

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6419796号  
(P6419796)

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(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 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

請求項の数 10 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-519773 (P2016-519773)
(86) (22) 出願日	平成26年10月2日(2014.10.2)
(65) 公表番号	特表2016-538827 (P2016-538827A)
(43) 公表日	平成28年12月15日(2016.12.15)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/071204
(87) 国際公開番号	W02015/049355
(87) 国際公開日	平成27年4月9日(2015.4.9)
審査請求日	平成29年8月24日(2017.8.24)
(31) 優先権主張番号	13004801.0
(32) 優先日	平成25年10月4日(2013.10.4)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	13005008.1
(32) 優先日	平成25年10月18日(2013.10.18)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	306021192 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチエン ゲゼルシャフト スイス、ツェハーー 4070 パーゼル、グ レンツァッハーシュトラッセ 124 番
(73) 特許権者	511286517 ヴェンタナ メディカル システムズ、 インク、 アメリカ合衆国 アリゾナ 85755、 ツーソン、 イースト イノベーション ン パーク ドライブ 1910
(74) 代理人	110002077 園田・小林特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER3 に特異的に結合する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト HER3 に結合する、単離された抗体又はその抗原結合部分であって、  
抗体又はその抗原結合部分が、

重鎖可変ドメインが配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変ドメインが配列番号 11 のアミノ酸配列を含む；又は

重鎖可変ドメインが配列番号 10 のアミノ酸配列を含み、

軽鎖可変ドメインが配列番号 12 のアミノ酸配列を含む

ことを特徴とする、単離された抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 2】

当該単離された抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1 に記載の  
単離された抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 3】

免疫組織化学法を行う方法であって、該方法が、

a) 組織試料を、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその抗原結合部分と共にインキュベ  
ートする工程であって、それによって前記抗体又はその抗原結合部分と前記組織中の HE  
R3 との結合が生じる、工程と、

b) 前記組織試料を、工程 a) において結合した抗 HER3 抗体又はその抗原結合部分  
について染色する工程と  
を含む方法。

10

20



wski M.X., et al., J. Biol.Chem.269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, et al., Onco gene.10 (1995) 1813- 1821; Hellyer, N.J., J. Biol.Chem.276 (2001) 42153-4261; Singer, E., J. Biol.Chem.276 (2001) 44266-44274; Schaefer, K.L., Neoplasia 8 (2006) 613-622)。

【 0 0 0 3 】

この遺伝子の増幅及び/又はそのタンパク質の過剰発現は、前立腺、膀胱、及び乳房の腫瘍を含めた多くの癌において報告されている。さまざまなアイソフォームをコードする選択的転写スプライス変異体の特徴が明らかにされてきている。

【 0 0 0 4 】

1つのアイソフォームは膜間領域を欠いており、細胞外に分泌される。この形態は、膜結合型の形態の活性を調節する作用をする。さらなるスプライス変異体もまた報告されているが、それらの特徴は完全には明らかになっていない。

【 0 0 0 5 】

ヒトHER3は20年以上も前から知られているという事実にもかかわらず、組織試料中のタンパク質HER3を検出することは、今日に至るまで、極めて困難である。しかしながら、組織試料中のHER3の検出は、HER3の局在性、組織分布及び/又は濃度を伴う所与の試料の構造及び形態を、生物学的機能、特に多くの癌に関連した病態生理学的意味と関連させるためには極めて重要である。

【 0 0 0 6 】

幾つかの抗HER3抗体はさまざまな会社から研究試薬として市販されているものの、組織試料、特に、ホルマリン固定パラフィン包埋組織試料の満足のいく染色は、これらの試薬を使用しても可能ではないように思われる。特に、ベンタナ・ベンチマークXTなどの組織試料用の自動染色システムを使用する場合に、HER3に対し高い結合特異性及び感度を示す抗体が必要とされている。

【 0 0 0 7 】

ヒトHER3タンパク質に特異的に結合し、かつ、当技術分野で知られている問題を少なくとも部分的に克服できる抗体を同定することは、本発明の目的であった。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 8 】

本発明は、ヒトHER3に結合する単離抗体又はその抗原結合部分に関し、該抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1H領域、配列番号2又は配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR2H領域、及び、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR3H領域、を含む重鎖可変ドメイン、並びに、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR1L領域、配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR2L領域、及び、配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR3L領域、を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 0 9 】

本発明はさらに、ヒトHER3に結合し、かつ、配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインと、を有する単離抗体又はその抗原結合部分を含む。

【 0 0 1 0 】

本発明はまた、ヒトHER3に結合し、かつ、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号1から改変されたアミノ酸配列を含むCDR1H領域、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって、配列番号2から改変又は配列番号3から改変されたアミノ酸配列を含むCDR2H領域、及び1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号4から改変されたアミノ酸配列を含むCDR3H領域、を含む重鎖可変ドメインと、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号5から改変されたアミノ酸配列を含むCDR1L領域、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号6から改変又は配列番号7から改変されたアミノ酸配列を含むCDR2L領域、及び、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号8から改変されたアミノ酸配列を含むCDR3L領域、を含む軽鎖可変ドメインと、を有する単離抗体又はその抗原結合部分を含む。本発明の1つの実施態様では、CDR1L領

10

20

30

40

50

域は、位置 5 における保存的アミノ酸置換によって、配列番号 5 から改変されたアミノ酸配列を含む。さらなる実施態様では、配列番号 5 の位置 5 における保存的アミノ酸置換は、スレオニン/セリン置換である。本発明の別の実施態様では、CDR3L 領域は、位置 6 又は位置 9 における保存的アミノ酸置換によって配列番号 8 から改変されたアミノ酸配列を含む、又は、CDR3L 領域は、位置 6 及び位置 9 における保存的アミノ酸置換によって配列番号 8 から改変されたアミノ酸配列を含む。さらなる実施態様では、配列番号 8 の位置 6 における保存的アミノ酸置換はバリン/アラニン置換である、又は、配列番号 8 の位置 9 における保存的アミノ酸置換はアラニン/スレオニン置換である。別の実施態様では、CDR3L 領域は、位置 6 及び位置 9 における保存的アミノ酸置換によって配列番号 8 から改変されたアミノ酸配列を含み、配列番号 8 の位置 6 における保存的アミノ酸置換はバリン/アラニン置換であり、配列番号 8 の位置 9 における保存的アミノ酸置換はアラニン/スレオニン置換である。

10

**【0011】**

本発明の別の態様は、ヒトHER3 に結合する単離抗体又はその抗原結合部分を提供し、該抗体は、配列番号 9 又は配列番号 10 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号 11 又は配列番号 12 に対して少なくとも 95% の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインと、を有する。

**【0012】**

1 つの実施態様では、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。

**【0013】**

別の実施態様では、本発明の抗体は IgG サブクラスの抗体である。

20

**【0014】**

驚くべきことに、本発明の前述の抗体のいずれも、非常に有利な特性を有し、当技術分野で知られている問題を少なくともある程度克服することができることを見出された。これらは、ヒトHER3 タンパク質を検出するための免疫組織化学的染色法において非常に有利に利用することができる。本発明に従った抗体が、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPET) 試料を用いてさえも、優れた染色結果をもたらすことは、特に驚きであり価値のあることである。このように、本発明に従った抗体は、自動染色法において処理された FFPET 試料中のヒトHER3 の検出に特に有用である。

**【0015】**

したがって、本発明は、組織試料を本発明に従った抗体と共にインキュベートし、それによって該試料中のヒトHER3 に対する該抗体の結合を生じさせる工程と、組織試料に結合する抗HER3 抗体用に該組織試料を染色する工程とを含む、免疫組織化学法を行う方法にも関する。

30

**【0016】**

1 つの実施態様では、本発明は、ヒトHER3 の免疫組織化学的検出、特にホルムアルデヒド固定パラフィン包埋組織 (FFPET) 試料における、本発明に従った抗体の使用に関する。

**【0017】**

本発明の別の実施態様は、ヒトHER3 の免疫組織化学的検出の実施を促進するのに有用なキットに関する。1 つの実施態様では、キットは、ホルムアルデヒド固定パラフィン包埋組織 (FFPET) 試料中のヒトHER3 の検出のために提供され、該キットは、本発明に従った抗体又はその抗原結合部分と、該抗体又はその抗原結合部分の検出用の試薬とを含む。

40

**【0018】**

本発明の別の態様は、本明細書に提供される抗HER3 抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸を提供する。

**【0019】**

1 つの実施態様では、核酸は抗HER3 抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、重鎖可変ドメインは、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む CDR1H 領域、配列番号 2 又は配列番号 3 の

50

アミノ酸配列を含むCDR2H領域、及び、配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR3H領域を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR1L領域、配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR2L領域、及び、配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR3L領域を含む。

【0020】

別の実施態様では、核酸は、抗HER3抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、重鎖可変ドメインは、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号1から改変されたアミノ酸配列を含むCDR1H領域、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号2から改変又は配列番号3から改変されたアミノ酸配列を含むCDR2H領域、及び1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号4から改変されたアミノ酸配列を含むCDR3H領域を含み、軽鎖可変ドメインは、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号5から改変されたアミノ酸配列を含むCDR1L領域、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号6又は配列番号7から改変されたアミノ酸配列を含むCDR2L領域、及び1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号8から改変されたアミノ酸配列を含むCDR3L領域を含む。

10

【0021】

さらなる実施態様では、核酸は抗HER3抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、重鎖可変ドメインは、配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは、配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列を含む。

【0022】

別の実施態様では、核酸は抗HER3抗体の重鎖及び軽鎖をコードし、重鎖可変ドメインは配列番号9又は配列番号10に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号11又は配列番号12に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0023】

本発明はさらに、原核又は真核宿主細胞における本発明に従った抗体の発現のための本発明に従った核酸を含む発現ベクターを含む。

【0024】

本発明はさらに、本発明に従ったベクターを含む原核又は真核宿主細胞を含む。

【0025】

本発明はさらに、原核又は真核宿主細胞において本発明に従った核酸を発現し、該細胞又は細胞培養液の上清から該抗体を回収することを特徴とする、本発明に従った組み換え抗体の産生方法を含む。

30

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明は、重鎖可変ドメインが、配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1H領域、配列番号2又は配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR2H領域、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR3H領域を含み、軽鎖可変ドメインが、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR1L領域、配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR2L領域、及び配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR3L領域を含むことを特徴とする、ヒトHER3に結合する単離抗体又はその抗原結合部分に関する。

