

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531263

(P2004-531263A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004. 10. 14)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K	39/00	A 6 1 K	39/00	H	4 B O 6 4
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395	E	4 B O 6 5
A 6 1 K	45/00	A 6 1 K	39/395	T	4 C O 8 4
A 6 1 K	51/00	A 6 1 K	45/00		4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 385 頁) 最終頁に続く					
(21) 出願番号	特願2002-589639 (P2002-589639)	(71) 出願人	500025570	ルードヴィッヒ インスティテュート フ ォー キャンサー リサーチ アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 1 5 8、ニューヨーク、サード アベニュー 6 0 5	
(86) (22) 出願日	平成14年5月13日 (2002. 5. 13)	(74) 代理人	100078282		
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月11日 (2003. 11. 11)		弁理士 山本 秀策		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/015185	(74) 代理人	100062409		
(87) 国際公開番号	W02002/092771		弁理士 安村 高明		
(87) 国際公開日	平成14年11月21日 (2002. 11. 21)	(74) 代理人	100113413	弁理士 森下 夏樹	
(31) 優先権主張番号	60/290, 410				
(32) 優先日	平成13年5月11日 (2001. 5. 11)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
(31) 優先権主張番号	60/326, 019				
(32) 優先日	平成13年9月28日 (2001. 9. 28)			最終頁に続く	
(33) 優先権主張国	米国 (US)				
(31) 優先権主張番号	60/342, 258				
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001. 12. 21)				
(33) 優先権主張国	米国 (US)				

(54) 【発明の名称】 特異的結合タンパク質およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、特異的結合メンバー、特に抗体およびその活性フラグメントに関し、この特異的結合メンバーは、E G F Rの異常な翻訳後修飾形態、特に異常なグリコシル化形態を認識する。本発明の結合メンバー、特に抗体およびそのフラグメントは、野生型遺伝子の増幅の非存在化で、正常細胞上のE G F Rに結合せず、接合部ペプチドと区別されるエピトープにおいてd e 2 - 7 E G F Rに結合し得る。この型の抗体は、そのV H配列およびV L配列が、配列番号2および配列番号4に示される新規の抗体8 0 6によって例証され、そしてそのキメラ抗体は、c h 8 0 6によって例証される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、E G F R エピトープを認識し、該 E G F R エピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ない、単離された特異的結合メンバー。

【請求項 2】

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、E G F R エピトープを認識し、ここで該 E G F R エピトープは、正常な E G F R からの任意のアミノ酸配列変化またはアミノ酸配列置換を示さず、そして該 E G F R エピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ない、単離された特異的結合メンバー。 10

【請求項 3】

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、E G F R エピトープを認識し、ここで該 E G F R エピトープは、正常な E G F R の任意のアミノ酸配列変化またはアミノ酸配列置換を示さず、そして該 E G F R エピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該エピトープは、E G F R の残基 273～501 を含む領域内に位置する、単離された特異的結合メンバー。

【請求項 4】

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、E G F R エピトープを認識し、該 E G F R エピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該エピトープは、異常な発現において増強されるかまたは明らかにされ、ここで、該特異的結合メンバーは、接合部ペプチドと区別されるエピトープで d e 2-7 E G F R と結合し得、そして該特異的結合メンバーは、異常な発現の非存在下において正常細胞上で E G F R に結合せず、そしてここで、該エピトープは、E G F R の残基 273～501 を含む領域内に位置する、単離された特異的結合メンバー。 20

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか 1 項以上に記載の単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーが、完全なヒトのメンバー、ヒト化されたメンバーまたはキメラ化されたメンバーである、単離された特異的結合メンバー。 30

【請求項 6】

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、E G F R エピトープを認識し、該 E G F R エピトープは、正常な E G F R からの任意のアミノ酸配列変化またはアミノ酸配列置換を示さず、そして該 E G F R エピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該結合メンバーは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれか 1 つまたは両方に実質的に記載されるとおりのポリペプチド配列を含む、単離された特異的結合メンバー。

【請求項 7】

単離された特異的結合メンバーであって、該単離された特異的結合メンバーは、E G F R エピトープを認識し、該 E G F R エピトープは、腫瘍形成性細胞、高増殖性細胞または異常細胞中に見出され、かつ正常細胞中では検出され得ず、ここで、該エピトープは、異常な発現において増強されるかまたは明らかにされ、ここで、該結合メンバーは、接合部ペプチドと区別されるエピトープで d e 2-7 E G F R を結合し得、かつ正常な野生型遺伝子の増幅の非存在化において正常細胞上の E G F R に結合せず、そしてここで、該結合メンバーは、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれか 1 つまたは両方に実質的に記載されるとおりのポリペプチド配列を含む、単離された特異的結合メンバー。 40

【請求項 8】

前記ポリペプチド配列が、配列番号 2 に記載される、請求項 6 または 7 に記載の単離され 50

た特異的結合メンバー。

【請求項 9】

前記ポリペプチド配列が、配列番号 4 に記載される、請求項 6 または 7 に記載の単離された特異的結合メンバー。

【請求項 10】

前記結合メンバーが、配列番号 2 の、残基 26～35A、49～64 または 93～102 の任意の 1 つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、請求項 8 に記載の特異的結合メンバー。

【請求項 11】

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号 2 の、残基 26～35A に記載されるとおりである、請求項 10 に記載の特異的結合メンバー。 10

【請求項 12】

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号 2 の、残基 49～64 に記載されるとおりである、請求項 10 に記載の特異的結合メンバー。

【請求項 13】

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号 2 の、残基 93～102 に記載されるとおりである、請求項 10 に記載の特異的結合メンバー。

【請求項 14】

前記抗体が、配列番号 4 の、残基 24～34、50～56 または 89～97 の任意の 1 つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、請求項 9 に記載の特異的結合メンバー。 20

【請求項 15】

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号 4 の、残基 24～34 に記載されるとおりである、請求項 14 に記載の特異的結合メンバー。

【請求項 16】

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号 4 の、残基 50～56 に記載されるとおりである、請求項 14 に記載の特異的結合メンバー。

【請求項 17】

前記ポリペプチド結合ドメインが、実質的に配列番号 4 の、残基 89～97 に記載されるとおりである、請求項 14 に記載の特異的結合メンバー。 30

【請求項 18】

前記単離された特異的結合メンバーが、抗体である、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の単離された特異的結合メンバー。

【請求項 19】

前記結合ドメインが、ヒト抗体フレームワークにを伴う、請求項 1～17 または 18 のいずれか 1 項に記載の単離された特異的結合メンバーまたは抗体。

【請求項 20】

前記ヒト抗体フレームワークが、ヒト IgG1 抗体フレームワークである、請求項 19 に記載の単離された結合メンバーまたは抗体。

【請求項 21】

配列番号 2 および配列番号 4 のいずれか 1 つに記載されるポリペプチド配列を含む、請求項 18 に記載の抗体。 40

【請求項 22】

配列番号 2 に記載されるポリペプチド配列を含む、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 23】

配列番号 4 に記載されるポリペプチド配列を含む、請求項 21 に記載の抗体。

【請求項 24】

抗体 F(ab')₂、scFv フラグメント、二価抗体、三価抗体または四価抗体の形態である、請求項 1～23 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

【請求項 25】

前記特異的結合メンバーまたは抗体が、検出可能標識または機能性標識を伴う、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

【請求項 26】

前記標識が、共有結合により薬物に結合される、請求項 25 に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

【請求項 27】

前記標識が、放射性標識である、請求項 25 に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

【請求項 28】

前記結合パートナーまたは抗体が、ペグ化される、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

10

【請求項 29】

請求項 1～24 のいずれか 1 項に規定されたとおりの特異的結合メンバーまたは抗体をコードする配列を含む、単離された核酸。

【請求項 30】

請求項 1～24 のいずれか 1 項に規定されたとおりの特異的結合メンバーまたは抗体を調製する方法であって、該方法は、該結合メンバーまたは抗体の発現をもたらすような条件下で、請求項 29 に記載の核酸を発現する工程、および該結合メンバーまたは抗体を回収する工程、を包含する、方法。

【請求項 31】

ヒトまたは動物の体を処置または診断する方法に使用するための、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

20

【請求項 32】

腫瘍抗原に結合し得る特異的結合メンバーを調製する方法であって、該方法は以下の工程：

a) CDR3 コード領域を欠く VH ドメインをコードする核酸の開始レパートリーを提供する工程；

b) 配列番号 2 の残基 26～35A、49～64 または 93～102 の任意の 1 つ以上に実質的に記載されたとおりのアミノ酸配列をコードするドナー核酸が、欠落した CDR3 領域に挿入されるように、該レパートリーと、該ドナー核酸とを結合し、それにより VH ドメインをコードする核酸の産物レパートリーを提供する工程；

30

c) 該産物レパートリーの核酸を発現する工程；

d) 試験動物において、 $>1:1$ である腫瘍 対 血液の最大局在比および必要に応じて、 $<1:1$ である非腫瘍保有器官 対 血液の局在比を持つ、特異的結合メンバーを選択する工程；および

e) 該結合メンバーまたは該結合メンバーをコードする核酸を回収する工程、を包含する、方法。

【請求項 33】

ヒト患者において腫瘍の処置をする方法であって、該方法は、該患者に、請求項 1～28 のいずれか 1 項に定義されたとおりの特異的結合メンバーまたは抗体の有効量を投与する工程を包含する、方法。

40

【請求項 34】

腫瘍の診断のためのキットであって、該腫瘍において EGF R は異常に発現されるかまたは EGF R は、短くされたタンパク質の形態で発現され、該キットは、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載される特異的結合メンバーまたは抗体を含み、必要に応じて、試薬および／または使用のための説明書を備える、キット。

【請求項 35】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に定義されたとおりの特異的結合メンバーまたは抗体、および必要に応じて、薬学的に受容可能なビヒクル、キャリアまたは希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 36】

50

ヒト患者における腫瘍の処置のためのキットであって、該キットは、請求項 35 に記載の薬学的組成物の医薬投与形態、ならびに化学療法剤、抗 E G F R 抗体、放射免疫治療剤、およびこれらの組み合わせからなる群から選択されるさらなる抗癌剤を含む別の医薬投与形態を含む、キット。

【請求項 37】

前記化学療法剤が、チロシンキナーゼインヒビター、リン酸化カスケードインヒビター、翻訳後モジュレーター、細胞増殖インヒビターまたは細胞分化インヒビター（例えば、抗有糸分裂因子）、シグナル変換インヒビター、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 38】

前記チロシンキナーゼインヒビターが、A G 1 4 7 8、Z D 1 8 3 9、S T I 5 7 1、O S I - 7 7 4、S U - 6 6 6 8、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 37 に記載のキット。

【請求項 39】

前記抗 E G F R 抗体が、抗 E G F R 抗体 5 2 8、2 2 5、S C - 0 3、D R 8 . 3、L 8 A 4、Y 1 0、I C R 6 2、A B X - E G F、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項 36 に記載のキット。

【請求項 40】

請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の特異的抗体メンバーもしくは抗体をコードする D N A 配列またはその変性改変体、あるいはそのフラグメントを含む組換え D N A 分子で形質転換された単細胞宿主であって、該フラグメントは以下：

- (A) 図 13 の D N A 配列（配列番号 1）；
- (B) 図 15 の D N A 配列（配列番号 3）；
- (C) 図 13 の D N A 配列（配列番号 1）および図 15 の D N A 配列（配列番号 3）；
- (D) 配列番号 8 に記載されたとおりの定常 I g G 1 配列を有する図 13 の D N A 配列（配列番号 1）および配列番号 7 に記載されたとおりの定常 κ 配列を有する図 15 の D N A 配列（配列番号 3）；
- (E) 標準的なハイブリダイゼーション条件下で前出の D N A 配列のうちのいずれかにハイブリダイズする D N A 配列；および
- (F) 前出の D N A 配列のうちのいずれかによってコードされるアミノ酸配列の発現をコードする D N A 配列；

からなる群から選択され、ここで該 D N A 配列は、発現制御配列に作動可能に連結される、単細胞宿主。

【請求項 41】

前記単細胞宿主が、E . c o l i、P s e u d o m o n a s、B a c i l l u s、S t r e p t o m y c e s、酵母、C H O 細胞、Y B / 2 0 細胞、N S O 細胞、S P 2 / 0 細胞、R 1 . 1 細胞、B - W 細胞、L - M 細胞、C O S 1 細胞、C O S 7 細胞、B S C 1 細胞、B S C 4 0 細胞、および B M T 1 0 細胞、植物細胞、昆虫細胞、および組織培養物中のヒト細胞からなる群から選択される、請求項 40 に記載の単細胞宿主。

【請求項 42】

増幅された E G F R、d e 2 - 7 E G F R または高マンノースグリコシル化 E G F R の存在を検出するための方法であって、該 E G F R は、以下の工程：

A . 増幅された E G F R、d e 2 - 7 E G F R または高マンノースグリコシル化 E G F R がその中に存在すると思われる哺乳動物由来の生物学的サンプルと、該 E G F R に特異的に結合し得る抗体とを、該抗体への該 E G F R の結合が生じ得る条件下で接触させる工程；および

B . 該サンプル由来の該 E G F R と、該抗体との間で、結合が生じたか否かを検出する工程；

によって測定され、ここで、該結合の検出は、該サンプル中の該 E G F R の存在または可能性を示す、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

哺乳動物中の癌を検出するための方法であって、該方法は、請求項 4 2 に記載の方法に従って E G F R の存在または活性を検出する工程を包含し、ここで、該 E G F R の存在の検出は、該哺乳動物中の腫瘍または癌の存在を示す、方法。

【請求項 4 4】

哺乳動物において癌を予防および／または処置する方法であって、該方法は、治療的に有効な量の請求項 3 5 に記載の薬学的組成物または請求項 3 6 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載のキットを哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 4 5】

哺乳動物中で異常に発現される E G F R を産生する脳内在性癌の処置のための方法であって、該方法は、治療的に有効な量の請求項 3 5 に記載の薬学的組成物または請求項 3 6 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載のキットを哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。 10

【請求項 4 6】

前記脳内在性癌が、グリア芽細胞種、髄芽細胞腫、髄膜腫、腫瘍性星状細胞種および腫瘍性動静脈先天異常から選択される、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記薬学的組成物または前記キットが、全身的に投与される、請求項 4 5 および 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

哺乳動物中の悪性神経腫瘍の処置のための方法であって、該方法は、治療的に有効な量の請求項 3 5 に記載の薬学的組成物または請求項 3 6 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載のキットを哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。 20

【請求項 4 9】

配列番号 2 に記載されるとおりのポリペプチド配列を有する可変重鎖およびヒト I g G 1 定常領域を含む、抗体。

【請求項 5 0】

配列番号 4 に記載されるとおりのポリペプチド配列を有する可変軽鎖およびヒト κ 定常領域を含む、抗体。

【請求項 5 1】

配列番号 2 に記載されるとおりのポリペプチド配列を有する可変重鎖を含む、抗体。 30

【請求項 5 2】

配列番号 4 に記載されるようなポリペプチド配列を有する可変軽鎖を含む、抗体。

【請求項 5 3】

配列番号 2 の、残基 2 6 ～ 3 5 A、4 9 ～ 6 4 または 9 3 ～ 1 0 2 の任意の 1 つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、抗体。

【請求項 5 4】

配列番号 4 の、残基 2 4 ～ 3 4、5 0 ～ 5 6 または 8 9 ～ 9 7 の任意の 1 つ以上に実質的に記載されるとおりのアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む、抗体。

【請求項 5 5】

哺乳動物における癌の処置または予防のための、請求項 1 ～ 2 8 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体の使用。 40

【請求項 5 6】

哺乳動物における癌の処置または予防のための、請求項 3 5 に記載の薬学的組成物または請求項 3 6 ～ 3 9 のいずれか 1 項に記載のキットの使用。

【請求項 5 7】

哺乳動物における癌の処置または予防のための医薬の調製のための、請求項 1 ～ 2 8 および 4 9 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体の使用。

【請求項 5 8】

前記癌が、脳内に位置するかまたは脳に隣接して位置する、請求項 5 5 ～ 5 7 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 59】

哺乳動物における神経腫瘍の処置または予防のための医薬の調製のための、請求項 1～28 および 49～54 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体の使用。

【請求項 60】

前記放射性標識が、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{121}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{67}Cu 、 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{99}Tc または ^{186}Re のうちのいずれか 1 つである、請求項 25 に記載の特異的結合メンバーまたは抗体。

【請求項 61】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の特異的結合メンバーまたは抗体が結合する、単離された糖タンパク質、および癌ワクチンとして使用するための薬学的に受容可能なアジュバントの組成物。 10

【請求項 62】

哺乳動物において癌を検出するための方法であって、該方法は、請求項 25 または 26 のいずれかに記載の特異的結合メンバーまたは抗体を使用して、画像診断を行なう工程を包含する、方法。

【請求項 63】

前記処置のための手順が、放射免疫療法を包含する、請求項 55～59 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 64】

請求項 25、26 または 60 に記載の特異的結合メンバーまたは抗体が最初に投与され、その後、化学療法剤を含む組成物が投与される、請求項 55～59 のいずれか 1 項に記載の使用。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、増幅した上皮増殖因子レセプター (EGFR) およびその EGFR の d e 2 - 7 EGFR 短縮型に結合する、特異的結合メンバー、特に、抗体およびそれらのフラグメントに関する。特に、その特異的結合メンバー、特に抗体およびそれらのフラグメントによって認識されるエピトープが、異常な翻訳後改変によって増強されているかまたは顕性である。これらの特異的結合メンバーは、癌の診断および処置において有用である。本発明の結合メンバーまたは、治療において、化学療法剤もしくは抗癌剤ならびに／または他の抗体もしくはそれらのフラグメントと併用して使用され得る。 30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

化学療法的手段による増殖性疾患、特に癌の処置は、しばしば、ヒトまたは動物の身体の中の、標的増殖細胞と他の正常細胞との間の差異を探索することに依存する。例えば、多くの化学薬剤は、迅速に複製する DNA によって取り込まれ、その結果、DNA 複製および細胞分裂のプロセスが破壊されるように設計される。別のアプローチは、発達したヒト組織では正常に発現されない腫瘍細胞または、他の異常細胞の表面における抗原 (例えば、腫瘍抗原または胚性抗原) を同定することである。このような抗原は、この抗原をブロックまたは中和し得る抗体のような結合タンパク質を用いて標的化され得る。さらに、これらの結合タンパク質 (抗体およびそれらのフラグメントを含む) は、毒性因子または直接的もしくは間接的に毒性因子を腫瘍部位で活性化し得る他の物質を送達し得る。 40

【0003】

EGFR は、腫瘍標的化抗体療法について魅力的な標的である。なぜならば、EGFR は、多くの型の上皮腫瘍において過剰発現されているからである (27, 28)。さらに、EGFR の発現は、胃、結腸、膀胱、胸部、前立腺、子宮内膜、腎臓および脳を含む多く 50

の型の腫瘍（例えば、神経膠腫）の乏しい予後に関連する。結果的に、多くのEGFR抗体が、文献に報告されており、いくつかでは、臨床的評価を行っている（18, 19, 29）。頭頸部の癌、扁平上皮細胞肺癌、脳神経膠腫、および悪性星細胞腫を有する患者においてEGFR mAbを使用した研究からの結果は、助長的であった。殆どのEGFR抗体の抗腫瘍活性は、それらのリガンド結合をブロックする能力によって増強されている（30, 31）。このような抗体は、細胞増殖および抗体依存性免疫機能（例えば、補体活性化）の両方の調節を介してこれらの効力を媒介し得る。しかし、これらの抗体の使用は、EGFRの高い内因性レベルを有する器官（例えば、肝臓および皮膚）における取り込みに制限され得る（18, 19）。

【0004】

EGFR遺伝子の増幅（すなわち、EGFR遺伝子の複数のコピー）を含む、有意な割合の腫瘍はまた、de2-7 EGFR、ΔEGFR、またはΔ2-7（本明細書中で、交換可能に使用される用語）（2）として知られているそのレセプター（13）の短縮型バージョンを同時に発現する。そのde2-7 EGFRにおいて見出される再配置は、エキソン2～7に及ぶ801ヌクレオチドを欠失しているインフレイムの成熟mRNAを生じさせる（6～9）。対応するEGFRタンパク質は、細胞外ドメインの残基6～273を含む267アミノ酸の欠失と融合連結部の新規グリシン残基とを有する（9）。この欠失は、グリシン残基の挿入と一緒に、欠失の境界点において独特の連結ペプチドを生み出す（9）。このde2-7 EGFR（2）は、神経膠腫、胸部、肺、卵巣、および前立腺を含む多くの型の腫瘍において報告されている（1-4）。この短縮型のレセプターはリガンドに結合しないが、このレセプターは、低い構成的活性を保持しており、そして、ヌードマウスにおいて腫瘍異種移植片として増殖した神経膠腫細胞に対して顕著な増殖jyを与え、そして、NIH3T3細胞（11）およびMCF-7細胞を形質転換し得る。神経膠腫細胞においてde2-7 EGFRにより使用されるこれらの細胞機構は、完全には定義されていないが、アポトーシスの減少（12）および増殖の僅かな増強（12）を含むことが報告されている。

【0005】

この短縮されたレポーターの発現が腫瘍細胞に限定されているので、この短縮されたレポーターは、抗体療法のための高度に固有の標的を示している。したがって、多くの研究機関は、de2-7 EGFRの特異的なペプチドに対して特異的な、ポリクローナル抗体（14）およびモノクローナル抗体（3, 15, 16）の両方の産生を報告している。一連のマウスmAb（これらは、独特のde2-7ペプチドで免疫した後に単離される）は、全て、短縮型レセプターに対して、選択性および特異性を示し、そして、ヌードマウスで増殖したde2-7 EGFR陽性異種移植片を標的化した（3, 25, 32）。

【0006】

しかし、de2-7 EGFR抗体の1つの潜在的欠点は、EGFR遺伝子の増幅を提示する腫瘍の僅かに一部分のみがde2-7 EGFR（5）をもまた発現する（5）ということである。このde2-7 EGFRを含む腫瘍の正確な割合は、完全には、確定されていない。なぜなら、様々な技術（すなわち、PCR 対 免疫組織化学的方法）および種々の抗体の使用によって、その存在の頻度について報告される値に広い範囲が生じているからである。公開されたデータは、約25～30%の神経膠腫が、de2-7 EGFRを発現し、その発現は、未分化の星状細胞腫において最も低く、そして、神経膠芽腫の多形態（multiforme）において最も高いことを示している（6, 13, 17）。de2-7 EGFRを発現している神経膠腫における陽性細胞の割合は、37～86%の範囲に及ぶと報告されている（1）。27%の胸部癌腫および17%の肺癌は、de2-7 EGFRについて陽性であることが見出された（1, 3, 13, 16）。したがって、de2-7 EGFR特異的抗体は、EGFR陽性腫瘍の一部のみにおいて有用であることが期待される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

【0007】

したがって、E G F R抗体の活性に関する既存の証拠に助長されているものの、上記を反映した適用性および効力の範囲に関して観察される限界は依然として残る。したがって、広範な腫瘍への効力を実証する抗体および類似の因子を開発することが所望され、そして、これは本発明が指向する目的の達成に向かうものである。

【0008】

本明細書中の参考文献の引用は、これらの参考文献が本発明の先行技術であるという承認として解釈されるべきではない。

【課題を解決するための手段】

【0009】

10

(発明の要旨)

広範な局面において、本発明は、野生型E G F Rから全くアミノ酸配列の変更も置換も示さず、そして、腫瘍形成性細胞、過増殖性細胞または異常細胞であることが見出され、そして、正常細胞においても野生型細胞（本明細書中で使用される「野生型細胞」との用語は、内因性E G F Rを発現するがd e 2-7 E G F Rは発現しない細胞を企図し、そしてこの用語は、このE G F R遺伝子を過剰発現する細胞を具体的に排除し；用語「野生型」とは、異常細胞または腫瘍形成性細胞ではなく正常細胞において存在する、遺伝子型もしくは表現型またはその他の特性をいう）においても検出可能ではないE G F Rエピトープを認識する、単離された特異的な結合メンバー、特に、抗体またはそれらのフラグメントを提供する。さらなる局面において、本発明は、腫瘍形成性細胞、過増殖性細胞、または異常細胞において見出されるが、正常細胞においても野生型細胞においても検出されないE G F Rエピトープを認識する、特異的な結合メンバー、特に、抗体またはそれらのフラグメントを提供し、ここで、このエピトープは、異常な翻訳後改変または異常発現に際して増強されるかまたは顕性となる。本明細書中で提供される特定の非限定的な例示において、このE G F Rエピトープは増強されるかまたは顕性となるが、ここで、翻訳後改変が野生型細胞におけるE G F Rの正常発現にみられる程度まで完全ではなく十分でもない。1つの局面において、E G F Rエピトープは、最初のもしくは単純な炭水化物改変または初期のグリコシル化、特に、高次のマンノース改変に際して増強されるかまたは顕性となり、そして、複雑な炭水化物改変の存在下では減少されるかまたは顕性とならない。

