本の鎖またはアームおよび第2の分子に特異的な第2の鎖またはアームを有する1つの抗体；(iii) HER2および第2の分子に対する特異性を有する単鎖抗体、例えば、余分なペプチドリンカーによって直列に連結された2本のscFvを介した単鎖抗体；(iv) それぞれの軽鎖および重鎖が短いペプチド結合を介して直列に2つの可変ドメインを含む、二重-可変-ドメイン抗体 (DVD-Ig) (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig (商標)) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))；(v) 化学的に連結された二重特異性 (Fab')₂断片；(vi) 2つの単鎖ダイアボディが融合して、標的抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価二重特異性抗体となった、Tandab；(vii) scFvとダイアボディ (diabody) とが組み合わされて多価分子となった、フレキシボディ (flexibody)；(viii) プロテインキナーゼAにある「二量体化・ドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドック・ロック (dock and lock)」分子、これをFabに適用すると、2つ同一のFab断片が異なる1つのFab断片と連結した三価二重特異性結合タンパク質を得ることができる；(ix) いわゆる、スコープオン (Scorpion) 分子、例えば、2つのscFvがヒトFc領域の両末端と融合しているスコープオン分子；ならびに(x) ダイアボディ。1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、ダイアボディである。

30

40

【0142】

1つの態様において、第2の分子は、癌抗原/腫瘍関連抗原、例えば、癌胎児抗原 (CEA)、前立腺特異的抗原 (PSA)、RAGE (腎臓抗原)、 α -フェトプロテイン、CAMEL (黒色腫においてCTLによって認識される抗原)、CT抗原 (例えば、MAGE-B5、-B6、-C2、-C3、およびD；Mage-12；CT10；NY-ESO-1、SSX-2、GAGE、BAGE、MAGE、およびSAGE)、ムチン抗原 (例えば、MUC1、ムチン-CA125など)、ガングリオシド抗原、チロシナーゼ、gp75、c-Met、C-myc、Mart1、MelanA、MUM-1、MUM-2、MUM-3、HLA-B7、およびEp-CAM、または癌関

50

連インテグリン、例えば 5 3インテグリンである。別の態様において、第2の分子は、T細胞抗原および/またはNK細胞抗原、例えば、CD3またはCD16である。別の態様において、第2の分子は、血管新生因子または他の癌関連増殖因子、例えば、血管内皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、上皮細胞成長因子、アンジオゲニンまたはこれらの任意の受容体、特に、癌進行に関連する受容体（例えば、HER受容体の別の受容体；HER1、HER3、またはHER4）である。1つの態様において、第2の抗原結合部位は、本発明の抗体が結合するHER2部位とは異なる部位、好ましくは、非ブロッキング部位に結合する。例えば、第2の分子は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、F5、もしくはC1に由来してもよく、またはトラスツズマブ、ペルツズマブ、F5、もしくはC1のHER2結合をクロスブロックしてもよい。

【0143】

10

核酸配列、ベクターおよび宿主細胞

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明の抗体の重鎖および軽鎖をコードする核酸配列、例えばDNA配列などに関する。

【0144】

1つの態様において、核酸配列は、SEQ ID NO : 1、5、8、12、15、19、22、26、29、33、36、40、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および56からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードする。

【0145】

別の特定の態様において、核酸配列は、SEQ ID NO : 1、8、15、22、29、36、43、45、47、49、51、53および55からなる群より選択されるVHアミノ酸配列をコードする。

20

【0146】

別の特定の態様において、核酸配列は、SEQ ID NO : 5、12、19、26、33、40、44、46、48、50、52、54および56からなる群より選択されるVLアミノ酸配列をコードする。

【0147】

さらに別のさらなる態様において、本発明は、本発明の抗体をコードする1つの発現ベクターまたは発現ベクターのセットに関する。抗体の重鎖および軽鎖は、同じベクターによってコードされてもよく、または異なるベクターによってコードされてもよい。

【0148】

そのような発現ベクターを、本発明の抗体の組換え作製のために用いることができる。

【0149】

30

1つの態様において、本発明の発現ベクターは、SEQ ID NO : 1、5、8、12、15、19、22、26、29、33、36、40、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55および56からなる群より選択されるアミノ酸配列のうち1つまたは複数をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0150】

別の特定の態様において、本発明の発現ベクターは、SEQ ID NO : SEQ ID NO : 1、8、15、22、29、36、43、45、47、49、51、53および55からなる群より選択されるVHアミノ酸配列のうち1つまたは複数をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0151】

別の特定の態様において、本発明の発現ベクターは、SEQ ID NO : SEQ ID NO : 5、12、19、26、33、40、44、46、48、50、52、54および56からなる群より選択されるVLアミノ酸配列のうち1つまたは複数をコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【0152】

さらなる態様において、発現ベクターは、抗体、例えばヒト抗体の軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方の定常領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0153】

本発明の文脈において発現ベクターは、染色体核酸ベクター、非染色体核酸ベクター、および合成核酸ベクター（適切な一組の発現制御エレメントを含む核酸配列）を含む任意の適切なベクターでよい。このようなベクターの例には、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせ

50

に由来するベクター、ならびにウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターの誘導体が含まれる。1つの態様において、HER2抗体をコードする核酸は、例えば直鎖発現エレメントを含む、裸のDNAベクターもしくはRNAベクター（例えば、Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59（1997）に記載）、圧縮された核酸ベクター（例えば、US6,077,835および/もしくはW000/70087に記載）、プラスミドベクター、例えばpBR322、pUC19/18、もしくはpUC118/119、「midge」最小サイズ核酸ベクター（例えば、Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800（2001）に記載）、または沈殿された核酸ベクター構築物、例えばCaPO4によって沈殿された構築物（例えば、W000/46147、Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 95 51-55（1986）、Wigler et al., *Cell* 14, 725（1978）、およびCoraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603（1981）に記載）の中に含まれる。このような核酸ベクターおよびその利用は当技術分野において周知である（例えば、US5,589,466およびUS5,973,972を参照されたい）。

10

【0154】

本発明の抗体のための例示的な発現ベクターは、実施例2および3にも記載する。

【0155】

1つの態様において、ベクターは、細菌細胞におけるHER2抗体の発現に適している。このようなベクターの例には、発現ベクター、例えばBlueScript（Stratagene）、pINベクター（Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509（1989）、pETベクター（Novagen, Madison WI）など）が含まれる。

【0156】

20

同様にまたは代替として、発現ベクターは、酵母系における発現に適したベクターでもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを使用することができる。適切なベクターには、例えば構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含むベクターが含まれる（F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York（1987）、およびGrant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544（1987）に概説）。

【0157】

同様にまたは代替として、発現ベクターは、哺乳動物細胞における発現に適したベクター、例えば選択マーカーとしてグルタミン合成酵素を含むベクター、例えばBebbington（1992）*Biotechnology (NY)* 10: 169-175に記載のベクターでもよい。

30

【0158】

核酸および/またはベクターはまた、分泌配列/局在化配列をコードする核酸配列を含んでもよい。分泌配列/局在化配列は、ポリペプチド、例えば新生ポリペプチド鎖を細胞周辺腔にまたは細胞培地中に標的化することができる。このような配列は当技術分野において公知であり、分泌リーダーまたはシグナルペプチドを含む。

【0159】

本発明の発現ベクターでは、HER2抗体をコードする核酸は、任意の適切なプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進エレメントを含んでもよく、これらと結合してもよい。このようなエレメントの例には、強発現プロモーター（例えば、ヒトCMV IEプロモーター/エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター）、有効なポリ（A）終結配列、大腸菌におけるプラスミド産物用の複製起点、選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、ならびに/または便利なクローニングサイト（例えば、ポリリンカー）が含まれる。核酸はまた、構成的プロモーターと相対する誘導性プロモーター、例えばCMV IEを含んでもよい。

40

【0160】

1つの態様において、HER2抗体をコードする発現ベクターは、ウイルスベクターを介して、宿主細胞もしくは宿主動物の中に配置されてもよく、および/または宿主細胞もしくは宿主動物に送達されてもよい。

【0161】

50

なおさらなる局面において、本発明は、本明細書において定義される本発明の抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞、例えばトランスフェクターマに関する。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞、および哺乳動物細胞、例えばCHO細胞またはHEK細胞が含まれる。例えば、1つの態様において、本発明は、本発明のHER2抗体の発現をコードする配列を含む核酸が細胞ゲノムに安定に組み込まれている細胞を提供する。別の態様において、本発明は、本発明のHER2抗体の発現をコードする配列を含む、非組み込み型核酸、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、または直鎖発現エレメントを含む細胞を提供する。

【0162】

さらなる局面において、本発明は、本明細書において定義される本発明の抗体を産生するハイブリドーマに関する。なおさらなる局面において、本発明は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖をコードする核酸を含む、トランスジェニック非ヒト動物または植物に関し、ここで、このような動物または植物は本発明の抗体を産生する。

10

【0163】

さらなる局面において、本発明は、本発明のHER2抗体を産生するための方法に関し、本方法は、

a) 本明細書において前述された本発明のハイブリドーマまたは宿主細胞を培養する段階、および

b) 培地から本発明の抗体を精製する段階を含む。

20

【0164】

組成物

さらなる主な局面において、本発明は、本明細書において定義されたHER2抗体、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物に関する。

【0165】

本発明の薬学的組成物は、本発明の1種類の抗体または本発明の異なる抗体の組み合わせを含有してもよい。

【0166】

薬学的組成物は、従来技法、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示される技法に従って処方することができる。本発明の薬学的組成物は、例えば希釈剤、増量剤、塩、緩衝液、界面活性剤（例えば、非イオン性界面活性剤、例えばTween-20もしくはTween-80）、安定剤（例えば、糖もしくはタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、組織固定液、可溶化剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適した他の材料を含んでもよい。

30

【0167】

薬学的に許容される担体には、本発明の化合物と生理学的に適合する、任意のおよび全ての適切な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが含まれる。本発明の薬学的組成物において使用することができる適切な水性および非水性の担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、および適切なその混合物、植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル、ならびに/または様々な緩衝液が含まれる。薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。適切な流動性は、例えばコーティング材料、例えばレシチンを使用することによって、分散液の場合、必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。

40

50

【0168】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば、(1)水溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2)油溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど；および(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含んでもよい。

【0169】

本発明の薬学的組成物はまた、組成物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロール、または塩化ナトリウムを含んでもよい。

10

【0170】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を増強することができる、選択された投与経路に適した1種類または複数種の佐剤、例えば防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、防腐剤、または緩衝液を含んでもよい。本発明の化合物は、急速に放出されないように化合物を保護する担体、例えば移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセルに閉じ込めた送達系を含む徐放製剤を用いて調製されてもよい。このような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のみもしくはポリ乳酸とろう、または当技術分野において周知の他の材料を含んでもよい。このような製剤を調製するための方法は一般的に当業者に公知である。

20

【0171】

滅菌注射液は、必要とされる量の活性化化合物を、必要に応じて、例えば前記で列挙された成分の1つまたは組み合わせと共に適切な溶媒中に組み込んだ後に、滅菌精密濾過を行うことによって調製することができる。一般的に、分散液は、活性化化合物を、基本分散媒、および必要とされる他の成分、例えば前記で列挙されたものを含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌散剤の場合、調製方法の例は、活性成分+任意のさらなる望ましい成分の散剤をそれらの予め濾過滅菌した溶液から生じさせる真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

30

【0172】

薬学的組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、患者への毒性無く、特定の患者、組成物、および投与方法について望ましい治療応答を実現するのに有効な活性成分量を得るように変えることができる。選択される投与量レベルは、使用される本発明の特定の組成物またはそのアミドの活性、投与経路、投与時間、使用されている特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組成物と併用される他の薬物、化合物、および/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、身体全体の健康、および前病歴、ならびに医学分野において周知の同様の要因を含む様々な薬物動態要因に依存する。

【0173】

薬学的組成物は、任意の適切な経路および方法によって投与することができる。1つの態様において、本発明の薬学的組成物是非経口投与される。本明細書で使用する「非経口投与される」とは、経腸投与および局所投与以外の投与方法、通常、注射による投与方法を意味し、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外、および胸骨内への注射および注入を含む。

40

【0174】

1つの態様において、薬学的組成物は、静脈内または皮下への注射または注入によって投与される。

【0175】

50

使用

さらなる主な局面において、本発明は、医薬として使用するための本発明のHER2抗体に関する。

【0176】

本発明のHER2抗体は多くの目的に使用することができる。特に、本発明の抗体は、転移性癌および難治性癌を含む様々な形態の癌の治療に使用することができる。

【0177】

1つの態様において、本発明のHER2抗体は、原発性乳癌、転移性乳癌、および難治性乳癌を含む乳癌の治療に用いられる。

【0178】

1つの態様において、本発明のHER2抗体は、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵臓癌、精巣癌、悪性黒色腫、および軟部組織癌（例えば、滑膜肉腫）からなる群より選択される癌の一形態の治療に用いられる。