40

【0027】

本発明はさらに、重鎖可変ドメインが配列番号9又は配列番号10のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号11又は配列番号12のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、ヒトHER3に結合する単離抗体又はその抗原結合部分を含む。

【0028】

本発明はまた、重鎖可変ドメインが、位置における1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号1から改変されたアミノ酸配列を含むCDR1H領域、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号2又は配列番号3から改変されたアミノ酸配列を含むCDR2H領域、及び1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号4から改変されたアミノ

50

酸配列を含むCDR3H領域を含み、軽鎖可変ドメインが、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号5から改変されたアミノ酸配列を含むCDR1L領域、1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号6又は配列番号7から改変されたアミノ酸配列を含むCDR2L領域、及び1つ以上の保存的アミノ酸置換によって配列番号8から改変されたアミノ酸配列を含むCDR3L領域を含むことを特徴とする、ヒトHER3に結合する単離抗体又はその抗原結合部分に関する。

【0029】

本発明の別の態様は、重鎖可変ドメインが配列番号9又は配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号11又は配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことを特徴とする、ヒトHER3に結合する単離抗体を提供する。

10

【0030】

1つの実施態様では、本発明に従った抗体はモノクローナル抗体である。

【0031】

別の実施態様では、本発明の抗体はIgGサブクラスの抗体である。

【0032】

特に説明されない限り、本明細書で用いられるすべての技術的及び科学的用語は、本明細書に開示される発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0033】

本明細書で用いられる冠詞「a」及び「an」は、冠詞の文法上の対象の1つまたはそれ以上（すなわち、少なくとも1つ）のことを指す。例として「抗体(an antibody)」は、1つの抗体または2つ以上の抗体を意味する。

20

【0034】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互に結合された、4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖からなる免疫グロブリン分子のことを指すことが意図されている。各重鎖は、重鎖可変領域（ここではHCVR又はVHと略される）及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2、及びCH3からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ここではLCVR又はVLと略される）及び軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLからなる。VH及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域がところどころに入り混じった、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化することができる。各VH及びVLは、アミノ末端からカルボキシ末端まで次の順：FR、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4に配置された、3つのCDR及び4つのFRからなる。

30

【0035】

用語「抗体の抗原結合部分」は、本明細書で用いられる場合には、抗原の結合の原因となる抗体のアミノ酸残基のことを指す。抗体の抗原結合部分はCDR由来のアミノ酸残基を含む。本発明の抗体の「抗原結合部分」という用語は、抗原の結合部位の親和性に様々な度合いで寄与する、6つのCDRを含む。3つの重鎖可変ドメインCDR(CDR1H、CDR2H及びCDR3H)と3つの軽鎖可変ドメインCDR(CDR1L、CDR2L及びCDR3L)が存在する。用語「CDR1H」は、Kabatに従って計算された重鎖可変領域のCDR1領域を意味する。CDR2H、CDR3H、CDR1L、CDR2L及びCDR3Lは、重(H)鎖又は軽(L)鎖に由来するそれぞれの領域を意味する。CDR及びFRの及び範囲はアミノ酸配列のコンパイルされたデータベースとの比較によって決定され、これらの領域は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup>Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)に従った配列間の可変性に従って定義されている。

40

【0036】

「単離(された)」抗体は、その自然環境の成分から同定かつ分離された、及び/又は

50

、回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の研究、診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質を含みうる。本明細書で用いられる「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体のことを指すことも意図されている。（例えば、ヒトHER3に特異的に結合する単離抗体は、ヒトHER3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、ヒトHER3に特異的に結合する単離抗体は、他の種に由来するHER3分子など、他の抗原に対する交差反応性を有しうる。幾つかの実施態様では、抗体は、例えばローリー法によって決定して、抗体の重量の70%超まで精製され、幾つかの実施態様では、80重量%超、90重量%超、95重量%超、96重量%超、97重量%超、98重量%超又は99重量%超まで精製される。1つの好ましい実施態様では、本発明に従った単離抗体は、タンパク質検出のためのクマシーブルー染色を使用して還元条件下でSDS-PAGEによって決定して、90%超まで精製される。

10

**【0037】**

抗体（モノクローナル又はポリクローナル抗体など）の産生方法は、当技術分野で十分に確立されている（例えば、Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照）。例えば、ヒトHER3のペプチド断片は、担体分子（又はこのようなエピトープをコードする核酸又はコンジュゲートされたRDP）にコンジュゲートすることができ、非ヒト哺乳動物（マウス又はウサギなど）に注入の後にさらにブースト注入して抗体反応を生成することができる。免疫された動物から単離された血清は、その中に含まれるポリクローナル抗体について単離されうるか、あるいは、免疫された動物に由来する脾臓は、ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体の産生に使用されうる。幾つかの実施例では、抗体は使用前に精製される。

20

**【0038】**

ヒトHER3に結合するポリクローナル抗体は、例えば、この配列を免疫吸着材料として含むアフィニティカラムを使用する免疫吸着によって入手することができる。単離抗体がモノクローナル抗体である場合、このような抗体は、幾つかの実施態様では、（1）例えばローリー法によって決定して、90%超まで、及び幾つかの実施態様では95重量%超、96重量%超、97重量%超、98重量%超又は99重量%超まで、（2）例えばスピニングカップシークエネーターの使用によって、少なくとも15残基のN-末端アミノ酸配列又は内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、又は（3）例えば、クマシーブルー染色又は銀染色を使用して、還元条件下又は非還元条件下で、SDS-PAGEによって、均質になるまで精製される。

30

**【0039】**

1つの例では、ヒトHER3に結合するモノクローナル抗体は、Kohler及びMilsteinの古典的方法（*Nature*, 256: 495, 1975）又はその誘導方法に従って、マウスのハイブリドーマから調製することができる。簡潔に言えば、マウス（Balb/cなど）は、数週間の期間にわたり、数マイクログラムのヒトHER3ペプチド断片又はその担体コンジュゲートを繰り返し接種される。次いで、マウスは殺処分され、脾臓の抗体産生細胞が単離される。脾臓細胞は、ポリエチレングリコールによってマウスの骨髄腫細胞と融合し、過剰の融合されていない細胞は、アミノプテリンを含む選択的培地（HAT培地）上でその系の成長によって破壊される。成功裏に得た融合細胞は希釈され、その希釈液のアリコートがマイクロタイタープレートのウェル内に置かれ、そこで培養物の成長が継続される。抗体産生クローンは、元々はEngvall（*Enzymol.*, 70: 419, 1980）によって記述されたELISAなどのイムノアッセイ手法及びその誘導方法により、ウェルの上澄み液中の抗体の検出によって同定される。選択された陽性クローンは増殖可能であり、そのモノクローナル抗体産物は使用のために採取できる。

40

**【0040】**

抗体がヒトHER3に結合するかどうかは、適切なイムノアッセイによって容易に評価される。1つの好ましい方法では、ヒトHER3のペプチドはビオチンでN-又はC-末端が標識化される。1つの好ましい標識化剤は、ビオチン残基とペプチド鎖の間に柔軟な親

50

水性のスペーサを取り込んだ Fmoc-Glu (ビオチニル-PEG)-OH の使用である。このビオチン化ペプチドは、例えばストレプトアビジンを介して、ビオチン結合試薬でコーティングされた固体相に結合される。分析すべき抗体がヒトHER3のペプチド内にエピトープに対する結合部位を含む場合、このような抗体はペプチドに結合させて、適切な手段によって検出することができる。

【0041】

ヒトHER3と結合する本発明に従った抗体は、好ましくは、この分子に対して少なくとも  $10^7$  l/mol の結合親和性を有する。  $10^8$  l/mol またはそれ以上の親和性、もしくは  $10^9$  l/mol またはそれ以上の親和性を有するものも好ましい。

【0042】

本明細書で用いられる用語「ヒトHER3に結合する」、「ヒトHER3に特異的に結合する」、又は「抗HER3抗体」は、相互に置換可能であり、ヒトHER3抗原に特異的に結合する抗体のことを指す。熟練した当業者が認識するように、用語「特異的な」又は「特異的に結合する」は、試料中に存在する他の生体分子が、ヒトHER3に(特異的に)結合する抗体に対して有意には結合しないことを示すために用いられる。ヒトHER3に特異的に結合する抗体は、しかしながら、他の種に由来するHER3分子に対する交差反応性を有しうる。好ましくは、ヒトHER3を含む試料中のヒトHER3以外の生体分子への結合レベルは、それぞれ、ヒトHER3に対する親和性の10%以下、さらに好ましくはわずか5%以下の結合親和性を生じる。ヒトHER3に特異的に結合する抗体は、例えば、ヒトHER2または他の近い相同体には結合しない、すなわち、ヒトHER3に対する結合親和性より少なくとも10倍乏しい又は好ましくは少なくとも20倍乏しい結合親和性を有する。

【0043】

ヒトHER3 (ErbB-3、ERBB3、c-erbB-3、c-erbB3、受容体型チロシンタンパク質キナーゼ erbB-3、配列番号17) は、HER1 (EGFRとしても知られる)、HER2、及びHER4 (Kraus, M.H. et al., PNAS 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D. et al., PNAS 87 (1990) 4905-4909; Kraus, M.H. et al., PNAS 90 (1993) 2900-2904) をも含む受容体型チロシンキナーゼの上皮増殖因子受容体 (EGFR) ファミリのメンバーをコードする。ヒトHER3のアミノ酸配列は、UniProtKB/Swiss-Protデータベースの参照配列番号P21860の下に現在注釈されるアミノ酸配列に見られる。原型的な上皮増殖因子受容体のように、膜貫通型受容体HER3は、細胞外リガンド結合ドメイン (ECD)、ECD内の二量体ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内タンパク質チロシンキナーゼドメイン (TKD) 及びC末端リン酸化ドメインからなる。この膜結合型タンパク質は、細胞外ドメイン内のヘレグリン (HRG) 結合ドメインであるHER3を有するが、活性キナーゼドメインを有しない。したがって、この膜貫通型タンパク質はこのリガンドには結合できるが、タンパク質リン酸化を通じて細胞内にシグナルを伝達することはできない。しかしながら、このタンパク質は、キナーゼ活性を有する他のHERファミリーメンバーとヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体化は、受容体介在性のシグナル伝達経路の活性化、及びその細胞内ドメインのリン酸基転移を生じさせる。HERファミリーメンバー間での二量体の形成はHER3のシグナル伝達能を拡大し、シグナルの多様化のみならず、シグナルの増幅のための手段にもなる。例えば、HER2/HER3ヘテロ二量体は、HERファミリーメンバーの中でも、PI3K及びAKT経路を介して最も重要な細胞増殖シグナルの1つを誘発する (Sliwkowski M.X., et al., J. Biol.Chem.269 (1994) 14661-14665; Alimandi M, et al., Oncogene.10 (1995) 1813- 1821; Hellyer, N.J., J. Biol.Chem.276 (2001) 42153-4261; Singer, E., J. Biol.Chem.276 (2001) 44266-44274; Schaefer, K.L., Neoplasia 8 (2006) 613-622)。