20

【0010】

30

この特異的な結合メンバーは、抗体またはそれらのフラグメント（例えば、その免疫原性フラグメント）であり得、このメンバーは、異常発現の非存在下でありかつ正常なE G F R翻訳後改変の存在下では正常なE G F Rエピトープまたは野生型E G F Rエピトープを含む正常細胞または野生型細胞に結合しないかまたはそれらを認識しない。より具体的には、本発明の特異的な結合メンバーは、抗体またはそれらのフラグメントであり得、特に、異常な翻訳後改変が存在下ではE G F Rを過剰発現する（例えば、E G F Rが増幅されている）かまたはd e 2-7 E G F Rを発現している細胞において存在し、そして、特に、正常な翻訳後改変が存在している場合には、通常の条件下でE G F Rを発現する細胞において検出可能ではないE G F Rエピトープを認識する。

【0011】

40

本発明者らは、異常発現されるE G F Rを特異的に認識する、新規のモノクローナル抗体（本明細書中において、m A b 806として示される抗体によって例示される）を発見した。特に、本発明の抗体は、腫瘍形成性細胞、過増殖性細胞、または異常細胞において見いだされ、かつ正常細胞においても野生型細胞においても検出されないE G F Rエピトープを認識し、ここで、そのエピトープは、異常な翻訳後改変に際して増強されるかまたは顕性となる。本発明の抗体はさらに、本明細書中に記載される、抗体m A b 124および抗体m A b 1133によって例示される。本発明の新規の抗体はまた、増幅された野生型E G F Rおよびd e 2-7 E G F Rを認識し、なおそのd e 2-7 E G F R変異の独特の接合部（j u n c t i o n a l）ペプチドとは異なるエピトープに結合する。本発明の抗体は、特に異常翻訳後改変に際して異常発現されるE G F Rを特異的に認識し、その

50

異常発現される E G F R は増幅された E G F R および変異 E G F R (本明細書中で、d e 2-7 変異によって例示される)を含む。さらに、m A b 8 0 6 は、正常量の E G F R を発現している神経膠腫細胞株の細胞表面において発現されている場合に、E G F R を認識しないが、m A b 8 0 6 は、E L I S A プレートの表面に固定された E G F R の細胞外ドメイン (s E G F R) に結合し、このことは、高次構造の (c o n f o r m a t i o n a l) エピトープの認識を示している。m A b 8 0 6 は、A 4 3 1 細胞の表面に結合し、その細胞は、増幅された E G F R 遺伝子を有しているが、d e 2-7 E G F R を発現しない。重要なことは、m A b 8 0 6 は、殆どの他の組織よりも高いレベルの内因性の野生型 (w t) E G F R を発現するが、E G F R を異常発現も増幅もしていない、肺および皮膚のような正常組織に有意に結合しない。

10

【0012】

本発明の抗体は、染色によってかまたは異常な E G F R 発現 (E G F R 増幅および／または E G F R 変異を含み、特に d e 2-7 E G F R である) が存在する腫瘍または細胞を認識する他の手段によって、E G F R 腫瘍または腫瘍形成性細胞の性質を特異的に分類し得る。さらに、本発明の抗体は、m A b 8 0 6 によって例示され、増幅された E G F R を含む腫瘍および d e 2-7 E G F R 陽性異種移植片に対する顕著なインビボ抗腫瘍活性を実証する。

【0013】

m A b 8 0 6 が d e 2-7 E G F R および増幅された E G F R に結合するが正常な野生型 E G F R には結合しないという m A b 8 0 6 の独特の特異性によって、これまで知られていた E G F R 抗体において見られ得た正常組織の取り込みに関連する問題なしに、多くの腫瘍型、例えば、頭頸部の腫瘍、胸部腫瘍または前立腺腫瘍および神経膠腫を同定し、特徴づけ、そして標的化するための診断的および治療的な使用が提供される。

20

【0014】

従って、本発明は、接合部ペプチドとは異なるエピトープにおける d e 2-7 E G F R に結合するが、その E G F R 遺伝子の増幅の非存在下にて正常細胞中の E G F R には結合しない特異的結合タンパク質 (例えば、抗体) を提供する。増幅とは、その細胞が複数の E G F R 遺伝子のコピーを含まないことを包含することを意味する。

【0015】

好ましくは、m A b 8 0 6 によって認識されるエピトープは、成熟正常 E G F R 配列または成熟野生型 E G F R 配列の残基 2 7 3 ~ 5 0 1 を含む領域の中に位置づけられる。したがって、E G F R 配列の残基 2 7 3 ~ 5 0 1 を含む領域に位置づけられるエピトープにおいて d e 2-7 E G F R に結合する、特異的結合タンパク質 (例えば、抗体) がまた、提供される。このエピトープは、当業者に公知である任意の従来のエピトープマッピング技術によって決定され得る。あるいは、残基 2 7 3 ~ 5 0 1 をコードする D N A 配列は消化され得、そしてその得られたフラグメントは適切な宿主において発現され得る。抗体結合は、上述のように決定され得る。

30

【0016】

好ましい局面において、その抗体は、本発明者が同定しそして特徴付けた抗体 (特に、増幅された E G F R および d e 2-7 E G F R において見出される、異常発現 E G F R を認識する抗体) の特徴を有する抗体である。特に好ましい局面において、この抗体は、m A b 8 0 6 またはその活性フラグメントである。さらに好ましい局面において、本発明の抗体は、図 1 4 (配列番号 2) および図 5 (配列番号 4) においてそれぞれ示されるような、V H アミノ酸配列および V L アミノ酸配列を含む。

40

【0017】

別の局面において、本発明は、8 0 6 抗体の V H 配列および V L 配列を有する少なくとも 1 0 % の抗体が、E L I S A アッセイにおいてこのような抗体に競合することによって、d e 2-7 E G F R に対する結合からブロックされる条件下で、8 0 6 抗体と競合し得る抗体を提供する。特に、抗イディオタイプ抗体が、本明細書中で企図され、そして、例示される。抗イディオタイプ抗体である、L M H-1 1、L M H-1 2、および L M H-

50

1 3 が本明細書中で提供される。

【0018】

成熟した正常な野生型 E G F R の残基 2 7 3 ～ 5 0 1 (成熟 d e 2 - 7 E G F R の残基 6 ～ 2 3 4) を含むエピトープから本質的になる単離されたポリペプチドは、本発明の別の局面を形成する。本発明のペプチドは、診断アッセイまたは診断キットにおいて、治療的または予防的に (腫瘍ワクチンまたは抗癌ワクチンを含む) において特に有用である。従って、本発明のペプチドの組成物としては、薬学的組成物および免疫学的組成物が挙げられる。

【0019】

抗体の標的抗原への結合は、その重鎖および軽鎖の相補性決定領域 (C D R) を通して媒介され、C D R 3 の役割は特に重要である。従って、その重鎖または軽鎖の C D R 3 領域、および好ましくは、m A b 8 0 6 の軽鎖および重鎖の両方の C D R 3 領域に基づく特異的結合メンバーは、インビボ治療法のために有用な特異的結合メンバーである。m A b 8 0 6 抗体の C D R は、図 1 6 および図 1 7 において示されている。 10

【0020】

従って、特異的結合タンパク質 (例えば、同定された m A b 8 0 6 抗体の C D R、特に、C D R 3 領域に基づく抗体) は、それらの d e 2 - 7 E G F R の状態にかかわらず、増幅した E G F R を有する腫瘍を標的化するのに有用である。m A b 8 0 6 は、正常な野生型レセプターには有意には結合しないので、現在開発されている E G F R 抗体の制限である。正常組織における有意な取り込みは存在しない (1 8, 1 9)。 20

【0021】

添付の図面において、8 0 6 V H 遺伝子の核酸配列 (配列番号 1) およびその翻訳物 (配列番号 2) は図 1 4 において示される。この 8 0 6 抗体の V L 遺伝子は図 1 5 にて核酸配列 (配列番号 3) および推定アミノ酸配列 (配列番号 4) として示される。図 1 6 および図 1 7 において、m A b 8 0 6 の V H ポリペプチド配列および V L ポリペプチド配列が示され、その C D R を枠で囲む。

【0022】

さらなる局面において、本発明は、抗原に結合し得る単離された特異的結合メンバーを提供し、ここで、この特異的結合メンバーは、配列番号 2 の残基 9 3 ～ 1 0 2 として実質的に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む。本発明は、配列番号 2 の残基 2 6 ～ 3 5 A および 4 9 ～ 6 4 として実質的に示されるポリペプチド結合ドメインの 1 つまたは両方 (好ましくは、両方) をさらに含む上記の単離された特異的結合メンバーをさらに提供する。このような実施形態の 1 つの例は、配列番号 2 において実質的に示される配列である。好ましい実施形態において結合ドメインはヒト抗体フレームワークによって保持される。 30

【0023】

別の局面において、本発明は、腫瘍抗原に結合し得る単離された特異的結合メンバーを提供し、ここで、上記特異的結合メンバーは、そのアミノ酸配列番号 4 の中に実質的に見出される C D R を含む軽鎖と一緒に、すくなくとも配列番号 2 の C D R 3 配列を含む重鎖配列を含むポリペプチド結合ドメインを含む。このような実施形態の 1 つの例は、配列番号 4 において実質的に見出される配列である。好ましい実施形態において、その C D R は、ヒト抗体フレームによって保持されている。 40

【0024】

さらなる局面において、本発明は、上記で定義されたような、特異的結合メンバーをコードする配列を含む単離された核酸、ならびに本発明の特異的結合メンバーを調製する方法を提供し、この方法は、このような結合メンバーの発現を生じる条件下で、上記核酸を発現する工程、およびこの結合メンバーを回収する工程を包含する。

【0025】

本発明のなおさらなる局面は、さらなる結合タンパク質を有するこのような結合タンパク質 (例えば、E G F R に結合する結合タンパク質であって、好ましくは、E G F R へのリ 50

ガンドの結合を阻害するタンパク質)の組成物である。このような組成物は、「ワンポット」カクテル、キットなどであり得、好ましくは投与の容易性のために処方され得る。

【0026】

本発明に従う特異的結合メンバーは、ヒトまたは動物の身体の処置または診断の方法(例えば、ヒトの患者における腫瘍を処置する方法であって、この患者に有効量の本発明の特異的結合メンバーを投与する工程を包含する方法)において有用であり得る。

【0027】

本発明はまた、本発明の抗体をコードする、組換えDNA分子もしくはクローン化された遺伝子またはそれらの縮重改変体に関し;好ましくは、本発明は、図14(配列番号1)に示されるDNAは配列を有するか、またはその配列に相補的である抗体VHをコードする核酸分子、特に、組換えDNA分子またはクローン化された遺伝子に関する。別の実施形態において、本発明はまた、組換えDNA分子もしくはクローン化された遺伝子またはそれらの縮重改変体に関し、好ましくは、図15(配列番号3)において示されるヌクレオチド配列を有しているかまたはそのDNA配列に相補的である抗体VLをコードする、核酸分子、特に、組換えDNA分子またはクローン化された遺伝子に関する。

【0028】

本発明はまた、本明細書で示される活性を有し、そして、上で示され、本明細書の図14および図15において示され、そして配列番号2および4から選択される、アミノ酸配列を提示する、ポリペプチドまたは抗体を含む。

【0029】

本発明のさらなる実施形態において、本明細書に提供された組換えDNA分子またはクローン化された遺伝子の全長DNA配列は、適切な宿主に導入され得る発現制御配列に作動可能に連結されて得る。従って、本発明は、本発明の抗体のVHおよび/またはVLあるいはそれらの部分、そしてより具体的には、上記で示され、配列番号1および配列番号3において示される、VHおよび/またはVLをコードするDNA配列を含む、そのクローン化した遺伝子または組換えDNA分子で形質転換される単細胞宿主に及ぶ。

【0030】

本発明は、本明細書において例示されるように、公知の組換え技術を含む、抗体およびその活性フラグメントの調製のためのいくつかの手段を必然的に企図し、従って、本発明は、その範囲において、このような合成抗体またはキメラ抗体の調製物に及ぶことが意図される。本明細書において開示される、cDNA配列およびアミノ酸配列の単離によって、このような組換え技術による本発明の抗体の再現が容易に行われ、従って、本発明は、組換えDNA技術による宿主系における発現のための、その開示されたDNA配列から調製される発現ベクターに及び、そしてそれにより得られる形質転換された宿主に及ぶ。

【0031】

本発明は、抗体に結合し得、それによってこの抗体の活性の調節、阻害、増強を行い得る、薬物または他の実体(抗イディオタイプ抗体のような抗体を含む)を提供する。従って、mAb806に対する抗イディオタイプ抗体が本明細書中で提供され、そして、例示される。このような抗イディオタイプ抗体は、抗体に特異的に結合する薬物(mAb806またはそのエピトープ)、またはその活性を高める薬物の開発において有用である。

【0032】

本発明の診断的用途は、腫瘍もしくは細胞サンプルを特徴付けるため、または腫瘍もしくは癌についてスクリーニングをするためのアッセイ(インビトロおよびインビボの診断アッセイを含む)における本発明の抗体の使用にまで及ぶ。

【0033】

免疫アッセイにおいて、制御された量の抗体などが調製され得、酵素、特異的結合パートナーおよび/または放射性元素で標識され得、次いで、細胞サンプルに導入され得る。標識された物質またはその結合パートナーが、サンプル内の部位と反応する機会を有した後で、生じた質量を公知技術によって試験しえ得る。この公知技術は、結合した標識の性質に応じて変動し得る。

10

20

30

40

50

【0034】

本発明の特異的結合メンバーは、検出可能な標識または機能的な標識を有し得る。特定の結合メンバーは、放射性標識（例えば、同位体³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In、²¹¹At、¹⁹⁸Au、⁶⁷Cu、²²⁵Ac、²¹³Bi、⁹⁹Tc、および¹⁸⁶Re）を有し得る。放射性標識が使用される場合、公知の現在利用可能な計数手順が、特定の結合メンバーを同定および定量するために使用され得る。例えば、標識が酵素である場合、検出は、当該分野で公知の任意の現在使用されている比色技術、分光測定技術、蛍光測定技術、電流測定技術、または気体測定技術により達成され得る。

10

【0035】

放射性標識された特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、インビトロでの診断技術およびインビボでの放射性画像化技術において有用である。本発明のさらなる局面において、放射性標識された特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント（特に、放射性免疫結合体））は、放射性免疫治療において（特に、癌治療のための放射性標識された抗体として）有用である。なおさらなる局面において、放射性標識された特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、放射性免疫誘導性外科手順において有用である。この手順において、それらは、癌細胞、前癌細胞、腫瘍細胞、および過剰増殖細胞の存在および／または位置を、このような細胞を除去する外科手術の前、最中、または後に同定および示し得る。

20

【0036】

本発明の免疫結合体または抗体融合タンパク質（ここで、本発明の特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、他の分子または因子に結合体化または付着されている）としてはさらに、化学的除去剤、毒素、免疫モジュレーター、サイトカイン、細胞毒性剤、化学療法剤、または薬物に結合体化された結合メンバーが挙げられるがこれらに限定されない。

【0037】

本発明は、例えば、増幅されたEGFRまたはde2-7EGFRの存在の程度の定量的分析のための試験キットの形態で調製され得るアッセイ系を包含する。この系または試験キットは、本明細書中に記載される放射性技術および／または酵素技術のうちの1つ（抗体への標識の連結）により調製される標識成分、ならびに1つ以上のさらなる免疫化学薬剤を含み得、これらのうちの少なくとも1つは、決定される遊離もしくは固定化された成分またはそれらの結合パートナーである。

30

【0038】

さらなる実施形態において、本発明は、結合メンバー、抗体、もしくはその活性フラグメントの活性、または同じ活性を有することが決定された薬剤または他の薬物に基づく特定の治療方法に関する。第1の治療方法は、癌（頭頸部癌、乳癌、前立腺癌、および神経腫瘍が挙げられるがこれらに限定されない）の予防または処置に関する。

【0039】

特に、本発明の結合メンバーおよび抗体、ならびに特定の実施形態においては、806抗体（その配列は、本明細書中で、配列番号2および4において示される）またはその活性フラグメント、およびそれらに由来するキメラ（二機能性）抗体または合成抗体が、薬学的組成物（治療が適切である（例えば、癌を処置するために）場合の投与のための、適切なビヒクル、キャリア、または希釈剤を含む）中で調製され得る。このような薬学的組成物はまた、ペグ化のような当該分野で公知の方法により、結合メンバー、抗体、またはフラグメントの半減期を調節する方法を含み得る。このような薬学的組成物はさらに、さらなる抗体または治療剤を含み得る。

40

【0040】

従って、本発明の組成物は、処置される状態に依存して、単独または他の処置、治療、または薬剤と、同時にかまたは連続的に組み合わせて、投与され得る。さらに、本発明は、

50

本明細書中に記載される結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）、および他の薬剤または治療（例えば、抗癌剤もしくは抗癌治療、抗EGFR剤もしくは抗体、または免疫モジュレーター）を含む組成物を企図し、それを包含する。より一般的に、これらの抗癌剤は、チロシンキナーゼインヒビターもしくはリン酸化カスケードインヒビター、翻訳後モジュレーター、細胞増殖インヒビターもしくは細胞分裂インヒビター（例えば、抗有糸分裂剤）、PDGFRインヒビター、またはシグナル伝達インヒビターであり得る。他の処置または治療としては、適切な用量の鎮痛薬（例えば、非ステロイド性抗炎症剤（例えば、アスピリン、パラセタモール、イブプロフェン、またはケトプロフェン）、あるいは鎮痛剤（例えば、モルヒネまたは抗催吐剤））の投与を包含し得る。従って、これらの薬剤は、抗EGFR特異的薬剤（例えば、AG1478）であり得るか、またはより一般的な抗癌剤および抗新生物剤であり得、非限定的な例として、ドキソルビシン、カルボプラチン、およびシスプラチンが挙げられる（がこれらに限定されない）。さらに、この組成物は、免疫モジュレーター（例えば、インターロイキン、腫瘍壊死因子（TNF）、もしくは他の増殖因子、サイトカイン、またはホルモン（例えば、デキサメタゾン））と共に投与され得、これらは、癌細胞または腫瘍の免疫応答、および減少または排除を刺激する。この組成物はまた、他の抗EGFR抗体（抗EGFR抗体528；225；SC-03；108（ATCC HB9764）米国特許第6,217,866号；14E1（米国特許第5,942,602号）；DH8.3；L8A4；Y10；HuMAX-EGFr（Genmab/Medarex）；ICR62；およびABX-EGF（Abgenix））と共に投与され得るか、またはこれらとの組み合わせを含み得る。

10

20

【0041】

本発明はまた、他の分子または薬剤に共有結合されているかそうでなければこれらに不随する結合メンバー（抗体およびそのフラグメントを含む）を含み得る。これらの他の分子または薬剤としては、別個の認識特性を有する分子（抗体または抗体フラグメントを含む）、毒素、リガンド、および化学治療剤が挙げられるがこれらに限定されない。

【0042】

（詳細な説明）

本発明に従って、当業者の範囲内にある従来の分子生物学、微生物学および組換えDNA技術が使用され得る。このような技術は、文献中に十分に記載されている。例えば、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」（1989）；「Current Protocols in Molecular Biology」Volumes I-III [Ausubel, R. M. 編（1994）]；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」Volumes I-III [J. E. Celis 編（1994）]；「Current Protocols in Immunology」Volumes I-III [Coligan, J. E. 編（1994）]；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait 編1984)；「Nucleic Acid Hybridization」[B. D. HamesおよびS. J. Higgins 編（1985）]；「Transcription And Translation」[B. D. HamesおよびS. J. Higgins 編（1984）]；「Animal Cell Culture」[R. I. Freshney 編（1986）]；「Immobilized Cells And Enzymes」[IRL Press、（1986）]；B. Perbal、「A Practical Guide To Molecular Cloning」（1984）を参照のこと。

30

40

【0043】

従って、本明細書中に現れる場合、以下の用語は、以下に示される意味を有するべきである。

【0044】

（A. 専門用語）

用語「特異的結合メンバー」は、互いに結合特異性を有する分子対のメンバーを記述する

50

。特異的結合対のメンバーは、天然由来であり得るか、または完全もしくは部分的に合成的に生成され得る。分子対の一方のメンバーは、分子対の他方のメンバーの特定の空間的構成および極性構成に特異的に結合し、従って、これらに相補的な、表面上のある領域または空洞を有する。従って、対のメンバーは、互いに対して特異的に結合する特性を有する。特異的結合対の型の例は、抗原－抗体、ビオチン－アビジン、ホルモン－ホルモンレセプター、レセプター－リガンド、酵素－基質である。この適用は、抗原－抗体型の反応に関する。

【0045】

用語「異常発現」は、その種々の文法的形態で、組織中のタンパク質の上昇した発現または変更された発現または過剰発現のいずれか（例えば、増強された発現もしくは翻訳、タンパク質のプロモーターもしくはレギュレーターの調節、タンパク質についての遺伝子の増幅、または半減期もしくは安定性の増強を含む、任意の手段によって引き起こされるタンパク質量の増加。その結果、過剰発現されていない状態とは対照的に、より多くのタンパク質が存在するか、または任意の1つの時点において検出され得る）を、意味しかつ含み得る。異常な発現は、任意のシナリオまたは変更を含みかつ意図し、ここで、細胞中のタンパク質発現機構または翻訳後修飾機構は、タンパク質（ここでは、変更されたタンパク質は、例えば、変異したタンパク質、あるいは配列の変更、欠失もしくは挿入または変化した折り畳みに起因した改変体が発現される場合を含む）の増強された発現または量もしくはレベルの増加に起因して、負荷をかけられるかさもなければ破壊される。

【0046】

用語「異常発現」は、その異常な量またはレベルの有効な原因にかかわらず、タンパク質の異常な（通常増加した）量／レベルが存在する状態を包含するように、本明細書中で特に選択されていることを理解することが重要である。従って、タンパク質の異常な量は、遺伝子増幅（この場合、例えば、癌を有する被験体の頭部および頸部から採取した多くの細胞／組織サンプルにおいてであるが、他のサンプルは、遺伝子増幅に寄与し得る異常なタンパク質レベルを示す）の非存在下での、タンパク質の過剰発現から生じ得る。

【0047】

後者に関して、本発明を説明するために本明細書中に示される本発明者らの研究のいくつかは、E G F Rの増幅から生じる異常なタンパク質レベルを示す特定のサンプルの分析を含む。従って、このことは、増幅に対して言及がなされる実験的知見の本明細書中での表示、およびE G F Rの異常なレベルを記述する際の用語「増幅／増幅された」などの使用を説明する。しかし、これは、本発明の結合メンバーの助けを借りることによる臨床的調査が意図される環境または状況を規定する、タンパク質の異常な量またはレベルの観察であり、そしてこの理由のために、本明細書は、用語「異常発現」が、E G F Rレベルの対応する異常を生じる原因環境をより広く捉えるとみなす。

【0048】

従って、用語「過剰発現」および「増幅」は、その種々の文法的形態において、別個の技術的意味を有することが理解されるが、これらは、本発明の文脈において、異常なE F G Fタンパク質レベルが存在する状態を示す限り、互いに等価であるとみなされるべきである。結果として、用語「異常発現」は、本明細書中の目的のために、その範囲内に用語「過剰発現」および「増幅」を包含すると考えられるように選択されており、その結果、全ての用語が本明細書中で使用される場合に互いに等価とみなされ得る。

【0049】

用語「抗体」は、天然または部分的もしくは全体的に合成により生成された免疫グロブリンを記述する。この用語はまた、結合ドメイン（これは、抗体結合ドメインであるか、または抗体結合ドメインに相同である）を有する任意のポリペプチドまたはタンパク質をカバーする。C D R移植された抗体もまた、この用語によって意図される。

【0050】

抗体は、多数の方法で改変され得るので、用語「抗体」は、必要な特異性を有する結合ドメインを有する任意の特定の結合メンバーまたは物質をカバーするように解釈されるべき

10

20

30

40

50

である。従って、この用語は、抗体フラグメント、抗体の誘導体、機能的等価物およびホモログ（天然または全体的もしくは部分的に合成であるかにかかわらず、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む）をカバーする。従って、別のポリペプチドに融合した免疫グロブリン結合ドメインまたは等価物を含むキメラ分子が含まれる。キメラ抗体のクローニングおよび発現は、EP-A-0120694およびEP-A-0125023ならびに米国特許第4,816,397号および同第4,816,567号に記載される。

【0051】

抗体全体のフラグメントが、抗原に結合する機能を遂行し得ることが示されている。結合フラグメントの例は、以下である：(i) VLドメイン、VHドメイン、CLドメインおよびCH1ドメインからなるFabフラグメント；(ii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iii) 単鎖抗体のVLドメインおよびVHドメインからなるFvフラグメント；(iv) VHドメインからなるdAbフラグメント（Ward, E. S. ら、Nature 341, 544-546 (1989)）；(v) 単離されたCDR領域；(vi) 2つの連結されたFabフラグメントを含む二価フラグメントである、F(ab)'₂フラグメント；(vii) 単鎖Fv分子（scFv）、ここで、VHドメインおよびVLドメインは、2つのドメインを結合させて抗原結合部位を形成するペプチドリンカーによって連結される（Birdら、Science, 242, 423-426, 1988；Hustonら、PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988）；(viii) 多価抗体フラグメント（scFvのダイマー、トリマーおよび／またはテトラマー（PowerおよびHudson, J Immunol. Methods 242:193-204 9 (2000)））；(ix) 二重特異的単鎖Fvダイマー（PCT/US92/09965）；および(x) 遺伝子融合によって構築された多価または多重特異的フラグメントである「二価抗体（diabody）」（W094/13804；P. Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)）。