【0179】

1つの態様において、本発明は、HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するための方法に関し、本方法は、それを必要とする個体に対する本発明による抗体の投与を含む。

【0180】

1つの態様において、本抗体は別の部分と結合体化されている。

【0181】

1つの態様において、1つまたは複数の腫瘍細胞は、HER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を共発現する。

【0182】

本発明はまた、癌を治療するための方法に関し、本方法は、

a) HER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を共発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、ならびに

b) 請求項1~35のいずれか一項記載の抗体を該対象に投与する段階を含む。

【0183】

1つの態様において、癌は、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍、例えば滑膜肉腫など、および膀胱癌からなる群より選択される。

【0184】

同様に本発明は、それを必要とする個体に、有効量の本発明の抗体、例えば抗体薬物結合体(ADC)を投与する段階を含む、HER2発現腫瘍細胞を死滅させるための方法に関する。

【0185】

1つの態様において、前記腫瘍細胞は、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌および頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵臓癌、精巣癌、悪性黒色腫、ならびに軟部組織癌（例えば、滑膜肉腫）からなる群より選択される癌の一形態に關与する。

【0186】

1つの態様において、腫瘍細胞は、HER2およびEGFRファミリーの少なくとも1つの他のメンバー、好ましくは、EGFR、HER3、またはEGFRおよびHER3の両方を同時発現する腫瘍細胞であり、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍（例えば、滑膜肉腫）、または膀胱癌に關与する腫瘍細胞である。

【0187】

1つの局面において、本発明は、HER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を同時発現する腫

10

20

30

40

50

瘍細胞を含む癌に罹患している対象を選択する段階、ならびに本発明の抗体、任意で、細胞傷害剤または薬物と結合体化されている抗体の形をした本発明の抗体を対象に投与する段階を含む、対象において癌を治療するための方法に関する。1つの態様において、対象は、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍（例えば、滑膜肉腫）、または膀胱癌からなる群より選択される癌に罹患している。

【0188】

また、本発明は、癌、例えば、前述された特定の癌適応症の1つを治療するための医用薬剤を調製するための、ヒトHER2に結合するモノクローナル抗体の使用に関する。

【0189】

さらに、本発明は、癌、例えば、前述された特定の癌適応症の1つの治療において使用するためのモノクローナル抗体に関する。

【0190】

本発明の治療方法のさらなる態様において、治療の効力は、療法中に、例えば所定の時点で、関連腫瘍細胞における腫瘍量またはHER2発現レベルを確かめることによってモニタリングされる。

【0191】

前記の治療方法および使用における投与計画は、最適な望ましい応答（例えば、治療応答）をもたらすように調節される。例えば、単一ボースを投与してもよく、いくつかの分割量を、ある期間にわたって投与してもよく、その用量は、治療状況の難局により示されるように比例して減少または増加してもよい。投与の容易さおよび投薬の均一性のために単位剤形で非経口組成物が処方されてもよい。

【0192】

HER2抗体の効率的な投与量および投与計画は、治療しようとする疾患または状態に左右され、当業者によって決定することができる。本発明の化合物の治療的有効量の例示的で非限定的な範囲は、約0.1~100mg/kg、例えば約0.1~50mg/kg、例えば約0.1~20mg/kg、例えば約0.1~10mg/kg、例えば約0.5 mg/kg、例えば約0.3mg/kg、約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、または約8mg/kgである。

【0193】

当技術分野において通常の知識を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物において用いられるHER2抗体の用量を、望ましい治療効果を達成するのに必要とされる用量より低いレベルで開始し、望ましい効果が達成されるまで投与量を段々と増やすことができる。一般的に、本発明の組成物の適切な一日量は、治療効果を生じるのに有効な最小用量である化合物量である。投与は、例えば非経口投与、例えば静脈内投与、筋肉内投与、または皮下投与でもよい。1つの態様において、HER2抗体は、10~500mg/m²、例えば200~400mg/m²の毎週投与量で注入されることによって投与されてもよい。このような投与は、例えば1~8回、例えば3~5回繰り返されてもよい。投与は、2~24時間、例えば2~12時間の期間にわたる連続注入によって行われてもよい。1つの態様において、毒性副作用を弱めるために、HER2抗体は、長期間にわたる、例えば24時間を超える、ゆっくりとした連続注入によって投与されてもよい。

【0194】

1つの態様において、HER2抗体は、250mg~2000mg、例えば300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg、または2000mgの毎週投与量で、8回まで、例えば4~6回、投与されてもよい。このようなレジメンは、例えば6ヶ月後または12ヶ月後に、必要に応じて1回または複数回、繰り返されてもよい。投与量は、投与の際の本発明の化合物の血中量を測定することによって、例えば、生物学的試料を採取し、本発明のHER2抗体の抗原結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を使用することによって決定または調節されてもよい。

【0195】

1つの態様において、HER2抗体は、維持療法によって、例えば、6ヶ月以上にわたって1

10

20

30

40

50

週間に1回、投与することができる。

【0196】

HER2抗体はまた、癌を発症するリスクを下げるために、癌進行における事象の発生の開始を遅延するために、および/または癌が軽快している時の再発のリスクを下げるために予防的に投与することもできる。

【0197】

HER2抗体はまた併用療法で投与することができる、すなわち、治療しようとする疾患または状態に関連する他の治療剤と組み合わせて投与することができる。従って、1つの態様において、抗体を含有する医薬は、1種類または複数種のさらなる治療剤、例えば細胞傷害剤、化学療法剤、または抗血管新生剤と併用するためのものである。

10

【0198】

このような併用投与は同時に行われてもよく、別々に行われてもよく、連続して行われてもよい。同時投与の場合、薬剤は、適宜、1つの組成物として投与されてもよく、別々の組成物として投与されてもよい。従って、本発明はまた、前記のHER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、下記の1種類または複数種のさらなる治療剤と組み合わせて本発明のHER2抗体を投与する段階を含む。

【0199】

1つの態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明のHER2抗体、および少なくとも1種類のさらなる化学療法剤を、障害の治療を必要とする対象に投与する段階を含む。

20

【0200】

1つの態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明のHER2抗体および少なくとも1種類のさらなる化学療法剤を、癌の治療または予防を必要とする対象に投与する段階を含む。

【0201】

1つの態様において、このようなさらなる治療剤は、代謝拮抗剤、例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン (decarbazine)、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピン、またはクラドリピンにより選択されてもよい。

30

【0202】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、アルキル化剤、例えばメクロレタミン、チオエパ (thioepa)、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導体、例えばカルボプラチンにより選択されてもよい。

【0203】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、有糸分裂阻害剤、例えばタキサン、例えばドセタキセルおよびパクリタキセル、ならびにピンカアルカロイド、例えばビンデシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、およびビノレルピンにより選択されてもよい。

40

【0204】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、トポイソメラーゼ阻害剤、例えばトポテカンもしくはイリノテカン、または細胞分裂停止薬、例えばエトポシドおよびテニポシドにより選択されてもよい。

【0205】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、増殖因子阻害剤、例えばErbB1 (EGFR) 阻害剤 (例えば、EGFR抗体、例えばザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブもしくはニモツズマブ (nimotuzumab)、または他のEGFR阻害剤、例えばゲフィチニブもしくはエルロチニブ)、ErbB2 (HER2/neu) の別の阻害剤 (例えば、HER2抗体、例えばトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、またはペルツズマブ)、あるいはEGFRおよびHER2両方の

50

阻害剤、例えばラパチニブにより選択されてもよい。

【0206】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、チロシンキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブ (Glivec、Gleevec STI571) またはラパチニブ、PTK787 / ZK222584により選択されてもよい。

【0207】

別の態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明のHER2抗体、ならびに血管形成、新血管新生、および / または他の血管新生の少なくとも1種類の阻害剤を、障害の治療を必要とする対象に投与する段階を含む。

10

【0208】

このような血管形成阻害剤の例は、ウロキナーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤 (例えば、マリマスタット、ネオバスタット (neovastat)、BAY12-9566、AG3340、BMS-275291、および類似の薬剤)、内皮細胞の遊走および増殖の阻害剤 (例えば、TNF- α 、スクアラミン、2-メトキシエストラジオール、コンプレタスタチン、エンドスタチン、アンジオスタチン、ペニシラミン、SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ)、R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ)、および類似の薬剤)、血管新生増殖因子のアンタゴニスト (例えば、ZD6474、SU6668、血管新生剤および / またはその受容体 (例えば、VEGF (例えば、ベパシズマブ)、bFGF、およびアンジオポエチン-1) に対する抗体、サリドマイド、サリドマイド類似体 (例えば、CC-5013)、Sugen5416、SU5402、抗血管新生リボザイム (例えば、アンジオザイム (angiozyme))、インターフェロン (例えば、インターフェロン 2a)、スラミン、および類似の薬剤)、VEGF-Rキナーゼ阻害剤および他の抗血管新生性のチロシンキナーゼ阻害剤 (例えば、SU011248)、内皮特異的インテグリン / 生存シグナル伝達の阻害剤 (例えば、ビタキシン (vitaxin) および類似の薬剤)、銅アンタゴニスト / キレート剤 (例えば、テトラチオモリブデート (tetrathiomolybdate)、カプトプリル、および類似の薬剤)、カルボキシアミド-トリアゾール (CAI)、ABT-627、CM101、インターロイキン-12 (IL-12)、IM862、PNU145156E、ならびに血管形成を阻害するヌクレオチド分子 (例えば、アンチセンス-VEGF-cDNA、アンジオスタチンをコードするcDNA、p53をコードするcDNA、および欠損VEGF受容体-2をコードするcDNA) である。

20

30

【0209】

血管形成、新血管新生、および / または他の血管新生のこのような阻害剤の他の例は、抗血管新生性のヘパリン誘導体 (例えば、ヘペリナーゼ (heparinase) III)、テモゾロミド、NK4、マクロファージ遊走阻害因子、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、低酸素誘導性因子1の阻害剤、抗血管新生性のダイズイソフラボン、オルチプラズ、フマギリンおよびその類似体、ソマトスタチン類似体、多流酸ペントサン、テコガランナトリウム、ダルテパリン、タムスタチン、トロンボスポンジン、NM-3、コンプレスタチン (combestatin)、カンスタチン (canstatin)、アバスタチン (avastatin)、他の標的に対する抗体、例えば抗 α -v / β -3インテグリンおよび抗キニノスタチン抗体である。

【0210】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤は、抗癌免疫原、例えば癌抗原 / 腫瘍関連抗原 (例えば、上皮細胞接着分子 (EpCAM / TACSTD1)、ムチン1 (MUC1)、癌胎児抗原 (CEA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (タグ-72)、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌関連ウイルスワクチン (例えば、ヒトパピローマウイルスワクチン)、または腫瘍由来熱ショックタンパク質でもよい。

40

【0211】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤は、抗癌性サイトカイン、ケモカイン、またはその組み合わせでもよい。適切なサイトカインおよび増殖因子の例には、IFN α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN γ (例えば、INF

50

2b)、IFN、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、およびTNFが含まれる。適切なケモカインは、Glu-Leu-Arg (ELR) ネガティブケモカイン、例えばヒトCXCおよびC-CケモカインファミリーからのIP-10、MCP-3、MIG、およびSDF-1を含んでもよい。適切なサイトカインには、サイトカイン誘導体、サイトカイン変種、サイトカイン断片、およびサイトカイン融合タンパク質が含まれる。

【0212】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤は、細胞周期制御/アポトーシス制御因子(または「制御剤」)でもよい。細胞周期制御/アポトーシス制御因子は、細胞周期制御/アポトーシス制御因子を標的とし、調節する分子、例えば、(i)cdc-25(例えば、NSC663284)、(ii)細胞周期を過度に刺激するサイクリン依存性キナーゼ(例えば、フラボピリドール(L868275、HMR1275)、7-ヒドロキスタウロスポリン(UCN-01、KW-2401)、およびロスコピチン(R-ロスコピチン、CYC202))、ならびに(iii)テロメラーゼモジュレーター(例えば、BIBR1532、SOT-095、GRN163、ならびに例えば、US6,440,735およびUS6,713,055に記載の組成物)を含んでもよい。アポトーシス経路に干渉する分子の非限定的な例には、TNF関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)/アポトーシス-2リガンド(Apo-2L)、TRAIL受容体を活性化する抗体、IFN、およびアンチセンスBcl-2が含まれる。