【0044】

この遺伝子の増幅及び/又はそのタンパク質の過剰発現は、前立腺、膀胱、及び乳房の腫瘍を含めた多くの癌において報告されている。さまざまなアイソフォームをコードする

10

20

30

40

50

選択的転写スプライス変異体の特徴が明らかにされてきている。

【0045】

1つのアイソフォームは膜間領域を欠いており、細胞外に分泌される。この形態は、膜結合型の形態の活性を調節する作用をする。さらなるスプライス変異体もまた報告されているが、それらの特徴は完全には明らかになっていない。

【0046】

本発明に従った抗体はHER3の細胞内領域に結合し、したがって、ヒトHER3の膜結合型アイソフォームのみを検出し、分泌されたアイソフォームを検出しない。

【0047】

上述のように、本発明に従った抗体、すなわちヒトHER3に結合する抗体は、例えば、ヒトHER3のペプチドを使用する免疫吸着によって、免疫された動物の血清から単離することができる。

【0048】

モノクローナル抗体は一定の品質で、ほぼ無制限の量で産生することができる。好ましい実施態様では、本発明に従った抗体はモノクローナル抗体である。

【0049】

生成された最良のモノクローナル抗体の2つは似たCDRを有し、驚くべきことに、特にFFPET試料用の自動染色システムにおける、組織試料中のヒトHER3の信頼性の高い検出に使用することができる。

【0050】

1つの態様では、本発明に従った抗HER3抗体は、配列番号9又は配列番号10と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、10のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン(VH)配列を含む。ある特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対する置換(例えば、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗HER3抗体はHER3への結合能力を保持する。ある特定の実施態様では、合計1から10のアミノ酸が、配列番号9又は配列番号10において置換、挿入、及び/又は欠失している。ある特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、CDRの外側の領域で(すなわち、FR内において)生じる。任意選択的に、抗HER3抗体は、配列番号9又は配列番号10内に、その配列の翻訳後修飾を含む、VH配列を含む。特定の実施態様では、VHは、(a)配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR1H、(b)配列番号2又は配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR2H領域、(c)配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR3Hから選択される1つ、2つ、又は3つのCDRを含む。

【0051】

別の態様では、本発明に従った抗HER3抗体は、配列番号11又は配列番号12と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して置換(例えば、保存的置換)、挿入、又は欠失を含むが、その配列を含む抗HER3抗体は、HER3への結合能力を保持する。ある特定の実施態様では、合計1から10のアミノ酸が、配列番号11又は配列番号12において置換、挿入、及び/又は欠失している。ある特定の実施態様では、置換、挿入、又は欠失は、CDRの外側の領域で(すなわち、FR内において)生じる。任意選択的に、抗HER3抗体は、配列番号11又は配列番号12内に、その配列の翻訳後修飾を含む、VL配列を含む。特定の実施態様では、VLは、(a)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR1L、(b)配列番号6又は配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR2L、及び(c)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR3Lから選択される1つ、2つ、又は3つのCDRを含む。

【0052】

別の態様では、抗体が、先に提供された実施態様のいずれかにあるようなVH、及び、先に提供された実施態様のいずれかにあるようなVLを含む、抗HER3抗体が提供される。1つの実施態様では、抗体は、配列番号9又は配列番号10、ならびに、配列番号11又は配列番号12内に、それらの配列の翻訳後修飾を含む、VH及びVL配列をそれぞれ含む。

【0053】

本明細書内で用いられる用語「アミノ酸」は、天然に存在するカルボキシ - アミノ酸の群を意味し、アラニン(3文字コード: ala、1文字コード: A)、アルギニン( arg、R)、アスパラギン( asn、N)、アスパラギン酸( asp、D)、システイン( cys、C)、グルタミン( gin、Q)、グルタミン酸( glu、E)、グリシン( gly、G)、ヒスチジン( his、H)、イソロイシン( ile、I)、ロイシン( leu、L)、リジン( lys、K)、メチオニン( met、M)、フェニルアラニン( phe、F)、プロリン( pro、P)、セリン( ser、S)、スレオニン( thr、T)、トリプトファン( trp、W)、チロシン( tyr、Y)、及びバリン( val、V)を含む。

10

【0054】

本発明に従った抗体は、加えて、「保存的配列改変」を有する抗体(変異抗体)、本発明に従った抗体の上述の特性に影響を及ぼしたり変更したりしない、ヌクレオチド及びアミノ酸配列の改変をも含む。改変は、当技術分野で知られている標準的な技法によって導入することができ、部位特異的な突然変異誘発及びPCR介在性の突然変異誘発又は突然変異などはデノボ合成的な遺伝子合成によって導入することができる。本明細書で用いられる用語「保存的アミノ酸置換」、「保存的置換」、又は「保存的配列改変」は相互に置換可能であり、1つのアミノ酸残基が似た側鎖を有する別のアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換のことを指す。似た側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分岐側鎖を有するアミノ酸(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。よって、ヒト抗HER3抗体における予測される非必須のアミノ酸残基は、好ましくは、同一の側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基と置換することができる。例示的な保存的アミノ酸置換を表1に示す。

20

30

【0055】

表1 - 例示的な保存的アミノ酸置換

元の残基	非常に高度に保存された置換	高度に保存された置換 (Blosum90 マトリクスに由来)	保存された置換 (Blosum65 マトリクスに由来)
Ala	Ser	Gly, Ser, Thr	Cys, Gly, Ser, Thr, Val
Arg	Lys	Gln, His, Lys	Asn, Gln, Glu, His, Lys
Asn	Gln; His	Asp, Gln, His, Lys, Ser, Thr	Arg, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr
Asp	Glu	Asn, Glu	Asn, Gln, Glu, Ser
Cys	Ser	なし	Ala
Gln	Asn	Arg, Asn, Glu, His, Lys, Met	Arg, Asn, Asp, Glu, His, Lys, Met, Ser
Glu	Asp	Asp, Gln, Lys	Arg, Asn, Asp, Gln, His, Lys, Ser
Gly	Pro	Ala	Ala, Ser
His	Asn; Gln	Arg, Asn, Gln, Tyr	Arg, Asn, Gln, Glu, Tyr
Ile	Leu; Val	Leu, Met, Val	Leu, Met, Phe, Val
Leu	Ile; Val	Ile, Met, Phe, Val	Ile, Met, Phe, Val
Lys	Arg; Gln; Glu	Arg, Asn, Gln, Glu	Arg, Asn, Gln, Glu, Ser,
Met	Leu; Ile	Gln, Ile, Leu, Val	Gln, Ile, Leu, Phe, Val
Phe	Met; Leu; Tyr	Leu, Trp, Tyr	Ile, Leu, Met, Trp, Tyr
Ser	Thr	Ala, Asn, Thr	Ala, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Lys, Thr
Thr	Ser	Ala, Asn, Ser	Ala, Asn, Ser, Val
Trp	Tyr	Phe, Tyr	Phe, Tyr
Tyr	Trp; Phe	His, Phe, Trp	His, Phe, Trp
Val	Ile; Leu	Ile, Leu, Met	Ala, Ile, Leu, Met, Thr

10

20

## 【 0 0 5 6 】

したがって、「変異体」抗HER3抗体とは、本明細書では、親抗体の1つ以上の可変領域において、最大10まで、好ましくは約2から約5の付加、欠失、及び/又は置換により、「親」抗HER3抗体アミノ酸配列とアミノ酸配列が異なる分子のことを指す。アミノ酸置換は、Riechmann, et al., Nature 332 (1988) 323-327及びQueen, C, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 10029-10033に記載される分子モデル化に基づいた突然変異誘発によって行うことができる。

30

## 【 0 0 5 7 】

本発明の一実施態様は、HER3に結合する単離抗体又はその抗原結合部分に関し、そのCDR1L領域は、位置5における保存的アミノ酸置換によって配列番号5から改変されたアミノ酸配列を含む。さらなる実施態様では、配列番号5の位置5における保存的アミノ酸置換はスレオニン/セリン置換である。本明細書で用いられる用語「スレオニン/セリン置換」とは、抗HER3抗体の1つの変異体におけるアミノ酸スレオニンがセリンによって置換されるか、又はその逆も同様で、抗HER3抗体の1つの変異体におけるセリンがスレオニンによって置換されることを意味する。本発明に従った「変異体」抗HER3抗体における他の特異的アミノ酸置換にも同じことが当てはまる。例えば、HER3に結合する単離抗体又はその抗原結合部分の別の実施態様では、CDR3L領域は、位置6又は位置9における保存的アミノ酸置換によって配列番号8から改変されたアミノ酸配列を含むか、又はCDR3L領域は、位置6及び位置9における保存的アミノ酸置換によって配列番号8から改変されたアミノ酸配列を含む。さらなる実施態様では、配列番号8の位置6における保存的アミノ酸置換はバリン/アラニン置換であるか、又は、配列番号8の位置9における保存的アミノ酸置換はアラニン/スレオニン置換である。さらに別の実施態様では、CDR3L領域は、位置6及び位置9における保存的アミノ酸置換によ

40

50

て配列番号 8 から改変されたアミノ酸配列を含み、配列番号 8 の位置 6 における保存的アミノ酸置換はバリン/アラニン置換であり、配列番号 8 の位置 9 における保存的アミノ酸置換はアラニン/スレオニン置換である。

【 0 0 5 8 】

本発明に従った抗体は、ヒト H E R 3 の免疫組織化学的検出に極めて有用であることが証明された。1 つの実施態様では、本発明は、免疫組織化学法 ( I H C ) を行う方法に関し、本方法は、a ) 組織試料を本発明に従った抗体と共にインキュベートし、それによって該抗体の該試料中のヒト H E R 3 への結合が生じ、b ) 工程 a ) において結合した抗 H E R 3 抗体について該組織試料を染色する、各工程を含む。