【0052】

「抗体結合部位」は、抗原に特異的に結合する、軽鎖または重鎖および軽鎖の可変領域および超可変領域から構成される抗体分子の構造的部分である。

【0053】

句「抗体分子」は、その種々の文法的形態において、本明細書中で使用する場合、インタクトな免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の両方を意図する。

【0054】

例示的な抗体分子は、インタクトな免疫グロブリン分子、実質的にインタクトな免疫グロブリン分子、およびパラトープ（paratope）を含む免疫グロブリン分子の部分（Fab、Fab'、F(ab)'₂およびF(v)として当該分野で公知の部分を含み、これらの部分は、本明細書中に記載される治療方法における使用のために好ましい）である。

【0055】

抗体はまた、二重特異的であり得、ここで、抗体の1つの結合ドメインは、本発明の特異的結合メンバーであり、そして他方の結合ドメインは、例えば、エフェクター機能などを補充するための異なる特異性を有する。本発明の二重特異的抗体としては、抗体の1つの結合ドメインが本発明の特異的結合メンバー（そのフラグメントを含む）であり、そして他方の結合ドメインが別個の抗体またはそのフラグメント（別個の抗EGFR抗体（例えば、抗体528（米国特許第4,943,533号）、キメラ225抗体およびヒト化225抗体（米国特許第4,943,533号およびWO/9640210）、抗de2-7抗体（例えば、DH8.3（Hills, D. ら、(1995) Int. J. Cancer 63 (4):537-543））、抗体L8A4および抗体Y10（Reist, CJら、(1995) Cancer Res. 55 (19):4375-4382；Fo 40 50

ulon CFら、(2000) Cancer Res. 60 (16) : 4453-4460)、ICR62 (Modjtahedi Hら、(1993) Cell Biophys. Jan-Jun; 22 (1-3) : 129-46; Modjtahediら、(2002) P. A. A. C. R. 55 (14) : 3140-3148)、またはWikstrandらの抗体 (Wikstrand C. ら (1995) Cancer Res. 55 (14) : 3140-3148) のフラグメントを含む) であるものが挙げられる。他の結合ドメインは、特定の細胞型を認識または標的化する抗体 (例えば、神経特異的抗体またはグリア細胞特異的抗体) であり得る。本発明の二重特異的抗体において、本発明の抗体の1つの結合ドメインは、特定の細胞レセプターを認識し、そして/または特定の様式で細胞を調節する他の結合ドメインまたは分子 (例えば、免疫調節因子 (例えば、インターロイキン)、増殖調節因子またはサイトカイン (例えば、腫瘍壊死因子 (TNF) および特に2002年2月13日出願のU. S. S. N. 60/355, 838号 (これは、本明細書中でその全体が参考として援用される) において実証されたTNF二重特異的様式) または毒素 (例えば、リシン) あるいは抗有糸分裂剤もしくは抗有糸分裂因子、またはアポトーシス剤もしくはアポトーシス因子) と組み合わせられ得る。

10

20

30

40

50

【0056】

抗体分子のFab部分およびF(ab')₂部分は、周知の方法によって、実質的にインタクトな抗体分子に対するパパインおよびペプシンのタンパク質分解反応によってそれぞれ調製され得る。例えば、Theofilopoulosらに対する米国特許第4, 342, 566号を参照のこと。Fab'抗体分子部分もまた周知であり、そしてこれは、F(ab')₂部分から作成され、次いで例えばメルカプトエタノールによって2つの重鎖部分を連結するジスルフィド結合が還元され、次いで、ヨードアセトアミドのような試薬によって得られたタンパク質メルカプタンがアルキル化される。インタクトな抗体分子を含む抗体が、本明細書中で好ましい。

【0057】

句「モノクローナル抗体」は、その種々の文法的形態において、特定の抗原と免疫反応し得る、抗体結合 (combining) 部位の1つの種のみを有する抗体をいう。従って、モノクローナル抗体は、代表的に、それが免疫反応する任意の抗原に対して、単一の結合親和性を示す。モノクローナル抗体はまた、複数の抗体結合部位 (各々が、異なる抗原について免疫特異的である) を有する抗体分子 (例えば、二重特異的 (キメラ) モノクローナル抗体) を含み得る。

【0058】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部または全てに特異的に結合し、かつこれらに相補的な領域を含む抗体の一部を記述する。抗原が大きい場合、抗体は、抗原の特定の一部のみ (この部分は、エピトープと称される) に結合し得る。抗原結合ドメインは、1以上の抗体可変ドメインを含む。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域 (VL) および抗体重鎖可変領域 (VH) を含む。

【0059】

「翻訳後修飾」は、共有結合的修飾を含む修飾のいずれか1つまたは組み合わせを包含し得、タンパク質は、翻訳完了後、およぼリボソームから放出された後か、または同時翻訳的に初期ポリペプチド上で、この修飾を受ける。翻訳後修飾としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：リン酸化、ミリスチル化、ユビキチン化、グリコシル化、補酵素結合、メチル化およびアセチル化。翻訳後修飾は、タンパク質の活性、その細胞内もしくは細胞外の目的地点、その安定性もしくは半減期、および/またはリガンド、レセプターもしくは他のタンパク質による認識を調節し得るかまたは影響を与え得る。翻訳後修飾は、細胞オルガネラにおいて、核または細胞質において、あるいは細胞外で生じ得る。

【0060】

用語「特異的」は、特異的結合対の1つのメンバーが、その特異的結合パートナー以外の分子に対する有意な結合を示さない状況をいうために使用され得る。この用語はまた、例えば、抗原結合ドメインが、多数の抗原によって保有される特定のエピトープに対して特

異的である場合に適用可能であり、この場合、抗原結合ドメインを保有する特異的結合メンバーは、エピトープを保有する種々の抗原に結合し得る。

【0061】

用語「含む (c o m p r i s e)」は、一般に、含む (i n c l u d e) 意味で使用され、すなわち、1 以上の特徴または成分の存在を許容することをいう。

【0062】

用語「から実質的になる」は、より大きい産物に共有結合していない、規定された残基数の産物（特にペプチド配列）をいう。しかし、本発明のペプチドが上記のことをいう場合、当業者は、ペプチドの N 末端または C 末端への軽微な改変（例えば、保護基などを付加するための末端の化学的改変（例えば、C 末端のアミド化））が意図され得ることを理解する。 10

【0063】

用語「単離された」とは、本発明の特異的結合メンバーまたはこのような結合メンバーをコードする核酸が本発明に従って存在する状態をいう。メンバーおよび核酸は、これらが天然に会合する物質（例えば、他のポリペプチドまたは核酸）、これらがその天然の環境において見出される物質、またはこのような調製物がインビトロまたはインビボで実施される組換え DNA 技術による場合には、これらが調製される環境（例えば、細胞培養物）において見出される物質を含まないかまたは実質的に含まない。メンバーおよび核酸は、希釈剤またはアジュバントを用いて処方され得、そしてなお特定の目的のために単離され得る。例えば、これらメンバーは、通常、免疫アッセイにおける使用のためにマイクロタイタープレートをコーティングするために使用される場合、ゼラチンまたは他のキャリアと混合されるか、あるいは診断または処置において使用される場合、薬学的に受容可能なキャリアまたは希釈剤と混合される。特異的結合メンバーは、天然にかまたは異種真核生物細胞の系によってかのいずれかでグリコシル化されてもよいし、あるいは（例えば、原核生物細胞における発現によって産生される場合）グリコシル化されなくてもよい。 20

【0064】

また、本明細書中で使用される場合、用語「グリコシル化」および「グリコシル化される（た）」は、オリゴ糖の添加によるタンパク質の翻訳後修飾（糖タンパク質と呼ばれる）を含みかつ包含する。オリゴ糖は、糖タンパク質（特に、N 連結糖タンパク質および O 連結糖タンパク質が挙げられ得る）のグリコシル化部位にて添加される。N 連結糖タンパク質は、A s n 残基に加えられる。詳細には、この A s n 残基は、配列 N - X - S / T 中にあり、ここで X は、P r o でも A s p でもあり得ず、かつグリコシル化において見いだされる最も一般的な残基である。N 連結糖タンパク質の生合成において、高マンノース型オリゴ糖（一般的には、ドリコール、N - アセチルグルコサミン、マンノースおよびグルコースから構成される）が、最初に小胞体（E R）において見出される。次いで、この高マンノース型糖タンパク質は、E R からゴルジ（G o l g i）に輸送され、ここで、オリゴ糖のさらなるプロセッシングおよび修飾が生じる。O 連結オリゴ糖が、S e r 残基または T h r 残基のヒドロキシル基に加えられる。O 連結オリゴ糖において、E R 中の N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼによって、N - アセチルグルコサミンが、S e r 残基または T h r 残基に最初に移動される。次いで、タンパク質がゴルジに移動し、ここで、さらなる改変および鎖伸長が生じる。O 連結改変は、S e r 部位または T h r 部位（これらの部位はまた、異なる条件下にて、グリコシル化ではなくリン酸化され得る）にて、O G 1 c N A c 単糖単独の単純な添加とともに生じ得る。 30 40

【0065】

本明細書中で使用される場合、「p g」は、ピコグラムを意味し、「n g」は、ナノグラムを意味し、「u g」または「μ g」は、マイクログラムを意味し、「m g」は、ミリグラムを意味し、「u l」または「μ l」は、マイクロリットルを意味し、「m l」は、ミリリットルを意味し、そして「l」は、リットルを意味する。

【0066】

用語「806 抗体」、「m A b 806」、「c h 806」および具体的に列挙されてい 50

い任意の改変体は、本明細書中で相互交換可能に使用され得、本出願および特許請求の範囲全体を通して使用される場合、単一のタンパク質または複数のタンパク質を含むタンパク質性物質をいい、そして本明細書中に記載され、配列番号 2 および配列番号 4 で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質、ならびに配列番号 7 および配列番号 8 に組み込まれて、これらの配列の一部を形成するキメラ抗体 c h 8 0 6 にわたり、そしてその活性プロフィールが、本明細書中および特許請求の範囲に示される。従って、実質的に等価な活性または変化された活性を表示するタンパク質が、同様に企図される。これらの改変は、例えば、部位特異的変異誘発によって得られる改変のように意図的であってもよいし、その複合体または指定のサブユニットを産生する宿主の変異によって得られるように偶発的であってもよい。また、用語「8 0 6 抗体」、「m A b 8 0 6」および「c h 8 0 6」は、

10

【0 0 6 7】

本明細書中に記載されるアミノ酸残基は、「L」異性体形態であるのが好ましい。しかし、免疫グロブリン結合の所望の官能化特性がポリペプチドによって維持される限り、「D」異性体形態の残基が、任意の L - アミノ酸残基と置換され得る。N H₂ は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基をいう。C O O H は、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシ基をいう。標準的なポリペプチドの命名法に賛同して (J . B i o l . C h e m , 2 4 3 : 3 5 5 2 - 5 9 (1 9 6 9)) 、アミノ酸残基についての略語が、以下の対応の表に示される：

20

【0 0 6 8】

【表 1】

対応の表

記号		アミノ酸
1文字	3文字	
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

10

20

30

。

【0069】

全てのアミノ酸残基配列は、左から右への方向が、従来のアミノ末端からカルボキシル末端への方向である構造式によって、本明細書中で表されることに留意すべきである。さらに、アミノ酸残基配列の始まりまたは終わりにおけるダッシュは、1つ以上のアミノ酸残基のさらなる配列に結合したペプチドを示すことに留意すべきである。上記表は、本明細書中で代替的に現され得る3文字表記および1文字表記の対応を示す。

【0070】

「レプリコン」は、任意の遺伝学的エレメント（例えば、プラスミド、染色体、ウイルス）である、この遺伝学的エレメントは、インビボでのDNA複製（すなわち、それ自体の制御下で複製し得る）の自律的単位としての役目を果たす。

40

【0071】

「ベクター」は、プラスミド、ファージまたはコスミドのようなレプリコンであり、結合したセグメントの複製を生じるように、別のDNAセグメントがこれに結合され得る。

【0072】

「DNA分子」とは、そのいずれかの一本鎖形態におけるデオキシリボヌクレオチド（アデニン、グアニン、チミン、またはシトシン）のポリマー形態、または二本鎖ヘリックスをいう。この用語は、分子の一次構造および二次構造のみをいい、任意の特定の三次形態に対して限定しない。従って、この用語は、とりわけ、直鎖DNA分子（例えば、制限フラグメント）、ウイルス、プラスミド、および染色体において見出される、二本鎖DNA

50

を含む。特定の二本鎖DNA分子の構造を議論する際に、配列は、DNAの非転写鎖（すなわち、mRNAと相同な配列を有する鎖）に沿って5'方向から3'方向の配列のみを与える一般的な慣習に従って、本明細書中に記載され得る。

【0073】

「複製起点」とは、DNA合成に係するDNA配列をいう。

【0074】

DNA「コード配列」は、適切な調節配列の制御下に置かれた場合、インビボにおいて転写されてポリペプチドに翻訳される、二本鎖DNA配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシル）末端の翻訳停止コドンによって、決定される。コード配列としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：原核生物配列、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA由来のゲノムDNA配列、およびさらに合成DNA配列。ポリアデニル化シグナル配列および転写末端配列は、通常、コード配列に対して3'側に位置される。

10

【0075】

転写制御配列および翻訳制御配列は、宿主細胞中でコード配列の発現を与えるDNA調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーターなど）である。

【0076】

「プロモーター配列」は、細胞内のRNAポリメラーゼに結合し得、かつコード領域の下流（3'方向）の転写を開始し得る、DNA調節領域である。本発明を規定する目的で、このプロモーター配列は、その転写開始部位によって、その3'末端で結合され、上記バックグラウンドを検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように、上流（5'方向）に伸長する。プロモーター配列内で、転写開始部位（簡便には、ヌクレアーゼS1を用いたマッピングによって規定される）、およびRNAポリメラーゼの結合を担うタンパク質結合ドメイン（コンセンサス配列）が見出される。真核生物プロモーターは、常にではなくしばしば、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含む。原核生物プロモーターは、-10および-35のコンセンサス配列に加えて、Shine-Dalgarno配列を含む。

20

【0077】

「発現制御配列」は、別のDNA配列の転写および翻訳を制御および調節する、DNA配列である。コード配列は、RNAポリメラーゼがこのコード配列をmRNAに転写する場合、細胞内の転写制御配列および翻訳制御配列の「制御下」であり、次いで、このコード配列は、このコード配列によってコードされるタンパク質に翻訳される。

30

【0078】

「シグナル配列」は、コード配列の前に含まれ得る。この配列は、シグナルペプチド（ポリペプチドに対するN末端）をコードし、このシグナルペプチドは、宿主細胞と連絡して、ポリペプチドを細胞表面に指向させるかまたはポリペプチドを媒体に分泌させ、このシグナルペプチドは、タンパク質が細胞から放出される前に、宿主細胞によって切断される（clipped off）。シグナル配列は、原核生物および真核生物に対してネイティブな種々のタンパク質に関連して見出され得る。

40

【0079】

用語「オリゴヌクレオチド」とは、本明細書中で使用される場合、本発明のプロープをいい、2種以上のリボヌクレオチド、好ましくは、3種以上のリボヌクレオチドからなる分子として定義される。その正確なサイズは、同様に最終的な機能およびこのオリゴヌクレオチドの使用に依存した多くの因子に依存する。

【0080】

用語「プライマー」とは、本明細書中で使用される場合、精製された制限消化物におけるように天然に生じるかまたは合成的に生成される、オリゴヌクレオチドをいい、これは、プライマー伸長産物（これは、核酸鎖に相補的である）の合成が誘導される条件下（すなわち、ヌクレオチドおよび誘導因子（例えば、DNAポリメラーゼ）の存在下、ならびに

50

適切な温度および pH) に置かれた場合、合成の開始点として作用し得る。プライマーは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、誘導因子の存在下で所望のプライマー伸長産物の合成を初回刺激するのに十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、多くの因子(温度、プライマーの供給源および方法の使用)に依存する。例えば、診断適用については、標的配列の複雑性に依存して、オリゴヌクレオチドプライマーは、代表的には、15~25ヌクレオチドまたはそれ以上のヌクレオチドを含むが、このオリゴヌクレオチドプライマーは、ほとんどヌクレオチドを含み得ない。

【0081】

本明細書中のプライマーは、異なる鎖の特定の標的 DNA 配列に「実質的に」相補的であるように選択される。これは、プライマーがそれらのそれぞれの鎖とハイブリダイズするのに十分相補的でなければならぬことを意味する。従って、プライマー配列は、テンプレートの正確な配列を示す必要がない。例えば、非相補的ヌクレオチドフラグメントが、プライマーの 5' 末端に結合され得、このプライマー配列の残りは、その鎖に相補的である。あるいは、非相補的な塩基またはより長い配列が、プライマー中に分散され得、但し、そのプライマー配列は、その鎖の配列と十分な相補性を有し、この鎖とハイブリダイズし、それによって、伸長産物の合成のためのテンプレートを形成する。

10

【0082】

本明細書中で使用される場合、用語「制限エンドヌクレアーゼ」および「制限酵素」とは、細菌性酵素をいい、それらの各々は、二重鎖 DNA を特定のヌクレオチド配列にて、または特定のヌクレオチド配列近位で、切断する。

20

【0083】

細胞は、外来性 DNA または非相同性 DNA によって、このような DNA が細胞内に導入された際に「形質転換される」。この形質転換 DNA は、細胞のゲノムを構成する染色体 DNA に組み込まれても組み込まれなくてもよい(共有結合されても共有結合されなくてもよい)。例えば、原核生物、酵母、および哺乳動物細胞において、この形質転換 DNA は、プラスミドのようなエピソードエレメントにより維持され得る。真核生物について、安定に形質転換される細胞は、形質転換 DNA が染色体内に組み込まれ、その結果、染色体複製を介する娘細胞によって遺伝される細胞である。この安定性は、真核生物細胞が、形質転換 DNA を含有する娘細胞の集団からなる細胞株またはクローンを樹立する能力によって証明される。「クローン」は、単細胞または有糸分裂による共通の祖先由来の細胞集団である。「細胞株」は、多くの世代について、インビボで安定に増殖し得る初代細胞のクローンである。

30

【0084】

ヌクレオチドの少なくとも約 75% (好ましくは、少なくとも約 80%、そして最も好ましくは、少なくとも約 90% または 95%) が DNA 配列の規定された長さとは一致する場合、2つの DNA 配列は、「実質的に相同」である。実質的に相同な配列は、配列データベースで利用可能な標準的なソフトウェアを使用してか、または例えば、特定の系について規定されるようなストリンジェントな条件下でのサザンハイブリダイゼーション実験において、配列を比較することによって、同定され得る。規定される適切なハイブリダイゼーション条件は、当業者の範囲内である。例えば、Maniatis ら、前出; DNA Cloning、第 I 巻および第 II 巻、前出; Nucleic Acid Hybridization、前出。

40

【0085】

本発明の特定の結合メンバー(抗体)をコードする DNA 配列(これは、例えば、配列番号 2 または配列番号 4 と同じアミノ酸配列を有する抗体をコードするが; 配列番号 2 または配列番号 4 に縮重される)もまた本発明の範囲内であることが、理解されるべきである。「~に縮重する」とは、異なる 3 文字コドンを使用して特定のアミノ酸を特定化することを意味する。以下のコドンを相互交換可能に使用して、各々の特定のアミノ酸をコードし得ることは、当該分野で周知である:

【0086】

50

【表 2】

フェニルアラニン(PheまたはF)	UUUまたは UUC
ロイシン (Leuまたは L)	UUAまたは UUGまたはCUUまたは CUCまたは CUA または CUG
イソロイシン(IleまたはI)	AUUまたは AUCまたはAUA
メチオニン (MetまたはM)	AUG
バリン (ValまたはV)	GUUまたは GUCまたは GUA または GUG
セリン (SerまたはS)	UCUまたはUCCまたはUCAまたはUCGまたはAGU またはAGC
プロリン (ProまたはP)	CCUまたは CCCまたはCCAまたは CCG
トレオニン (ThrまたはT)	ACUまたは ACCまたはACAまたはACG
アラニン (Alaまたは A)	GCUまたは GCG またはGCAまたは GCG
チロシン (TyrまたはY)	UAUまたはUAC
ヒスチジン(HisまたはH)	CAU または CAC
グルタミン (GlnまたはQ)	CAA または CAG
アスパラギン (Asnまたは N)	AAU または AAC
リジン (LysまたはK)	AAA または AAG
アスパラギン酸 (AspまたはD)	GAU または GAC
グルタミン酸 (GluまたはE)	GAA またはGAG
システイン(CysまたはC)	UGU または UGC
アルギニン (Argまたは R)	CGUまたはCGCまたはCGAまたはCGGまたは AGAまたはAGG
グリシン (Glyまたは G)	GGUまたは GGCまたはGGAまたはGGG
トリプトファン(TrpまたはW)	UGG
終止コドン	UAA(オーカー)または UAG(アンバー)または UGA (オパール)

10

20

30

【0087】

上で特定化されたコドンはRNA配列についてのコドンであることが、理解されるべきである。DNAについての対応するコドンは、Uの代わりにTを有する。

【0088】

変異は、配列番号2または配列番号4においてなされ得、この結果、特定のコドンが、異なるアミノ酸をコードするコドンに変化される。このような変異は、一般的に、最小のヌクレオチド変化を可能にすることによって、なされ得る。この種類の置換変異は、非保存的な様式でか（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から別の分類に属するアミノ酸まで、コドンを変化させることによって）、または保存的な様式で（すなわち、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から同じ分類に属するアミノ酸まで、コドンを変化させることによって）、得られるタンパク質中のアミノ酸を変化させるようになされ得る。このような保存的变化は、一般に、得られるタンパク質の構造および機能の変化を引き起こさない。非保存的变化は、得られるタンパク質の構造、活性または機能をより変化させるようである。本発明は、得られるタンパク質の活性または結合特性を有意に変化させない保存的变化を含む配列を含むように考慮されるべきである。

40

【0089】

以下は、アミノ酸の種々の分類の1つの例である：

（非極性R基を有するアミノ酸）

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、トリプトフ

50

ァン、メチオニン。

【0090】

(非荷電の極性R基を有するアミノ酸)

グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン。

【0091】

(荷電した極性R基を有するアミノ酸 (pH 6.0 にて負に帯電している))

アスパラギン酸、グルタミン酸。

【0092】

(塩基性アミノ酸 (pH 6.0 にて正に帯電している))

リジン、アルギニン、ヒスチジン (pH 6.0)。

10

【0093】

別の分類は、フェニル基を有するアミノ酸であり得る：

フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン。

【0094】

別の分類は、分子量 (すなわち、R基のサイズ) に従い得る：

【0095】

【表3】

グリシン	75
アラニン	89
セリン	105
プロリン	115
バリン	117
トレオニン	119
システイン	121
ロイシン	131
イソロイシン	131
アスパラギン	132
アスパラギン酸	133
グルタミン	146
リジン	146
グルタミン酸	147
メチオニン	149
ヒスチジン (pH 6.0)	155
フェニルアラニン	165
アルギニン	174
チロシン	181
トリプトファン	204

20

30

40

。

【0096】

以下の置換基が、特に好ましい：

- Argに対するLys (逆もまた同様) (その結果、正電荷が維持され得る)；
- Aspに対するGlu (逆もまた同様) (その結果、負電荷が維持され得る)；
- Thrに対するSer (その結果、遊離—OHが維持され得る)；および、
- Asnに対するGln (その結果、遊離NH₂が維持され得る)。

50

【0097】

アミノ酸置換はまた、特定の好ましい性質を有するアミノ酸を置換するために導入され得る。たとえば、Cysは、別のCysとジスルヒド結合するための潜在的部位を導入され得る。Hisは、特定の「触媒」部位として導入され得る（すなわち、Hisは、酸または塩基として作用し得、そして生化学的な触媒において最も一般的なアミノ酸である）。Proは、タンパク質構造のβ-ターンを誘導するその特定の平面構造に起因して、誘導され得る。

【0098】

アミノ酸残基の少なくとも約70%（好ましくは、少なくとも約80%、そして最も好ましくは少なくとも90%または95%）が、同一であるか、または保存的置換を表す場合、2つのアミノ酸配列は、「実質的に相同」である。 10

【0099】

DNA構築物の「非相同的」領域は、天然の大きな分子に関連して見出されない大きなDNA分子内で、DNAのセグメントと同一視することができる。従って、非相同的領域が哺乳動物遺伝子をコードする場合、この遺伝子は、通常、供給源生物体のゲノムにおける哺乳動物のゲノムDNAに隣接しないDNAによって隣接される。非相同性コード配列の別の例は、コード配列自身が天然に見出されない構築物である（例えば、cDNA、ここで、ゲノムのコード配列は、イントロンまたはネイティブな遺伝子と異なるコドンを含む）。対立遺伝子の変異または天然に生じる変異事象は、本明細書中に定義されるようなDNAの非相同性領域を生じさせない。 20

【0100】

句「薬学的に受容可能」は、生理学的に耐用性があり、そしてヒトに投与される場合、代表的にアレルギーまたは同様の有害反応（例えば、胃の不調、めまい感など）を起こさない分子実体および組成物をいう。