10

【0213】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤は、ホルモン制御剤、例えば抗アンドロゲン療法および抗エストロゲン療法に有用な薬剤でもよい。このようなホルモン制御剤の例は、タモキシフェン、イドキシフェン、フルベストラント、ドロロキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ジエチルstilbestrol、エチニルエストラジオール/エスチニル(estinyl)、抗アンドロゲン(例えば、フルタミンド(flutamide)/エルレキシン(eulexin))、プロゲステロン(例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシ-プロゲステロン/プロベラ、酢酸メゲストロール/メゲース)、副腎皮質ステロイド(例えば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン)、黄体形成ホルモン放出ホルモン(およびその類似体、ならびに他のLHRHアゴニスト、例えばブセレリンおよびゴセレリン)、アロマターゼ阻害剤(例えば、アナストラゾール(anastrozole)/アリミデックス、アミノグルテチミド/シトラデン(cytradene)、エキセメスタン)、またはホルモン阻害剤(例えば、オクトレオチド/サンドスタチン)である。

20

30

【0214】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤は、抗アネルギー剤、例えばCTLA-4の活性をブロックする分子、例えばイピリムマブでもよい。

【0215】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤は、抗癌性核酸または抗癌性抑制性RNA分子でもよい。

【0216】

前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、分化誘導剤、レチノイン酸類似体(例えば、オールトランスレチノイン酸、13-cisレチノイン酸、および類似の薬剤)、ビタミンD類似体(例えば、セオカルシトール(seocalcitol)および類似の薬剤)、ErbB3、ErbB4、IGF-1R、インシュリン受容体、PDGFRa、PDGFR、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、RON(例えば、抗RON抗体)、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7の阻害剤、および類似の薬剤である。

40

【0217】

前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、エストラムスチンおよびエピルピシンである。

【0218】

50

前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、HSP90阻害剤、例えば17-アリルアミノゲルダナマイシン、腫瘍抗原、例えばPSA、CA125、KSAなどに対する抗体、インテグリン、例えばインテグリン 1、またはVCAM阻害剤である。

【0219】

前記の障害を治療するためにHER2抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、カルシニューリン阻害剤（例えば、バルスポダール（valsopodar）、PSC833および他のMDR-1またはp-糖タンパク質阻害剤）、TOR阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムス、およびラパミン（rapamcyin））、ならびに「リンパ球ホーミング」機構の阻害剤（例えば、FTY720）、ならびに細胞シグナル伝達に作用する薬剤、例えば接着分子阻害剤（例えば、抗LFAなど）である。

10

【0220】

1つの態様において、本発明のHER2抗体は、1種類または複数種の他の治療用抗体、例えば、オフアツムマブ、ザノリムマブ（zanolimumab）、ダラツムマブ（daratumumab）、ラニビズマブ、Zenapax、Simulect、Remicade、Humira、Tysabri、Xolair、raptiva、および/またはリツキシマブと併用するためのものである。

【0221】

別の態様において、本明細書に記載の2つ以上の異なる本発明の抗体は、疾患の治療のために併用される。特に興味深い組み合わせには2種類以上の非ブロック抗体が含まれる。このような併用療法によって、細胞1個あたり多数の抗体分子が結合することがあり、それによって、効力が増大する、例えば、補体媒介性溶解の活性化を介して効力が増大することがある。

20

【0222】

前記に加えて、本発明の併用療法のための他の態様は、以下を含む：

乳癌の治療の場合、HER2抗体またはその治療用結合体と、メトトレキサート、パクリタキセル、ドキシソルピシン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダウノルビシン、エビルピシン、5-フルオロウラシル、ゲムシタピン、イクサベピロン、ムタマイシン（mutamycin）、ミトキサントロン、ピノレルピン、ドセタキセル、チオテパ、ピンクリスチン、カペシタピン、EGFR抗体（例えば、ザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブ（nimotuzumab））、または他のEGFR阻害剤（例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ）、別のHER2抗体もしくはHER2結合体（例えば、トラスツズマブ、例えば、トラスツズマブ-DM1もしくはペルツズマブ）、EGFRおよびHER2両方の阻害剤（例えば、ラパチニブ）との併用、ならびに/あるいはHER3阻害剤との併用；

30

非小細胞肺癌の治療の場合、HER2抗体と、EGFR阻害剤、例えば、EGFR抗体、例えば、ザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブ、または他のEGFR阻害剤（例えば、ゲフィチニブもしくはエルロチニブ）との組み合わせ、あるいは別のHER2薬剤（例えば、HER2抗体、例えば、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1もしくはペルツズマブ）との組み合わせ、あるいはEGFRおよびHER2両方の阻害剤、例えば、ラパチニブとの併用、あるいはHER3阻害剤との併用；

結腸直腸癌の治療の場合、HER2抗体と、ゲムシタピン、ペバシズマブ、FOLFOX、FOLFIRI、XELOX、IFL、オキサリプラチン、イリノテカン、5-FU/LV、カペシタピン、UFT、EGFR標的剤、例えばセツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ；VEGF阻害剤、またはチロシンキナーゼ阻害剤、例えばスニチニブより選択される1種類または複数種の化合物との併用；

40

前立腺癌の治療の場合、HER2抗体と、ホルモン/抗ホルモン療法；例えば、抗アンドロゲン、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、および化学療法剤、例えばタキサン、ミトキサントロン、エストラムスチン、5FU、ピンブラスチン、およびイクサベピロンより選択される1種類または複数種の化合物との併用。

【0223】

放射線療法-外科手術

50

1つの態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供するものであり、この方法は、それを必要とする対象への、治療的有効量のHER2抗体、例えば本発明のHER2抗体および放射線療法との投与を含む。

【0224】

1つの態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供するものであり、この方法は、それを必要とする対象への、治療的有効量のHER2抗体、例えば本発明のHER2抗体および放射線療法との投与を含む。

【0225】

1つの態様において、本発明は、放射線療法と組み合わせて投与される癌を治療するための薬学的組成物を調製するための、HER2抗体、例えば本発明のHER2抗体の使用を提供する。

10

【0226】

放射線療法は放射線を含む場合があり、または患者への放射性医薬品の關連する投与が提供される。放射線源は、治療を受けている患者の外部にあってもよく、内部にあってもよい（放射線治療は、例えば外部ビーム放射線療法（EBRT）または近接照射療法（BT）の形をとってもよい）。このような方法の実施において使用することができる放射性元素には、例えばラジウム、セシウム-137、イリジウム-192、アメリシウム-241、金-198、コバルト-57、銅-67、テクネチウム-99、ヨウ素-123、ヨウ素-131、およびインジウム-111が含まれる。

【0227】

20

さらなる態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供し、本方法は、癌の治療または予防を必要とする対象に、治療的有効量のHER2抗体、例えば本発明のHER2抗体を外科手術と組み合わせて投与する段階を含む。

【0228】

診断用途

本発明のHER2抗体は診断目的でも使用することができる。従って、さらなる局面において、本発明は、本明細書において定義されたHER2抗体を含む診断用組成物に関する。

【0229】

1つの態様において、本発明のHER2抗体は、HER2を発現する活性化細胞が発病において積極的な役割を果たしている疾患を診断するために、HER2レベルまたは膜表面にHER2を含有する細胞のレベルを検出することによってインビボまたはインビトロで使用することができる。これは、例えば試験しようとする試料とHER2抗体とを、任意で対照試料と共に、抗体とHER2との複合体が形成する条件下で接触させることによって達成することができる。

30

【0230】

従って、さらなる局面において、本発明は、試料中のHER2抗原またはHER2を発現する細胞の存在を検出するための方法に關し、本方法は、

試料と本発明のHER2抗体とを、抗体とHER2との複合体が形成する条件下で接触させる段階；および

複合体が形成したかどうか分析する段階を含む。

40

【0231】

1つの態様において、前記方法はインビトロで行われる。

【0232】

さらに具体的には、本発明は、浸潤細胞および浸潤組織、ならびに本発明のHER2抗体によって標的化される他の細胞を特定および診断するための方法、ならびに治療処置の進行、治療後の状況、癌が発症するリスク、癌の進行などをモニタリングするための方法を提供する。

【0233】

このような技法において用いられるHER2抗体および/または二次抗体に適した標識は当

50

技術分野において周知である。

【0234】

さらなる局面において、本発明は、
本発明のHER2抗体または本発明の二重特異性分子；および
キットを使用するための説明書

を含む、試料中のHER2抗原またはHER2を発現する細胞の存在を検出するためのキットに関する。

【0235】

1つの態様において、本発明は、HER2抗体、およびHER2抗体とHER2との結合を検出するための1種類または複数種の試薬を含む容器を含む、癌を診断するためのキットを提供する。試薬は、例えば蛍光タグ、酵素タグ、または他の検出可能なタグを含んでもよい。試薬はまた、二次もしくは三次の抗体または酵素反应用試薬を含んでもよく、酵素反応によって、視覚化可能な産物が産生される。

10

【0236】

抗イディオタイプ抗体

さらなる局面において、本発明は、本明細書に記載のように本発明のHER2抗体に結合する抗イディオタイプ抗体に関する。

【0237】

抗イディオタイプ (Id) 抗体は、概して、抗体の抗原結合部位に関連する独特の決定基を認識する抗体である。Id抗体は、HER2 mAbの供給源と同じ種および遺伝子型の動物を、抗Idの抗原となるmAbで免疫することによって調製することができる。免疫された動物は、典型的には、免疫用抗体のイディオタイプ決定基に対する抗体 (抗Id抗体) を産生することによって、これらのイディオタイプ決定基を認識し、イディオタイプ決定基に応答することができる。

20

【0238】

抗Id抗体はまた、さらに別の動物において免疫応答を誘導するための「免疫原」として使用して、いわゆる抗抗Id抗体を産生することもできる。抗抗Idは、抗Idを誘導した最初のmAbとエピトープが同一である可能性がある。従って、mAbのイディオタイプ決定基に対する抗体を用いることによって、特異性が同一の抗体を発現する他のクローンを特定することができる。

30

【0239】

本発明は以下の実施例によってさらに例示される。実施例は、本発明の範囲を限定するものであると解釈してはならない。

【実施例】

【0240】

実施例1-HER2およびHER2変種のための発現構築物

完全長HER2 (1255aa、Swissprot P04626)、HER2細胞外ドメイン (ECD) (Her2-ECDHis、C末端His6タグを有するaa1~653)、天然HER2スプライスバリエーション (Her2-del ϵ 16、エキソン16欠失から生じ、aa633~648を欠く)、および切断型HER2受容体 (Her2-stumpy、aa648~1256) を発現させるために、完全にコドン最適化された構築物を作製した。これらの構築物は、クローニングに適した制限部位および最適Kozak配列 (Kozak, M., Gene 1999; 234 (2) : 187-208) を含んだ。これらの構築物を、哺乳動物発現ベクター-pEE13.4 (Lonza Biologics; Bebbington, C.R., et al., Biotechnology (NY) 1992; 10 (2) : 169-75) にクローニングし、構築物が正しいことを確認するために全配列決定した。

40

【0241】

実施例2-ペルツズマブ、C1、およびF5のための発現構築物

HEK細胞においてIgG1抗体ペルツズマブ、C1、およびF5の重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) を発現させるために、完全にコドン最適化された構築物を作製した。これらの構築物によってコードされる可変領域は、ペルツズマブ重鎖および軽鎖については米国特許第6,949,245号ならびにC1およびF5重鎖および軽鎖については米国特許第7,244,826号と同一である

50

。C1およびF5については、ヒトIgG1重鎖（アロタイプf）の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターp33G1f、ヒト軽鎖またはヒト軽鎖の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターp33Kまたはp33L（pcDNA3.3（Invitrogen））を使用した。ペルツズマブについては、ヒトIgG1重鎖（アロタイプf）の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターpG1f（pEE12.4（Lonza Biologics））、およびヒト軽鎖の完全にコドン最適化された定常領域を含有するpKap pa（pEE6.4（Lonza Biologics））を使用した。

【0242】

トラスツマブ（Herceptin（登録商標））は、例えば、米国特許第7,632,924号に記載の重鎖配列および軽鎖配列を用いて同じやり方で生成することができる。

10

【0243】

実施例3-HEK-293細胞またはCHO細胞における一過性発現

Freestyle（商標）293-F（懸濁増殖および既知組成のFreestyle培地に順応させたHEK-293サブクローン、（HEK-293F））細胞をInvitrogenから入手し、適切なプラスミドDNAと293fectin（Invitrogen）を用いて製造業者の説明書に従ってトランスフェクトした。抗体発現の場合、適切な重鎖発現ベクターおよび軽鎖発現ベクターを同時発現させた。