【 0 0 5 9 】

名詞として用いられる用語「染色」又は用語「染色試薬」とは、生物学的又は化学的化合物、及び、このような化合物を含む組成物であって、生物学的試料中の標的分子に適用した場合に、その分子を検出可能にする (例えば、顕微鏡検査下で) もののことを指す。染色は、限定はしないが、組み合わせ、又はそれら自体によって検出可能な最終産物を生じさせる、検出可能な核酸プローブ、抗体、及び他の試薬を含む。用語「染色」は、用語「染料」と相互に置き換え可能に用いられる。動詞として用いられる用語「染色する」、又は用語「染色し」は、生物学的試料と、染色試薬、染色剤、又は染料との接触を意味する。

【 0 0 6 0 】

細胞又は組織試料中の抗原の成功した免疫染色のためには、少なくとも 3 つの基準 : a ) 元々の部位での抗原の保持、b ) 抗原のアクセス可能性、及び c ) 対象の抗原 / エピトープの正しい立体構造 / 保存を満たさなければならない。

【 0 0 6 1 】

非常に驚いたことは、本発明に従った抗体が、ホルマリンで固定され、パラフィンに包埋された組織試料を用いても優れた働きをするという事実である。

【 0 0 6 2 】

1 つの実施態様では、本発明は、免疫染色が行われる組織試料がホルムアルデヒド固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 組織試料である、本発明に従った抗体を用いたヒト H E R 3 の検出のための免疫組織化学的方法に関する。

【 0 0 6 3 】

グルタルジアルデヒド、ホルムアルデヒド及びアセトン、又は他の有機溶媒のような幾つかの固定剤が利用可能であり、臨床病理学研究所で常套的に用いられている。しかしながら、固定化手法の圧倒的多数は、ホルムアルデヒドのような架橋結合剤の使用に基づいている。固定液は、通常、p H 7 . 2 ~ 7 . 6 への緩衝化 (少量の強酸又は塩基の添加後の最小限の p H 変化) と、略等張な液 (しばしば生理食塩水をベースとし、浸透圧が哺乳動物の細胞外液と同一のもの) とをもたらすように考案された、リン酸ナトリウムを含む水性ホルムアルデヒド溶液である。用語ホルムアルデヒド及びホルマリンは、相互に置き換え可能に用いられる。

【 0 0 6 4 】

先に述べたように、ホルムアルデヒドでの固定は臨床病理学において最も幅広く用いられている。最も可能性の高い主な理由は、ホルムアルデヒドで固定することにより、対象とする抗原が、生存生物においてそれが占有していた部位に捕捉されることである。ホルムアルデヒド固定の際に導入されるメチレン架橋を通じて、細胞又は組織試料の形態も良好に保存される。しかしながら、これらのプラス効果は、試料の透過性の費用を生じ、対象とする抗原 / エピトープのアクセス可能性及び / 又は立体構造の変化、核酸の損傷、及び酵素活性の不活性化を生じさせる固定につながる。

【 0 0 6 5 】

長期の保管のためには、固定された細胞又は組織試料は、通常、脱水し、適切な包埋媒体に包埋させる必要がある。パラフィン包埋は、通常、振動マイクロトームを用いて又はクライオスタット中で、標本をプラスチック包埋する、又は非包埋の標本をカットする、の

10

20

30

40

50

いずれかを行うことが好ましい。

【0066】

この開示は、とりわけ、固体表面（例えば、顕微鏡スライド）上に装着され、処理（例えば、ホルマリン固定及びパラフィン包埋）された、生物学的試料（例えば、単離された細胞又は組織）中のヒトHER3の検出方法を提供する。FFPE細胞又は組織試料上で免疫組織化学法を行うことの利点の1つは、このような標本中のHER3が、他の成分に対するその位置、例えば、細胞又は組織試料内におけるその位置を実質的に維持することである。

【0067】

本明細書で用いられるように、用語「検出する」とは、例えば試料を測定することによって、ある薬剤（例えば、核酸分子又はタンパク質）又は相互作用（例えば、抗体と抗原との結合、タンパク質と核酸との結合、又は2つの核酸分子間の結合）が存在するかしないかを判断することを意味する。幾つかの例では、これはさらに、定量をも包含することができる。特定の例では、標識からの放出シグナルが検出される。検出は、巨視的な数の分子を同時に観察できるように、バルクで行うことができる。検出はまた、背景雑音を低減するために顕微鏡法及びこのような技法を全内部反射として使用する、単一分子に由来するシグナルの識別をも含むことができる。

10

【0068】

例えば、特定のタンパク質（例えば、ヒトHER3）に特異的な抗体の使用は、例えばFFPE細胞又は組織試料などの試料中のタンパク質、又はタンパク質-タンパク質相互作用の検出を可能にする。

20

【0069】

本発明に従った抗体は、例えば、放射性標識、蛍光性標識、ビオチンなどのハプテン標識、もしくは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼなどの酵素を用いて、抗体自体を直接標識化することにより検出することができる。あるいは、非標識化一次抗HER3抗体は、一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清又はモノクローナル抗体を含む、標識化された二次抗体と併せて用いられる。免疫組織化学法（IHC）のプロトコル及びキットは当技術分野で周知であり、市販されている。

【0070】

特異的に結合する薬剤は、任意選択的に、検出可能部分で直接標識することもできる。有用な検出薬剤には、蛍光化合物（フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリスリン、ランタノイド系リン光体、又はシアニンファミリの染料（Cy3又はCy5など）及び同様のものを含む）；生物発光化合物（ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、又は黄色蛍光タンパク質など）；検出可能な反応生成物を生成できる酵素（ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はグルコースオキシダーゼ及び同様のものなど）、又は放射性標識（ $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、又は $^{131}\text{I}$ など）が含まれる。

30

【0071】

開示される方法に有用な生物学的試料は、単離され、インビトロで分析され、かつ、固体表面上に固定化及び装着可能ないずれかの細胞調製物又は組織調製物を含む。例示的な試料としては、限定はしないが、血液塗抹、細胞遠心調製物、細胞塗抹、コア生検、細針吸引、及び/又は組織切片（例えば、クライオスタット組織切片及び/又はパラフィン包埋された組織切片）が挙げられる。例示的な生物学的試料は、正常な細胞又は組織から、又は腫瘍（新生）細胞又は組織から単離されうる。新生物とは、1つ以上の細胞が、分化の消失、成長速度の増大、周囲組織浸潤を伴う特徴的な退形成を被り、及び、その細胞が転移可能であり得うる、生物学的状態である。例示的な腫瘍（新生）細胞又は組織は、乳癌（例えば、小葉癌及び腺管癌）、肉腫、肺癌（例えば、非小細胞癌、大細胞癌、扁平上皮癌、及び腺癌）、肺の中皮腫、結腸直腸腺癌、胃癌、前立腺癌、卵巣癌（漿液性嚢胞腺

40

50

癌及びムチン性嚢胞腺癌)、卵巣胚細胞腫瘍、精巣癌及び胚細胞腫瘍、膵臓腺癌、胆管腺癌、肝細胞癌、膀胱癌(例えば、移行上皮癌、腺癌、及び扁平上皮癌を含む)、腎細胞腺癌、子宮内膜癌(例えば、腺癌及びミューラー管混合腫瘍(癌肉腫)を含む)、子宮頸内膜、子宮頸腔部、及び膺の癌(それぞれ、腺癌及び扁平上皮癌)、皮膚癌(例えば、扁平上皮癌、基底細胞癌、メラノーマ、及び皮膚付属器腫瘍)、食道癌、鼻咽頭及び中咽頭の癌(それぞれ扁平上皮癌、及び腺癌を含む)、唾液腺癌、脳及び中枢神経系の腫瘍(例えば、グリア、ニューロン、及び髄膜起源のものを含む)、末梢神経腫瘍、軟組織肉腫ならびに骨及び軟骨の肉腫を含む、固形腫瘍から単離されうる。

【0072】

開示される方法に有用な固体支持体は、生物学的試料を有することのみが必要とされるが、任意選択的に、有利には、試料中の成分(例えば、タンパク質及び/又は核酸配列)の簡便な検出を可能にする。例示的な支持体としては、顕微鏡スライド(例えば、ガラスの顕微鏡スライド又はプラスチックの顕微鏡スライド)、カバースリップ(例えば、ガラスのカバースリップ又はプラスチックのカバースリップ)、組織培養皿、マルチウェルプレート、膜(例えば、ニトロセルロース又はポリフッ化ビニリデン)P V D F)、又はバイオコア(B I A C O R E (商標))チップが挙げられる。

【0073】

ホルムアルデヒド固定に起因する架橋は、一般に、エピトープを覆い隠すか又は破壊する傾向にあり、偽陰性の免疫染色を生じやすい。本発明に従った抗体によって認識されるヒトHER3上のエピトープは、例えば、B e n c h M a r k 分析器(米国ツーソン所在のVentana Medical Systems, Inc.製)上で自動的に実施される標準的な手法によって、容易に回収することができることを見出された。1つの実施態様では、本発明は、ホルムアルデヒド固定パラフィン包埋組織(F F P E T)試料中のHER3の検出における、本発明に開示される抗体の使用に関する。

【0074】

本明細書に開示されるヒトHER3の免疫組織化学的検出の実施を促進するのに有用なキットもまた予定されている。1つの実施態様では、本発明に従った抗体又はその抗原結合部分、及び、該抗体又はその抗原結合部分を検出するための試薬を含む、ホルムアルデヒド固定パラフィン包埋組織試料中のヒトHER3の検出のためのキットが提供される。

【0075】

特定の例において、本発明に従った抗体又はその抗原結合部分、及び該抗体又はその抗原結合部分を検出するための試薬は、別々の容器又はバイアル内に包装される。

【0076】

幾つかのキットの実施態様では、抗体又はその抗原結合部分は、例えば、フルオロフォア、発色団、又は検出可能な生成物を生成することができる酵素(アルカリホスファターゼ(alkaline phosphates)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、及び当技術分野で一般に知られている他のものなど)で、直接標識化することができる。