【0101】

句「治療的有效量」は、本明細書中で使用され、予防するのに十分な量、および少なくとも約30%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%まで、標的細胞の質量の増殖または進行あるいは有糸分裂、癌細胞または腫瘍のグループ、もしくは病理の他の特性において臨床的に有意な変化を好ましくは減少するのに十分な量を意味する。例えば、EGFR活性化もしくはEGFR活性の程度、またはEGFR陽性細胞（特に抗体または反応性細胞もしくは陽性細胞の結合メンバー）の量もしくは数は、減少され得る。 30

【0102】

DNA配列は、発現制御配列が、DNA配列の転写および翻訳を制御し、そして調節する場合、発現制御配列に「作動可能に連結される」。用語「作動可能に連結される」は、発現されるべきDNA配列の前の適切な開始シグナル（例えば、ATG）を有すること、そして発現制御配列およびDNA配列によってコードされた所望の産物の生産の制御下で、DNA配列の発現を可能にする正しいリーディングフレームを維持することを包含する。組換えDNA分子中に挿入されることが所望される遺伝子が、適切な開始シグナルを含んでいない場合、このような開始シグナルは、遺伝子の前部分に挿入され得る。 40

【0103】

用語「標準的ハイブリダイゼーション条件」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の両方について5×SSCおよび65℃に実質的に等価な塩および温度条件およびをいう。しかし、当業者は、このような「標準的ハイブリダイゼーション条件」は、緩衝液中のナトリウムおよびマグネシウムの濃度、ヌクレオチド配列の長さおよび濃度（ミスマッチ%、ホルムアミド%など）を含む特定の条件に依存することを理解する。「標準的ハイブリダイゼーション条件」の決定において重要なことはまた、ハイブリダイズする2つの配列が、RNA-RNA、DNA-DNAまたはRNA-DNAであるか否かである。このような標準的ハイブリダイゼーション条件は、周知の式に従って当業者によって容易に決定され、ここでハイブリダイゼーションは、代表的に、所望である場合、より高いストリンジ 50

エンシーの洗浄を用いて、予測されるかまたは測定された T_m よりも $10 \sim 20^\circ\text{C}$ 下である。

【0104】

(B. 詳細な開示)

本発明は、腫瘍形成性細胞、過剰増殖性細胞または異常細胞において見出される EGF R エピトープを認識する新規の特異的結合メンバー、特に、抗体またはそのフラグメント（免疫原性フラグメントを含む）を提供し、このエピトープは、異常な翻訳後改変の際に増大されるか、または顕性であり、正常細胞または野生型細胞において検出可能ではない。特定ではあるが、非限定の実施形態において、この結合メンバー（例えば、抗体）は、EGF R エピトープを認識し、これは、単純な炭水化物改変または初期のグリコシル化の際に増大されるか、または顕性であり、そして複雑な炭水化物改変またはグルコシル化の存在において減少されるか、または顕性ではない。特異的結合メンバー（例えば、抗体またはそのフラグメント）は、過剰発現が存在しない場合および正常な EGF R 翻訳後改変が存在する場合において、正常 EGF R エピトープまたは野生型 EGF R エピトープを含む正常細胞または野生型細胞に結合も認識もしない。

10

【0105】

本発明は、EGF R エピトープを認識する特異的結合メンバー、特に、抗体またはそのフラグメントに関し、この EGF R エピトープは、増幅した EGF R または de 2-7 EGF R を発現する細胞において存在し、正常 EGF R または野生型 EGF R を発現する細胞において（特に、正常な翻訳後改変の存在において）検出可能ではない。

20

【0106】

本発明の抗体のさらなる非限定的な観察または特徴は、初期のグリコシル化または単純な炭水化物改変の特徴である、高マンノース基の存在におけるそれらのエピトープの認識であることは、さらに記載され、そして本明細書中で実証される。従って、変更されたか、または異常なグリコシル化は、この抗体エピトープの存在および／または認識を容易にするか、あるいはこの抗体エピトープの一部を含む。

【0107】

グリコシル化には、オリゴ糖の付加によるタンパク質（糖タンパク質と称される）の翻訳後改変が挙げられ、そして包含する。オリゴ糖は、糖タンパク質（特に、N-連結オリゴ糖およびO-連結オリゴ糖を含む）のグリコシル化部位に付加される。N-連結オリゴ糖は Asn 残基に付加され、特に Asn 残基は、配列 N-X-S/T に存在し、ここで、X は Pro でも Asp でもあり得ず、そして糖タンパク質において最も共通に見出される。N-連結糖タンパク質の生合成において、高マンノース型オリゴ糖（一般的にドリコール、N-アセチルグリコサミン、マンノースおよびグルコース含む）は、最初に小胞体（ER）において形成される。次いで、高マンノース型糖タンパク質は、ER からゴルジに移送され、ここで、オリゴ糖のさらなるプロセッシングおよび改変が通常生じる。O-連結オリゴ糖は、Ser 残基または Thr 残基のヒドロキシル基に添加される。O-連結オリゴ糖において、N-アセチルグリコサミンは、最初に ER において N-アセチルグリコサミニルトランスフェラーゼによって Ser 残基または Thr 残基に転移される。次いで、このタンパク質は、ゴルジまで移動し、ここでさらなる改変および鎖の伸長が生じる。

30

40

【0108】

本発明の特定の局面および上記のような場合において、本発明は、新規のモノクローナル抗体（mAb 806 およびそのキメラの ch 806 と命名された抗体によって本明細書中で例示される）を発見し、これらは、増幅された野生型 EGF R および de 2-7 EGF R を特異的に認識し、さらに、de 2-7 EGF R 変異の特有の接合部ペプチドとは明らかに異なるエピトープに結合する。本発明の抗体は、特に、異常な翻訳後改変の際に過剰発現した EGF R（増幅した EGF R および変異体 EGF R（de 2-7 変異によって本明細書中で例示される）を含む）を特異的に認識する。さらに、mAb 806 は、神経膠腫細胞の細胞表面において発現される正常な、野生型 EGF R を認識しないが、ELISA プレーットの表面上に固定された EGF R の細胞外ドメインに結合する。このことは、

50

ポリペプチドの局面を有する高次構造エピトープを示す。重要なことに、mAb 806は、多くの他の正常組織において発現されるレベルより高いレベルの内在性wt EGFRを発現するが、EGFRは過剰発現も増幅もされない肝臓および皮膚のような正常な組織には顕著に結合しない。従って、mAb 806は、新規であり、かつ有用な特異性（de 2-7 EGFRおよび増幅されたEGFRを認識するが、正常な、野生型EGFRも、de 2-7 EGFRの特徴である特有の接合部ペプチドも認識しない）を実証する。

【0109】

好ましい局面において、抗体は、本発明者が、増幅したEGFRおよびde 2-7 EGFRを特に認識することを同定および特徴付けた特徴を有する抗体である。特に好ましい局面において、抗体は、mAb 806であるか、またはその活性フラグメントである。さらに好ましい局面において、本発明の抗体は、VHアミノ酸配列およびVLアミノ酸配列（それぞれ、図14（配列番号2）および図15（配列番号4）に示される）を含む。 10

【0110】

好ましくは、特異的結合メンバーまたは抗体のエピトープは、成熟した正常EGFR配列または野生型EGFR配列の残基273～501を含む領域内に局在される。従って、EGFR配列の残基273～501を含む領域内に局在するエピトープで、de 2-7 EGFRに結合する、特異的結合タンパク質（例えば、抗体）もまた、提供される。このエピトープは、当業者に公知の、任意の慣用的なエピトープマッピング技術によって決定され得る。あるいは、残基273～501をコードするDNA配列は消化され得、そして得られるフラグメントは適切な宿主において発現される。抗体結合は、上記のように決定され得る。 20

【0111】

特に、このメンバーは成熟した正常EGFRまたは野生型EGFRの前記273～501を含むエピトープに結合する。しかし、同様か、または実質的に類似する反応性パターンを示す他の抗体または、本発明の局面を形成する。これは、それぞれ、配列番号2および配列番号4に示されるVHドメインおよびVLドメインを含む抗体と、このようなメンバーを比較することによって決定され得る。比較は、代表的には、ウエスタンブロット（結合メンバーは、細胞の核調製物から調製された二重ブロットに結合される）を用いてなされ、その結果、結合パターンを直接比較し得る。

【0112】

別の局面において、本発明は、806抗体のVH配列およびVL配列を有する抗体の少なくとも10%が、ELISAアッセイにおいてこのような抗体との競合によってde 2-7 EGFRへの結合をブロックする条件下で、806抗体と競合し得る抗体を提供する。上記のように、抗イディオタイプ抗体は、本明細書中で意図され、図解される。 30

【0113】

成熟した野生型EGFRの残基273～501（成熟したde 2-7 EGFRの残基6～234）を含むエピトープから本質的に構成される、単離されたポリペプチドは、本発明の別の局面を形成する。本発明のペプチドは、診断アッセイまたはキットにおいて特に有用であり、そして治療的または予防的（抗腫瘍ワクチンまたは抗癌ワクチン）に有用である。従って、本発明のペプチドの組成物は、薬学的組成物および免疫原性組成物を包含する。 40

【0114】

（診断用途および治療的用途）

本発明の特異的結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）に特有な特異性（それによって結合メンバーはEGFRエピトープ（腫瘍形成性細胞、過剰増殖性細胞または異常細胞において見出されるが、正常細胞または野生型細胞において検出可能ではない）を認識し、ここで、このエピトープは異常な翻訳後改変の際に増大されるか、または顕性であり、そしてこのメンバーはde 2-7 EGFRおよび増幅したEGFRに結合するが、wt EGFRには結合しない）は、多くの腫瘍形成性細胞型および腫瘍型（例えば、頭部および頸部、胸部、肺、膀胱または前立腺の腫瘍および神経膠腫）を同定、特徴づけ、標 50

的化および処置、減少または排除するための診断用途および治療用途を、以前から公知であるEGFR抗体に見られ得るような正常組織取込みに関連する問題を伴わずに、提供する。従って、EGFRを（例えば、変異体EGFRまたは改変体EGFRの増幅または発現によって）過剰発現する細胞、特に、異常な翻訳後改変を示す細胞は、本発明の結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）を利用して、認識、単離、特徴づけ、標的化および処置または排除され得る。

【0115】

従って、本発明の抗体は、EGFR過剰発現（特に増幅）および／またはEGFR変異（特にde2-7EGFR）が存在する、腫瘍または細胞を染色あるいは認識することによって、EGFR腫瘍細胞または腫瘍形成性細胞の性質を特異的に分類し得る。さらに、本発明の抗体（mAb806およびキメラ抗体ch806によって増幅されるような）は、増幅されたEGFRを含む腫瘍細胞およびde2-7EGFR陽性異種移植片に対する有意な抗腫瘍活性をインビボで実証する。

10

【0116】

上に概説するように、本発明者らは、本発明の特異的結合メンバーが、正常細胞において発現する場合、正常な、野生型レセプターではなく、EGFR（de2-7EGFRおよび増幅したEGFR）の腫瘍関連形態を認識することを発見した。抗体の認識は、EGFR遺伝子の過剰発現を示す細胞において発現したEGFRの異常な翻訳後改変（例えば、特有のグリコシル化改変体、アセチル化改変体またはリン酸化改変体）に依存すると考えられる。

20

【0117】

下に記載するように、mAb806およびch806は治療的研究において使用されている。mAb806およびch806は、EGFRを過剰発現した（例えば、増幅された）異種移植片およびヒトde2-7EGFRを発現するヒト腫瘍の異種移植片の増殖を阻害することおよびこのような腫瘍内の壊死を有意に誘導することが示される。

【0118】

さらに、本発明の抗体は、予防モデルにおいて頭蓋内腫瘍の増殖を阻害する。このモデルは、ヌードマウスへ、de2-7EGFRを発現する神経膠腫細胞を注射すること、次いで、同日または1～3日以内のいずれかで、抗体を頭蓋内に注射すること（必要に応じて反復される用量で）を包含する。抗体の用量は、適切には約10μgである。抗体を注射したマウスは、コントロールと比較され、そして処置したマウスの生存が有意に増加することを見出した。

30

【0119】

従って、本発明のさらなる局面において、腫瘍、癌性状態、前癌性状態および任意の過剰増殖性細胞増殖に関連する状態または過剰増殖性細胞増殖から生じる状態の処置方法を提供し、この方法は、本発明の特異的結合メンバーの投与を包含する。

【0120】

本発明の抗体は、ヒト被験体および動物被験体における腫瘍（特に、上皮腫瘍）の診断方法および処置方法において使用されるように設計される。これらの腫瘍は、任意の型の一次固形腫瘍または二次固形腫瘍であり得、これらの腫瘍としては、神経膠腫、胸部、肺、前立腺、頭部または頸部の腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0121】

（結合メンバーおよび抗体生成）

ハイブリドーマによってモノクローナル抗体を作製するための一般的な方法論は周知である。不死化の抗体生成細胞株はまた、融合以外の技術（例えば、オンコジーンDNAを用いるBリンパ球の直接的な形質転換、またはエプスタインバーウイルスを用いるトランスフェクション）によっても作製され得る（例えば、M. Schreierら、「Hybridoma Techniques」（1980）；Hammerlingら「Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas」（1981）；Kennettら、「Monoclonal Antibodies」

50

(1980)を参照のこと；米国特許第4,341,761号；同第4,399,121号；同第4,427,783号；同第4,444,887号；同第4,451,570号；同第4,466,917号；同第4,472,500号；同第4,491,632号；同第4,493,890号もまた参照のこと）。

【0122】

EGFRに対して産生されたモノクローナル抗体のパネルは、種々の特性；すなわち、アイソタイプ、エピトープ、親和性などについてスクリーニングされ得る。EGFRまたはそのサブユニットの活性を模倣するモノクローナル抗体が特に興味深い。このようなモノクローナル抗体は、特異的結合活性アッセイにおいて容易に同定され得る。高親和性抗体はまた、ネイティブまたは組換えの特異的結合メンバーの免疫親和性精製が可能である場合、有用である。 10

【0123】

ポリクローナル抗EGFR抗体を生成するための方法は当該分野で周知である。Nestorらに対する米国特許第4,493,795号を参照のこと。モノクローナル抗体（代表的に、有用な抗体分子のFabおよび／またはF(ab')₂部分を含む）は、以下に記載されるハイブリドーマ技術を用いて調製され得る：Antibodies—A Laboratory Manual、HarlowおよびLane編、Cold Spring Harbor Laboratory、New York（1988）、これは、参考として本明細書中で援用される。簡単に言うと、モノクローナル抗体組成物が生成されるハイブリドーマを形成するために、骨髓腫細胞株または他の自己永続性細胞株が、適切なEGFRで過剰に免疫された哺乳動物の脾臓から得られたリンパ球と融合される。 20

【0124】

脾細胞は代表的に、ポリエチレングリコール（PEG）6000を用いて骨髓腫細胞と融合される。融合されたハイブリットは、HATに対するそれらの感受性によって選択される。本発明の実施において有用なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、本発明の抗体または結合メンバーと免疫応答する能力、および標的細胞における特定の腫瘍形成または過剰増殖活性を阻害する能力によって同定される。

【0125】

本発明の実施に有用なモノクローナル抗体は、適切な抗原特異性の抗体分子を分泌するハイブリドーマを含有する栄養培地を含むモノクローナルハイブリドーマ培養を開始することによって産生され得る。この培養物は、ハイブリドーマが培地中に抗体分子を分泌するために十分な条件および時間で維持される。次いで、抗体含有培地が収集される。次いで、抗体分子は、周知の技術によってさらに単離され得る。 30

【0126】

これらの組成物の調製のために有用な培地は、当該分野で周知の培地および市販の培地の両方であり、合成培養培地、近交マウスなどを含む。例示的な合成培地は、4.5 gm／lグルコース、20 mmグルタミンおよび20%胎仔血清を補充したダルベッコ最小必須培地（DMEM；Dulbeccoら、Virol. 8:396（1959））である。例示的な近交マウス系は、Balb／cである。

【0127】

モノクローナル抗EGFR抗体を生成する方法はまた、当該分野で周知である。Nimanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953（1983）を参照のこと。代表的に、EGFRまたはペプチドアナログは、以前に記載された抗EGFRモノクローナル抗体を産生するための手順における免疫原として、単独または免疫原性キャリアに結合体化するかのいずれかで使用される。ハイブリドーマは、腫瘍形成性細胞、異常な細胞または過剰増殖性細胞に存在するEGFRと免疫応答する抗体を産生する能力についてスクリーニングされる。他の抗EGFR抗体としては、Genmab／MedarexからのHuMAX-EGFr抗体、108抗体（ATCC HB9764）（米国特許第6,217,866号）およびSchering AGからの抗体14E1（米国特許第5,942,602号）が挙げられるが、これらに限定されない。 40 50

【0128】

(組換え結合メンバー、キメラ、二重特異性およびフラグメント)

一般的に、CDR3領域(配列番号2および配列番号4のCDR3領域として実質的に記載されるアミノ酸配列を含む)が、腫瘍抗原へのCDR3の結合を可能にする構造に含まれる。配列番号4のCDR3の場合において、好ましくは、これは配列番号4のVL領域によって含まれる。

【0129】

「実質的に記載される」とは、本発明のCDR3領域が、配列番号2および配列番号4の特異的領域に対する同一性および高い相同性のいずれかであることを意味する。「高い相同性」とは、いくつかの置換のみ、好ましくは1~8、好ましくは1~5、好ましくは1~4、または1~3もしくは1~2の置換がCDRにおいて作製され得ることが意図される。

10

【0130】

本発明のCDR3を有する構造は、一般的に、抗体の重鎖配列または軽鎖配列あるいはその実質的な部分であり得、ここで、CDR3は、再配置された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる、天然に存在するVHおよびVL抗体の可変ドメインのCDR3領域に対応する位置に局在される。免疫グロブリン可変ドメインの構造および位置は、Kabat, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第4版, US Department of Health and Human Services, 1987およびそれらの最新のもの、インターネット(<http://immunology.bme.nwu.edu>)で現在利用可能なものを参照することによって決定され得る。

20

【0131】

好ましくは、配列番号2の残基93~102に実質的に記載されるようなアミノ酸配列は、ヒト重鎖可変ドメインまたはその実質的な部分においてCDR3として保持され、そして配列番号4の残基24~34、50~56および89~97に実質的に記載されるようなアミノ酸配列は、それぞれ、ヒト軽鎖可変ドメインまたはその実質的な部分においてCDR1~3として保持される。

【0132】

可変ドメインは、任意の生殖細胞系列または再配置されたヒト可変ドメインから誘導され得るか、あるいは公知のヒト可変ドメインのコンセンサス配列に基づいて合成可変ドメインであり得る。本発明のCDR3由来配列(前述の段落に規定されるように)は、組換えDNA技術を使用して、CDR3領域を欠く可変ドメインのレパートリーに導入され得る。

30

【0133】

例えば、Marksら(Bio/Technology, 1992, 10:779-783)は、抗体の可変ドメインのレパートリーを産生する方法を記載し、ここで、可変ドメイン領域の5'末端に指向されるか、または近接されるコンセンサスプライマーは、ヒトVH遺伝子の第3フレームワーク領域に対するコンセンサスプライマーとの結合に使用され、CDR3を欠くVH可変ドメインのレパートリーを提供する。Marksらはさらに、このレパートリーがどのように特定の抗体のCDR3と結合し得るのかを記載する。類似の技術を使用して、本発明のCDR3由来配列は、CDR3を欠くVHドメインまたはVLドメインのレパートリーと混ぜ合わせられ得、そして混合された完全VHドメインまたはVLドメインは、本発明の特異的結合メンバーを提供するために、同系のVLドメインまたはVLドメインと結合され得る。次いで、レパートリーは、適切な宿主系(例えば、W092/01047のファージディスプレイ系)において提示され得、その結果、適切な特異的結合メンバーが選択され得る。レパートリーは、 10^4 個以上(例えば、 $10^6 \sim 10^8$ または 10^{10} メンバー)の任意の個々のメンバーからなり得る。

40

【0134】

類似の混合またはコンビナトリアル技術はまた、Stemmer(Nature, 199

50

4, 370:389-391) によって開示され、Stemmer は、 β -ラクタマーゼ遺伝子に関連する技術を記載するが、このアプローチが抗体の産生のために使用され得ることを観察する。

【0135】

さらなる代替物は、全体の可変ドメイン内で変異を生じるために、例えば、mAb806 のVH遺伝子またはVL遺伝子のランダム変異誘発を用いて、本発明のCDR3由来配列を含む、新規のVH領域またはVL領域を生成することである。このような技術は、Gramら(1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580)によって記載される(Gramは、エラー頻発型PCRを使用した)。

【0136】

使用され得る別の方法は、VH遺伝子またはVL遺伝子のCDR領域に変異誘発を指向させることである。このような技術は、Barbasら(1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813)およびSchierら(1996, J. Mol. Biol. 263:551-567)によって開示される。

【0137】

上記の技術の全ては、それ自体、当該分野で公知であり、そしてそれら自体で本発明の一部を形成しない。当業者は、当該分野において慣用的な方法論を用いて、本発明の特異的結合メンバーを提供するために、このような技術を使用することが可能である。

【0138】

免疫グロブリン可変ドメインの実質的部分は、それらの介在性フレームワーク領域と共に、少なくとも3つのCDR領域を含む。好ましくは、この部分はまた、第1および第4フレームワーク領域の、または両方のいずれかの少なくとも約50%、第1フレームワーク領域のC末端50%および第4フレームワーク領域のN末端50%を含む。可変ドメインの実質的部分のN末端またはC末端でのさらなる残基は、天然に存在する可変ドメイン領域と通常会合しない残基である。例えば、組換えDNA技術によって作成された本発明の特異的結合メンバーの構築は、導入されたリンカーによってコードされるN末端またはC末端の残基の導入を生じさせ得、クロニングまたは他の操作工程を容易にし得る。他の操作工程としては、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン(例えば、二重抗体の産生における)またはより詳細に下に考察されるようなタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列に本発明の可変ドメインを結合するためのリンカーの導入が挙げられる。

【0139】

本発明の好ましい局面において、配列番号2および配列番号4に実質的に記載される配列に基づく1対の結合ドメインを含む特異的結合メンバーが好ましいが、これらの配列のいずれかに基づく単一結合ドメインは本発明のさらなる局面を形成する。配列番号2に実質的に記載される配列に基づく結合ドメインの場合において、このような結合ドメインは、腫瘍抗原に対する標的薬剤として使用され得る。なぜなら、免疫グロブリンVHドメインが特異的様式で標的抗原に結合し得ることが公知であるからである。

【0140】

単鎖抗体に特異的に結合するドメインのうちのいずれかの場合、これらのドメインは、2つのドメインに特異的に結合するメンバーを形成し得る相補的ドメインについてスクリーニングするために使用され得、このメンバーは、本明細書中に開示されるmAb806抗体と同程度に良好であるかまたは等しいインビボ特性を有する。

【0141】

このことは、米国特許第5,969,108号に開示されるような、いわゆる階層的二重コンビナトリアルアプローチを使用するファージディスプレイスクリーニング法によって、達成され得る。ここで、H鎖クローンまたはL鎖クローンのいずれかを含む個々のコロニーが、他方の鎖(LまたはH)をコードするクローンの完全なライブラリーを感染するために使用され、そして得られる2つの鎖に特異的な結合メンバーが、この参考文献に記載されるもののようなファージディスプレイ技術に従って選択される。この技術はまた、Marksら(同書)にも開示されている。

10

20

30

40

50

【0142】

本発明の特異的結合メンバーは、抗体定常領域またはその一部をさらに含み得る。例えば、配列番号4に基づく特異的結合メンバーは、そのC末端において、抗体の軽鎖定常ドメイン（ヒトC κ 鎖またはヒトC λ 鎖が挙げられ、好ましくはC λ 鎖）に付着し得る。同様に、配列番号2に基づく特異的結合メンバーは、そのC末端において、任意の抗体アイソタイプ（例えば、IgG、IgA、IgE、IgDおよびIgM）および任意のアイソタイプサブクラス（特に、IgG1、IgG2b、およびIgG4であり、IgG1が好ましい）由来の免疫グロブリン重鎖のすべてまたは一部に付着し得る。

【0143】

25年前のモノクローナル抗体（mAb）技術の出現は、有用な研究試薬の莫大なレパートリーを提供し、そして抗体を、癌治療、自己免疫障害、移植拒絶、抗ウイルス予防法における認可された薬学的試薬、および抗血栓剤として使用する機会を生じた（GlennieおよびJohnson 2000）。マウスmAbをキメラmAb（マウスV領域、ヒトC領域）に転換するための分子操作の適用、およびmAb相補性決定領域（CDR）のみがマウスを起源とする場合のヒト化試薬は、mAb治療の臨床的成功のために重要であった。操作されたmAbは、免疫原性が顕著に減少しているかまたは有さず、血清半減期が増加しており、そしてmAbのヒトFc部分は、補体および細胞傷害性細胞の免疫効果を漸増させる可能性を増加させる（Clark 2000）。生体分布、薬物速度論および臨床的に投与されたmAbに対する免疫応答の何らかの誘導についての調査は、薬学的タンパク質と内因性タンパク質とを区別するための分析の開発を必要とする。