【0244】

pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16、およびpEE13.4Her2-stumpyを、Freestyle（商標）CHO-S（Invitrogen）細胞株においてFreestyle MAXトランスフェクション試薬（Invitrogen）を用いて一過性にトランスフェクトした。HER2およびHer2-delex16の発現を、下記のようにFACS分析によって試験した。

20

【0245】

実施例4-NS0における安定ポリクローナルプール発現

pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16、およびpEE13.4Her2-stumpyを、ヌクレオフェクション（nucleofection）（Amaxa）によってNS0細胞に安定にトランスフェクトした。組み込まれたグルタミン合成酵素選択マーカー（Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 2000; 32(2): 109-123）に基づくグルタミン依存性増殖による選択後に、安定にトランスフェクトされた細胞のプールを樹立した。

【0246】

実施例5-Hisタグ化HER2の精製

Her2ECDHisをHEK-293F細胞において発現させた。Her2ECDHisの中にあるHisタグは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを用いた精製を可能にした。なぜなら、Hisタグ化タンパク質は樹脂ビーズに強く結合するが、培養上清中に存在する他のタンパク質は強く結合しないからである。

30

【0247】

このプロセスでは、クロマトグラフィー樹脂上に固定化されたキレート剤に Co^{2+} カチオンが充填されている。バッチモードで（すなわち、溶液中で）、Her2ECDHisを含有する上清を樹脂とインキュベートした。インキュベーション後、ビーズを上清から取り出し、カラムに詰めた。弱く結合しているタンパク質を除去するためにカラムを洗浄した。次いで、強く結合しているHer2ECDHisタンパク質を、Hisと Co^{2+} との結合において競合するイミダゾールを含有する緩衝液で溶出した。脱塩カラムにおける緩衝液交換によって溶出剤をタンパク質から除去した。

40

【0248】

実施例6 トランスジェニックマウスの免疫処置手順

抗体005、006、041、044、059、060、067、072、093、106および111を、以下の免疫処置手順によって得た：2匹の雌性HCo12マウス、1匹の雌性および1匹の雄性HCo12-Balb/Cマウス、1匹の雌性および1匹の雄性HCo17マウス、ならびに2匹の雄性HCo20マウス（Medarex, San Jose, CA, USA）に対して、Her2ECDを一過性にトランスフェクトした 5×10^6 個のNS0細胞の腹腔内（IP）免疫処置、およびハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させた $20 \mu\text{g}$ のHer2ECDHisタンパク質を一過性にトランスフェクトした 5×1

50

0⁶個のNS0細胞の尾基部への皮下（SC）免疫処置を、交互に2週間毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中で行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞をPBS中にてIP注射し、KLHを結合させたHer2ECDを、不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いてSC注射した。

【0249】

抗体150は、1匹の雌性HCo17マウス（Medarex）に対する、Her2delex16を一過性にトランスフェクトした5×10⁶個のNS0細胞のIP免疫処置、およびハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させた20 μgのHer2ECDHisタンパク質を一過性にトランスフェクトした5×10⁶個のNS0細胞の尾基部へのSC免疫処置を、14日の間隔をおいて交互に行うことによって得た。最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中で行った。他の免疫処置についてはすべて、PBS中にある細胞をIP注射し、KLHと結合させたHer2ECDは不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いてSC注射した。

【0250】

抗体163は、1匹の雄性HCo20マウス（Medarex）に対する、ハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させた20 μgのHer2ECDHisタンパク質による、14日間隔でのIPおよび尾基部へのSCの交互の免疫処置によって得た。最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中でIPで行った。他の免疫処置は、不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いて注射した。

【0251】

抗原特異的FMATスクリーニングアッセイ（実施例7に記載）においてTC1014-Her2、TC1014-Her2delex16、またはTC1014-Her2stumpyに対する力価が少なくとも2回連続して認められたマウスを陽性とみなし、融合した。

【0252】

実施例7：均質抗原特異的スクリーニングアッセイ

免疫マウスの血清中またはHuMab（ヒトモノクローナル抗体）ハイブリドーマもしくはトランスフェクターマの培養上清中にあるHER2抗体の存在を、均質抗原特異的スクリーニングアッセイ（4クワドラント（four quadrant））によってFluorometric Micro volume Assay Technology（FMAT；Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて確かめた。このために、4種類の細胞ベースのアッセイの組み合わせを使用した。TC1014-Her2（HER2受容体を一過性に発現するHEK-293F細胞；前記のように作製された）、TC1014-Her2delex16（Her2-delexの細胞外ドメインを一過性に発現するHEK-293F細胞（HER2受容体の16アミノ酸欠失変異体；前記のように作製された）、およびTC1014-Her2stumpy（HER2受容体の細胞外stumpyドメインを一過性に発現するHEK-293F細胞；前記のように作製された）、ならびにHEK293野生型細胞（HER2を発現しない負の対照細胞）との結合を確かめた。HER2と結合させるために、試料を細胞に添加した。その後、蛍光結合体（ヤギ抗ヒトIgG-Cy5；Jackson ImmunoResearch）を用いて、HuMabの結合を検出した。TH1014-ベルツズマブ（HEK-293F細胞において作製された）を正の対照として使用し、HuMab-マウスプール血清およびHuMab-KLHを負の対照として使用した。試料を、Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System（8200 CDS）を用いてスキャンし、「カウントx蛍光」を読み取り値として使用した。カウントが50を超えた時に試料は陽性と示され、カウントx蛍光は、負の対照の少なくとも3倍であった。

【0253】

実施例8：HuMabハイブリドーマの作製

十分な抗原特異的力価（前記で定義した）が発生したHuMabマウスを屠殺し、脾臓なら

びに腹大動脈および大静脈に隣接するリンパ節を収集した。脾細胞およびリンパ節細胞とマウスミエローム細胞株を、CEEF 50 Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA) を用いて、本質的に製造業者の説明書に従って融合した。次に、一次ウェルを、ClonePixシステム (Genetix, Hampshire, UK) を用いてサブクローニングした。この目的のために、特異的な一次ウェルハイブリドーマを、40% CloneMedia (Genetix, Hampshire, UK) および60% HyQ 2x完全培地 (Hyclone, Waltham, USA) から作られた半固体培地に播種した。実施例 7に記載のように抗原特異的結合アッセイにおいてサブクローンを再試験した。さらに増殖させるために、Octet (Fortebio, Menlo Park, USA) を用いてIgGレベルを測定して、一次ウェル1個につき最も特異的かつ最も産生しているクローンを選択した。結果として生じたHuMabハイブリドーマのさらなる増殖および培養は、標準的なプロトコール (例えば、Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006に記載のプロトコール) に基づいて行った。このプロセスによって得られたクローンをPC1014と名付けた。

10

【 0 2 5 4 】

実施例9-精製された抗体の質量分析

6ウェルまたはHyperflask段階からの抗体含有上清の小さな0.8mlアリコート、Sciclone ALH 3000ワークステーション (Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA) においてプロテインG樹脂 (PhyNexus Inc., San Jose, USA) を含有するPhyTipカラムを用いて精製した。PhyTipカラムを製造業者の説明書に従って使用したが、緩衝液を、Binding Buffer PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Netherlands) およびElution Buffer 0.1Mグリシン-HCl pH2.7 (Fluka Riedel-de Haen, Buchs, Germany) と交換した。精製後、試料を2M Tris-HCl pH9.0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands) によって中和した。または、場合によっては、さらに多量の培養上清を、MabSelect SuReを用いて精製した。

20

【 0 2 5 5 】

精製後、試料を384ウェルプレート (Waters, 100ul角型ウェルプレート, 部品番号18600 2631) に入れた。N-グリコシダーゼF (Rocheカタログ番号11365177001) を用いて、試料を37 で一晩、脱グリコシルした。DTT (15mg/mL) を添加し (1 μ l/ウェル)、37 で1時間インキュベートした。試料 (5 μ lまたは6 μ l) を、Acquity UPLC (商標) (Waters, Milford, USA) においてBEH300 C18、1.7 μ m、2.1x50mmカラムを用いて60 で脱塩した。0.1%ギ酸 (Fluka, カタログ番号56302, Buchs, Germany) を含むMQ水および0.1%ギ酸 (Fluka, カタログ番号56302, Buchs, Germany) を含むLC-MS等級のアセトニトリル (Biosolve, カタログ番号01204101, Valkenswaard, The Netherlands) を、それぞれ、溶出剤 (Eluents) AおよびBとして使用した。飛行時間型エレクトロスプレーイオン化質量スペクトルを、陽イオンモードで動いているmicrOTOF (商標) 質量分析計 (Bruker, Bremen, Germany) においてオンラインで記録した。分析の前に、900~3000m/zスケールを、ESチューニングミックス (tuning mix) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) を用いて校正した。DataAnalysis (商標) ソフトウェアv.3.4 (Bruker) と5~80kDaの分子量を探すMaximal Entropyアルゴリズムを用いて、質量スペクトルをデコンボリューションした。

30

【 0 2 5 6 】

デコンボリューション後、重複する抗体を見つけるために、全ての試料について、得られた重鎖および軽鎖の質量を比較した。これは時として余分な軽鎖の存在によるものであったが、重鎖の比較では、C末端リジン変種が存在する可能性があることも考慮に入れた。これにより、重複しない抗体、すなわち、ある特定の重鎖および軽鎖の重複しない組み合わせのリストが得られた。重複する抗体が見つかった場合には、他の試験からの結果に基づいて、1つの重複しない抗体が選択された。

40

【 0 2 5 7 】

実施例10-HER2抗体可変ドメインの配列分析および発現ベクターへのクローニング

HER2 HuMabの全RNAを 5×10^6 個のハイブリドーマ細胞から調製し、SMART RACE cDNA Amplificationキット (Clontech) を用いて製造業者の説明書に従って、100ngの全RNAから5' -

50

RACE-Complementary DNA (cDNA) を調製した。VHコード領域およびVLコード領域をPCR増幅し、連結非依存クローニング (ligation independent cloning) (Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990 ; 18 (20) : 6069-74) によって、pG1f発現ベクターおよびpKappa発現ベクターにインフレームで直接クローニングした。このプロセスによって得られたクローンをTH1014と名付けた。それぞれの抗体について、16個のVLクローンおよび8個のVHクローンを配列決定した。さらなる研究および発現のために、重鎖質量および軽鎖質量の推定値が (質量分析によって求められた) 同じ抗体のハイブリドーマ由来材料の質量と一致するクローンを選択した。

【 0 2 5 8 】

結果として生じた配列を図1および図2ならびに配列表に示した。選択された配列を下記においてもさらに詳細に説明する。CDR配列を、IMGT (Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999およびBrochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)) に従って定義した。表1、表2、および表3は抗体配列情報または生殖系列配列の概要を示す。表4はコンセンサス配列を示す。

【 0 2 5 9 】

(表1) HuMab 005、006、059、060、106、および111の重鎖可変領域 (VH)、軽鎖可変領域 (VL)、およびCDR配列

SEQ ID No: 1	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDS DTRYRPSFQGQVTISA DKSISTAYLQW TSLKASDTAIYYCARQRGDY YFYGM DVWGQGT TTVTSS
SEQ ID No: 2	VH 005, CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID No: 3	VH 005, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No: 4	VH 005, CDR3	ARQRGDY YFYGM DV
SEQ ID No: 5	VL 005	EIVLTQSPG T LSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWY QQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 6	VL 005, CDR1	QSVSSSY
	VL 005, CDR2	GAS
SEQ ID No: 7	VL 005, CDR3	QQYGSSLT
SEQ ID No: 8	VH 006	EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSNYALIWV RQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPLFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 9	VH 006, CDR1	GFTFSNYA
SEQ ID No: 10	VH 006, CDR2	IRGGAGST
SEQ ID No: 11	VH 006, CDR3	AKARIWGPLFDY
SEQ ID No: 12	VL 006	EIVLTQSPAT LSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGG TKVEIK