【0077】

他のキットの実施態様は、二次的検出手段;二次抗体(例えば、抗ウサギヤギ抗体、抗マウスウサギ抗体、抗ハプテン抗体)又は非抗体ハプテン結合分子(例えば、アビジン又はストレプトアビジン)などを含む。このような幾つかの例では、二次的検出手段は、直接、検出可能な部分を用いて標識化される。他の例では、二次的(又はそれより高次の)抗体は、検出可能に標識化された同種のハプテン結合分子(例えば、ストレプトアビジン(S A)ホースラディッシュペルオキシダーゼ、S Aアルカリホスファターゼ、及び/又はS A Q D o t (登録商標)N a n o c r y s t a l s (商標))によって検出可能なハプテン(ビオチン、D N P、及び/又はF I T C など)にコンジュゲートされる。幾つかのキットの実施態様は、このような比色試薬の顕色化のために酵素で標識化された一次又は二次(又はそれより高次の)検出手段(例えば、抗体)と併せて、比色試薬(例えば、D A B 及び/又はA E C)を、使用すべき適切な容器内に含みうる。

【0078】

10

20

30

40

50

幾つかの実施態様では、キットは、ヒトHER3を発現する又は発現しないことが知られている細胞株又は組織など、陽性対照又は陰性対照の試料を含む。特定の例では、対照試料はFFPET試料である。例示的な試料は、正常な（例えば、非癌性の）細胞又は組織を含むが、それらに限定されない。

【0079】

幾つかの実施態様では、キットは、例えば、ヒトHER3に特異的に結合する抗体を使用する手段を開示する、指示書を含む。指示書は、電子的形態（例えば、フロッピーディスク又はコンパクトディスク）で記載されていてもよく、あるいは視覚的（例えば、動画ファイル）であってもよい。キットはまた、キットが設計されている特定の用途を促進するための追加の構成要素を含んでいてもよい。よって、例えば、キットは、本明細書に開示される免疫組織化学的検出の実施に常套的に使用されるバッファー及び他の試薬を含むことができる。このようなキット及び適切な内容は、当業者に周知である。

10

【0080】

ある特定のキットの実施態様は、箱、袋、かばん、プラスチックの箱（plastic carton）（成形プラスチック又は他の透明な包装など）、包装材（封止された又は封止可能なプラスチック、紙、又は金属製の包装材など）、又は他の容器などの搬送手段を含むことができる。幾つかの例では、キットの構成要素は、キットの1つ以上の構成要素を入れることができる区画を有していてもよい、箱又は他の容器などの単一の包装単位内に封入される。他の例では、キットは、例えば試験すべき1つ以上の生物学的試料を保持できる、例えばバイアル、管、及び同様のものなど、1つ以上の容器を含む。

20

【0081】

他のキットの実施態様は、生物学的試料の取り扱い、回収、及び/又は処理に有用でありうる、例えばシリンジ、綿棒、又はゴム手袋を含む。キットはまた、例えば、スポイト、シリンジ、及び同様のものを含む、生物学的試料を1つの場所から別の場所へ移動させるのに有用な器具も、任意選択的に含む。さらに他のキットの実施態様は、使用済みの又は不要となったアイテム（例えば対象試料等）を廃棄する処分手段を含みうる。このような処分手段は、限定はしないが、プラスチック、金属、又は他の不浸透性の袋、箱、又は容器など、廃棄された物質からの漏出物を収容することができる容器を含みうる。

【0082】

本明細書で用いられる用語「核酸」又は「核酸分子」は、DNA分子及びRNA分子を含むことが意図されている。核酸分子は一本鎖又は二本鎖でありうるが、好ましくは二本鎖DNAである。核酸は、別の核酸と機能的関係に置かれたとき、「機能可能に結合」されている。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、ポリペプチドのDNAに機能可能に結合されている；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列に機能可能に結合されている；あるいは、リボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置される場合、コード配列に機能可能に結合されている。一般に、「機能可能に結合される」とは、結合されているDNA配列同士は共線的であることを意味し、分泌リーダーの場合には、近接し、かつリーディングフレーム内にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は、簡便な制限部位におけるライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合は、慣行に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

30

40

【0083】

本発明の一実施態様は、本発明に従った抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸である。

【0084】

本明細書で用いられる表現「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」は相互に置き換え可能に用いられ、このような指定はすべて子孫をも含む。よって、語句「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、転換の数を考慮せずに、一次対象細胞及びそれに由来する細胞培養物を含む。意図的な又は不慮の突然変異に起因して、すべての子孫はDNAコンテンツにおいて厳密に同一ではなくてもよいことも理解される。元々の形質転換細胞において

50

スクリーニングされたものと同じの機能又は生物活性を有する変異体の子孫が含まれる。

【0085】

本明細書で用いられる用語「ベクター」は、結合されている別の核酸を輸送することができる核酸分子のことを指すことが意図されている。ベクターの一種は「プラスミド」であり、これは、追加のDNAセグメントがライゲーションされうる、環状の二本鎖DNAループのことを指す。また別のタイプのベクターは、追加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる、ウイルスベクターである。ある特定のベクターは、導入先の宿主細胞において自律複製することができる（例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター及びエピソーム性の哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性の哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される。さらには、ある特定のベクターは、それらが機能可能に結合されている遺伝子の発現を誘導することができる。このようなベクターは、本明細書では、「組み換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技法に有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態をしている。プラスミドはベクターの最も一般的に用いられる形態である）とから、本明細書では、「プラスミド」及び「ベクター」は、相互に置き換可能に使用されうる。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター（例えば、複製欠損型のレトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）など、発現ベクターの他の形態も含むことが意図されている。

【0086】

本明細書で用いられる用語「組み換え宿主細胞」（又は単に「宿主細胞」）は、組み換え発現ベクターが導入される細胞のことを指すことが意図されている。これらの用語は、特定の対象細胞のみならず、このような細胞の子孫をも指すことが意図されていることが理解されるべきである。ある特定の改変は、突然変異又は周囲条件の影響のいずれかに起因して次世代において生じうることから、このような子孫は実際には親細胞とは同一ではないかもしれないが、それでもなお、本明細書で用いられる用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0087】

本発明に従った抗体は、好ましくは組み換え手段によって産生される。このような方法は当技術分野で幅広く知られており、原核及び真核細胞でのタンパク質発現を、それに続く抗体ポリペプチドの単離及び通常は許容可能な純度への精製と共に、含む。タンパク質発現では、重鎖及び軽鎖又はその断片をコードする核酸が、標準的な方法によって発現ベクターに挿入される。発現は、CHO細胞、NSO細胞、SP2/O細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母、又は大腸菌細胞などの適切な原核細胞又は真核宿主細胞において行われ、抗体は細胞から（上清から又は細胞溶解後に）回収される。抗体の組み換え産物は当技術分野で周知であり、例えば、Makrides, S.C., Protein Expr.Purif.17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., Protein Expr.Purif.8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol.Biotechnol.16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res.48 (1998) 870-880の各総説で述べられている。抗体は、全細胞に、細胞溶解物中に、もしくは部分的に精製された又は実質的に純粋な形態で、存在しうる。精製は、例えば、他の細胞核酸又はタンパク質など、他の細胞成分又は他の夾雑物を取り除くことを目的として、カラムクロマトグラフィ及び他の技法を含む、当技術分野で周知の標準的な技法によって行われる（Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)参照）。NSO細胞での発現は、例えば、Barnes, L.M., et al, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; Barnes, L.M., et al., Biotech.Bioeng.73 (2001) 261-270に記載されている。一過性発現は、例えば、Durocher, Y., et al., Nucl.Acids.Res.30 (2002) E9に記載されている。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89 (1992) 4285-4289; Norderhaug, L., et al., J. Immunol.Methods 204 (1997) 77-87に記載されている。好ましい一過性発現系（HEK293

)は、Schlaeger, E.-J.及びChristensen, K.のCytotechnology 30 (1999) 71-83及びSchlaeger, E.-J.によるJ. Immunol.Methods 194 (1996) 191-199に記載されている。モノクローナル抗体は、例えば、プロテインA - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなど、通常の免疫グロブリンの精製手法によって培地から適切に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNA及びRNAは、通常的手法を用いて、容易に単離及び配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNA及びRNAの起源としての役割を果たす。単離後、DNAは発現ベクター内に挿入されて差し支えなく、次いで、トランスフェクトされなければ免疫グロブリンタンパク質を産生して宿主細胞中に組み換えモノクローナル抗体の合成をもたらさない、HEK293細胞、CHO細胞、又は骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされる。該細胞株から入手可能な抗体は、本発明の好ましい実施態様である。非フコシル化 (afucosylated) 抗体は、好ましくは上述の糖鎖工学によって調製される。

10

**【0088】**

抗HER3抗体のアミノ酸配列変異体は、DNAをコードする抗体に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、又はペプチド合成によって、調製される。しかしながら、このような改変は、例えば、上述したような非常に限られた範囲でしか行うことができない。例えば、改変は、IgGアイソタイプとエプトープとの結合のような上述の抗体特性を変化させはしないが、組み換え産物の収率やタンパク質の安定性を向上しうる、又は精製を促進しうる。いずれのシステイン残基も抗HER3抗体の適切な立体構造の維持には関与しないが、一般にセリンで置換されて差し支えなく、それによって分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を妨げる。反対に、安定性を改善するために、1つ以上のシステイン結合を抗体に追加してもよい(特に抗体がFv断片などの抗体断片の場合)。抗体のアミノ酸変異体の別の種類は、抗体の元来のグリコシル化パターンを変化させる。「変化させる」は、抗体にみられる1つ以上の炭水化物部分を除去する、及び/又は抗体中に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を追加することを意味する。

20

**【0089】**

抗体のグリコシル化は、典型的にはN-結合型である。N-結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合のことを指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここで、Xは、プロリン以外の任意のアミノ酸である)は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合に対する認識配列である。よって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列の何れかの存在が、潜在的なグリコシル化部位を創出する。抗体へのグリコシル化部位の付加は、簡便には、上述のトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位についての)を1つ以上含むように、アミノ酸配列を変化させることによって達成される。

30

**【0090】**

抗HER3抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で知られているさまざまな方法で調製される。これらの方法は、限定はしないが、天然起源からの単離(天然に存在するアミノ酸配列変異体の場合)又は、予め調製された変異体又は非変異体型のヒト化抗HER3抗体のオリゴヌクレオチド介在性の(又は部位特異的な)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