【0144】

抗体、またはその任意のフラグメントはまた、任意の細胞毒素、細菌毒素または他の毒素（例えば、シュードモナス体外毒素、リシン、またはジフテリア毒素）に結合体化され得るか、または組換え的に融合され得る。使用される毒素の一部は、毒素全体、または毒素の任意の特定のドメインであり得る。このような抗体-毒素分子は、異なる種類の癌の標的化および治療のために、首尾よく使用されている。例えば、Pastan, Biochim Biophys Acta. 1997 Oct 24; 1333 (2): C1-6; Kreitmanら, N Engl J Med. 2001 Jul 26; 345 (4): 241-7; Schnellら, Leukemia. 2000 Jan; 14 (1): 129-35; Ghetieら, Mol Biotechnol. 2001 Jul 30; 18 (3): 251-68を参照のこと。

【0145】

二重特異的多量体および三重特異的多量体は、異なるscFv分子の会合によって形成され得、そして腫瘍内へのT細胞漸増のための架橋剤（免疫療法）、ウイルス再標的化（遺伝子療法）および赤血球凝集試薬（免疫診断）として、設計されている。例えば、Todorovskaら, J Immunol Methods. 2001 Feb 1; 248 (1-2): 47-66; Tomlinsonら, Methods Enzymol. 2000; 326: 461-79; McCallら, J Immunol. 2001 May 15; 166 (10): 6112-7を参照のこと。

【0146】

完全ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の大部分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、調製され得る。これらのマウス（このようなマウスの例は、XenomouseTM（Abgenix, Inc.）（米国特許第6,075,181号および同第6,150,584号）、HuMAb-MouseTM（Medarex, Inc. / GenPharm）（米国特許第5,545,806号および同第5,698,255号）、TransChromo MouseTM（Kirin）およびKM MouseTM（Medarex / Kirin）である）は、当該分野において周知である。次いで、抗体は、例えば、標準的なハイブリドーマ技術またはファージディスプレイによって調製され得る。このようにして、これらの抗体は、完全ヒトアミノ酸配列のみを含む。

10

20

30

40

50

【0147】

完全ヒト抗体はまた、ヒトライブラリーからファージディスプレイを使用して作製され得る。ファージディスプレイは、当業者に周知の方法（例えば、HoogenboomらおよびMarksら（Hoogenboom HRおよびWinter G. (1992) J Mol Biol. 227 (2) : 381-8; Marks JDら (1991) J Mol Biol. 222 (3) : 581-97; ならびにまた米国特許第5885793号および同第5969108号））を使用して実施され得る。

【0148】

（治療抗体および使用）

本発明の特異的結合メンバーのインビボ特性（特に、腫瘍：血液比およびクリアランス速度に関して）は、少なくともmAb806に匹敵する。ヒトまたは動物の被験体にこのような特異的結合メンバーを投与した後に、1：1より大きいピークの腫瘍対血液比を示す。好ましくは、このような比において、特異的結合メンバーはまた、1：1より大きい比、好ましくは2：1より大きい比、より好ましくは、5：1より大きい比の腫瘍対器官比を有する。好ましくは、このような比において、特異的結合メンバーはまた、腫瘍の部位から離れた器官において、1：1未満の器官対血液比を有する。これらの比は、投与された特異的結合メンバーの異化作用器官および分泌器官を除く。従って、scFvおよびFabの場合（添付の実施例に示されるように）、結合メンバーは、腎臓によって分泌され、そして腎臓に、他の器官より多く存在する。IgG全体の場合、クリアランスは、少なくとも部分的に、肝臓による。インタクトな抗体のピーク局在比は、通常、特異的結合メンバーの投与の10時間後と200時間後との間に達成される。より具体的には、この比は、無胸腺症ヌードマウス的一方の側腹部において皮下に形成される、約0.2～1.0gの腫瘍異種移植片において測定され得る。

【0149】

本発明の抗体は、検出可能な標識または機能的標識で標識され得る。検出可能な標識としては、同位体³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In、²¹¹At、¹⁹⁸Au、⁶⁷Cu、²²⁵Ac、²¹³Bi、⁹⁹Tcおよび¹⁸⁶Reのような放射性同位元素標識が挙げられるが、これらに限定されず、抗体画像化の分野において公知の従来の化学を使用して、本発明の抗体に付着され得る。標識としてはまた、蛍光標識およびMRI-CT画像のために当該分野において従来使用される標識が挙げられる。これらとしてはまた、ホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素標識が挙げられる。標識としてはさらに、ビオチンのような化学部分が挙げられ、これは、特定の同源物質を検出可能な部分（例えば、標識アビジン）に結合することによって、検出され得る。

【0150】

機能的標識としては、腫瘍の部位に標的化されて腫瘍組織の破壊を引き起こすように設計された物質が挙げられる。このような機能的標識としては、細胞傷害性薬物（例えば、5-フルオロウラシルまたはリシン）および酵素（例えば、細菌性カルボキシペルオキシダーゼまたはニトロレダクターゼ）が挙げられ、これらは、腫瘍の部位において、プロドラッグを活性薬物に転換し得る。

【0151】

また、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体との両方を含む抗体、ならびに特異的結合メンバー、抗体および／またはこれらのサブユニットの産生または活性を調節する薬物は、特定の診断適用を有し得、そして例えば、癌、癌前の病変、過剰増殖性の細胞の増殖に関連するかまたはその結果である状態などのような状態を検出および／または測定する目的で、利用され得る。例えば、特異的結合メンバー、抗体またはそのサブユニットを使用して、公知の技術（例えば、融合したマウス脾臓リンパ球および骨髓腫細胞を利用するハイブリドーマ技術など）によって、種々の細胞培地中で、それら自体に対するポリクローナル抗体とモノクローナル抗体との両方を産生し得る。同様に、本発明の特異的結合メンバーの活性を模倣または拮抗する低分子が、発見または合成され得、そして診断および

／または治療のプロトコルにおいて使用され得る。

【0152】

放射性同位体標識された特異的結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、インビトロ診断技術ならびにインビボでの放射線画像化技術および放射免疫治療において有用である。インビボでの画像化の例において、本発明の特異的結合メンバーは、放射性同位体よりむしろ、画像化薬剤（磁気共鳴画像増強剤が挙げられるが、これに限定されない）に結合体化され得、ここで、例えば、抗体分子が、多数の常磁性イオンを、キレート基を介して負荷される。キレート基の例としては、EDTA、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、およびポリオキシムが挙げられる。常磁性イオンの例としては、ガドリニウム、鉄、マンガン、レニウム、ユーロピウム、ランタン、ホルミウム、およびテルビウム（ferbium）が挙げられる。本発明のさらなる局面において、放射性同位体標識された特異的結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント、特に、放射性免疫結合体）は、放射免疫治療において、特に、癌治療のための放射性同位体標識された抗体として、有用である。なおさらなる局面において、放射性同位体標識された特異的結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）は、放射免疫誘導手術技術において有用であり、ここで、これらのメンバーは、癌細胞、癌前細胞、腫瘍細胞、および過剰増殖細胞の存在および／または位置を、このような細胞を除去する手術の前、手術の間または手術の後に、同定および指示し得る。

10

【0153】

本発明の免疫結合体または抗体融合タンパク質（ここで、本発明の特異的結合メンバー、特に、抗体およびそのフラグメントは、他の分子または薬剤に結合体化または付着されている）としては、さらに、化学解離剤、毒素、免疫調節因子、サイトカイン、細胞傷害性因子、化学療法剤または薬物に結合体化された、結合メンバーが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0154】

放射免疫治療（RAIT）は、種々の抗体免疫結合体を使用して、臨床的効力および実証効力を増強させた。¹³¹Iで標識されたヒト化抗癌胎児抗原（抗CEA）抗体hMN-14は、結腸直腸癌において評価され（Behr TMら（2002）Cancer 94（補遺4）：1373-81）、そして⁹⁰Y標識を有するこの抗体は、髄質の甲状腺癌腫において評価された（Stein Rら（2002）Cancer 94（1）：51-61）。モノクローナル抗体を使用する放射免疫治療もまた、非ホジキンリンパ腫および膵臓癌について、評価および報告されている（Goldenberg DM（2001）Crit Rev Oncol Hematol 39（1-2）：195-201；Gold DVら（2001）Crit Rev Oncol Hematol 39（1-2）147-54）。特定の抗体を用いる放射免疫治療の方法もまた、米国特許第6,306,393号および同第6,331,175号に記載されている。放射免疫誘導手術（RIGS）もまた、臨床実習に入り、そして効力および有用性が実証されている（抗CEA抗体および腫瘍関連抗原に対する抗体の使用を含む）（Kim JCら（2002）Int J Cancer 97（4）：542-7；Schneebaum Sら（2001）World J Surg 25（12）：1495-8；Avital Sら（2000）Cancer 89（8）：1692-8；McIntosh DGら（1997）Cancer Biother Radiopharm 12（4）：287-94）。

30

40

【0155】

本発明の抗体は、処置を必要とする患者に、任意の適切な経路で、通常は、血流もしくはCSFへ、または腫瘍の部位への直接の注射によって、投与され得る。正確な用量は、多数の要因（その抗体が診断用であるか処置用であるか、腫瘍の大きさおよび位置、抗体の正確な性質（抗体全体であるか、フラグメントであるか、ダイアボディー（diabody）であるかなど）、ならびにその抗体に付着した検出可能標識または機能的標識の性質が挙げられる）に依存する。放射性核種が治療のために使用される場合、適切な最大の単

50

回用量は、約 $45 \text{ mCi} / \text{m}^2$ であり、最大で約 $250 \text{ mCi} / \text{m}^2$ である。好ましい投薬量は、 $15 \sim 40 \text{ mCi}$ の範囲であり、さらに好ましい投薬範囲は、 $20 \sim 30 \text{ mCi}$ 、または 10 から 30 mCi である。このような治療は、骨髄置換または幹細胞置換を必要とし得る。腫瘍の画像化または腫瘍の処置のいずれかのための、代表的な抗体の用量は $0.5 \sim 40 \text{ mg}$ 、好ましくは $1 \sim 4 \text{ mg}$ の、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 形態の抗体の範囲である。裸の抗体は、 1 用量あたり $20 \sim 1000 \text{ mg}$ のタンパク質、または 1 用量あたり $20 \sim 500 \text{ mg}$ のタンパク質または 1 用量あたり $20 \sim 100 \text{ mg}$ のタンパク質の用量で、好ましく投与される。これは、成人患者の 1 回の処置についての用量であり、これは、小児および幼児に対しては適切に調節され得、そしてまた、分子量に比例させて、他の抗体形式について調整され得る。処置は、毎日、 1 週間に 2 回、隔週または隔月で、医師の計らいで繰り返され得る。

【0156】

これらの処方物は、第二の結合タンパク質（例えば、前出で記載された EGF R 結合タンパク質）を含み得る。特に好ましい形態において、この第二の結合タンパク質は、前出で議論された 528 または 225 のようなモノクローナル抗体である。

【0157】

（薬学製組成物および治療組成物）

本発明の特異的結合メンバーは、通常、薬学的組成物の形態で投与され、この組成物は、この特異的結合メンバーに加えて、少なくとも 1 つの成分を含有し得る。

【0158】

従って、本発明による薬学的組成物は、本発明による使用のために、活性成分に加えて、薬学的に受容可能な賦形剤、キャリア、緩衝剤、安定剤、または当業者に周知の他の材料を含有し得る。このような材料は、非毒性であるべきであり、そして活性成分の効力に影響を与えないべきである。キャリアまたは他の材料の正確な性質は、投与経路（これは、経口、または注射（例えば、静脈内）であり得る）に依存する。

【0159】

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤または液体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントのような固体キャリアを含有し得る。液体の薬学的組成物は、一般に、水、石油、動物性油または植物性油、鉱油あるいは合成油のような、液体キャリアを含有する。生理食塩水、ブドウ糖または他の糖類の溶液、あるいはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）が、含有され得る。

【0160】

静脈内注射、または苦痛の部位での注射のためには、活性成分は、非経口的に受容可能な水溶液（これは、発熱物質を含まず、そして適切な pH、等張性および安定性を有する）の形態である。当業者は、例えば、等張性ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム注入剤、リンガー注入剤、乳酸加リンガー注入剤）を使用して、適切な溶液を調製することが十分に可能である。防腐剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤、および／または他の添加剤が、必要に応じて含有され得る。

【0161】

組成物は、処置される状態に依存して、単独でかまたは他の処置、治療剤もしくは薬剤と組み合わせて、同時にかまたは連続してかのいずれかで、投与され得る。さらに、本発明は、本明細書中に記載される結合メンバー（特に、抗体またはそのフラグメント）、および他の薬剤または治療剤（例えば、抗癌剤もしくは治療剤、ホルモン、抗 EGF R 抗原もしくは抗体、または免疫調節因子）を含有する組成物を企図し、そして包含する。より一般的には、これらの抗癌剤は、チロシンキナーゼインヒビターまたはリン酸化カスケードインヒビター、翻訳後修飾因子、細胞増殖インヒビターまたは分裂インヒビター（例えば、抗有糸分裂薬）、あるいはシグナル伝達インヒビターであり得る。他の処置および治療としては、適切な用量の疼痛軽減薬物（例えば、非ステロイド系抗炎症薬物（例えば、アスピリン、パラセタモール、イブプロフェンもしくはケトプロフェン）またはモルヒネの

ようなアヘン剤)、あるいは制吐薬の投与が挙げられ得る。この組成物は、チロシンキナーゼインヒビター (AG1478およびZD1839、STI571、OSI-774、SU-6668が挙げられるが、これらに限定されない)、ドキソルビシン、テモゾロミド、シスプラチン、カルボプラチン、ニトロソ尿素、プロカルバジン、ビンクリスチン、ヒドロキシ尿素、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エピドドフィロトキシシン、カルムスチン、ロムスチン、および/または他の化学療法剤と組み合わせて (連続的に (すなわち、前もしくは後に) または同時にのいずれか)、投与され得る。従って、これらの薬剤は、抗EGFR特異的抗原、またはチロシンキナーゼインヒビター (例えば、AG1478、ZD1839、STI571、OSI-774、またはSU-6668) であり得るか、あるいはより一般的な抗癌剤および抗腫瘍剤 (例えば、ドキソルビシン、シスプラチン、テモゾロミド、ニトロソ尿素、プロカルバジン、ビンクリスチン、ヒドロキシ尿素、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エピドドフィロトキシシン、カルムスチン、またはロムスチン) であり得る。さらに、この組成物は、デキサメタゾンのようなホルモン、インターロイキン、腫瘍壊死因子 (TNF) のような免疫調節因子、あるいは免疫応答および癌細胞もしくは腫瘍の減少または排除を刺激する他の増殖因子またはサイトカインと共に投与され得る。TNFのような免疫調節因子は、二重特異的抗体の形態で、本発明のメンバーと一緒に組み合わせられ、806EGFRエピトープを認識し、そしてTNFレセプターに結合し得る。この組成物はまた、他の抗EGFR抗体とともに投与され得るか、またはこの抗体との組み合わせを含有し得、この抗体としては、抗EGFR抗体528、225、SC-03、DR8.3、L8A4、Y10、ICR62およびABX-EGFが挙げられるが、これらに限定されない。

【0162】

以前に、ドキソルビシンおよびシスプラチンのような薬剤の、抗EGFR抗体と組み合わせての使用は、増強された抗腫瘍活性を生じた (Fanら, 1993; Baselgaら, 1993)。ドキソルビシンとmAb528との組合せは、樹立されたA431異種移植片の完全な根絶をもたらし、一方でいずれかの薬剤単独を用いる処置は、インビボでの増殖の阻害を一時的にのみ引き起こした (Baselgaら, 1993)。同様に、シスプラチンと、mAb28または225のいずれかとの組合せもまた、十分に樹立されたA431異種移植片の根絶をもたらし、これは、いずれかの薬剤を用いる処置が使用された場合には、観察されなかった (Fanら, 1993)。

【0163】

(従来の放射線治療)

さらに、本発明は、従来の放射線治療と組み合わせた結合メンバーの使用のための、治療組成物を企図し、そして包含する。EGFレセプターを標的化する抗体を用いる処置は、従来の放射線治療の効果を増強し得ることが示されている (Milasら, Clin Cancer Res. 2000 Feb; 6(2): 701-8, Huangら, Clin Cancer Res. 2000 Jun; 6(6): 2166-74)。

【0164】

本明細書中で実証されるように、本発明の結合メンバー (特に、抗体またはそのフラグメント、好ましくは、mAb806、ch806またはそのフラグメント) と、抗癌治療剤 (特に、抗EGFR治療剤であり、他の抗EGFR抗体を含む) との組合せは、異種移植された腫瘍に対する効果的な治療、および特に、相乗作用を示す。実施例において、AG1478とmAb806との組合せは、いずれかの薬剤単独での処置と比較して、有意に増強されたA431異種移植腫瘍体積の減少を生じることが実証される。AG1478 (4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン) は、EGFレセプターキナーゼの強力かつ選択的なインヒビターであり、そして特に、米国特許第5,457,105号 (その全体が本明細書中に参考として援用される) に記載されている (Liu, W. ら (1999) J. Cell Sci. 112: 2409; Eguchi, S. ら (1998) J. Biol. Chem. 273: 8890; Levitsky, A. およびG

azit, A. (1995) Science 267:1782 もまた参照のこと)。本明細書の実施例は、806 抗体の、他の抗 EGF R 抗体（特に、528 抗 EGF R 抗体）との治療的相乗作用をさらに実証する。

【0165】

本発明は、本発明の治療方法を実施する際に有用な治療組成物をさらに企図する。本発明の治療組成物は、混合物中に、薬学的に受容可能な賦形剤（キャリア）、および活性成分として、本明細書中に記載されるような1種以上の特異的結合メンバー、そのポリペプチドアナログまたはそのフラグメントを含有する。好ましい実施形態において、この組成物は、本発明の結合メンバー／抗体の、標的細胞との特異的結合を調節し得る抗原を含有する。

10

【0166】

ポリペプチド、アナログまたは活性フラグメントを、活性成分として含有する治療組成物の調製は、当該分野において十分に理解されている。代表的に、このような組成物は、注射可能物（injectable）（液体の溶液または懸濁液としてのいずれか）として調製される。しかし、注射の前に液体中の溶液または懸濁液に適切な固体形態もまた、調製され得る。この調製物はまた、乳化され得る。活性な治療剤成分は、しばしば、薬学的に受容可能でありかつその活性成分と適合性の賦形剤と混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。さらに、所望であれば、この組成物は、活性成分の有効性を増強する少量の補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤）を含有し得る。

20

【0167】

ポリペプチド、アナログまたは活性なフラグメントは、中和された、薬学的に受容可能な塩の形態で、治療組成物に処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、酸付加塩（ポリペプチドまたは抗体分子の遊離アミノ基と形成される）が挙げられ、そしてこれらは、無機酸（例えば、塩酸またはリン酸など）または有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸など）と形成される。遊離カルボキシル基から形成される塩もまた、無機塩基（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化鉄など）および有機塩基（例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなど）から誘導され得る。

【0168】

治療用のポリペプチド含有組成物、アナログ含有組成物または活性フラグメント含有組成物は、例えば、単位用量の注入によって静脈内に慣用的に投与される。本発明の治療用組成物に関して使用される場合、用語「単位用量」は、ヒトに対する単位投薬量として適切な物理的に別個の単位をいい、各単位は、必要とされる希釈剤（すなわち、キャリア、またはビヒクル）とともに、所望される治療効果を生じるように計算された、予め決められた量の活性物質を含む。

30

【0169】

この組成物は、投薬量処方物と適合可能な様式で、かつ治療有効量で投与される。投与される量は、処置される被験体（活性成分を利用するための被験体の免疫系の能力、および所望される EGF R の結合能力の程度）に依存する。投与されるのに必要とされる活性成分の正確な量は、医者判断に依存し、各個体に特有である。しかし、適切な投薬量は、1日に、個体の体重1kgあたり、約0.1mg～20mg、好ましくは、約0.5mg～約10mg、そしてより好ましくは、1mg～数mgの活性成分の範囲であり得、そして投与の経路に依存し得る。初回の投与およびブースターショットのための適切なレジメンもまた変動し得るが、初回の投与後に、続く注射または他の投与により1時間以上の間隔を空けて投薬が繰り返されるのが典型的である。あるいは、血液中で10nM～10μMの濃度を維持するのに十分な連続する静脈注入が、企図される。

40

【0170】

経口投与のための薬学的組成物は、錠剤形態、カプセル形態、粉末形態または液体形態であり得る。錠剤は、固体キャリア（例えば、ゼラチンまたはアジュバンド）を含み得る。

50

液体の薬学的組成物は、一般に、液体キャリア（例えば、水、石油、動物油、植物油、鉱油、または合成油）を含む。生理食塩水溶液、デキストロース溶液もしくは他のサッカライド溶液、またはグリコール（例えば、エチレングリコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコール）が、含まれ得る。

【0171】

静脈内注射、または痛みのある部位での注射のために、活性成分が、発熱物質を含まず、かつ適切なpH、等張性および安定性を有する、非経口的に受容可能な水溶液の形態である。当業者は、例えば、等張性ビヒクル（例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー液、乳酸加リンガー液）の使用に適切な溶液を十分に調製し得る。保存剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤および／または他の添加剤が、必要な場合に、含まれ得る。

10

【0172】

（診断アッセイ）

本発明はまた、種々の診断適用（本発明の特定の結合メンバーによって認識されるそれらの能力を参照することにより、異常に発現したEGFRのような刺激物の存在を検出するための方法を含む）に関する。上記のように、このEGFRは、種々の公知の技術によって、抗体をそれ自体に産生するために使用され得、次いで、このような抗体は単離され、推定標的細胞中における特定のEGFR活性の存在についての試験において利用され得る。

【0173】

本発明の特定の結合メンバー（特に、抗体およびそのフラグメント）の診断適用としては、当業者に周知かつ標準的であり、本明細書中の記載に基づく、インビトロ適用およびインビトロ適用が挙げられる。（特に、EGFRの異常な発現に関する）EGFR状態のインビトロ判定およびインビトロ評価のための、診断アッセイおよび診断キットは、癌、前癌状態、過剰増殖細胞の増殖に関連する状態を有していることが既知であるか、もしくはこれらの状態を有していると疑われるものを含む患者のサンプルまたは腫瘍サンプル由来のサンプルを判定、評価およびモニタリングするために利用され得る。EGFR判定の診断および評価はまた、薬物の臨床実験についての患者の適合性、または本発明の特定の化学療法剤もしくは特異的な結合メンバー（特に、抗体）（これらの組み合わせを含む）の投与についての患者の適合性を、異なる薬剤または結合メンバーに対して決定するのに有用である。このタイプの診断モニタリングおよび判定は、乳癌においてHER2タンパク質に対する抗体を既に実際に利用しており（Hercept Test, Dako Corporation）、ここで、このアッセイをまた使用して、Herceptinを利用する抗体療法のために患者を評価する。インビトロ適用としては、腫瘍の画像化または個体の癌の状態の評価（放射線画像化を含む）が挙げられる。

20

30

【0174】

上記で示唆したように、本発明の診断方法は、EGFR／タンパク質に対する有効量のアンタゴニスト（例えば、抗-EGFR抗体、好ましくは、親和性により精製されたポリクローナル抗体、そしてより好ましくは、mAb）を含むアッセイ手段によって、細胞サンプルまたは培地を試験する工程を包含する。さらに、本明細書中で使用される抗-EGFR抗体分子が、Fab部分、Fab'部分、F(ab')₂部分、もしくはF(v)部分、または抗体分子全体の形態であることが、好ましい。上記で議論されるように、この方法から利益を受け得る患者としては、癌、前癌病変、ウイルス感染、過剰増殖細胞の増殖もしくは他の同様の病理的障害に関連するかもしくはこれにより生じる病理、を患っている患者が挙げられる。EGFRを単離して、抗EGFR抗体を誘導するための方法、ならびに標的細胞の試験を補助する抗EGFR抗体の能力を決定および最適化するための方法は、全て、当該分野で周知である。

40

【0175】

好ましくは、本発明の診断方法において使用される抗EGFR抗体は、親和性により精製されたポリクローナル抗体である。より好ましくは、この抗体は、モノクローナル抗体（mAb）である。さらに、本明細書中で使用される抗EGFR抗体分子は、Fab部分、

50

F a b ' 部分、F (a b ')₂ 部分、もしくは F (v) 部分、または抗体分子全体の形態であり得る。

【0176】

上記で詳細に議論されているように、E G F R に対する抗体は、周知のハイブリドーマ技術を含む標準的な方法によって産生および単離され得る。便宜のために、E G F R に対する抗体は、本明細書中で、A b₁ と呼ばれ、そして別の種において惹起される抗体を A b₂ と呼ぶ。