10

20

30

SEQ ID No: 13	VL 006, CDR1	QSVSSY	
	VL 006, CDR2	DAS	
SEQ ID No: 14	VL 006, CDR3	QQRSNWPPLT	
SEQ ID No: 15	VH 059	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYAQLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELY FDYWGQGTLVTVSS	
SEQ ID No: 16	VH 059, CDR1	GYTFTRYG	
SEQ ID No: 17	VH 059, CDR2	ISAYNGKT	
SEQ ID No: 18	VH 059, CDR3	ARSPLLWFEELYFDY	10
SEQ ID No: 19	VL 059	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGTSLFTFGPGTKVDIK	
SEQ ID No: 20	VL 059, CDR1	QSVSSTY	
	VL 059, CDR2	GAS	
SEQ ID No: 21	VL 059, CDR3	QQYGTSLFT	
SEQ ID No: 22	VH 060	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQQQVTISA DKSIATAYLQWNSLKASDTAMYYCARHAGDFYFDG LDVWGQGTTVTVSS	20
SEQ ID No: 23	VH 060, CDR1	GYRFTTSYW	
SEQ ID No: 24	VH 060, CDR2	IYPGDSYT	
SEQ ID No: 25	VH 060, CDR3	ARHAGDFYFDGLDV	
SEQ ID No: 26	VL 060	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGTRLEIK	
SEQ ID No: 27	VL 060, CDR1	QSVSSSY	
	VL 060, CDR2	GAS	
SEQ ID No: 28	VL 060, CDR3	QQYGSSPPIT	
SEQ ID No: 29	VH 106	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRYSPSFQQQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFYDY SGMDVWGQGTTVTVSS	30
SEQ ID No: 30	VH 106, CDR1	GYSFTRYW	
SEQ ID No: 31	VH 106, CDR2	IYPGSDST	
SEQ ID No: 32	VH 106, CDR3	ARLTGDRGFYYSGMDV	
SEQ ID No: 33	VL 106	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-FTFGPGTKVDIK	
SEQ ID No: 34	VL 106, CDR1	QSVSSSY	
	VL 106, CDR2	GAS	40
SEQ ID No: 35	VL 106, CDR3	QQYGSSFT	

SEQ ID No: 36	VH 111	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISW VRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITAD KSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSNWYYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 37	VH 111, CDR1	GGTFSSYG
SEQ ID No: 38	VH 111, CDR2	IIPILGIA
SEQ ID No: 39	VH 111, CDR3	ARDQEYSSNWYY
SEQ ID No: 40	VL 111	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVRSSLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQLYGSSPTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 41	VL 111, CDR1	QSVRSSY
	VL 111, CDR2	GAS
SEQ ID No: 42	VL 111, CDR3	QLYGSSPT

10

【 0 2 6 0 】

(表2) HuMab 005、006、059、060、106、および111の Maus 起源ならびに重鎖配列相同性および軽鎖配列相同性

HuMab:	Maus:	系統 :	生殖系列 VH:	生殖系列 VL:
005	350611	HCo12- BalbC	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
006	350611	HCo12- BalbC	IgHV3-23-1	IgKV3-11-01
059	350654	HCo17	IgHV1-18-1	IgKV3-20-01
060	350654	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
106	350660	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
111	350660	HCo17	IgHV1-69-4	IgKV3-20-01

20

【 0 2 6 1 】

(表3) HuMab 041、150、067、072、163、093、および044の重鎖可変領域 (VH) 配列、軽鎖可変領域 (VL) 配列。それぞれのCDRは、図1において下線が引かれたVH配列のCDRおよび図2において下線が引かれたVL配列のCDRに対応する。

30

SEQ ID No: 43	VH 041	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQKGDYFFFLDVGQGTITVSS
SEQ ID No: 44	VL 041	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 45	VH 150	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQAGDYNNYNGMDVWGQGTITVSS
SEQ ID No: 46	VL 150	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 47	VH 067	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDT AMYCARQKGDYNNYHYGLDVGQGTITVSS
SEQ ID No: 48	VL 067	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 49	VH 072	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYCARQKGDYNNYFNGLDVGQGTITVSS
SEQ ID No: 50	VL 072	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 51	VH 163	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYRFISYWIGWVRQMPGKGL EWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQKGDYNNYFNGLDVGQGTITVSS
SEQ ID No: 52	VL 163	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 53	VH 093	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSITAYLQWSSLRASDT AMYCARQKGDYNNYFFGLDIWGQGTITVTVSL
SEQ ID No: 54	VL 093	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 55	VH 044	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIFGDS DTRYSPSFQGQVTISADKSITAYLQWSSLKASDT AMYCARQAGDYNNYNGMDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID No: 56	VL 044	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK

【 0 2 6 2 】

(表4) 図1および2に示された配列アラインメントに基づくコンセンサスCDR

SEQ ID No: 57 005-060-106-041- 150-067-072-163- 093-044	IgHV5- 51-1	VH CDR1	GYX1FX2X3YW	式中、X1=SまたはR； X2=S、T、HまたはI； およびX3=S、RまたはF； 好ましくは、式中、 X2=HまたはT
SEQ ID No: 58 005-060-106-041- 150-067-072-163- 093-044	IgHV5- 51-1	VH CDR2	IX1PGDSX2T	式中、X1=YまたはF； X2=D、YまたはH； 好ましくは、式中、 X2=DまたはY

SEQ ID No: 59 005-060-106-041- 150-067-072-163- 093-044	IgHV5- 51-1	VH CDR3	ARX1X2X3X4X5X 6X7X8YX9X10GX 11DX12	式中、X1=Q、HまたはL； X2=R、A、TまたはK； X3=G；X4=D；X5=Rまたは 無し；X6=Gまたは無し； X7=YまたはF；X8=YまたはD； X9=Y、FまたはH；X10=Y、 D、S、FまたはN；X11=Mまたは L；およびX12=VまたはI； 好ましくは、式中、 X1=Q、X2=RまたはA； X5=X6=無し；X7=Yまたは F；X8=Y；X9=F；X10=Y； およびX12=V	10
SEQ ID No: 60 006	IgHV3- 23-1	VH CDR1	GFTFSXYA	式中、X=NまたはS、 好ましくはN	
SEQ ID No: 61 006	IgHV3- 23-1	VH CDR2	IX1GX2X3GST	式中、X1=RまたはS； X2=GまたはS；およびX3=A またはG、好ましくは式中、 X1=R；X2=G；およびX3=A	20
SEQ ID No: 62 006	IgHV3- 23-1	VH CDR3	AKRIWGPXFDY	式中、X=LまたはY、 好ましくはL	
SEQ ID No: 63 059	IgHV1- 18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	式中、X=RまたはS、 好ましくはR	
SEQ ID No: 64 059	IgHV1- 18-1	VH CDR2	ISAYNGXT	式中、X=KまたはN、 好ましくはK	
SEQ ID No: 65 059	IgHV1- 18-1	VH CDR3	ARSPLLWFEELYF DY		30
SEQ ID No: 66 111	IgHV1- 69-4	VH CDR1	GGTFSSYX	式中、X=GまたはA、 好ましくはG	
SEQ ID No: 38 111	IgHV1- 69-4	VH CDR2	IIPILGIA		
SEQ ID No: 67 111	IgHV1- 69-4	VH CDR3	ARDQEYSSX1X2 X3	式中、X1=NまたはY； X2=WまたはF；およびX3=Y またはD、好ましくは式中、 X1=N；X2=W；および X3=Y	40

SEQ ID No: 68 005-059-060-106- 111-041-150-067- 072-163-093-044	IgKV3- 20-01	VL CDR1	QSVX1SX2Y	式中、X1=SまたはR、 およびX2=SまたはT	
005-059-060-106- 111-041-150-067- 072-163-093-044	IgKV3- 20-01	VL CDR2	GAS		
SEQ ID No: 69 005-059-060-106- 111-041-150-067- 072-163-093-044	IgKV3- 20-01	VL CDR3	QX1YGX2SX3X4 X5T	式中、X1=QまたはL； X2=SまたはT；X3=P または無し；X4=P、L、 Rまたは無し；および X5=L、F、Iまたは無し； 好ましくは、式中、 X4=P、Lまたは無し	10
SEQ ID No: 13 006	IgKV3- 11-01	VL CDR1	QSVSSY		
006	IgKV3- 11-01	VL CDR2	DAS		20
SEQ ID No: 14 006	IgKV3- 11-01	VL CDR3	QQRSNWPLT		

【0263】

実施例11-抗体の精製

培養上清を0.2µmデッドエンドフィルターで濾過し、5mlのMabSelect SuReカラム（GE Health Care）にロードし、0.1Mクエン酸ナトリウム-NaOH、pH3を用いて溶出した。すぐに、溶出液を2M Tris-HCl、pH9で中和し、12.6mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH7.4（B.Braun）に対して一晩、透析した。または、精製後、溶出液をHiPrep Desaltingカラムにロードし、抗体を12.6mM NaH₂PO₄、140mM NaCl、pH7.4（B.Braun）緩衝液に交換した。透析後または緩衝液交換後、試料を0.2µmデッドエンドフィルターで滅菌濾過した。純度をSDS-PAGEによって求め、濃度を比濁分析および280nmでの吸光度によって測定した。精製抗体を4で保管した。実施例9に記載のように、ハイブリドーマによって発現された抗体重鎖および軽鎖の分子量を特定するために、質量分析を行った。

【0264】

実施例12 FACS分析を利用して測定した、膜結合型HER2を発現する腫瘍細胞に対するHER2クローンの結合

AU565細胞（ATCCで購入、CRL-2351）およびA431細胞（ATCCで購入、CRL-1555）に対するHER2抗体の結合を、フローサイトメトリーを用いて試験した（FACS Canto II, BD Biosciences）。Qifi分析（Dako, Glostrup, Denmark）により、AU565細胞が細胞当たり平均1,000,000コピーのHER2タンパク質を発現し、一方、A431細胞は細胞当たり平均15,000コピーを発現したことが判明した。HER2抗体の結合は、フィコエリトリン（PE）結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson）を用いて検出した。臨床グレードのハーセプチン（登録商標）（Roche）を陽性対照として用い、アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。EC₅₀値は、非線形回帰（傾きが変化するS字形用量反応）を利用して、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて決定した。

【0265】

図3に示すように、試験したHER2抗体はすべて、AU565細胞およびA431細胞の両方の上で

10

20

30

40

50

発現されたHER2と用量依存的な様式で結合した。結合に関するEC₅₀値は、AU565細胞については0.304~2.678 µg/mL、A431細胞については0.106~1.982 µg/mLとさまざまであった。特にA431細胞に関しては、試験した抗体の間でEC₅₀値の大きな違いが観察された。最大結合レベルのある程度の違いは、異なる抗体間でも観察された。特に、抗体005および006は、他のHER2抗体と比較して、A431上でのより高度な最大結合レベルを明らかに示した。

【0266】

実施例13-FACS分析によって測定された、HER2抗体と、アカゲザル上皮細胞上に発現している膜結合型HER2との結合

アカゲザルHER2との交差反応性を確かめるために、フローサイトメトリー（FACS Canto II, BD Biosciences）を用いて、HER2抗体とHER2陽性アカゲザル上皮細胞（4MBr-5、ATCCで購入）との結合を試験した。フィコエリトリン結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson）を二次結合体として使用した。アイソタイプ対照抗体を負の対照抗体として使用した。

【0267】

図4に示したように、試験した全てのHER2抗体がアカゲザルHER2と交差反応した。どちらの試験濃度（1 µg/mLおよび10 µg/mL）でもHER2抗体はアカゲザルHER2に特異的に結合することができた。アイソタイプ対照抗体を用いた場合、結合は観察されなかった。

【0268】

実施例14-サンドイッチELISAにおいて測定された、可溶性Her2ECDHisとの結合におけるHER2抗体の競合

最適な試験HER2抗体コーティング濃度および最適なHer2ECDHis濃度を以下のように求めた。ELISAウェルを、PBSで連続希釈したHER2 HuMab（2倍希釈で0.125~8 µg/mL）で4晩コーティングした。次に、ELISAウェルをPBST（0.05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands] を添加したPBS）で洗浄し、PBSTC（2% [v/v] ニワトリ血清 [Gibco, Paisley, Scotland] を添加したPBST）で室温（RT）で1時間ブロックした。次いで、ELISAウェルをPBSTで洗浄し、PBSTCで連続希釈したHer2ECDHis（2倍希釈で0.25~2 µg/mL）とRTで1時間インキュベートした。結合しなかったHer2ECDHisをPBSTで洗い流し、結合したHer2ECDHisを、0.25 µg/mL ビオチン化ウサギ抗6xhis-biot（Abcam, Cambridge, UK）とRTで1時間インキュベートした。その後、プレートをPBSTで洗浄し、PBSTで希釈した0.1 µg/mL ストレプトアビジン-ポリ-HRP（Sanquin, Amsterdam, The Netherlands）と1時間インキュベートした。洗浄後、光から保護しながら、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)（ABTS：1個のABTS錠剤を50mL ABTS緩衝液（Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands）で希釈した）とRT（室温）で15分間インキュベートすることによって、反応を視覚化した。等量のシュウ酸（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）を添加することによって発色を止めた。405nmでの蛍光をマイクロタイタープレートリーダー（Biotek Instruments, Winooski, USA）によって測定した。それぞれの抗体の最適以下の結合をもたらした抗体濃度を求め、以下のクロスブロック実験に使用した。