40

**【0091】**

抗体の共有結合修飾の別の種類は、米国特許第4640835号、同第4496689号、同第4301144号、同第4670417号、同第4791192号、及び同第4179337号の各明細書に記載される方式で、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンなど、さまざまな非タンパク質性ポリマーの1つに抗体を結合させることを含む。

**【0092】**

本発明に従った重鎖及び軽鎖可変ドメインは、プロモーター、翻訳開始、定常領域、3'非翻訳領域、ポリアデニル化、及び転写終結の配列と組み合わせて、発現ベクターコン

50

ストラクトを形成する。重鎖及び軽鎖発現コンストラクトは、単一ベクター内に組み込まれ、宿主細胞に同時トランスフェクト、連続トランスフェクト、又は別々にトランスフェクトされ、次いで融合されて両鎖を発現する単一の宿主細胞を形成する。

【 0 0 9 3 】

以下の配列表、実施例、及び図面は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は添付の特許請求の範囲に記載される。本発明の精神から逸脱することなく、記載された手法に改変が施されることが理解される。

【 0 0 9 4 】

配列表の説明

配列	HER3 モノクローナル抗体 MAK<ヒト HER3>クローン	10
配列番号 1 CDR1H 配列: TFTDYNLH	M- 7.2.42 M- 7.3.8	
配列番号 2 CDR2H 配列、変異体 1: YFNPYNGGTFYTQK	M- 7.2.42	
配列番号 3 CDR2H 配列、変異体 2: YFNTYNGGIFYTQK	M- 7.3.8	
配列番号 4 CDR3H 配列: TRRYFDGSSYF	M- 7.2.42 M- 7.3.8	
配列番号 5 CDR1L 配列: RSSQTIVH	M- 7.2.42	20
配列番号 6 CDR2L 配列、変異体 1: QSLKL	M- 7.2.42	
配列番号 7 CDR2L 配列、変異体 2: QSPKL	M- 7.3.8	
配列番号 8 CDR3L 配列: FQGSHVPRA	M- 7.2.42	
配列番号 9 VH 配列、変異体 1: EVQLLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNLHWVK QSHGRTLEWIGYFNPYNGGTFYTQKFKDKATLTINKSSS TAYMELRSLTSEDSAVYYCTRRYFDGSSYFDYWGGTT LTVSS	M- 7.2.42	30
配列番号 10 VH 配列、変異体 2: EVQLQQSGPELAKPGASVKMSCKASGYTFTDYNLHWVK QSHGKTLEWIGYFNTYNGGIFYTQKFKDKATLTINKSSST AYMELRSLTSEDSAVYYCTRRYFDGSSYFDYWGRGTT TVSS	M- 7.3.8	
配列番号 11 VL 配列、変異体 1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQTIVHSNGNTYLE WYVQKPGQSLKLLIYKVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCFQGSHPRAFGGGKLEIKR	M- 7.2.42	
配列番号 12 VL 配列、変異体 2: DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLE WYVQKPGQSPKLLIYKVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCFQGSHPRTFSGGKLEIKR	M- 7.3.8	40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 5 】

【 図 1 】 幾つかのトランスフェクトされた対照細胞株を用いた比較ウェスタンブロット分析。HER 1、HER 2、HER 3、HER 4 を過剰発現する、又は哺乳動物発現ベクター p R K 5 をトランスフェクトされた（陰性対照として）トランスフェクト H E K 2 9 3 細胞株から調製された細胞溶解物を、S D S - P A G E によって分離し、ニトロセルロー

ス膜に移した。ブロッキング後、膜を、HER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42と共に、又はHER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.3.8と共に、又はDako社の最先端モノクローナル技術である抗HER3抗体DAK-H3-ICatと共に、室温又は37℃で、インキュベートした。HRP-コンジュゲート化抗マウスFabを二次抗体として使用した。

【図2】非小細胞肺癌(NSCLC)試料を用いた比較ウェスタンブロット分析。新鮮凍結NSCLC試料から調製された細胞溶解物をSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロース膜に移した。ブロッキング後、膜を、HER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42、又はDako社の最先端モノクローナル技術である抗HER3抗体DAK-H3-ICと共に、37℃でインキュベートした。HRP-コンジュゲート化抗マウスFabを二次抗体として使用した。

10

【図3】モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42及びMAK<ヒトHER3>M-7.3.8を使用した、細胞株対照試料における免疫組織化学法。試料調製物用の標準細胞条件付け1(CC1)試薬を使用し、一次抗体としてHER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42又はHER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.3.8を使用し、検出システムとしてultraView DABを使用して、HER1、HER2、HER3又はHER4を過剰発現するホルマリン固定パラフィン包埋HEK293細胞を、ベンタナ社製の自動スライド染色装置ベンチマークXT機器で分析した。

【図4A-C】FFPET非小細胞肺癌(NSCLC)試料における比較免疫組織化学分析。常套的にホルマリン固定パラフィン包埋NSCLC組織における、HER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42の染色特性及び染色パターンと、Dako社の最新技術抗HER3抗体DAK-H3-ICとの比較。A及びB：試料調製物用の標準細胞条件付け1(CC1)試薬、及び検出システムとしてのultraView DABを使用した、ベンタナ・ベンチマークXTシステム上でのHER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42を用いた免疫組織化学法。C：UltraVision LP検出システム及びDABを使用した、Dako社の半自動化Autostainerプラットフォーム上におけるDako社の抗HER3抗体DAK-H3-ICを用いた免疫組織化学法。脱パラフィン化及び抗原回収の工程の手順を手動で行った。Dako社のDAK-H3-IC抗体は、このプラットフォーム上ではFFPET試料における結合活性を示さないことから、ベンタナ・ベンチマークXTシステム上では用いることができない。

20

30

【図5A-D】結腸癌及び肺に由来するヒト腫瘍組織試料における比較免疫組織化学分析。常套的にホルマリン固定かつパラフィン化された組織試料における、HER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.3.8(左;0.125µg/ml)の、Santa Cruz社の最新技術の抗HER3抗体C17(右;0.125µg/ml)に対する染色特性及び染色パターンの比較。図5AからDのそれぞれにおいて、左右の図は、それぞれ、MAK<ヒトHER3>M-7.3.8及びC17の結合を示している(増幅:10倍(上)及び20倍(下))。A:ヒト腫瘍組織試料 結腸A1278-Tp6。B:ヒト腫瘍組織試料 結腸B594-Tp5。C:ヒト腫瘍組織試料 結腸CRC071147.1.1。D:ヒト腫瘍組織試料 肺p339-Tc16。

40

#### 【実施例1】

##### 【0096】

HER3に対するモノクローナル抗体の産生

モノクローナル抗体の産生のため、8週齢の雌Balb/cマウスの腹腔内を、cFAでエマルジョン化した100µgのHER3抗原ペプチドを用いて免疫化した。予め、適切なスペースを備えた自動ペプチド合成機を用いて抗原を合成し、N末端をKLH(Keyhole limpet hemocyanin:すかし貝ヘモシアニン)に結合させた。初回の免疫化に続いて、iFAを用いて、6週間後に1か月間隔でさらに3回の免疫化を行った。脾臓摘出の3日前に、マウスの静脈内に50µgの抗原をブーストした。脾臓細胞及びP3X63Ag

50

8.653 骨髓腫細胞をPEGで融合し、HAz選択培地で培養した。除去後、脾臓の単一細胞調製物を作成し、例えば、Kohler及びMilstein (1975)に記載されるように、脾臓細胞を骨髓腫細胞に融合した。結果として得られたハイブリドーマを、使用される免疫原に対応する配列を有する、ビオチン化スクリーニングペプチドに対する反応性について、ELISAを用いてスクリーニングした。ストレプトアビジンでコーティングした384ウェルMTPをビオチン化HER3ペプチドでコーティングし、未希釈のハイブリドーマ上清と共にインキュベートした。次いでプレートをHRPで標識された抗マウスヒツジIgG-Fc特異的抗体を用いてプローブ化し、ABTSで顕色化させた。選択されたハイブリドーマの結合親和性を、バイオコア分析法によって試験した。それぞれの免疫原配列に高い親和性を有するハイブリドーマを、FACS Aria IIIを使用した単一細胞沈着によってクローン化した。得られたモノクローナルサブクローンを、再びELISA及びバイオコア分析法で試験した。

10

## 【実施例2】

## 【0097】

バイオコア分析法によるハイブリドーマ培養液上清の試験。

適切な抗体の選択のため、ハイブリドーマ培養液上清において動態スクリーニングを行った。バイオコアSPR技術を使用して測定を行った。CM5シリーズのSセンサーチップをA100機器(GE Healthcare社製、バイオコア)に装着し、製造業者の指示書に従ってHBSNバッファー(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl)中で流体力学的に取り扱った。システムバッファーはHBS-ET(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.05% TWEEN 20)であった。試料バッファーは1mg/mlのCMD(カルボキシメチルデキストラン、シグマ社製#86524)が補充されたシステムバッファーであった。システムは25で運用された。

20

## 【0098】

10000RU RAM IgGFC(それぞれのマウス免疫グロブリンGサブクラスの抗マウスウサギFc断片/Jackson Laboratories社の相対単位)を、それぞれフローセルFC1(サブクラス1の抗マウスFc)、FC2、FC3及びFC4上で、各フローセル上の感受性スポット1、2、4及び5において、EDC/NHS化学を使用して、製造業者の指示書に従って固定化した。スポットを、1M エタノールアミンを使用して不活性化した。

30

## 【0099】

HER3ペプチドに対する抗体の結合活性について動態試験を行った。粗ハイブリドーマ上清を試料バッファーで1:3に希釈し、10µl/分で1分間注入することによって、抗体を捕捉した。ビオチン化HER3ペプチドを、慎重に1つずつストレプトアビジン上にグラフトし、複合体の分子量を増大させ、システムの質量感度を増大させた。抗原複合体の解離 $k_d$ は被分析物の注入濃度とは無関係であることから、これは、システムの感度を増大させるためのリーガルメソッドである。

## 【0100】

それぞれのペプチドグラフトを30µl/分で5分間注入し、解離を3分間モニタリングした。センサー表面の酸性再生に、30µl/分での10mM グリシン pH1.5の3回の連続注入を用いた。

40

## 【0101】

製造業者の指示書に従って、Biaevaluation A100ソフトウェアV.1.1を使用してデータを評価した。結合遅延(binding late)(RU)、安定遅延(Stability Late)(RU)、 $R_{max}$ 、 $k_d$ (1/s)及びMR(モル比)を計算した。クローンをそれらの抗原複合体の安定性及びMRに従って採点した。