【0177】

細胞中での E G F R の存在は、このような決定に対して適切な、通常のインビトロ免疫学的手順またはインビボ免疫学的手順によって確認され得る。多数の有用な手順が、公知である。特に有用であるこのような3つの手順は、検出可能な標識で標識された E G F R、検出可能なレベルで標識された抗体 A b₁、または検出可能な標識で標識された抗体 A b₂ のいずれかを利用する。この手順は、以下の式によって要約され得、ここでこのアスタリスクは、この粒子が標識されていることを示し、「R」は、E G F R を表す： 10

$$A. R^* + A b_1 = R^* A b_1$$

$$B. R + A b^* = R A b_1^*$$

$$C. R + A b_1 + A b_2^* = R A b_1 A b_2^*。$$

【0178】

この手順およびそれらの適用は、当業者に全て熟知されており、従って、本発明の範囲内で利用され得る。この「競合」手順（手順A）は、米国特許第3,654,090号および同第3,850,752号において記載されている。手順C（サンドイッチ手順）は、米国特許R E 31,006号および同第4,016,043号に記載されている。「二重抗体」または「D A S P」手順のような、さらに別の手順が公知である。 20

【0179】

上記の各場合において、E G F R は、1種以上の抗体または結合パートナーとの複合体を形成し、その複合体の1つのメンバーは、検出可能な標識で標識される。複合体が形成されるという事実、および所望の場合、その量が、標識の検出に適用可能な公知の方法によって決定され得る。

【0180】

A b₂ の特徴のある特性は、A b₂ が A b₁ と反応することであるということが、上記から理解される。これは、ある哺乳動物種において惹起される A b₁ が、抗体 A b₂ を惹起するために、抗原として別の種において使用されているからである。例えば、A b₂ は、ヤギにおいて、抗原としてウサギの抗体を使用して惹起され得る。従って、A b₂ は、ヤギにおいて惹起される抗ウサギ抗体である。この記載および特許請求の範囲の目的のために、A b₁ は、一次抗体または抗 E G F R 抗体をいい、そして A b₂ は、二次抗体または抗 A b₁ 抗体をいう。 30

【0181】

これらの研究のために最も一般的に使用される標識は、放射性元素、酵素、紫外線に曝露した場合に蛍光を発する化学物質などである。多数の蛍光物質が公知であり、そして標識として利用され得る。これらには、例えば、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、T e x a s R e d、A M C A ブルーおよび L u c i f e r イエローが挙げられる。特定の検出物質は、ヤギにおいて調製される抗ウサギ抗体であり、そしてイソチオシアネートを介してフルオレセインと結合体化される。 40

【0182】

E G F R またはその結合パートナー（例えば、本発明の特異的な結合メンバー）はまた、放射性元素または酵素により標識され得る。この放射性標識は、現在利用可能な計数手順のいずれかによって検出され得る。好ましい同位体は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹In、²¹¹At、¹⁹⁸Au、⁶⁷Cu、²²⁵Ac、²¹³Bi、²²⁵Ac、²¹³Bi、⁹⁹Tc および ¹⁸⁶Re から選択され得る。 50

【0183】

酵素標識は、同様に有用であり、そして現在利用されている、比色技術、分光測光技術、蛍光分光測光技術、電流測定技術または気体定量技術によって検出され得る。この酵素は、架橋分子（例えば、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなど）との反応によって選択粒子に結合体化される。これらの手順において使用され得る多くの酵素は、公知であり、そして利用され得る。ペルオキシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが、好ましい。米国特許第3,654,090号；同第3,850,752号；および同第4,016,043号には、代替の標識物質および標識方法の開示が、例示の目的で言及されている。

10

【0184】

本発明に従って有利に利用され得る特定のアッセイシステムは、レセプターアッセイとして公知である。レセプターアッセイにおいて、特異的な結合メンバーのようなアッセイされる物質が、適切に標識され、次いで、特定の細胞試験コロニーに、一定量の標識された物質および標識されていない物質の両方とともに播種し、この後、結合研究を、標識された物質が細胞レセプターに結合する程度を決定するために行う。この方法において、物質間の親和性の差を、確認し得る。

【0185】

従って、精製した量の特異的な結合メンバーを、放射標識し得、例えば、このメンバーに対する抗体または他のインヒビターと合わせ得、この後、結合研究を実施する。次いで、一定の量の、標識された未結合の特異的な結合メンバーおよび標識されていない未結合の特異的な結合メンバーを含む溶液を調製し、次いで、細胞サンプルを播種し、そしてその後、インキュベートする。次いで、得られた細胞の単層を洗浄し、溶解し、次いで十分な時間をかけて γ 線計数器で計数し、5%未満の標準誤差を得た。次いで、これらのデータを、Scatchard分析に供し、その後、物質の活性に関する観察および結果が得られ得る。上記は、例示であるが、レセプターアッセイが実施され得、そして利用され得る様式を例示し、この場合、アッセイされる材料の細胞結合能は、区別可能な特性として役立つ。

20

【0186】

本発明に従って有用であり、そして企図されるアッセイは、「シス／トランス」アッセイとして公知である。簡単には、このアッセイは、2種類の遺伝子構造を利用する、その一方は、代表的に、適切な細胞株中にトランスフェクトされた場合に、目的の特定のレセプターを構成的に発現するプラスミドであり、そしてその2番目は、レセプター／リガンド複合体の制御下で、ルシフェラーゼのようなレポーターを発現するプラスミドである。従って、例えば、特定のレセプターに対するリガンドとして化合物を評価することが所望される場合、そのプラスミドの一方は、選択された細胞株中でレセプターの発現を生じる構築物であるが、この2番目のプラスミドは、特定のレセプターに対する応答エレメントが挿入されている、ルシフェラーゼ遺伝子に連結されたプロモーターを有する。試験において化合物が、レセプターに対するアゴニストである場合、このリガンドは、レセプターとの複合体を形成し、そして得られた複合体は、応答エレメントに結合し、そしてルシフェラーゼ遺伝子の転写を開始する。次いで、得られた化学発光を、測光法により測定し、そして用量応答曲線を得、そして公知のリガンドの用量応答曲線と比較する。上記のプロトコールは、米国特許第4,981,784号およびPCT国際公開番号WO88/03168号（当業者がその目的について参照する）において詳細に記載されている。

30

40

【0187】

本発明のさらなる実施形態において、医療専門家による使用に適した市販の試験キットが、EGFRの異常な発現（推定される標的細胞中における、増幅されたEGFRおよび／またはEGFRの変異が挙げられるが、これらに限定されない）の存在または非存在を決定するために調製され得る。上記で議論した試験技術に従って、このようなキットの一つのクラスは、少なくとも標識されたEGFRまたはその結合パートナー（例えば、このE

50

G F Rに特異的な抗体)、および指示書を含み、当然、この指示書は、選択される方法(例えば、「競合」、「サンドイッチ」、「D A S P」など)に依存する。このキットはまた、周辺の試薬(例えば、緩衝液、安定剤など)も含むみ得る。

【0188】

従って、試験キットは、E G F Rの存在、またはE G F Rの異常な発現または翻訳後の改変に関する細胞の能力を実証するために調製され得、このキットは、以下：

(a) 本発明の特異的な結合メンバーまたはそれに対する特異的な結合パートナーを、検出可能なラベルに直接的または間接的に結合させることによって得られる、予め決められた量の少なくとも1種の標識された免疫学的反応成分；

(b) 他の試薬；および

(c) 上記キットの使用のための指示書、を含む。

10

【0189】

より具体的に、診断用試験キットは、以下：

(a) 一般に固相に結合して、イムノソルベントを形成するか、あるいは最終産物などのような適切なタグ(または、それらの結合パートナー)に結合する、上記のような公知の量の特異的な結合メンバー(または結合パートナー)

(b) 必要な場合、他の試薬；および

(c) 上記試験キットの使用のための指示書、を含む。

20

【0190】

さらなるバリエーションにおいて、この試験キットは、上述の目的のために調製および使用され得、これは、予め決められたプロトコール(例えば、「競合」、「サンドイッチ」、「二重抗体」など)に従って操作され、このキットは、以下：

(a) 特異的な結合メンバーを検出可能なラベルにカップリングすることによって得られた、標識された成分；

(b) 少なくとも1種の試薬が、リガンドまたは固定リガンドである、1種以上のさらなる免疫化学的試薬；および

(c) E F G RとE F G Rに対する特異的な結合メンバーとE F G Rに対する特異的な結合パートナーとの間の免疫化学的反応の1つ以上の成分を検出および／または測定するためのプロトコールの実施のための指示書、

30

を含むキットであって、このリガンドは、以下：

(i) 標識された成分(a)と結合し得るリガンド；

(i i) 標識された成分(a)の結合パートナーと結合し得るリガンド；

(i i i) 測定される、成分の少なくとも1種と結合し得るリガンド；および

(i v) 測定される、少なくとも1種の成分の結合パートナーの少なくとも1種と結合し得るリガンド、

からなる群から選択される。

【0191】

上記に従って、E F G Rの活性、E F G Rの異常な発現もしくは翻訳後の改変、および／または特異的な結合メンバーの活性もしくは結合を調節するのに有効な、潜在的な薬物をスクリーニングするためのアッセイシステムが、調製され得る。このレセプターまたは結合メンバーは、試験システムに導入され得、そしてこの推定薬物がまた、得られた細胞培養物中に導入され得、そしてその後、この培養物を、推定薬物単独の添加か、または公知の薬剤の追加量の効果のいずれかに起因する、細胞のS期活性におけるいかなる変化も観察するために試験され得る。

40

【0192】

(核酸)

本発明は、本発明の特異的な結合メンバーをコードする、単離された核酸を提供する。核酸は、D N AおよびR N Aを含有する。好ましい局面において、本発明は、上に定義され

50

るような本発明のポリペプチドをコードする核酸を提供し、これには、以下が挙げられる：配列番号2の残基93～102または配列番号2の26～35A、49～64および93～102として記載されるようなポリペプチド、配列番号4の残基24～34、50～56および89～97として記載されるようなポリペプチド、ならびに配列番号2および配列番号4のポリペプチド全体。

【0193】

本発明はまた、上記のような少なくとも1種のポリヌクレオチドを含む、プラスミド、ベクター、転写カセットまたは発現カセットの形態の構築物を提供する。

【0194】

本発明はまた、上記のような1種以上の構築物を含む、組換え宿主細胞を提供する。それ自体が提供される、任意の特異的な結合メンバーをコードする核酸は、特異的な結合メンバーの産生方法を同様に、本発明の局面を形成し、この方法は、コードする核酸からの発現を含む。発現は、適切な条件下で、核酸を含む組換え宿主細胞を培養することによって簡便に達成され得る。発現による産生後に、特異的な結合メンバーは、任意の適切な技術を使用して単離および／または精製され得、次いで適切に使用され得る。

【0195】

本発明に従う、特異的な結合メンバーならびにコードする核酸分子およびベクターを、例えば、それらの天然の環境から、実質的に純粋な形態もしくは均質な形態で単離および／または精製して提供し得、あるいは核酸の場合において、これらの特異的な結合メンバーならびにコードする核酸分子およびベクターは、必要とされる機能を有するポリペプチドをコードする配列以外の核酸または遺伝子起源を、含まないか、または実質的に含まないものであり得る。本発明に従う核酸は、DNAまたはRNAを含み得、そして全体的または部分的に合成され得る。

【0196】

種々の異なる宿主細胞において、ポリペプチドのクローニングおよび発現系は、周知である。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、酵母、およびバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当該分野で利用可能な哺乳動物の細胞株としては、チャイニーズハムスターの卵巣細胞、HeLa細胞、乳児ハムスターの腎臓細胞、NSOマウス黒色腫細胞および他に多くが挙げられる。一般に、好ましい細菌の宿主は、E. coliである。

【0197】

原核生物細胞（例えば、E. coli）における抗体および抗体フラグメントの発現は、当該分野で十分に確立されている。総説として、例えば、Plueckthum, A. B. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)を参照のこと。培養物中での真核生物細胞の発現はまた、特異的な結合メンバーの産生に関する選択肢として当業者に利用可能であり、最近の総説として、例えば、Raff, M. E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576; Trill J. J.ら (1995) Curr. Opinion Biotech. 6: 553-560を参照のこと。

【0198】

適切な調節配列を含む適切なベクターが、選択または構築され得、この調節配列としては、適切な場合、プロモーター配列、末端配列、ポリアデニル化配列、エンハンサー配列、マーカー遺伝子および他の配列が挙げられる。ベクターは、適切な場合、プラスミド、ウイルス（例えば、ファージまたはファージミド）であり得る。さらに詳細に、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 第2版、Sambrookら, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照のこと。核酸の操作（核酸構築物の調製、変異誘発、配列決定、DNAの細胞中への導入および遺伝子の発現、ならびにタンパク質の分析）のための多くの公知の技術およびプロトコルは、Short Protocols in Molecular Biology, 第2版, Ausubelら編, John Wiley

y & Sons, 1992に詳細に記載されている。SambrookらおよびAusbelらの開示は、本明細書中で参考として援用されている。

【0199】

従って、本発明のさらなる局面は、本明細書中に開示されるような核酸を含む宿主細胞を提供する。なおさらなる局面は、このような核酸を宿主細胞に導入する工程を包含する方法を提供する。この導入は、任意の利用可能な技術を利用し得る。適切な技術としては、真核生物細胞に関して、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-Dextran、エレクトロポレーション、リポソーム媒介トランスフェクション、およびレトロウイルスまたは他のウイルス（例えば、ワクシニアウイルス）が挙げられ得、あるいは昆虫細胞に関して、バキュロウイルスが挙げられ得る。細菌細胞に関して、適切な技術は、塩化カルシウム形質転換、エレクトロポレーション、およびバクテリオファージを使用するトランスフェクションが挙げられ得る。 10

【0200】

この導入の後に、例えば、遺伝子の発現のための条件下で宿主細胞を培養することによって、核酸から発現を引き起こすか、または核酸からの発現を可能にすることが続き得る。

【0201】

一つの実施形態において、本発明の核酸は、宿主細胞のゲノム（例えば、染色体）中に組み込まれる。組込みは、標準的な技術に従って、ゲノムとの組換えを促進する配列を包含することによって促進され得る。

【0202】

本発明はまた、上記の特異的結合メンバーまたはポリペプチドを発現させるための発現系において上述の構築物を使用する工程を包含する方法を提供する。 20

【0203】

上述のように、本発明はまた、配列番号2および／または配列番号4に記載のアミノ酸配列を有する、特異的結合メンバー、特に抗体またはそのフラグメントをコードする、組換えDNA分子もしくはクローン化された遺伝子、またはその縮重改変体に関し；好ましくは、この結合メンバーまたは抗体をコードする核酸分子、特に組換えDNA分子またはクローン化された遺伝子は、配列番号1および／もしくは配列番号3に提供されるヌクレオチド配列を有するかまたは配列番号1および／もしくは配列番号3に提供されるDNA配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する。 30

【0204】

本発明の別の特徴は、本明細書中に開示されるDNA配列の発現である。当該分野で周知のように、DNA配列は、適切な発現ベクター中の発現制御配列にそれらを作動可能に連結し、そしてその発現ベクターを使用して適切な単細胞宿主を形質転換することにより発現され得る。

【0205】

発現制御配列への、本発明のDNA配列のこのような作動可能な連結は、当然のことながら、既にそのDNA配列の一部でない場合は、そのDNA配列の上流の正しいリーディングフレームに開始コドンATGを準備することを含む。

【0206】

広範な種々の宿主／発現ベクターの組み合わせが、本発明のDNA配列を発現させる際に使用され得る。例えば、有用な発現ベクターは、染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNA配列のセグメントから構成され得る。適切なベクターとしては、以下が挙げられる：SV40の誘導体および公知の細菌プラスミド（例えば、E. coli プラスミドcolE1、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体、RP4のようなプラスミド）；ファージDNA（例えば、ファージλの多数の誘導体（例えば、NM989）および他のファージDNA（例えば、M13））ならびに線状一本鎖ファージDNA；2μプラスミドのような酵母プラスミドまたはその誘導体；真核生物細胞において有用なベクター（例えば、昆虫細胞または哺乳動物細胞において有用なベクター）；プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター（例えば、ファージD 40 50

NAまたは他の発現制御配列を使用するように改変されたプラスミド) ; など。

【0207】

任意の広範な種々の発現制御配列(その配列に作動可能に連結されたDNA配列の発現を制御する配列)は、本発明のDNA配列を発現させるためにこれらのベクターにおいて使用され得る。このような有用な発現制御配列としては、例えば、SV40、CMV、ワクシニア、ポリオーマまたはアデノウイルスの初期プロモーターもしくは後期プロモーター、lac系、trp系、TAC系、TRC系、LTR系、ファージλの主要オペレーター領域およびプロモーター領域、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼもしくは他の解糖酵素のプロモーター、酸性ホスファターゼ(例えば、Pho5)のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、ならびに原核生物細胞もしくは真核生物細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが公知の他の配列、およびこれらの組合せが挙げられる。 10

【0208】

広範な種々の単細胞宿主細胞はまた、本発明のDNA配列を発現する際に有用である。これらの宿主としては、以下が挙げられ得る: 周知の真核生物宿主および原核生物宿主(例えば、E. coli、Pseudomonas、Bacillus、Streptomycesの株)、真菌(例えば、酵母)、ならびに動物細胞(例えば、CHO細胞、YB/20細胞、NSO細胞、SP2/0細胞、R1.1細胞、B-W細胞、およびL-M細胞)、アフリカミドリザル腎臓細胞(例えば、COS1、COS7、BSC1、BSC40、およびBMT10)、昆虫細胞(例えば、Sf9)、ならびに組織培養物中のヒト細胞および植物細胞。 20

【0209】

全てのベクター、発現制御配列および宿主が、本発明のDNA配列を発現するように等しく十分に機能するのではないことが理解される。また、全ての宿主が、同じ発現系で等しく十分に機能するわけでもない。しかし、当業者は、本発明の範囲から逸脱することなく、所望の発現を達成するために過度の実験をすることなく、適切なベクター、発現制御配列、および宿主を選択することができる。例えば、ベクターを選択する際に、ベクターが宿主において機能しなければならないので、その宿主を考慮しなければならない。ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、およびそのベクターによりコードされる任意の他のタンパク質(例えば、抗生物質マーカー)の発現もまた考慮される。 30

【0210】

発現制御配列を選択する際に、種々の因子が、通常考慮される。これらとしては、例えば、その系の相対的強度、その制御可能性、および、特に潜在的2次構造に関して、発現される特定のDNA配列または遺伝子との適合性が挙げられる。適切な単細胞宿主は、以下を考慮することにより選択される: 例えば、選択されたベクターとのそれらの適合性、それらの分泌特徴、タンパク質を正確に折り畳むそれらの能力、およびそれらの発酵要件、ならびに発現されるDNA配列によりコードされる産物の宿主に対する毒性、および発現産物の精製の容易さ。

【0211】

これらおよび他の因子を考慮して、当業者は、発酵または大規模動物培養において本発明のDNA配列を発現する、種々のベクター/発現制御配列/宿主の組合せを構築し得る。 40

【0212】

特異的結合メンバーのアナログが、本発明の範囲内において、タンパク質複合体/由来するサブユニットのヌクレオチド配列から調製され得ることがさらに意図される。フラグメントのようなアナログは、例えば、特異的結合メンバー材料のペプシン消化により生成され得る。ムテインのような他のアナログは、特異的結合メンバーのコード配列の標準的な部位特異的変異誘発により生成され得る。プロモーターまたはインヒビターのどちらとして機能しても、低分子のような「特異的結合メンバー活性」を示すアナログは、公知のインビボアッセイおよび/またはインビトロアッセイにより同定され得る。

【0213】

上述のように、特異的結合メンバーをコードするDNA配列は、クローニングよりも合成により調製され得る。特異的結合メンバーアミノ酸配列についての適切なコドンを持つDNA配列が、設計され得る。一般的に、配列が発現に使用される場合、意図される宿主について好ましいコドンを選択する。完全な配列は、標準的な方法により調製される重複しているオリゴヌクレオチドから組み立てられ、そして完全なコード配列へと組み立てられる。例えば、Edge, Nature, 292:756 (1981); Nambairら, Science, 223:1299 (1984); Jayら, J. Biol. Chem., 259:6311 (1984)を参照のこと。

【0214】

合成DNA配列は、特異的結合メンバーのアナログまたは「ムテイン」を発現する遺伝子の都合の良い構築を可能にする。あるいは、ムテインをコードするDNAは、ネイティブ特異的結合メンバー遺伝子またはcDNAの部位特異的変異誘発により作製され得、そしてムテインは、従来のポリペプチド合成を使用して直接作製され得る。 10

【0215】

タンパク質への非天然アミノ酸の部位特異的組込みのための一般的な方法は、Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244:182-188 (1989年4月)に記載されている。この方法は、非天然アミノ酸を有するアナログを生成するために使用され得る。

【0216】

本発明は、翻訳レベルにおいてEGFRの発現を妨害するために使用され得る、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの調製に及ぶ。このアプローチは、アンチセンス核酸を有する特異的mRNAをマスクするかまたはそれをリボザイムで切断することのいずれかにより、そのmRNAの翻訳をブロックするために、アンチセンス核酸およびリボザイムを利用する。 20

【0217】

アンチセンス核酸は、特定のmRNA分子の少なくとも一部に対して相補的であるDNA分子またはRNA分子である。(Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988を参照のこと。)細胞において、アンチセンス核酸は、そのmRNAにハイブリダイズし、二本鎖分子を形成する。この細胞は、この二本鎖形態のmRNAを翻訳しない。従って、アンチセンス核酸は、mRNAのタンパク質への発現を妨害する。約15個のヌクレオチドのオリゴマーおよびAUG開始コドンにハイブリダイズする分子は、特に有効である。なぜなら、これらは、合成が容易であり、そしてこれらを産生細胞中に導入する場合に、より大きな分子よりも引き起こす問題が少ないからである。アンチセンス法は、多くの遺伝子のインビトロでの発現を阻害するために使用されている(Marcus-Sekura, 1988; Hamborら, 1988)。 30

【0218】

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼといくらか類似した様式で、他の一本鎖RNA分子を特異的に切断する能力を有するRNA分子である。リボザイムは、特定のmRNAが、それ自身のイントロンを切除する能力を有するという知見から発見された。これらのRNAのヌクレオチド配列を改変することにより、研究者らは、RNA分子中の特定のヌクレオチド配列を認識して、かつそれを切断する分子を操作することができた(Cech, 1988)。これらは配列特異的であるので、特定の配列を有するmRNAのみが、不活化される。 40

【0219】

研究者らは、2つの型のリボザイム、Tetrahymena型および「ハンマーヘッド」型を同定した。(HasselhoffおよびGerlach, 1988)。Tetrahymena型リボザイムは、4塩基の配列を認識するが、一方「ハンマーヘッド」型は、11~18の塩基の配列を認識する。認識配列が長いほど、排他的に標的mRNA種において起こる可能性が高くなる。したがって、ハンマーヘッド型リボザイムは、特定の 50

mRNA種を不活化するためにTetrahymena型リボザイムより望ましく、そして18個の塩基の認識配列は、より短い認識配列よりも望ましい。

【0220】

従って、本明細書中に記載されるDNA配列を使用して、EGFRおよびそのリガンドのmRNAに対するアンチセンス分子、およびこのmRNAを切断するリボザイムを調製し得る。

【0221】

本発明は、本発明の例示として提供される以下の非限定的な実施例を参照することによりよりよく理解され得る。以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために示されるが、いかなる場合も本発明の広い範囲を限定するとは解釈すべきではない。 10

【実施例】

【0222】

(実施例1)

(抗体の単離)

材料

(細胞株)

免疫化および特異性分析のために、ネイティブか、あるいは正常、野生型または「wt EGFR」遺伝子もしくは $\Delta 2-7$ 欠失変異を有する Δ EGFR遺伝子でトランスフェクトされたいくつかの細胞株が使用された：マウス線維芽細胞株NR6、NR6 Δ EGFR (Δ EGFRでトランスフェクトされた) およびNR6_{wt EGFR} (wt EGFRでトランスフェクトされた)、ヒト神経膠芽細胞腫細胞株U87MG (低レベルの内因性wt EGFRを発現する)、U87MG_{wt EGFR} (wt EGFRでトランスフェクトされた)、U87MG Δ EGFR (Δ EGFRでトランスフェクトされた)、およびヒト扁平上皮癌細胞株A431 (高レベルのwt EGFRを発現する) [38]である。細胞株およびトランスフェクションは、以前に記載された(Nishikawa R., ら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91(16):7727-7731)。 20

【0223】

U87MG星状細胞腫細胞株(20) (内因的に低レベルのwt EGFRを発現する)を、 $\Delta 2-7$ EGFRを含有するレトロウイルスに感染させて、U87MG $\Delta 2-7$ 細胞株を産生した(10)。トランスフェクトされた細胞株U87MG_{wt EGFR}を、Naganeら1996(Cancer Res., 56:5079-5086)に記載されるように生成した。U87MG細胞は、約 1×10^5 個のEGFRを発現するが、U87MG_{wt EGFR}細胞は、約 1×10^6 個のEGFRを発現し、従って遺伝子増幅で見られる状況を模倣する。 30

【0224】

ヒト扁平上皮癌A431細胞を、ATCC(Rockville, MD)から入手した。全ての細胞株を、10%FCS(CSL, Melbourne, Australia)を補充した、GlutaMAXTM (Life Technologies, Melbourne, Australia)を含むDMEM/F-12中で培養した。 40

【0225】

(試薬)

$\Delta 2-7$ EGFRからのビオチン化した特有の接合部(junctional)ペプチド(ビオチン-LEEKKGNYVVTDH(配列番号5)およびLEEKKGNYVVTDH-ビオチン(配列番号6))を、標準的なFmoc化学により合成し、純度(>96%)を、逆相HPLCおよび質量スペクトル分析(Auspep, Melbourne, Australia)により決定した。