【0269】

各HER2抗体を、上記の通りに決定した準最適用量でELISAウェルにコーティングした。ELISAウェルのブロック後に、ウェルを、所定の濃度の1 µg/mL ビオチン化Her2ECDHisとともに、過剰な第2の（競合用）HER2抗体の存在下または非存在下でインキュベートした。次いでELISAを上記の通りに行った。コーティングされた抗体に対するHer2ECDHisの残留結合を、競合用抗体の非存在下で観察された結合に対する相対的なパーセンテージとして表した。続いて、それぞれの抗体の組み合わせに関する競合率を、100から阻害率を差し引いたものとして求めた。75%の競合は完全なブロック、25~74%の競合は部分的ブロック、および0~24%の競合はブロックがないことを表した。

【0270】

表5に示すように、HER2抗体はすべて、Her2ECDHisに対する結合に関して、それら自体と少なくとも部分的には競合した。トラスツズマブ（臨床グレードのハーセプチン（登録

10

20

30

40

50

商標)) およびペルツズマブ (TH1014-pert、HEK-293細胞において一過性に産生) は、それら自体と競合することのみが可能であり、列記した他のHER2抗体のいずれとも競合することができなかった。C1およびF5 (どちらもHEK-293細胞において一過性に産生) は、Her2ECDHisに対する結合に関して互いに競合したが、他のHER2抗体とは競合しなかった。

【0271】

抗体005、006、059、060、106および111はすべて、Her2ECDHisに対する結合に関して互いに競合したが、トラスツズマブ、ペルツズマブ、C1またはF5のいずれともクロスブロックは行わなかった。クローン005、059、060および106は、006が競合用抗体である場合にのみ006をブロックした。006を固定化した逆反応では、005、059、060または106によるブロックは全く見られなかった。これは、クローン006の見かけの親和性が、図3Aおよび3B

10

【0272】

(表5) Her2ECDHisに対する結合に関するHER2抗体の競合およびブロック

固定化されたmAb ↓	競合 mAb: →									
	Tras	Pert	C1	F5	106	111	005	006	059	060
トラスツズマブ	6	100	103	99	114	166	137	110	120	119
TH1014-pert	104	9	106	125	115	145	151	125	132	118
TH1014-C1	89	85	65	58	84	86	98	99	89	93
TH1014-F5	197	178	70	21	129	183	178	192	165	185
PC1014-106	323	275	471	495	26	21	25	25	25	23
PC1014-111	110	102	122	119	75	14	51	10	65	36
PC1014-005	126	115	157	227	54	32	18	15	22	12
PC1014-006	163	136	136	153	127	47	148	20	129	125
PC1014-059	117	107	78	128	23	12	13	11	12	11
PC1014-060	106	99	108	126	37	35	30	6	14	19
クロスブロック群	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4

20

30

75 - 100% 競合

25 - 74% 競合

0 - 24% 競合

【0273】

示した値は、2回の独立した実験の、競合用抗体の非存在下で観察された結合に対する相対的な結合の平均阻害率である。HEKにより産生されたC1およびF5 (TH1014-C1およびTH1014-F5) を用いる競合実験は1回行った。トラスツズマブ (臨床グレードのハーセプチン (登録商標)) およびHEKにより産生されたペルツズマブ (TH1014-pert) についても2回

40

【0274】

実施例15-抗体依存性細胞傷害 (ADCC)

SK-BR-3細胞 (ATCCで購入、HTB-30) を収集し (5x10⁶個の細胞)、洗浄し (PBSで1500rpm、5分間、2回)、10% コスミック (cosmic) 仔ウシ血清 (CCS) (HyClone, Logan, UT, USA) を添加したRPMI1640培地1mLに収集した。これに、200 μCi⁵¹Cr (クロム-51; Amer sham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands) を添加した。振盪している水浴中で、混合物を37 °Cで1.5時間インキュベートした。細胞を (PBSで1500rpm、5分間、2回) 洗浄した後、10% CCSを添加したRPMI1640培地に再懸濁し、トリパンブルー排除によって計数し、1x10⁵細胞/mLの濃度まで希釈した。

50

【0275】

その間、末梢血単核球（PBMC）を、標準的なFicoll密度遠心分離を用いて製造業者の説明書（リンパ球分離培地； Lonza, Verviers, France）に従って、新鮮なバフィーコート（Sanquin, Amsterdam, The Netherlands）から単離した。細胞を、10%CCSを添加したRPMI1640培地に再懸濁した後に、トリパンブルー排除によって計数し、 1×10^7 細胞/mLまで濃縮した。

【0276】

ADCC実験のために、96ウェルマイクロタイタープレートの中で、 $50 \mu\text{L}$ の ^{51}Cr 標識SK-BR-3細胞（5,000個の細胞）を、総体積 $100 \mu\text{L}$ の10%CCS添加RPMI培地に溶解した $15 \mu\text{g/mL}$ HER2抗体（IgG1, ）とプレインキュベートした。RTで15分後に、 $50 \mu\text{L}$ のPBMC（500,000個の細胞）を添加して、100：1のエフェクター：標的比にした。細胞溶解の最大量は、 $50 \mu\text{L}$ の ^{51}Cr 標識SK-BR-3細胞（5,000個の細胞）を $100 \mu\text{L}$ の5%Triton-X100とインキュベートすることによって確かめられた。自然溶解量は、抗体またはエフェクター細胞を含まない $150 \mu\text{L}$ の培地中で5,000個の ^{51}Cr 標識SK-BR-3細胞をインキュベートすることによって確かめられた。抗体非依存性細胞溶解のレベルは、抗体を使用せずに5000個のSK-BR-3細胞を500,000個のPBMCとインキュベートすることによって確かめられた。その後細胞を、37、5%CO₂で4時間インキュベートした。細胞溶解量を確かめるために、細胞を遠心分離（1200rpm、3分）し、 $75 \mu\text{L}$ の上清をマイクロニックチューブ（micronic tube）に移し、この後に、放出された ^{51}Cr を、ガンマカウンターを用いてカウントした。測定されたカウント毎分（cpm）を用いて、以下のように抗体性溶解のパーセントを計算した：

$$\left(\text{cpm試料} - \text{cpm Ab非依存性溶解} \right) / \left(\text{cpm最大溶解} - \text{cpm自然溶解} \right) \times 100\%。$$

【0277】

図5に示すように、HER2抗体はすべて、SK-BR-3細胞のADCCを介した効率的な溶解を誘導した。種々の抗体による平均溶解率は15%～28%の間であったが、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））だけは例外で、平均41%の溶解を示した。理論に拘束されるものではないが、トラスツズマブによるより高い溶解率は、HEKにより産生された他のHER2抗体上のほぼ4%の非コア（non-core）フコシル化と比較して、そのCHO産生に起因する非コアフコシル化グレードの増大（12.4%）が原因で、またはHER2受容体-抗体複合体の、より少ない内部移行を誘導するエピトープを認識することによって、起こった可能性がある。

【0278】

実施例16-AU565細胞のリガンド非依存性増殖の阻害

HER2抗体がインビトロでAU565細胞の増殖を阻害する能力を試験した。AU565細胞上でのHER2発現レベルが高いために（実施例12に記載のように細胞1個あたり約1,000,000コピー）、これらの細胞においてHER2は常時活性型であり、従って、リガンド誘導性ヘテロ二量体化に依存しない。

【0279】

96ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany）の中に、1ウェルにつき9000個のAU565細胞を、無血清細胞培地に溶解した $10 \mu\text{g/mL}$ HER2抗体の存在下で播種した。対照として、細胞を、抗体を含まない無血清培地に播種した。3日後に、Alamarblue（BioSource International, San Francisco, US）を用いて製造業者の説明書に従って、生細胞量を定量した。EnVision 2101 Multilabelリーダー（PerkinElmer, Turku, Finland）と標準的なAlamarblue設定を用いて、蛍光をモニタリングした。抗体処理細胞のAlamarblueシグナルを未処理細胞に対するパーセントでプロットした。統計解析にはダネット検定を適用した。

【0280】

結果は図6に描写されており、これはHER2抗体処理後のAU565細胞の増殖率を、100%に設定した非処理細胞と比較して示している。ハーセプチンは見かけ上、AU565細胞増殖を阻害したが、この効果は統計学的に有意ではなかった。TH1014-F5はAU565細胞の増殖を有意に強化し、このことはこれがアゴニスト抗体であることを示しているが、一方、試験し

た他の抗体はいずれも（005、060およびペルツズマブ）、AU565増殖に対して実質的効果を有しなかった。トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））およびペルツズマブに関して、これはJuntilla et al., (Cancer Cell 2009;15:429-440)によって記載された結果に一致している。

【0281】

（表6）100%に設定した非処理細胞と比較した、HER2抗体処理後のAU565細胞の平均増殖率

抗体	増殖率
PC1014-005	103
PC1014-060	104
TH1014-F5	180
TH1014-pert	101
ハーセプチン	83
アイソタイプ対照	101

10

【0282】

実施例17-抗 -ETA'アッセイ

抗体-薬物結合体アプローチへのHER2抗体の適性を調べるために、指向性シュードモナス属エキソトキシンA（抗 -ETA'）を用いた商標登録で保護されていない（generic）インビトロ細胞ベース殺傷アッセイを開発した。このアッセイでは、切断型シュードモナス属エキソトキシンAと結合体化された高親和性抗ドメイン抗体を使用する。抗 -ETA'ドメイン抗体は内部移行するとタンパク質分解され、ジスルフィド結合が還元されて、触媒ドメインと結合ドメインは分離される。触媒ドメインはKDEL保留モチーフを介してゴルジ体から小胞体に輸送され、その後サイトゾルに移動される。サイトゾルにおいて触媒ドメインはタンパク質合成を阻害し、アポトーシスを誘導する（Kreitman RJ. BioDrugs 2009; 23(1): 1-13）。このアッセイにおいて、内部移行および毒素による死滅を可能にするHER2抗体を特定するために、HER2抗体は抗 -ETA'と先に結合体化された後に、HER2陽性細胞とインキュベートされる。上述の通り、AU565細胞は、細胞当たり多数のHer2分子を発現し（約 10^6 分子/細胞）、一方A431細胞は、細胞当たり少数のHer2分子を発現する（約30,000分子/細胞）。

20

【0283】

最初に、それぞれの細胞株に最適な抗 -ETA'濃度、すなわち、非特異的細胞死を誘導しない最大投与可能量を求めた。AU565細胞（7500細胞/ウェル）およびA431細胞（2500細胞/ウェル）を正常細胞培地が入っている96ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one）に播種し、少なくとも4時間、付着させた。次に、細胞を、正常細胞培地で溶解した100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.01 μ g/mL、0.001 μ g/mL、および0 μ g/mLの抗 -ETA'希釈液とインキュベートした。3日後に、Alamarblue（BioSource International, San Francisco, US）を用いて製造業者の説明書に従って、生細胞量を定量した。EnVision 2101 Multilabelリーダー（PerkinElmer, Turku, Finland）と標準的なAlamarblue設定を用いて、蛍光をモニタリングした。単独で細胞を死滅させなかった抗 -ETA'最高濃度を以下の実験に使用した（AU565の場合、0.5 μ g/mL、A431の場合、1 μ g/mL）。

30

40

【0284】

次に、異なるHER2抗体について、抗体によって媒介された内部移行および毒素による死滅を試験した。細胞を前記のように播種した。HER2抗体の希釈シリーズを所定の濃度の抗 -ETA'と30分間プレインキュベートした後に、細胞に添加した。3日間インキュベートした後に、生細胞量を前記のように定量した。抗 -ETA'結合抗体で処理された細胞のAlamarblueシグナルを、抗体のみで処理された細胞と比較してプロットした。細胞死滅については正の対照として23.4 μ g/mLのスタウロスポリンを使用した。負の対照としてアイソタイプ対照抗体を使用した。

【0285】

図7Aおよび表7に示す通り、抗 -ETA'結合HER2抗体はすべて、AU565細胞を用量依存的

50

な様式で死滅させることができた。抗 -ETA' 結合ハーセプチンはAU565細胞の32%のみを死滅させ、一方、他の結合体化抗体はすべて、50~72%の細胞死滅を誘導した。さらに、抗体005および111は、トラスツズマブ(78.49ng/mL)と比較して、EC₅₀値(それぞれ15.13ng/mLおよび24.20ng/mL)を3倍を超えて向上させることが実証された。トラスツズマブを除き、非結合体化HER2抗体は、試験した濃度ではAU565細胞の死滅を誘導しなかった。

【0286】

(表7) 抗 -ETA' 結合HER2抗体によるAU565細胞の死滅。示したデータは、1つの代表的な実験で測定した、抗 -ETA' 結合HER2抗体で処理したAU565細胞のEC₅₀値および最大細胞死滅率である。スタウロスポリンによって誘導された細胞死滅を100%に設定し、非処理細胞のMFIを0%に設定した。「Ndet」は検出されなかったことを意味する。