## 【0102】

製造業者の指示書に従い、BiaevaluationソフトウェアV.4.1を使用してデータを評価した。解離速度定数 $k_d$ (1/秒)を計算し、 $t_{1/2\text{diss}} = \ln(2) / 60 * k_d$  [分]の式に従って $t_{1/2\text{diss}}$ を算出した。それぞれのデー

50

タを表 2 に示す。

【 0 1 0 3 】

表 2 : - 抗 H E R 3 モノクローナル抗体クローンの動態パラメータ

モノクローナル抗体	アイソタイプ <sup>o</sup>	kd [1/秒]	t1/2 diss [分]
MAK<ヒト HER3>M-1.1.1	IgG1 $\kappa$	4,26E-04	27
MAK<ヒト HER3>M-1.2.2	IgG1 $\kappa$	4,18E-04	28
MAK<ヒト HER3>M-1.1.4	IgG2a $\kappa$	2,92E-04	40
MAK<ヒト HER3> M-6.3.1	IgG1 $\kappa$	9,28E-04	12
MAK<ヒト HER3>M-7.3.8	IgG2a $\kappa$	2,66E-05	435
MAK<ヒト HER3>M-7.2.42	IgG2a $\kappa$	4,26E-05	271

【 0 1 0 4 】

モノクローナル抗体 M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 3 . 8 及び M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 2 . 4 2 は、ペンタナ・ベンチマーク X T プラットフォーム上で用途に十分な複合体安定性 t 1 / 2 d i s s を示している。

【 0 1 0 5 】

特に、どちらかといえば遅い解離は、自動化ペンタナ・ベンチマーク X T プラットフォームを使用する I H C 染色にとって非常に重要である。

【 0 1 0 6 】

表 2 から明らかなように、非常に遅い解離は、ハイブリドーマ (クローン) M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 3 . 8 及び M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 2 . 4 2 によって産生されたモノクローナル抗体で観察され、M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 3 . 8 は最も遅い解離を示している。

【 実施例 3 】

【 0 1 0 7 】

ウェスタンブロット法

新しく産生された H E R 3 モノクローナル抗体 M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 2 . 4 2、M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 3 . 8、及び D a k o 社のモノクローナル抗体 D A K - H 3 - I C を使用して、比較ウェスタンブロット分析を行った。

【 0 1 0 8 】

a) 幾つかのトランスフェクト対照細胞株を用いた比較ウェスタンブロット分析

幾つかの H E K 2 9 3 対照細胞株から溶解物を調製した。H E R 1、H E R 2、H E R 3 又は H E R 4 をコードするプラスミドを用いて、細胞を一時的にトランスフェクトした。哺乳動物発現ベクター p R K 5 をトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞を陰性対照として使用した。ウェスタンブロット法のため、10  $\mu$ g のタンパク質溶解物を 4 ~ 12 % の N u P a g e S D S ゲル ( I n v i t r o g e n 社製 ) 上にレーンごとに流した。標準的なプロトコルに従い、標準的な N u P a g e バッファー及び試薬 ( I n v i t r o g e n 社製 ) を用いてウェスタンブロット法を行った。ブロッキング後、膜を、M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 2 . 4 2、M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 3 . 8 又は D a k o 社の H E R 3 モノクローナル抗体 D A K - H 3 - I C と共にインキュベートした。M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 2 . 4 2 及び M A K < ヒト H E R 3 > M - 7 . 3 . 8 を 1 n g / m l の濃度で使用した。一次抗体のインキュベーションを、室温及び 37  $^{\circ}$  で 60 分間、行った。H R P - コンジュゲート化抗マウス F a b を二次抗体として使用した。D A K

10

20

30

40

50

- H3 - IC 抗体の希釈液を製造業者が推奨するように作出し、必要に応じて二次（検出）抗体の選択を適合させた。膜を ECL（Amersham 社製）を用いて顕色化させて、X線フィルムに曝露した。

#### 【0109】

個別のプロットの結果が図1に与えられている。比較ウェスタンブロット分析は、新たに顕色化した MAK<ヒトHER3>M-7.2.42 及び MAK<ヒトHER3>M-7.3.8 が HER3 を特異的に検出し、HER1、HER2、HER4 又は他のタンパク質とは交差反応を示さないことを示している。これらの結合特性は室温及び 37 で見られるのに対し、Dako社のHER3モノクローナル抗体 DAK-H3-ICは37で顕著に弱い結合活性を示している。このように、新たに顕色化した MAK<ヒトHER3>M-7.2.42 及び MAK<ヒトHER3>M-7.3.8 は、Dako社の最新技術のモノクローナル抗HER3抗体 DAK-H3-ICと比較して、特に自動染色システムに使用される温度条件下におけるウェスタンブロット分析において優れた結合特性を示す。

10

#### 【0110】

b) 非小細胞肺癌 (NSCLC) 試料を用いた比較ウェスタンブロット分析

0 から高レベルまでさまざまな HER3 発現レベルを有する、新鮮凍結された NSCLC 試料を溶解し、実施例 3a に記載される SDS-PAGE / ウェスタンブロット法の手順に類似して、37 で、MAK<ヒトHER3>M-7.2.42 又は Dako 社の抗体 DAK-H3-IC を使用して分析した。

20

#### 【0111】

個別のプロットの結果が図2に与えられている。比較ウェスタンブロット分析は、新たに顕色化した MAK<ヒトHER3>M-7.2.42 が、Dako社の最新技術のモノクローナル抗HER3抗体 DAK-H3-ICと比較して、HER3 に対し顕著に高い結合感度を示すことを示唆している。

#### 【実施例4】

#### 【0112】

配列決定

選択ハイブリドーマクローンの DNA 配列を得るため、5' RACE PCR を行った。RT-PCR では、全 RNA 精製キット (Qiagen 社製) を使用して、 $5 \times 10^6$  細胞から全 RNA を調製した。5' プライム RACE PCR キット (Roche 社製) を使用して、逆転写及び PCR を行った。重鎖及び軽鎖から結果的に得られた PCR 断片を、ゲル電気泳動及びその後のゲル抽出によって精製した。Topo Zero-Blunt クローニングキット (Invitrogen 社製) を使用して PCR 断片をクローニングし、化学的に有用な細胞へと形質転換した。各ハイブリドーマ由来の幾つかのクローンを配列決定に供し、選択されたクローンについてのコンセンサス配列を得た。

30

#### 【実施例5】

#### 【0113】

免疫組織化学法

a) モノクローナル抗体 MAK<ヒトHER3>M-7.2.42 及び MAK<ヒトHER3>M-7.3.8 を使用する、細胞株対照試料における免疫組織化学法

40

FFPE 細胞株対照を使用して、新たに顕色化した HER3 モノクローナル抗体 MAK<ヒトHER3>M-7.2.42 及び MAK<ヒトHER3>M-7.3.8 の適合性を示した。したがって、それぞれ、HER1、HER2、HER3 又は HER4 をトランスフェクトされた又はトランスフェクトされていない HEK293 細胞を、4% PBS でバッファ化したホルムアルデヒドを用いて固定した後、パラフィンに包埋した。

#### 【0114】

すべての染色手順は、ベンタナのバッファー及び試薬、すなわち、とりわけ、試料調製物用の標準細胞条件付け 1 (CC1) 試薬及び検出システムとして ultraView DAB を使用して、ベンタナ・ベンチマーク XT 自動化 IHC 染色機上で行われた。

50

## 【 0 1 1 5 】

図3から明らかのように、新たに顕色化したHER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42及びMAK<ヒトHER3>M-7.3.8は、HER3をトランスフェクトされた細胞においてのみ特異的な膜染色を示している。HER1、HER2及びHER4をトランスフェクトされた細胞及び対照細胞は陰性である。HER3モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42及びMAK<ヒトHER3>M-7.3.8は、ペンタナ・ベンチマークXT分析器での標準的なプロトコルに従って使用される場合に、HER3をトランスフェクトされた細胞に対し良好なIHC染色性を示す(図3参照、HER3を捕捉した細胞の染色性)。

## 【 0 1 1 6 】

b) FFPE非小細胞肺癌(NSCLC)試料における比較免疫組織化学分析  
モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42を、Dako社の最新技術のモノクローナル抗体DAK-H3-ICと比較した、ホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)試料由来の免疫組織化学染色の適合性についてさらに評価した。常套的にホルマリン固定パラフィン包埋NSCLC組織試料において免疫組織化学分析を行った。MAK<ヒトHER3>M-7.2.42を用いた染色を、標準的な試薬及び手順、すなわち、とりわけ、試料調製物用の標準細胞条件付け1(CC1)試薬及び検出システムとしてUltraView DABを使用して、ペンタナ・ベンチマークXTプラットフォーム上で行った。HER3に対するDako社のDAK-H3-IC抗体を用いた免疫組織化学分析を、UltraVision LP検出システム及びDABを使用して、半自動化Dako自動染色機プラットフォーム上で行った。脱パラフィン化及び抗原回収工程のプロセスを手動で行った。Dako社のDAK-H3-IC抗体は、このプラットフォーム上ではFFPE試料における結合活性を示さないことから、ペンタナ・ベンチマークXTシステム上では用いることができない。

## 【 0 1 1 7 】

図4Bに示す組織試料の拡大断面である図4Aから明らかのように、新たに顕色化したモノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42は、腫瘍細胞において強い膜染色性を示している。その染色度は、HER3に対するDako社の最新技術のDAK-H3-IC抗体により得られた染色度よりも有意に強い。このように、モノクローナル抗体MAK<ヒトHER3>M-7.2.42は、FFPE試料中のHER3に対して高い結合特異性及び感度を示し、臨床ヒト腫瘍試料を染色するための自動化システムに使用した場合に、HER3発現の信頼性の高い検出を提供する。

## 【 0 1 1 8 】

c) 結腸癌及び肺に由来するヒト腫瘍組織試料における比較免疫組織化学分析  
市販の抗体と比較した免疫組織化学法のための新たな抗HER3抗体の感度を分析するため、連続した切片の染色を行った。肺及び結腸の癌に由来するホルマリン固定パラフィン包埋ヒト腫瘍組織から3µmの連続した切片を調製した。すべての染色は、Roche社/ペンタナ・ベンチマークXT機器上で行われた。抗原回収のためバッファcc1を60分間適用し、その後、異なる一次抗体(MAK<ヒトHER3>M-7.3.8及びSanta Cruz C17)を用いて染色した。ペンタナOptiViewキットを使用して、一次抗体の検出を行った。両方の抗体を125ng/mlの濃度で使用した。