【0226】

(研究で使用する抗体)

本発明者らの発見を他の試薬と比較するために、さらなるmAbを、本発明者らの研究に 50

含めた。これらの試薬は、wt EGF Rに対するmAb 528 (Sato, J. D. ら (1983) Mol. Biol. Med. 1 (5) : 511-529)、およびΔ2-7 EGF R欠失変異の接合部配列にわたる合成ペプチドに対して生成されたDH8. 3である。このDH8. 3抗体 (IgG1) は、以前に記載されており (Hills ら, 1995, Int. J. Cancer 63 (4) : 537-543)、そしてde2-7 EGF Rにおいて見出される特有の接合部ペプチドを用いてマウスを免疫化した後に得られた (16)。この528抗体 (de2-7および野生型EGF Rの両方を認識する) は、以前に記載されており (21)、そしてATCC HB-8509から得られるハイブリドーマを使用して、Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) において生成された。SC-03は、EGF Rのカルボキシ末端ペプチドに対して惹起され、アフィニティ精製されたウサギポリクローナル抗体である (Santa Cruz Biotechnology Inc.)。

【0227】

(モノクローナル抗体の作製)

マウス線維芽細胞株NR6_{ΔEGFR}を免疫原として使用した。マウスハイブリドーマを、アジュバント中に $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 個の細胞で、皮下に2~3週間の間隔で5回BALB/cマウスを免疫することにより作製した。完全フロイントアジュバントを、第1の注射に使用した。その後、不完全フロイントアジュバント (Difco) を使用した。免疫したマウス由来の脾臓細胞を、マウス骨髄腫細胞株SP2/0と融合させた。新しく作製したクローンの上清を、細胞株NR6、NR6_{wtEGFR}、およびNR6_{ΔEGFR}との反応性について血球吸着アッセイでスクリーニングし、次いでヒト神経膠芽細胞株U87MG、U87MG_{wtEGFR}、およびU87MG_{ΔEGFR}を用いる血球吸着アッセイにより分析した。選択されたハイブリドーマ上清を、続けてウエスタンブロットにより試験し、そして免疫組織化学によりさらに分析した。予測された反応性パターンを示す新しく生成されたmAbを、精製した。

【0228】

5つのハイブリドーマを樹立し、そして、3つのクローン124 (IgG2a)、806 (IgG2b) および1133 (IgG2a) を、血球凝集アッセイにおけるNR6_{ΔEGFR}の高い力価およびNR6細胞およびNR6_{wtEGFR}細胞における低いバックグラウンドに基づいて、さらなる特徴付けのために選択した。その後の血球凝集分析において、これらの抗体は、ネイティブヒト神経膠芽細胞腫細胞株U87MGおよびU87MG_{wtEGFR}とに反応性を示さなかった (希釈していない上清で $\leq 10\%$) が、U87MG_{ΔEGFR}とは強い反応性であり; A431とのより低い反応性が見られた。対照的に、FACS分析において、806は、ネイティブU87MGと非反応性であり、そしてU87MG_{ΔEGFR}を強く染色し、そしてより低い程度でU87MG_{wtEGFR}を染色し、このことは、ΔEGFRおよびwtEGFRの両方への806の結合を示す (以下を参照のこと)。

【0229】

ウエスタンブロットアッセイにおいて、次いで、mAb 124、mAb 806 および mAb 1133 を、wtEGFR および ΔEGFR との反応性について分析した。界面活性剤溶解物を、NR6_{ΔEGFR}、U87MG_{ΔEGFR} および A431 から抽出した。3つのmAb全てが、細胞溶解物との類似した反応性パターンを示し、wtEGFRタンパク質 (170 kDa) および ΔEGFRタンパク質 (140 kDa) の両方を染色した。基準試薬として、wtEGFRと反応性であることが既知 (Waterfield M. D. ら (1982) J. Cell Biochem. 20 (2) : 149-161) のmAb R. I を、ウエスタンブロット分析において非反応性であることが既知のmAb 528の代わりに使用した。mAb R. I は、wtEGFR および ΔEGFR との反応性を示した。3つの新たに作製されたクローンの全てが、ΔEGFRとの反応性およびwtEGFRとのより少ない反応性を示した。DH8. 3は、U87MG_{ΔEGFR} およ

びNR6 Δ EGFRの溶解物中で唯一ポジティブであった。

【0230】

異種移植片腫瘍U87MG、U87MG Δ EGFR、およびA431におけるクローン124、806、および1133ならびにmAb 528およびmAb DH8.3の免疫組織化学的分析を表1に示す。全てのmAbは、異種移植片U87MG Δ EGFRの強い染色を示した。mAb 528のみが、ネイティブU87MG異種移植片においける弱い反応性を示した。A431異種移植片において、mAb 528は、強い均一な反応性を示した。MAb124、MAb806、およびMAb1133は、A431の扁平上皮細胞癌の最も底部に位置する細胞との反応性が明らかとなり、そして上部細胞層または角化成分とは反応しなかった。DH8.3は、A431異種移植片においてネガティブであった。 10

【0231】

(表1)

(抗体528、DH8.3および124、806および1133の免疫組織化学的分析)

【0232】

【表4】

Mab	異種移植片 AU87MG Δ EGFR	異種移植片A431	異種移植片U87MG (ネイティブ)
528	ポジティブ	ポジティブ	ポジティブ(集中した染色)
mAb-124	ポジティブ	ポジティブ(主に基底細胞)	-
mAb-806	ポジティブ	ポジティブ(主に基底細胞)	-
mAb-1133	ポジティブ	ポジティブ(主に基底細胞)	-
DH8.3	ポジティブ	-	-

20

内因性マウス抗体の検出に起因する少量の間質染色

(実施例2)

(FACSによる細胞株への抗体の結合)

mAb806の特異性を決定するために、U87MG細胞、U87MG Δ 2-7細胞およびU87MG.wtEGFR細胞に対するその結合を、フロー活性化細胞ソーティング(flow activated cell sorting)(FACS)により分析した。簡潔には、細胞を関連抗体(10 μ g/ml)次いでフルオレセイン結合ヤギ抗マウスIgG(1:100希釈; Calbiochem San Diego, USA)で標識した。FACSデータを、最少で5,000事象を観測することによりCoulter Epics Elite ESPで得、そしてWindows(登録商標)用EXP O(バージョン2)を使用して分析した。非関連IgG2bは、mAb 806についてのアイソタイプコントロールとして含まれ、そして528抗体は、de2-7EGFRおよびwtEGFRの両方を認識するので含まれた。 30

【0233】

528抗体のみが、親U87MG細胞株を染色し得た(図1)。このことは、これらの細胞がwtEGFRを発現することを実証する以前の報告(Nishikawaら、1994)と一致している。MAb 806およびDH8.3は、コントロール抗体と同様の結合レベルを有しており、明らかにこれらがwtレセプターと結合できないことを実証している(図1)。U87MG Δ 2-7細胞およびU87MG.wtEGFR細胞へのアイソタイプコントロール抗体の結合は、U87MG細胞について観察された結合と同様であった。 40

【0234】

MAb 806は、U87MG Δ 2-7細胞およびU87MG.wtEGFR細胞を染色した。このことは、mAb 806が、de2-7EGFRおよび増幅されたEGF 50

Rを特異的に認識することを示す(図1)。DH8.3抗体は、U87MG.Δ2-7細胞を染色した。このことは、DH8.3抗体が、de2-7 EGF Rを特異的に認識することを裏付けした(図1)。予測されたとおり、528抗体は、U87MG.Δ2-7細胞株およびU87MG.wt EGF R細胞株の両方を染色した(図1)。予測されたとおり、528抗体は、これらの細胞において同時発現されるde2-7レセプターおよび野生型細胞の両方に結合するので、親細胞より高い強度でU87MG.Δ2-7を染色した(図1)。同様の結果を、ヒト赤血球(O型)でコーティングされたプロテインAの標的細胞への出現により表面結合IgGを検出するプロテインA混合血球吸着を使用して得た。モノクローナル抗体806は、U87MG.Δ2-7細胞と反応性であったが、U87MG発現野生型EGF-Rとは有意な反応性を示さなかった(希釈していない上清で100%未満)。

【0235】

(実施例3)

(アッセイにおける抗体の結合)

mAb 806およびDH8.3抗体の特異性をさらに特徴付けるために、これらの結合を、ELISAにより調べた。2つの型のELISAを、これらの抗体の特異性を決定するために使用した。第1のアッセイにおいて、プレートをsEGFR(0.1M炭酸塩緩衝液(pH 9.2)中10μg/ml)で2時間コーティングし、次いでPBS中の2%ヒト血清アルブミン(HSA)でブロックした。sEGFRは、野生型EGFRの組換え細胞外ドメイン(アミノ酸1~621)であり、そして以前に記載されるように生成した(22)。抗体を、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)中2%HSA中の増加する濃度において3連でウェルに加えた。結合した抗体を、基質としてABTS(Sigma, Sydney, Australia)を使用して西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヒツジ抗マウスIgG(Silenus, Melbourne, Australia)により検出し、そして吸光度を405nmで測定した。

【0236】

mAb 806および528抗体の両方が、固定化された野生型sEGFRに対する用量依存性でかつ飽和した結合を示した(図2A)。de2-7 EGF R中に見出される特有の接合部ペプチドが、sEGFR内に含まれていないので、mAb 806は、野生型EGFR配列内に位置するエピトープに結合していなければならない。この528抗体の結合は、mAb 806について観察された結合より低かった。予測されたとおり、DH8.3抗体は、10μg/mlまでの濃度でさえ野生型sEGFRに結合しなかった(図2A)。溶液中のsEGFRは、用量依存性様式で、固定化されたsEGFRへの528抗体の結合を阻害したが、mAb 806の結合を阻害することはできなかった(図2B)。このことは、mAb 806が、一旦ELISAプレートに固定化された(コンホメーション変化を誘導し得るプロセス)野生型EGFRのみに結合し得ることを示唆する。同様の結果が、BIAcoreを使用して観察され、これによりmAb 806は、固定化されたsEGFRを結合したが、固定化されたmAb 806は、溶液中のsEGFRを結合することができなかった(データ示さず)。DH8.3抗体は、特有のde2-7 EGF Rペプチドに対する用量依存性でかつ飽和可能な結合を示した(図2C)。

【0237】

第2のアッセイでは、ビオチン化されたde2-7特異的ペプチド(ビオチン-LEEK KGN YVVT DH(配列番号5))を、ストレプトアビジン(Pierce, Rockford, Illinois)で予めコーティングされたELISAプレートに結合させた。抗体を、第1のアッセイにおけるのと同じようにして、結合させ、そして検出した。mAb 806も528抗体も、DH8.3の飽和結合を得るために使用された濃度よりも高い濃度においてさえ、ペプチドに結合しなかった。このことはさらに、mAb 806が、このペプチド内のエピトープ決定基を認識しないことを示している。

【0238】

mAb 806が、接合部ペプチドとは異なるエピトープを認識することをさらに実証す

るために、さらなる実験を行った。C末端をビオチン化したde2-7ペプチド(LEEKKNYVVTDH-ビオチン(配列番号6))を、de2-7ペプチドに対して生成されたmAb 806およびmAb L8A4と共に、研究において使用した(Reist, CJら(1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382; Foulon CFら(2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460)。

【0239】

(ペプチド研究において使用された試薬)

接合部ペプチド:LEEKKNYVVTDH-OH(Bioscience, Camarillo, CA);

ペプチドC:LEEKKNYVVTDH(K-Biot)-OH(Bioscience, Camarillo, CA);

sEGFR:野生型EGFRのCHO細胞由来組換え可溶性細胞外ドメイン(aal-621)(LICR Melbourne);

mAb 806:マウスモノクローナル抗体、IgG_{2b}(LICR NYB);

mAb L8A4:マウスモノクローナル抗体、IgG₁(Duke University);

IgG₁アイソタイプコントロールmAb;

IgG_{2b}アイソタイプコントロールmAb。

【0240】

ペプチドCを、350RU(+/-30RU)の表面密度で、ストレプトアビジンマイクロセンサーチップ上に固定した。mAbの段階希釈物を、ペプチドとの反応性について試験した。ビオチン化されていないペプチドを用いたブロック実験を行って、特異性を評価した。

【0241】

mAb L8A4は、低い抗体濃度(6.25nM)においてでさえ、ペプチドCと強い反応性を示した(図2D)。mAb 806は、100nMの抗体濃度(試験された最高濃度)まで、ペプチドCと検出可能な特異的反応性を示さなかった(図2Dおよび2E)。mAb L8A4は、ペプチドCと反応することが予期された。なぜなら、このペプチドは、mAb L8A4の生成において免疫原として使用されたからである。接合部ペプチド(非ビオチン化、50μg/ml)の添加により、ペプチドCとmAb L8A4の反応は完全にブロックされる。このことにより、接合部ペプチドのエピトープに対する抗体の特異性が確認される。

【0242】

第2セットのBIACore実験では、sEGFRを、約4000RUの表面密度で、CMマイクロセンサーチップ上に固定した。mAbの段階希釈物を、sEGFRとの反応性について試験した。

【0243】

mAb 806は、変性したsEGFRと強く反応性であったが、mAb L8A4は、変性したsEGFRと反応しなかった。変性したsEGFRとmAb 806の反応性は、抗体濃度が減少するにつれて減少する。mAb L8A4は、sEGFRとは反応しないことが予期された。なぜなら、mAb L8A4は、免疫原として接合部ペプチドを使用することにより生成されたものであり、そしてsEGFRは接合部ペプチドを含まないからである。

【0244】

ドットプロット免疫染色実験もまた実施した。ペプチドの段階希釈物を、PVDFメンブレンまたはニトロセルロースメンブレン上に0.5μlでスポットした。メンブレンを、PBS中の2%BSAでブロックし、次いで、806抗体、L8A4抗体、DH8.3抗体およびコントロール抗体でプローブした。L8A4抗体およびDH8.3抗体は、メンブレン上でペプチドに結合した(データは示さず)。L8A4が明らかに結合を示した濃

10

20

30

40

50

度において、mAb 806はペプチドを結合しなかった（データは示さず）。コントロール抗体もまた、ペプチド結合についてネガティブであった。

【0245】

mAb 806は、イムノブロッティング後の細胞溶解産物中で、wt EGFRに結合した（結果は示さず）。このことは、de2-7 EGFRと反応したがwt EGFRとは反応しなかった、DH8.3抗体で得られた結果とは異なる。従って、mAb 806は、レセプターが細胞表面上においてその天然の状態にある場合を除き、変性後のwt EGFRを認識し得る。

【0246】

（実施例4）

（スキッチャード分析）

U87MG. Δ2-7細胞を使用するスキッチャード分析を、免疫反応性についての補正後に実施して、各抗体の相対的親和性を決定した。抗体を、¹²⁵I（Amrad、Melbourne、Australia）で、クロラミンT方法により標識化し、そして免疫反応性を、Lindmoアッセイ（23）により決定した。すべての結合アッセイを、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の生存U87MG. Δ2-7細胞またはA431細胞において、1% HSA/PBS中で90分間にわたり4℃で穏やかに回転させながら実施した。 10 ng/ml の¹²⁵I標識化抗体の一定の濃度セットを、適切な未標識抗体の漸増濃度の存在下において使用した。非特異的結合は、10,000倍過剰の未標識抗体の存在下において決定された。インキュベーションの完了後、細胞を洗浄し、そしてCOBRA II γ 20
計数器（Packard Instrument Company、Meriden、USA）を用いて、結合した¹²⁵I標識化抗体について計数した。

【0247】

mAb 806およびDH8.3抗体は両方とも、ヨウ素化された場合に高い免疫反応性を保持しており、そして代表的には、mAb 806については90%より高く、そしてDH8.3抗体については45~50%高かった。mAb 806は、de2-7 EGFRレセプターに対して、 $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有したが、DH8.3の親和性は、 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ でおよそ1/10倍近く低かった。¹²⁵Iで放射性標識されたmAb 806も、¹²⁵Iで放射性標識されたDH8.3抗体も、親のU87MG細胞には結合しなかった。mAb 806は、1細胞あたり平均で 2.4×10^5 個の結合 30
部位を認識し、DH8.3抗体は、平均で 5.2×10^5 個の部位に結合した。従って、この抗体間でレセプター数に良好な一致が見られるだけでなく、同じ細胞株で異なるde2-7 EGFR特異的抗体により測定された場合に1細胞あたり 2.5×10^5 個のde2-7レセプターを示した以前の報告（25）とも良好な一致を示した。

【0248】

（実施例5）

（U87MG. Δ2-7細胞による、抗体のインターナリゼーション）

標的細胞への結合後に抗体をインターナリゼーションする速度は、その腫瘍標的化特性および治療対象の両方に影響を及ぼす。従って、本発明者らは、FACSによって、U87MG. Δ2-7細胞への結合後のmAb 806およびDH8.3抗体のインターナリゼーションを試験した。U87MG. Δ2-7細胞を、DMEM中で4℃にて1時間にわたり、mAb 806またはDH8.3抗体（ $10 \mu\text{g/ml}$ ）のいずれかと共にインキュベートした。洗浄後、細胞を、37℃に予め暖めておいたDMEMに移し、そして37℃でのインキュベーション後の種々の時点で、アリコートを採取した。氷冷洗浄緩衝液（1% HSA/PBS）中でアリコートを迅速に洗浄することによって、インターナリゼーションを停止させた。時間経過の終了時に、細胞を、上記のようにFACSによって染色した。インターナリゼーションのパーセンテージを、以下の式を使用して、0時間目に対して種々の時点での表面抗体染色を比較することにより算出した：インターナライズされた抗体のパーセント = $(x \text{ 時間目の平均蛍光} - \text{バックグラウンド蛍光}) / (0 \text{ 時間目の平均蛍光} - \text{バックグラウンド蛍光}) \times 100$ 。この方法は、以前（24）に記載されたような 50

インターナリゼーションを測定するためのヨウ素化抗体 (mAb 806) を使用して、1 アッセイで確認された。異なる時点でのインターナリゼーション速度の差異を、スチューデント t 検定を使用して比較した。

【0249】

両方の抗体は、mAb 806 については10分間で、そしてDH8.3については30分間で定常状態レベルに達する比較的急速なインターナリゼーションを示した (図3)。DH8.3のインターナリゼーションは、速度 (mAb 806 についての36.8%と比較して、10分間でインターナライズされたDH8.3は80.5%、 $p < 0.01$) および60分間でインターナライズされた総量 (30.4%に対して93.5%、 $p < 0.001$) の両方に関して有意に高かった。mAb 806 は、実施された4回のアッセイすべてにおいて、20分間目と比較して30分間目および60分間目には、わずかに低いレベルのインターナリゼーションを示した (図3)。この結果はまた、ヨウ素化されたmAb 806 に基づくインターナリゼーションアッセイを使用して確認された。

10

【0250】

(実施例6)

(抗体のインターナリゼーションの電子顕微鏡検査分析)

抗体間でのインターナリゼーション速度における上記で着目された差異を考慮して、抗体の細胞内輸送に関する詳細な分析を、電子顕微鏡検査を使用して実施した。

【0251】

U87MG、Δ2-7細胞を、ゼラチンコーティングされたチャンバースライド (Nunc、Naperville、IL) 上で80%コンフルエンスまで増殖させ、次いで、氷冷DMEMで洗浄した。次いで、細胞を、DMEM中で45分間にわたり4℃で、mAb 806 またはDH8.3抗体と共にインキュベートした。洗浄後、細胞を、金結合体化 (20nm粒子) 抗マウスIgG (BBInternational、Cardiff、UK) と共に、4℃にてさらに30分間インキュベートした。さらなる洗浄後、予め暖めておいたDMEM/10%FCSを細胞に添加し、これを、37℃で1~60分間の種々の時間にわたりインキュベートした。抗体のインターナリゼーションを、氷冷培地によって停止させ、そして、PBS/0.1%HSA中の2.5%グルタルアルデヒドを用いて細胞を固定し、次いで、2.5%四酸化オスミウム中で後固定 (post-fix) した。段階的な一連のアセトンを通して脱水した後、サンプルをEpon/Araldite 樹脂中に包埋し、Reichert Ultracut-Sミクロトーム (Leica) を用いて超薄切片として切り出し、そしてニッケルグリッド上に収集した。この切片を、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、その後、Philips CM12透過電子顕微鏡において80kVで観察した。コーティングされた孔内に含まれた金粒子の統計分析を、カイ2乗検定を用いて実施した。

20

30

【0252】

DH8.3抗体は、コーティングされた孔を介して優勢にインターナライズされたが、mAb 806 は、マクロピノサイトーシスによってインターナライズされるようであった (図19)。実際、mAb 806 と共にインキュベートされた細胞において形成された32個のコーティングされた孔の詳細な分析によって、これらがいずれも抗体を含まないことが明らかにされた。対照的に、DH8.3と共にインキュベートされた細胞由来のすべてのコーティングされた孔のうちの約20%が、抗体についてポジティブであり、多数のものは複数の金粒子を含んだ。コーティングされた孔に含まれた金粒子の総数に関する統計分析によって、この差異が高度に有意 ($p < 0.01$) であることが見出された。20~30分後、両方の抗体は、形態学的にリソソームに類似した構造体において観察され得る。これらの構造体内における細胞碎片の存在はまた、そのリソソームの性質と一致した。

40

【0253】

(実施例7)

(腫瘍保有ヌードマウスにおける抗体の生体内分布)

50

mAb 806およびDH8.3抗体の生体内分布を、一方の側にU87MG異種移植片を含みかつ他方の側にU87MG.Δ2-7異種移植片を含むヌードマウスにおいて比較した。比較的短い時間を、この研究のために選択した。なぜなら、以前の報告により、DH8.3抗体は、4～24時間の間に腫瘍標的化のピークレベルを示すことが実証されていたからである(16)。

【0254】

腫瘍異種移植片を、 3×10^6 個のU87MG細胞、U87MG.Δ2-7細胞またはA431細胞のs.c.注射によって、ヌードBALB/cマウスにおいて確立した。U87MG.Δ2-7異種移植片におけるde2-7EGFRの発現は、生体内分布の全期間を通じて安定なままであった。また、A431細胞は、免疫組織化学によって決定されるように腫瘍異種移植片として増殖される場合に、mAb 806とのその反応性を保持していた(データは示さず)。U87MG細胞またはA431細胞を一方の側で、U87MG.Δ2-7細胞を他方の側に注射する7～10日前に注射した。この理由は、de2-7EGFRを発現する異種移植片について観察されたより早い増殖速度の為である。抗体を放射性標識し、そして上記のようにして免疫反応性について評価し、そして腫瘍が100～200mg重量になった時点で、眼窩後方(retro-orbital)経路によりマウスに注射した。各マウスは、2種類の異なる抗体(1抗体あたり2μg)を受けた: $2 \mu\text{Ci}$ の ^{125}I 標識化mAb 806および $2 \mu\text{Ci}$ の ^{131}I 標識化DH8.3または528。示されない限り、5匹のマウスの群を、感染後の種々の時点で屠殺し、そして心臓穿刺によって採血した。腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓および肺を、切開によって得た。すべての組織の重さを測り、そして二重チャンネル計数Windowを使用して、 ^{125}I および ^{131}I 活性についてアッセイした。データは、注射された用量標準に対して比較することによって決定される%ID/g腫瘍として各抗体について表されるか、または腫瘍対血液/肝臓比に変換された(すなわち、%ID/g腫瘍を、%ID/g血液または肝臓で除算した)。群間の差異を、スチューデントt検定によって分析した。

【0255】

%ID/g腫瘍に関して、mAb 806は、8時間で18.6% m/gの腫瘍のU87MG.Δ2-7異種移植片においてそのピークレベルに達した(図4A)。これは、血液を除くすべての他の組織よりもかなり高い。DH8.3もまた8時間でピーク腫瘍レベルを示したが、そのレベルは、mAb 806と比較して、統計的により低い($p < 0.001$) 8.8% m/g腫瘍であった(図4B)。両方の抗体のレベルは、24時間目および48時間目には緩やかに低下した。いずれの抗体も、U87MG親異種移植片の特異的標的化を示さなかった(図4A、B)。腫瘍対血液/肝臓比に関して、mAb 806は、血液(1.3の比)および肝臓(6.1の比)の両方について、24時間目に最高の比を示した(図5A、B)。DH8.3抗体は、血液中では8時間目に(0.38の比)、そして肝臓では24時間目に(1.5の比)、その最高比率を有した(図5A、B)。これらは両方とも、mAb 806について得られた値よりもかなり低かった。

【0256】

上記のように、腫瘍内におけるmAb 806のレベルは8時間目にピークに達した。このピークは、多くの腫瘍標的化抗体と比較して比較的早い。これは、同様の用量の抗体を使用する場合に感染後4～24時間目にすべてピークを示した、de2-7EGFR特異的抗体を使用した他の研究と完全に一致する(16、25、33)。実際、初期の報告とは異なり、8時間目の時点は、抗体標的化が迅速にピークに達するという仮定のもとに含まれていた。mAb 806で観察された%ID/g腫瘍は、標準的なヨウ素化技術を使用した場合に他のde2-7EGFR特異的抗体について報告されていたものと類似していた(16、24、32)。この早期ピークの理由はおそらく、2つの部分から構成される。第1には、de2-7EGFRを発現する腫瘍(トランスフェクトされたU87MG細胞を含む)は、腫瘍異種移植片として極めて迅速に増殖する。従って、これらの生体内分布研究において使用された比較的短い期間の間でさえ、腫瘍のサイズは、%ID/g腫瘍が、緩やかに増殖する腫瘍と比較して低減されるような程度(4日間にわたっ