抗体	細胞死滅率	EC50 ng/mL
PC1014-111	72.0	24.2
PC1014-005	69.7	15.13
PC1014-059	67.0	67.65
PC1014-060	64.3	79.38
PC1014-106	59.1	107.9
PC1014-006	50.4	45.14
トラスツズマブ	31.9	78.49
アイソタイプ対照	Ndet	Ndet

【0287】

図7Bおよび表8に示すように、抗体005および060は、抗 -ETA' と結合体化させた場合にA431細胞の有効な死滅(85%以上)を誘導することができたが、一方、抗 -ETA' 結合ハーセプチンおよびアイソタイプ対照抗体はA431細胞の死滅を誘導しなかった。さらに、抗体005および111は、低い抗体濃度(10ng/mL)で既にA431細胞を死滅させ、EC₅₀値は約10ng/mLであることが実証された。非結合体化HER2抗体では細胞死滅は全く観察されなかった。

【0288】

(表8) 抗 -ETA' 結合HER2抗体によるA431細胞の死滅。示したデータは、1つの代表的な実験で測定した、抗 -ETA' 結合HER2抗体で処理したAU431細胞のEC₅₀値および最大細胞死滅率である。スタウロスポリンによって誘導された細胞死滅を100%に設定し、非処理細胞のMFIを0%に設定した。

抗体	細胞死滅率	EC50 ng/mL
PC1014-005	88.5	~ 10.07
PC1014-060	85.0	~ 10.03
トラスツズマブ	NDet	NDet
アイソタイプ対照	NDet	NDet

【0289】

実施例18 FMATに基づくfab-CypHer5Eアッセイを用いて測定したHER2抗体の内部移行

前の実施例で記載した -毒素-ETA' アッセイにおいて観察されたAU565細胞の強化された死滅が、HER2抗体の強化された内部移行と相関するか否かを調べるために、fab-CypHer5Eに基づく内部移行アッセイを行った。CypHer5Eは、塩基性pH(細胞外:培養培地)では非蛍光性であって、酸性pH(細胞内:リソソーム)では蛍光性であるpH感受性色素であり、酸解離定数(pKa)は7.3である。

【0290】

AU565細胞を、240ng/mLのfab-CypHer5E(ヤギfab-抗ヒトIgG [Jackson] とCypHer5E [GE Healthcare, Eindhoven, The Netherlands])とを製造元の指示に従って自社内で結合体化)を加えた通常の細胞培養培地中にて、384ウェル組織培養プレート(Greiner bio-one)に細胞3000個/ウェルで播種した。次に、HER2抗体を正常細胞培養培地中に系列希釈した上で細胞に添加し、室温で9時間そのまま置いた。細胞内CypHer5Eの平均蛍光強度(M

FI) を8200 FMAT (Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, The Netherlands) を用いて測定し、「カウント数×蛍光」を読み取り値として用いた。アイソタイプ対照抗体を陰性対照抗体として用いた。EC₅₀値および最大MFIは、非線形回帰(傾きが変化するS字形用量反応)を利用して、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて決定した。

【0291】

結果は表9に示されており、これはAU565細胞を用いたCypHer5E内部移行アッセイにおける試験したHER2抗体すべてに関するEC₅₀値および最大MFIを描写している。最大MFI値は、結合に際してどの程度の数のHER2抗体が内部移行を受けたかを反映している。ヒトHER2抗体はすべて、トラスツズマブ(35,000)およびTH1014-pert(35,323)よりも高い最大MFI値(130,529~57,428)を示し、このことはこれらの抗体が強化された受容体内部移行を誘導したことを示している。TH1014-F5の強化された内部移行は、そのアゴニスト活性およびHER2-HER2二量体化の誘導の結果である可能性がある(実施例16参照)。

10

【0292】

(表9) HER2抗体のCypher-5に基づく内部移行アッセイ。示したデータは、fab-CypHer5E標識HER2抗体で処理したAU565細胞を用いた2回の実験からの1つの代表的な実験のMFIおよびEC₅₀値である。

Cypher 5		
抗体	EC ₅₀ ng/ mL	最大 MFI
PC1014-006	23.08	130829
PC1014-005	21.37	95117
PC1014-111	35.22	81680
PC1014-059	14.77	77123
PC1014-060	36.16	68184
PC1014-106	68.60	57428
TH1014-F5	22.65	113116
TH1014-pert	~1041	35323
トラスツズマブ	21.70	35000

20

30

【0293】

実施例19 HER2のダウンモジュレーション

本発明の抗体によって誘導された強化されたHER2内部移行が、強化された受容体ダウンモジュレーションももたらすか否かを調べるために、005を代表的抗体として選択し、HER2のダウンモジュレーションを誘導する能力に関して試験した。このために、AU565細胞をHER2抗体とともに3日間インキュベートして、HER2の存在に関して分析した。AU565細胞を正常細胞培養培地中にて24ウェル組織培養プレート(細胞100,000個/ウェル)に播種して、10 µg/mLのHER2抗体の存在下で37 °Cで3日間培養した。PBSで洗浄した後に、細胞を、25 µLのSurefire溶解緩衝液(Perkin Elmer, Turku, Finland)とともに室温で30分間インキュベートすることによって溶解させた。ピシンコニン酸(BCA)タンパク質アッセイ試薬(Pierce)を製造元のプロトコールに従って用いて、総タンパク質レベルを定量した。溶解液におけるHER2タンパク質レベルを、HER2特異的サンドイッチELISAを用いて分析した。ウサギ-抗ヒトHER2細胞内ドメイン抗体(Cell Signaling)を用いてHER2およびビオチン化ヤギ抗ヒトHER2ポリクローナル抗体(R&D)を捕捉し、その後にストレプトアビジン-ポリ-HRPを用いて結合型HER2を検出した。反応を2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS: ABTSの1錠を50mL ABTS緩衝液[Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands]中に希釈)を用いて視覚化し、シュウ酸(Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)を用いて停止させた。405nmの蛍光をマイクロタイターブ

40

50

レートリーダー (Biotek Instruments, Winooski, USA) で測定し、HER2の量を非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとして表した。

【0294】

結果は図8および以下の表10に示されており、これはHER2の量を非処理細胞と比較したパーセンテージとして表している。図8および表10における結果は、抗体005がおよそ30%のHER2ダウンモジュレーションを誘導し、一方、ハーセプチンがおよそ20%のHER2ダウンモジュレーションを誘導したことを明らかに示している。これは抗体005によって観察された強化された内部移行と合致する。

【0295】

(表10) 抗体が誘導したHER2のダウンモジュレーションを、非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージとして表す

抗体	非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージ
ハーセプチン	80
IgG1-1014-005	70
アイソタイプ対照	108

【0296】

実施例20 共焦点顕微鏡検査によって分析したHER2抗体とリソソームマーカーLAMP1との共存

実施例19に記載したHER2ダウンモジュレーションアッセイ、およびCypHer-5Eに基づく内部移行アッセイにより、本発明のHER2抗体がより効率的に内部移行を受け、リソソームに向けて標的化されることが示された。これらの知見を確かめるために、共焦点顕微鏡検査技術を適用した。AU565細胞を標準的な組織培養培地中にてカバーガラス(厚さ1.5ミクロン、ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Germany)上で37°Cで3日間増殖させた。リソソーム活性をブロックするために細胞を50 µg/mLのロイペプチン(Sigma)とともに1時間プレインキュベートし、その後10 µg/mLのHER2抗体を添加した。細胞を37°Cでさらに3時間または18時間インキュベートした。その後それらをPBSで洗浄した上で、4%ホルムアルデヒド(Klinipath)とともにRT(室温)で30分間インキュベートした。スライドをブロック用緩衝液(0.1%サポニン[Roche]および2% BSA [Roche]を加えたPBS)で洗浄して、ホルムアルデヒドを失活させるための20mM NH₄Clを含むブロック用緩衝液中で20分間インキュベートした。スライドを再びブロック用緩衝液で洗浄した上で、リソソームを同定するためのマウス-抗ヒトCD107a(LAMP1)(BD Pharmingen)とともに室温で45分間インキュベートした。ブロック用緩衝液で洗浄した後に、スライドを、二次抗体の混合液; ヤギ抗マウスIgG-Cy5(Jackson)およびヤギ抗ヒトIgG-FITC(Jackson)とともに室温で30分間インキュベートした。スライドを再びブロック用緩衝液で洗浄して、20 µLの封入剤(6グラムのグリセロール[Sigma]および2.4グラムのMowiol 4-88[Omnibio])を6mL蒸留水に溶解させ、それに12mLの0.2M Tris[Sigma] pH8.5を添加して、その後50~60°Cで10分間インキュベートした。封入剤を等分して-20°Cで保存した)を用いて顕微鏡用スライド上にマウントした。スライドを、63倍1.32-0.6油浸対物レンズを装着したLeica SPE-II共焦点顕微鏡(Leica Microsystems)およびLAS-AFソフトウェアによって画像化した。重複ピクセル強度の定量が可能となるように、ピクセル飽和を伴わずに抗体が可視化されるようにレーザー強度、ゲインおよびオフセットを調整した。これらの設定を、すべての共焦点スライドで同一に保った。

【0297】

12ビットのグレースケールTIFF画像を、MetaMorph(登録商標)ソフトウェア(バージョンMeta Series 6.1、Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, USA)を用いて、共存に関して分析した。FITC画像およびCy5画像をスタックとして取り込み、バックグラウンドを減算した。すべてのFITC画像およびすべてのCy5画像に関して、同一の閾値設定を用いた(手動で設定)。共存を重複領域(ROI)におけるFITCのピクセル強度として描写したが、ここでROIはすべてのCy5陽性領域で構成される。いくつかのHER2抗体で染色した異なるスライドを比較するために、Cy5のピクセル強度を用いて画像を標準化した。

ヤギ抗マウスIgG-Cy5を、リソソームマーカーLAMP1 (CD107a) の染色のために用いた。LAMP1のピクセル強度は、試験したさまざまなHER2抗体の間で異ならないはずである。FITCおよびCy5の共存に関する標準化値 =

$$\frac{\text{(総ピクセル強度FITC} \times \text{FITC-Cy5共存のパーセンテージ} / 100)}{\text{総ピクセル強度Cy5}}$$

結果は図9および以下の表11に示されており、これらはさまざまなHER2抗体に関して、Cy5と重複するFITCピクセル強度を描写している。各抗体に関して、およそ1個、3個または5個を上回る細胞を含む1枚のスライドからの3つの異なる画像を分析した。各スライド内の異なる画像間で有意な差異が観察された。それでもなお、抗体005は、ハーセプチンおよびバルツズマブと比較した場合、リソソームマーカーLAMP1との共存の増加を明らかに示すことが明確であった。これらの結果は、ひとたび内部移行を受けるとHER2抗体005はリソソーム区画に向かって効率的に局在化されることを示しており、このことは抗体薬物結合体アプローチにとって特に興味深い。

10

【0298】

(表11) 任意単位で示した、Cy5と重複する平均FITCピクセル強度

抗体	リソソーム中のFITCピクセル強度 [任意単位]
TH1014-005	0.619
TH1014-pert	0.214
ハーセプチン	0.236

20

【0299】

実施例21-ヒトとニワトリとのHER2細胞外ドメインシャッフル

本発明の抗体によって認識されるHER2結合領域をさらに規定するために、HER2細胞外ドメインシャッフル実験を行った。この目的のために、ヒトHER2細胞外ドメインのドメインI、II、III、またはIVの配列を、ニワトリHER2 (ニワトリ (Gallus gallus) アイソフォームB NCBI : NP_001038126.1) の対応する配列と交換した5つの構築物を用いて小さな遺伝子合成ライブラリーを作製した：1) 完全ヒトHER2 (Uniprot P04626)、以下hu-HER2と呼ぶ、2) ニワトリドメインIを有するhu-HER2 (ヒトHer2のアミノ酸 (aa) 1~203を対応するニワトリHer2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (I) と呼ぶ、3) ニワトリドメインIIを有するhu-HER2 (ヒトHer2のアミノ酸 (aa) 204~330を対応するニワトリHer2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (II) と呼ぶ、4) ニワトリドメインIIIを有するhu-HER2 (ヒトHer2のaa331~507を対応するニワトリHer2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (III) と呼ぶ、および5) ニワトリドメインIVを有するhu-HER2 (ヒトHer2のaa508~651を対応するニワトリHer2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (IV) と呼ぶ。ヒトHER2オルソログおよびニワトリHER2オルソログは細胞外ドメインでは67%の相同性、ドメインIでは62%の相同性、ドメインIIでは72%の相同性、ドメインIIIでは63%の相同性、ドメインIVでは68%の相同性を示す。これらの構築物を、Freestyle (商標) CHO-S (Invitrogen) 細胞株において、Freestyle MAXトランスフェクション試薬 (Invitrogen) を用いて製造業者の説明書に従って一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を20時間、培養した。トランスフェクトされた細胞に対するHER2抗体の結合をフローサイトメトリーによって分析した。