## 【 0 1 1 9 】

図5AからDに示すように、抗体MAK<ヒトHER3>M-7.3.8は、HER3が少量しか発現されない場合であっても、腫瘍組織内におけるHER3の発現及び膜局在化をはっきりと検知することができる。新しい抗体7.3.8と比較して、市販の抗体C17では同一の腫瘍の染色は検出できなかった。

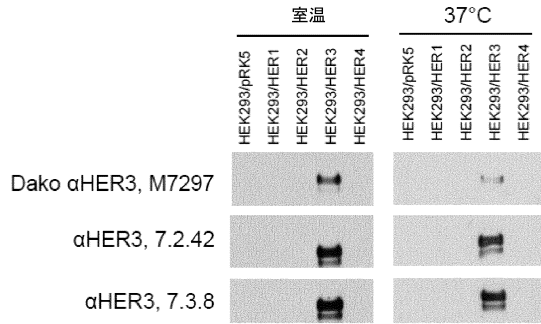
10

20

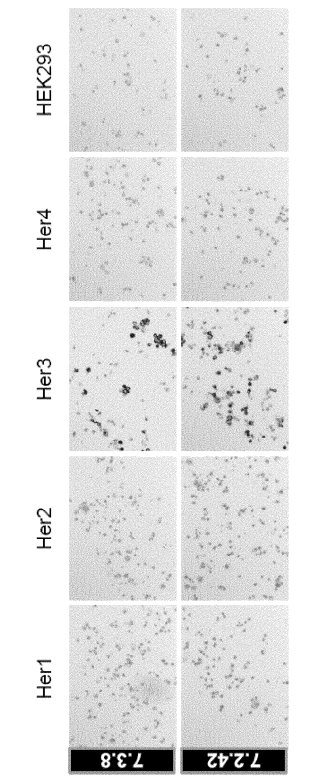
30

40

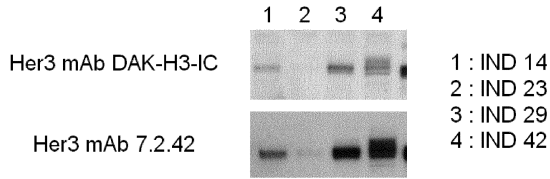
【 図 1 】



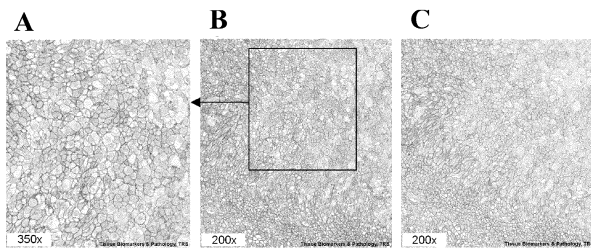
【 図 3 】



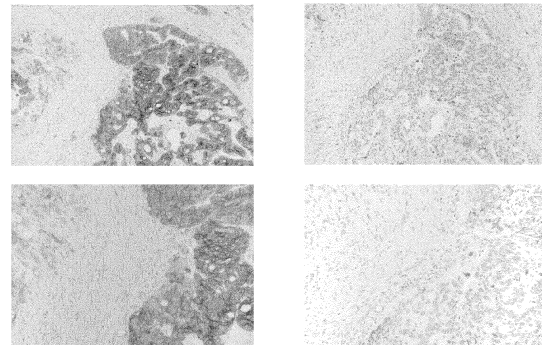
【 図 2 】



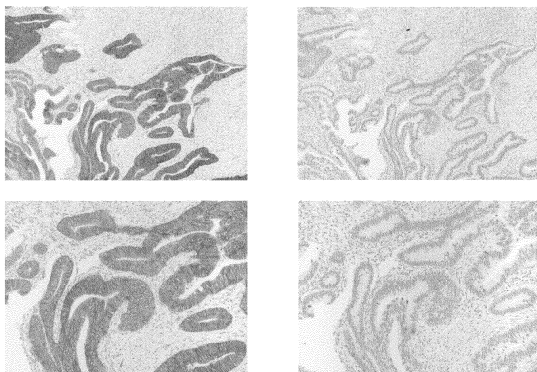
【 図 4 】



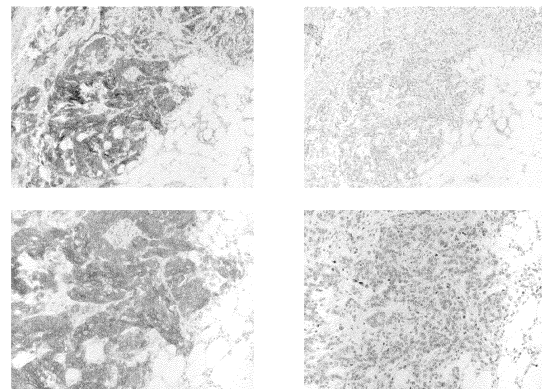
【 図 5 B 】



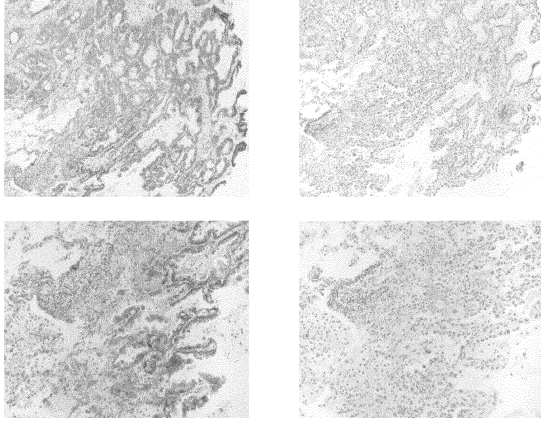
【 図 5 A 】



【 図 5 C 】



【図 5 D】



【配列表】

0006419796000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
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 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
G 0 1 N	33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/48 P
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 Y
		G 0 1 N	33/53 D

- (72)発明者 ソウクポヴァー, モニカ  
ドイツ国 8 2 4 0 5 ヴェッツブルン, バーダーヴェーク 1 6
- (72)発明者 シュレムル, ミヒヤエル  
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ホーホフェルトシュトラッセ 4 6
- (72)発明者 ボッセンマイアー, ビルギット  
ドイツ国 8 2 2 2 9 ゼーフェルト, ホルスト・ヴォルフラム・ガイスラー・ヴェーク 1 0
- (72)発明者 ロシュ, パトリック シー.  
アメリカ合衆国 アリゾナ 8 5 7 1 8, ツーソン, イースト カーレ マリポーザ 9 3 1
- (72)発明者 ゲルク, ミヒヤエル  
ドイツ国 8 1 3 7 7 ミュンヘン, ダウテンダイシュトラッセ 3 1
- (72)発明者 ジャトキ, セバスチャン  
ドイツ国 8 3 6 7 1 ベネディクトボイアーン, エリラントシュトラッセ 2

審査官 松田 芳子

- (56)参考文献 特表2012-515226(JP,A)  
特表2013-544492(JP,A)  
米国特許出願公開第2011/0033482(US,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C 0 7 K 1 / 0 0 ~ 1 9 / 0 0  
CAplus/WPIDS/REGISTRY(STN)  
PubMed  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	一种特异性结合HER3的抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP6419796B2</a>	公开(公告)日	2018-11-07
申请号	JP2016519773	申请日	2014-10-02
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏股份公司 本塔纳医疗系统, 墨水.		
当前申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏股份公司 本塔纳医疗系统, 墨水.		
[标]发明人	ソウクボヴァーモニカ シュレムルミヒヤエル ポッセンマイアービルギット ロシュパトリックシー ゲルクミヒヤエル ジャトキセバスチャン		
发明人	ソウクボヴァー, モニカ シュレムル, ミヒヤエル ポッセンマイアー, ビルギット ロシュ, パトリックシー. ゲルク, ミヒヤエル ジャトキ, セバスチャン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/2863 C07K16/3023 C07K16/3046 C07K16/32 C07K2317/33 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N1/30 G01N33/57492 G01N33/74 G01N2001/302 G01N2333/71		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/46 G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.D		
审查员(译)	松田良子		
优先权	2013004801 2013-10-04 EP 2013005008 2013-10-18 EP		
其他公开文献	JP2016538827A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及与人HER3结合的分离的抗体或其抗原结合部分。该新型抗体非常有用,因为它能够高度灵敏和特异性地检测人HER3。人类HER3的检测是,例如,可以在组织样品中,即使这样的组织样品是福尔马林固定的石蜡包埋的组织(FFPET)的样品,它是可能的。背景技术

(45) 発行日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(24) 登録日 平成30年10月19日(2018.10.19)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C 1 2 N</b> 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
<b>C O 7 K</b> 16/28 (2006.01)	C O 7 K	16/28	
<b>C 1 2 N</b> 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
<b>C 1 2 N</b> 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
<b>C 1 2 N</b> 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	

請求項の数 10 (全 26 頁) 最終頁に続く

- (21) 出願番号 特願2016-519773 (P2016-519773)
- (86) (22) 出願日 平成26年10月2日(2014.10.2)
- (65) 公表番号 特表2016-538827 (P2016-538827A)
- (43) 公表日 平成28年12月15日(2016.12.15)
- (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/071204
- (87) 国際公開番号 W02015/049355
- (87) 国際公開日 平成27年4月9日(2015.4.9)
- 審査請求日 平成29年8月24日(2017.8.24)
- (31) 優先権主張番号 13004801.0
- (32) 優先日 平成25年10月4日(2013.10.4)
- (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
- (31) 優先権主張番号 13005008.1
- (32) 優先日 平成25年10月18日(2013.10.18)
- (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

- (73) 特許権者 306021192  
エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチュエン  
ゲゼルシャフト  
スイス、ツェッハー 4070ハーゼル、グ  
レンツァッハーシュトラッセ124番
- (73) 特許権者 511286517  
ヴェンタナ メディカル システムズ、  
インク。  
アメリカ合衆国 アリゾナ 85755、  
ツーソン、 イースト イノヴェーショ  
ン パーク ドライヴ 1910
- (74) 代理人 110002077  
園田・小林特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H E R 3 に特異的に結合する抗体