30

40

【0300】

トランスフェクトされたCHO-S細胞を収集し、FACS緩衝液で洗浄し、10 μg/mL HER2抗体と(氷上で30分間) インキュベートした。HER2抗体の結合を、フィコエリトリン (PE) 結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Jackson) を用いて検出した。異なるバッチ間で発現が同一であるかどうか調べるために、細胞を固定し、Cytotfix/Cytoperm溶液 (BD) を用いて製造業者の説明書に従って透過処理し、ウサギ抗ヒト細胞内HER2抗体 (DAKO) と二次PE結合ヤギ抗ウサギ抗体 (Jackson) の組み合わせを用いて染色した。アイソタイプ対照抗体を負の対照として使用した。蛍光をFACSCanto-II (BD) によって測定し、GraphPad Prism V4.03ソフト

50

トウェア (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて、結合曲線を非線形回帰によって作成した (傾きが変わるS字形用量反応)。異なる抗体によって、どのHER2ドメインが認識されるのかを特定するために、結合の消失を読み取り値として使用した。

【0301】

抗体106に関する例示的な曲線を図10に示している。すべての結合結果は表12に示す。ハーセプチンはHu-HER2-ch (IV) に対しては結合低下を示したが、シャッフリングした残りのドメインの1つを有するタンパク質に対してはそうでなく、このことからハーセプチンのエピトープがHER2ドメインIVに存在することが裏づけられた。ペルツズマブはHuHER2 ch (II) のみに対して結合低下を示し、このことはそのエピトープがHER2ドメインIIに存在することを裏づけている。抗体005、006、060および111はHER2ドメインIIIの置換時に結合低下を示したが、このことからそのエピトープがHER2ドメインIIIに存在することが実証された。興味深いことに、抗体059および106はhu-HER2-ch (III) およびhu-HER2-ch (I) の両方に対する結合低下を明らかに示したが、このことは抗体059および106がこれらの2つのドメイン内の立体構造エピトープを認識することを意味する。

【0302】

(表12) 異なるHER2ECD受容体構築物に対するHER2抗体の結合の概要。FL; hu-HER2、I; hu-HER2-ch (I)、II; hu-HER2-ch (II)、III; hu-HER2-ch (III)、IV; hu-HER2-ch (IV)。+++は正常な結合を示し、+はhu-HER2に対して観察された結合と比較して減少した結合を示し、-は全く結合が検出されなかったことを示す。

抗体	シャッフリングしたHER2ドメイン				
	FL	I	II	III	IV
ハーセプチン	+++	+++	+++	+++	+++
ペルツズマブ	+++	+++	+	+++	+++
005	+++	+++	+++	+++	+++
006	+++	+++	+++	+++	+++
059	+++	+++	+++	+++	+++
060	+++	+++	+++	+++	+++
106	+++	+++	+++	+++	+++
111	+++	+++	+++	+++	+++

【0303】

実施例22 SCIDマウスでのNCI-N87ヒト胃癌異種移植片におけるHER2 HuMab 005のインビボ有効性

雌性CB.17重症複合免疫不全症 (SCID) マウスでのNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルにおける腫瘍成長および生存に対するHER2-HuMab 005のインビボ効果を判定した。50%マトリゲル中の 10×10^6 個のNCI-N87腫瘍細胞を、雌性SCIDマウスに、各群当たりマウス10匹ずつ皮下注射した。腫瘍接種から8日後に、HER2-HuMabs 005または対照抗体HuMab-HepCの静脈内投与を開始した。図11中で、これは第1日、治療開始日として示されている。初回用量は40mg/kgとし、その後、治療開始後の第4日、8日、11日、15日、18日、22日および25日には10mg/kgとした。

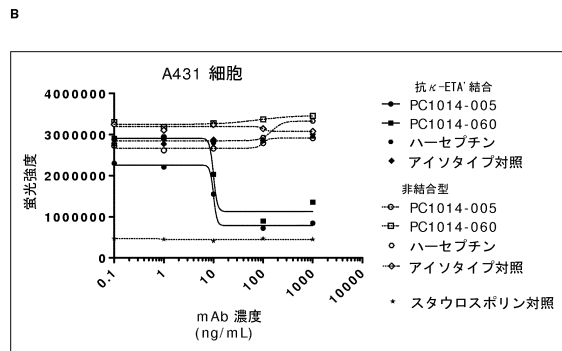
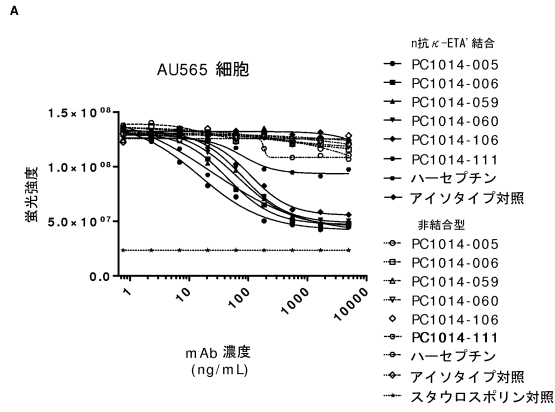
【0304】

腫瘍体積を毎週少なくとも2回測定した。体積 (mm^3) は、キャリパー (PLEXX) 測定値から (幅² × 長さ) / 2として算出した。腫瘍のキャリパー計測は週2回行い、その腫瘍が所定のエンドポイント体積 (800mm^3) に達した時点で各動物を安楽死させた。

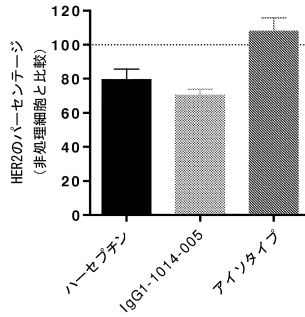
【0305】

図11Aおよび11Bに示すように、HuMab 005を投与されたマウスは、陰性対照抗体HuMab-HepCを投与されたマウスよりも、より緩徐な腫瘍成長 (A) およびより良好な生存 (B) のそれぞれを明らかに示した。

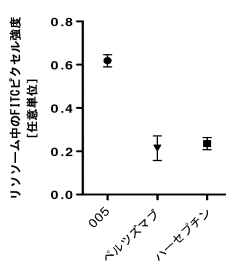
【 図 7 】



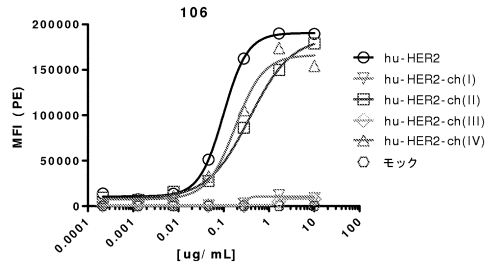
【 図 8 】



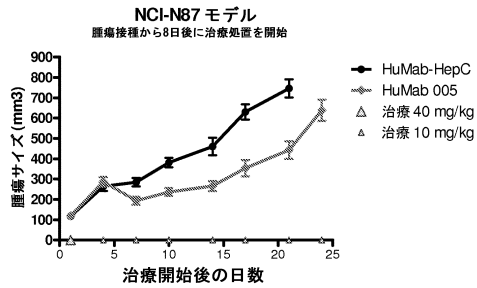
【 図 9 】



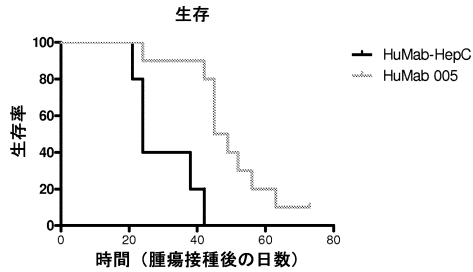
【 図 10 】



【 図 11 A 】



【 図 11 B 】



【配列表】

0006438442000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	G 0 1 N	33/53
		G 0 1 N	33/574
			C
			C
			L
			D
			A

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ゴージ バルト デ

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

(72)発明者 ブリンク エトワルト エヌ. ヴァン デン

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

(72)発明者 ハイ シモネ

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

(72)発明者 リートル ティロ

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

(72)発明者 ホート レネ

オランダ王国 ボクスメール ファン スパイク 1 2 6

(72)発明者 バーズガード オレ

デンマーク王国 ヘレルブ トゥボルフ スントパルク 1 0 1 . ティービー.

(72)発明者 サテン ダビト

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

(72)発明者 ウィンケル ヤン ヴァン デ

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

(72)発明者 パレン パウル

オランダ王国 ユトレヒト イヤレラーン 6 0

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特許第6082344(JP, B2)

特開2010-006705(JP,A)
特表2009-545325(JP,A)
特表2008-529549(JP,A)
国際公開第2005/118635(WO,A1)
国際公開第2006/113643(WO,A1)
国際公開第2008/007648(WO,A1)
国際公開第2009/073524(WO,A1)
Molecular Oncology, 2009, vol.3, p.238-247
Cancer Res, 2005, vol.65, p.650-656
Int J Cancer, 2003, vol.107, p.976-983
Proteins, 2008, vol.70, p.938-949

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/GeneSeq

专利名称(译)	抗HER2表位的单克隆抗体		
公开(公告)号	JP6438442B2	公开(公告)日	2018-12-12
申请号	JP2016177734	申请日	2016-09-12
[标]申请(专利权)人(译)	根马布股份公司		
申请(专利权)人(译)	Genmabu ER / ES		
当前申请(专利权)人(译)	Genmabu ER / ES		
[标]发明人	ゴージバルトデ ブリンクエトワルトエヌヴァンデン ハイシモネ リートルティロ ホートレネ バーズガードオレ サテンダビト ウィンケルヤンヴァンデ パレンパウル		
发明人	ゴージ バルト デ ブリンク エトワルト エヌ. ヴァン デン ハイ シモネ リートル ティロ ホート レネ バーズガード オレ サテン ダビト ウィンケル ヤン ヴァン デ パレン パウル		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C07K14/52 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12P21/02 A61K39/395 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/30 C07K16/32 C07K2317/21 C07K2317/33 C07K2317/732 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C07K14/52 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12P21/02.C A61K39/395.C A61K39/395.L A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53.D G01N33/574.A A61K37/02 A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/DA33 4C084/NA05 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA27 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/349182 2010-05-27 US 201000468 2010-05-27 DK		

外部链接

Espacenet

摘要(译)

与人表皮生长因子受体2 (HER2) 结合的分离的单克隆抗体, 以及相关的基于抗体的组合物和分子, 包含这些抗体的药物组合物, 以及使用这些抗体的方法提供使用的治疗方法和诊断方法。提供了阻断参照抗体与可溶性人表皮生长因子受体2 (HER2) 结合的单克隆抗体。此外, 单克隆抗体阻断至少两种, 优选至少三种参照抗体, 并用于治疗癌症。【选择图】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号
(45) 発行日 平成30年12月12日 (2018.12.12)	(24) 登録日 平成30年11月22日 (2018.11.22)	特許第6438442号 (P6438442)
(5) Int. Cl.		
C12N 15/13 (2006.01)	F1	
C07K 16/28 (2006.01)	C12N 15/13	ZNA
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/28	
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 16/46	
C07K 14/62 (2006.01)	C07K 19/00	
	C07K 14/52	
請求項の数 40 (全 74 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-177734 (P2016-177734)	(73) 特許権者 507316398	
(22) 出願日 平成28年9月12日 (2016.9.12)	ゲンマブ エー/エス	
(62) 分割の表示 特願2013-511701 (P2013-511701) の分割	デンマーク アイケー1560 コペンハーゲン ブイカルウェボーブリッゲ 43	
原出願日 平成23年5月27日 (2011.5.27)	(74) 代理人 100102978	
(65) 公開番号 特開2017-46694 (P2017-46694A)	弁理士 清水 初志	
(43) 公開日 平成29年3月9日 (2017.3.9)	(74) 代理人 100102118	
審査請求日 平成28年10月11日 (2016.10.11)	弁理士 春名 雅夫	
(31) 優先権主張番号 61/349,182	(74) 代理人 100160923	
(32) 優先日 平成22年5月27日 (2010.5.27)	弁理士 山口 裕孝	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100119507	
(31) 優先権主張番号 PA201000468	弁理士 刑部 俊	
(32) 優先日 平成22年5月27日 (2010.5.27)	(74) 代理人 100142929	
(33) 優先権主張国 デンマーク (DK)	弁理士 井上 隆一	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 HER2エピトープに対するモノクローナル抗体		