て質量において5～10倍増加)まで増加する。第2に、mAb 806のインターナリゼーションは、DH8.3と比較して比較的緩徐であったが;それはなお、多くの他の腫瘍抗体/抗原系と比較すると迅速である。インターナライズされた抗体は、迅速なタンパク質分解を受け、その分解産物が細胞から排泄される(34)。このインターナリゼーション、分解および排泄のプロセスは、細胞内に保持されるヨウ素化抗体の量を減少させる。結果として、インターナライズされる抗体は、そのインターナライズされない対応物よりも低いレベルの標的化を示す。本明細書で報告された電子顕微鏡データは、インターナライズされたmAb 806が迅速にリソソームに輸送され、このリソソームにおいて迅速な分解がおそらく生じることを実証する。この観察は、細胞からのヨウ素の迅速な排泄と一致する。

10

【0257】

de2-7 EGFRにおいて見出された固有の接合部ペプチドに対する以前に記載されたL8A4モノクローナル抗体は、mAb 806と同様の様式(35)で挙動する。de2-7 EGFRでトランスフェクトされたU87MG細胞を使用すると、この抗体は、類似のインターナリゼーション速度を有し(mAb 806についての1時間で30%と比較して、1時間で35%)、そしてde2-7 EGFRでトランスフェクトされた3T3線維芽細胞を使用した場合に匹敵するインビボ標的化を示した(mAb 806についての8時間で18% ID/g腫瘍と比較して、24時間で24% ID/g腫瘍のピーク)(25)。興味深いことに、腫瘍異種移植片におけるこの抗体のインビボ保持率は、N-スクシンイミジル5-ヨード-3-ピリジンカルボキシレートで標識された場合に増強された(25)。この標識化された補欠分子族は、リソソームのpHでは正に荷電し、そのため、増強された細胞保持率を有する(33)。保持率の増強は、放射性免疫治療用の抗体を考慮する場合に潜在的に有用であり、そしてこの方法を使用して、ヨウ素化されたmAb 806またはそのフラグメントの保持率を改善し得る。

20

【0258】

(実施例8)

(増幅されたEGFRを含有する細胞へのmAb 806の結合)

mAb 806が、増幅されたレセプター遺伝子を含有する細胞において発現されるEGFRを認識し得るか否かを試験するために、A431細胞に対するその結合を分析した。以前に記載されたように、A431細胞は、ヒト扁平上皮癌細胞であり、そして高レベルのwt EGFRを発現する。A431細胞に対するmAb 806の弱い再現性は高い結合が、FACS分析によって観察された(図6)。DH8.3抗体はA431細胞に結合しなかった。このことは、mAb 806の結合が、de2-7 EGFRの低レベル発現の結果ではなかったことを示す(図6)。予期されたように、抗EGFR 528抗体は、A431細胞の強い染色を示した(図6)。この結果を考慮して、A431に対するmAb 806の結合を、スキッチャード分析によって特徴付けた。ヨウ素化されたmAb 806の結合は比較的低かったが、スキッチャードについて一貫したデータを得ることが可能であった。このような実験の平均は、1細胞あたり 2.4×10^5 レセプターで、 $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性値を与えた。従って、このレセプターについての親和性は、de2-7 EGFRについての親和性よりもおよそ1/10倍近く低かった。さらに、mAb 806は、A431細胞表面上に見出されるEGFRの小さな部分のみを認識するようである。528抗体を使用して、本発明者らは、1細胞あたり約 2×10^6 個のレセプターを測定した。これは、多くの他の研究(26)と一致する。

30

40

【0259】

mAb 806による野生型sEGFRの認識は明らかに、エピトープを露出させるためのレセプターのいくらかの変性を必要とする。必要とされる変性の程度はごくわずかにすぎない。なぜなら、プラスチック表面上への野生型sEGFRの吸着でさえ、ELISAアッセイにおいてmAb 806の頑強な結合を誘導したからである。mAb 806のみが、A431細胞表面上で約10%のEGFRに結合したので、このレセプターのサブセットがde2-7 EGFR短縮化によって誘導されるのと同様のコンフォメーション変

50

化を有し得ると推測することは興味を引く。実際、A 4 3 1 細胞において遺伝子増幅により媒介される E G F R の極めて高い発現は、いくつかのレセプターを不適切にプロセシングさせ、これによりコンフォメーション変化を誘導し得る。興味深いことに、m A b 8 0 6 による A 4 3 1 細胞溶解産物の半定量的イムノブロッティングによって、m A b 8 0 6 が、S D S - P A G E およびウェスタンブロッティング後に、大半の A 4 3 1 E G F R レセプターを認識し得ることが示された。この結果はさらに、m A b 8 0 6 が、コンフォメーション変化を有する、A 4 3 1 細胞表面上のレセプターサブセットに結合するという議論を支持する。A 4 3 1 細胞におけるこれらの観察は、m A b 8 0 6 が、E G F R 遺伝子の増幅物を含むグリオーマに結合することを示した免疫組織化学データと一致する。m A b 8 0 6 の結合は、親の U 8 7 M G 細胞に対しては完全にネガティブであったので、この表現型は、増幅された E G F R を含む細胞に限定され得る（しかし、U 8 7 M G 細胞表面における「変性」レセプターのレベルは、検出レベル未満であり得る）ように思われた。しかし、ヨウ素化された m A b 8 0 6 は、 1×10^7 個までの細胞を含む U 8 7 M G 細胞ペレットに結合しなかったため、この可能性は低いように思われた。

【0 2 6 0】

（実施例 9）

（m A b 8 0 6 による A 4 3 1 細胞のインビボ標的化）

第 2 の生体内分布研究を、m A b 8 0 6 を用いて実施することにより、m A b 8 0 6 が A 4 3 1 腫瘍異種移植片を標的化し得るか否かを決定した。この研究を、より長い期間にわたって行い、m A b 8 0 6（これは、ポジティブコントロールとして、すべてのマウスに含まれた）による U 8 7 M G、 $\Delta 2-7$ 異種移植片の標的化に関してより多くの情報を得た。さらに、抗 E G F R 5 2 8 抗体を、A 4 3 1 異種移植片についてのポジティブコントロールとして含ませた。なぜなら、以前の研究により、ヌードマウスにおいて増殖した A 4 3 1 細胞に対するこの抗体の弱い有意な標的化が示されていたからである（2 1）。

【0 2 6 1】

最初の 4 8 時間の間、m A b 8 0 6 は、最初の実験において観察されたものとほぼ同一の標的化特性を示した（図 4 A と比較した図 7 A）。% I D / g 腫瘍に関して、U 8 7 M G、 $\Delta 2-7$ 異種移植片における m A b 8 0 6 のレベルは、2 4 時間後に緩やかに低下したが、常に、正常組織において検出されるよりも高いレベルを維持していた。A 4 3 1 異種移植片における取り込みは比較的低かったが、最初の 2 4 時間の間では、正常組織（例えば、肝臓、脾臓、腎臓および肺）では観察されない % I D / g 腫瘍の小さな増加が見られた（図 7 A）。5 2 8 抗体の取り込みは、% I D / g 腫瘍として表された場合に（図 7 B）、両方の異種移植片において非常に低かった。これは、血液からのこの抗体の迅速なクリアランスに一部起因する。腫瘍対血液比に関して、m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G、 $\Delta 2-7$ 異種移植片については 7 2 時間目および A 4 3 1 異種移植片については 1 0 0 時間目でピークとなった（図 8 A、B）。m A b 8 0 6 についての腫瘍対血液比は、A 4 3 1 腫瘍に対して決して 1. 0 を上回ることはなかったが、この比は、時間経過全体を通して増加し（図 8 B）、そして低レベルの標的化を示す試験された他のすべての組織（データは示さず）よりも高かった。

【0 2 6 2】

5 2 8 抗体についての腫瘍対血液比は、m A b 8 0 6 と類似したプロファイルを示したが、より高いレベルが、A 4 3 1 異種移植片において見られた（図 8 A、B）。m A b 8 0 6 は、7 2 時間目に、U 8 7 M G、 $\Delta 2-7$ 異種移植片において 7. 6 のピーク腫瘍対肝臓比を有した。このことは明らかに、正常組織と比較してこれらの腫瘍における優先的な取り込みを示す（図 8 C）。m A b 8 0 6 についての他の腫瘍対器官比は、肝臓において観察された比と類似していた（データは示さず）。A 4 3 1 異種移植片における m A b 8 0 6 についてのピーク腫瘍対肝臓比は、1 0 0 時間目に 2. 0 であった。これもまた、正常組織と比較して腫瘍におけるわずかに優先的な取り込みを示

している（図8D）。

【0263】

（実施例10）

（治療研究）

mAb806の効果を、疾患の2つの異種移植片モデル（予防モデルおよび確立された腫瘍モデル）において評価した。

【0264】

（異種移植片モデル）

これまでの以前の報告（Nishikawaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91（16）；7727～7731）と一貫して、de2-7EGFRでトランスフェクトされたU87MG細胞は、親細胞およびwtEGFRでトランスフェクトされたU87MG細胞よりも迅速に増殖した。故に、同じマウスにおいて両方の細胞型が増殖することは不可能であった。

【0265】

100mlのPBS中の 3×10^6 個の腫瘍細胞を、4～6週齢の雌のヌードマウス（Animal Research Centre, Western Australia, Australia）の両方の側腹部に皮下投与した。mAb806の治療効果を、予防モデルおよび確立された腫瘍モデルの両方で研究した。予防モデルにおいて、それぞれ2つの異種移植片を有する5匹のマウスを、腫瘍細胞接種の前日に開始し、1mgもしくは0.1mgのmAb806、またはビヒクル（PBS）のいずれかを用いて心膜内処置した。この処置を、計6用量で、一週間あたり3回、2週間続けた。確立されたモデルにおいて、腫瘍が平均量の $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ （U87MG Δ 2-7）、 $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ （U87MG）、 $73 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ （U87MG, wtEGFR）または $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$ （A431腫瘍）に到達した場合に、処置を開始した。腫瘍体積（ mm^3 ）を、式（長さ $\times$ 幅²）／2を用いて決定し、ここで長さは最長軸であり、そして幅は、長さに直角で測定された（Scottら、2000）。データを各処置群についての平均腫瘍体積 $\pm$ S.E.として表した。統計学的分析を、スチューデントのt検定を用いて所定の時間で実行した。異種移植片が約 1.5 cm^3 の体積に到達し、そして腫瘍が組織学的試験のために摘出された場合に、動物を安楽死させた。この研究プロジェクトを、Animal Ethics Committee of the AustinおよびRepatriation Medical Centreによって立証した。

【0266】

（腫瘍の異種移植片の組織学的試験）

異種移植片を摘出し、そして二等分した。その半分を、パラフィン中に包埋する前に10%ホルマリン／PBSで固定した。次いで、4ミクロンの切片を切断し、そして通常の組織学的試験のためにヘマトキシリンおよびエオシン（H&E）を用いて染色した。もう半分を、Tissue Tek（登録商標）OCT化合物（Sakura Finetek, Torrance, CA）に包埋し、そして液体窒素で凍結させて -80°C で保存した。薄い（5ミクロン）のクリオスタット切片を、切断し、そして氷浴アセトンで10分間固定化し、続いてさらに10分間風乾させた。切片を、タンパク質ブロッキング剤（Lipshaw Immunon, Pittsburgh U.S.A）で10分間ブロッキングし、次いでビオチン化1次抗体（ 1 mg/ml ）を用いて室温（RT）で30分間インキュベートした。全ての抗体を、製造者の指示とおりに、ECLタンパク質ビオチン化モジュール（Amersham, Baulkham Hills, Australia）を用いてビオチン化した。PBSでリンスした後、切片を、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体と共にさらに30分間インキュベートした（Silenus, Melbourne, Australia）。PBSでの最終的な洗浄後、切片を過酸化水素の存在下で、3-アミノ-9-エチルカルボゾール（AEC）基質（0.1M酢酸、0.1M酢酸ナトリウム、0.02M AEC（Sigma Chemical Co., St Louis, MO））に30分間曝露した。切片を水でリンスし、そしてヘマト

キシリンを用いて5分間対比染色し、そして標本にした。

【0267】

(予防モデルにおけるmAb806の効果)

MAb806を、予防異種移植片モデルにおけるU87MGおよびU87MGΔ2-7腫瘍に対する効果について試験した。抗体またはビヒクルを、腫瘍接種の前日に腹腔内投与し、そして1週間当たり3回、2週間投与した。MAb806は、親U87MG異種移植片の増殖に効果を有さず、これは、1回の注射あたり1mgの容量でwtEGFRを発現した(図9A)。対照的に、mAb806は、用量依存性の様式でU87MGΔ2-7異種移植片の増殖を有意に阻害した(図9B)。20日目、コントロール動物を屠殺した場合に、平均腫瘍体積は、コントロール群について、 $1637 \pm 178.98 \text{ mm}^3$ であり、0.1mgの注射群($p < 0.0001$)について $526 \pm 94.74 \text{ mm}^3$ そして1mgの注射群($p < 0.0001$)について $197 \pm 42.06 \text{ mm}^3$ より統計的に小さかった。処置群を、24日目に屠殺し、この時点で腫瘍体積は、0.1mgの処置群について $1287 \pm 243.03 \text{ mm}^3$ および1mgの処置群について $492 \pm 100.8 \text{ mm}^3$ であった。

【0268】

(確立された異種移植片モデルにおけるmAb806の効果)

予防異種移植片モデルにおけるmAb806の効果を与えて、次いで、確立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害するその能力を試験した。抗体処置は、腫瘍が、U87MGΔ2-7異種移植片について $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ および親のU87MG異種移植片について $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍体積に到達した場合に開始することを出いて、予防モデルに記載されたとおりであった。前と同じように、mAb806は、注射あたり1mgの用量で親のU87MG異種移植片の増殖に影響しなかった(図10A)。対照的に、mAb806は、用量依存性の様式においてU87MGΔ2-7異種移植片の増殖を有意に阻害した(図10B)。17日目、1日前にコントロール動物を屠殺し、平均腫瘍体積は、コントロール群について $935 \pm 215.04 \text{ mm}^3$ 、0.1mgの注射群($p < 0.01$)について $386 \pm 57.51 \text{ mm}^3$ 、そして1mgの注射群($p < 0.002$)について $217 \pm 58.17 \text{ mm}^3$ であった。

【0269】

mAb806で観察される増殖阻害が、de2-7EGFRの細胞発現を制限するか否かを決定するために、U87MGwtEGFR腫瘍異種移植片に対するその効果を、確立されたモデルで試験した。これらの細胞は、de2-7EGFR発現なしのEGFR遺伝子の増幅を含む腫瘍のためのモデルとして働く。腫瘍が、 $73 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍体積に到達した場合に、MAb806の処置を開始した。ビヒクルで処置したコントロール腫瘍と比較した場合、MAb806は、確立されたU87MGwtEGFR異種移植片の増殖を有意に阻害した(図10C)。コントロール動物を屠殺した日において、平均腫瘍体積は、コントロール群について $960 \pm 268.9 \text{ mm}^3$ 、そして1mg注射($p < 0.04$)で処置した群について $468 \pm 78.38 \text{ mm}^3$ であった。

【0270】

(確立された腫瘍の組織学的分析および免疫組織化学的分析)

mAb806処置したU87MGΔ2-7およびコントロールU87MGΔ2-7、ならびにU87MGwtEGFR異種移植片(それぞれ、24日目と42日目に収集した)の間の潜在的な組織学的差異を評価するために、ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋した切片をH&Eで染色した。ネクロシスの範囲は、mAb806で処置したU87MGΔ2-7(処置終了後3日目に収集した)、およびU87MGwtEGFR異種移植片(処置終了後9日目に収集した)の両方由来の切片において見られた。この結果は、多数の腫瘍異種移植片($n = 4$)において一貫して観察された。しかし、コントロールで処置した異種移植片由来の切片の分析は、mAb806処置で見出されるネクロシスと同じ範囲を示さなかった。mAb806またはU87MG異種移植片処置したコントロール由来の切片をまたH&Eで染色し、そして2つの群の間に何の細胞生存性にお

ける差異も無いことを明らかにし、さらに、mAb 806 結合が、腫瘍の異種移植片内の細胞生存性／ネクロシスの減少を誘導するという仮説を支持した。

【0271】

U87MG、U87MG. Δ2-7 および U87MG. wt EGFR 異種移植片切片の免疫組織化学的分析を実行して、mAb 806 処置後の de 2-7 および wt EGFR 発現のレベルを決定した。切片を、上記のように24日目と42日目に収集し、そして528抗体または806抗体で免疫染色した。予想どおり、528抗体は、処置された腫瘍とコントロール腫瘍との間に明らかな強度の減少を伴わずに全ての異種移植片切片が染色された。U87MG切片の染色は、mAb 806では検出不可能であったが、U87MG. Δ2-7 および U87MG. wt EGFR 異種移植片切片の陽性染色を観察した。コントロールおよび処置されたU87MG. Δ2-7、ならびにU87MG. wt EGFR 異種移植片の間にmAb 806 染色強度の差異はなく、抗体処置は、de 2-7 または wt EGFR 発現をダウンレギュレートしないことを示唆した。

10

【0272】

(mAb 806 を用いた A431 異種移植片の処置)

mAb 806 の抗腫瘍効果がU87MG細胞に制限されないことを実証するために、抗体を、A431 異種移植片と共にマウスに投与した。これらの細胞は、増幅されたEGFR遺伝子を含み、そして細胞あたり約 2×10^6 個のレセプターを発現する。上記のように、mAb 806 は、約10%のこれらのEGFRおよび標的A431 異種移植片に結合する。以前に記載された予防異種移植片モデルにおいて試験される場合、MAb 806 は、A431 異種移植片の増殖を有意に阻害した(図11A)。13日目、コントロール動物を屠殺した場合に、平均腫瘍体積は、コントロール群について $1385 \pm 147.54 \text{ mm}^3$ 、および1mgの注射処置群 ($p < 0.0001$) について $260 \pm 60.33 \text{ mm}^3$ であった。

20

【0273】

別の実験において、0.1mgの用量のmAbはまた、予防モデルにおけるA431 異種移植片の増殖を有意に阻害した。

【0274】

予防A431 異種移植片モデルにおけるmAb 806 の効果を与え、確立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害するその能力を試験した。抗体処置は、腫瘍が、 $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$ の平均腫瘍体積に到達するまで開始しないことを除いて、予防モデルに記載されるとおりであった。mAb 806 は、確立された腫瘍異種移植片の増殖を優位に阻害した(図11B)。13日目、コントロール動物を屠殺した場合に、平均腫瘍体積は、コントロール群について $1142 \pm 120.06 \text{ mm}^3$ 、および1mg注射群 ($p < 0.0001$) について $451 \pm 65.58 \text{ mm}^3$ であった。

30

【0275】

要約すれば、本明細書中に記載されるmAb 806 を用いた治療研究は、U87MG. Δ2-7 異種移植片増殖の用量依存性阻害を明らかに実証した。対照的に、親U87MG 異種移植片の阻害は、これらが、インビボでwt EGFRを発現し続ける事実に関わらず観察されなかった。mAb 806 は、異種移植片の量を有意に減少するのみでなく、腫瘍内の有意なネクロシスを誘導した。これは、神経膠腫異種移植片を発現するヒト de 2-7 EGFR に対するインビボでの抗体の都合よい治療の使用を示す。

40

【0276】

EGFRの遺伝子増幅は、多数の異なる腫瘍において報告されており、そして約50%の神経膠腫において観察される(Voldbergら、1997)。レセプター遺伝子増幅によって媒介される実質的なEGFR過剰発現は、細胞内シグナルおよび細胞増殖によって増加される増殖の利点を与え得る(Filmusら、1987)。EGFR遺伝子増幅のプロセスを模倣する神経膠腫細胞を生成するために、U87MG細胞を、wt EGFRでトランスフェクトした。mAb 806での確立されたU87MG. wt EGFR 異種移植片の処置は、有意な増殖阻害を生じた。従って、mAb 806 はまた、EGFR遺伝子

50

の増幅を含む細胞に対するインビボでの抗腫瘍活性を媒介する。興味深いことに、U87MG. wt EGFR異種移植片のmAb 806阻害は、U87MG. Δ2-7腫瘍で観察されるよりも少ない効果を示す。これは、mAb 806が、増幅されたEGFRに対してより低い親和性を有し、そして細胞表面で発現される少い割合のレセプターのみに結合するという事実を反映している。しかし、U87MG. wt EGFR異種移植片容量における少ない効果にも関わらず、mAb 806処置が、これらの異種移植片内に大規模なネクロシスをつくるということに、注意すべきである。この可能性を指摘するために、mAb 806は、本発明者らが、A431異種移植片に対するその効果を試験したU87MG由来細胞株の阻害のみを媒介する。これらの扁平上皮細胞癌由来の細胞株は、有意なEGFR遺伝子増幅を含み、これらはインビトロおよびインビボの両方で保持される。mAb 806を用いたA431異種移植片の処置は、予防モデルおよび確立されたモデルの両方において、優位な増殖阻害を生じ、mAb 806の抗腫瘍効果は、トランスフェクトされたU87MG細胞株に制限されないことを示す。

10

【0277】

(実施例11)

(A431異種移植片とmAb 806およびAG1478との併用治療処置)

AG1478と組み合わせたmAb 806の抗腫瘍効果を、A431異種移植片を伴なうマウスにおいて試験した。AG1478(4-(3-クロロアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン)は、HER2-neuおよび血小板由来の増殖因子レセプターキナーゼに対する強力かつ選択的なEGFRキナーゼのインヒビターである(Calbiochem、カタログ番号658552)。3つのコントロールが挙げられた:ビヒクルのみでの処置、ビヒクル+mAb 806のみでの処置、そしてビヒクル+AG1478のみでの処置。この結果は、図12に例示される。0.1mgのmAb 806を、異種移植の1日前、および異種移植の1日後、3日後、6日後、8日後、および10日後に投与した。400μgのAG1478を、異種移植の0日後、2日後、4日後、7日後、9日後、および11日後に投与した。

20

【0278】

単独で投与した場合、AG1478およびmAb 806の両方が、有意な腫瘍体積の減少を生じた。しかし、組み合わせることによって、腫瘍体積の減少が、大幅に増大した。

【0279】

さらに、A431細胞のEGFRへのmAb 806の結合を、AG1478の非存在下および存在下で評価した。細胞を、無血清培地に一晚置き、次いでAG1478で、37℃で10分間処理し、PBSで2回洗浄し、次いで1% Tritonに溶解させて、溶解物を調製した。この溶解物を、本明細書中の実施例20に記載されるとおりに調製した。次いで、溶解物を、ELISA(SchoolerおよびWiley, Analytical Biochemistry 277, 135~142(2000))によって記載されるアッセイの改変バージョン)によって806の反応性について評価した。プレートを、PBS/EDTA中の10μg/mlのmAb 806で、室温で一晩コーティングし、次いで2回洗浄した。次いで、プレートを、10%の血清アルブミン/PBSを用いて、37℃で2時間ブロックし、そして2回洗浄した。1:20の細胞溶解物を、10%血清アルブミン/PBSに37℃で1時間添加し、次いで4回洗浄した。10%血清アルブミン/PBS中の抗-EGFR(SC-03(Santa Cruz Biotechnology Inc.))を、室温で90分間反応させ、プレートを4回洗浄し、そして10%血清アルブミン/PBS中の抗ウサギ-HRP(無症候由来の場合1:2000)を室温で90分間添加し、4回洗浄し、そしてABTSを基質として用いて発色させた。mAb 806結合がAG1478の量の増加の存在下で有意に増加することを見出した(図13)。

30

40

【0280】

(実施例12)

(EGFR状態について事前に分類されたヒト神経膠腫前駆型における免疫反応性)

50

E G F R 発現の高い発生率を与えて、神経膠腫における増幅および変異の詳細な免疫組織化学的研究を、異種移植片以外の 806 個の腫瘍における特性を評価するために実行した。16 個の神経膠腫のパネルを、免疫組織化学によって分析した。16 個の神経膠腫のパネルを、増幅された野生型 E G F R および d e 2 - 7 E G F R 発現の存在について R T - P C R によって事前に分類した。これらの腫瘍のうち 6 個のみが、w t E G F R 転写を発現し、10 個は、w t E G F R 遺伝子を増殖し、これらのうち 5 個は、野生型 E G F R 転写のみを示し、そして 5 個は、野生型 E G F R と d e 2 - 7 遺伝子転写の両方を示した。免疫組織化学的分析を、組織学的スライドに塗布された新鮮な凍結組織の 5 m m 切片を用いて実行し、そして冷アセトンで 10 分間固定した。結合した 1 次抗体を、ビオチン化ホース抗マウス抗体に続くアビジン-ビオチン-複合体反応を用いて検出した。ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド (D A B) を、色素原として使用した。組織における免疫組織化学的反応の程度を、光学顕微鏡によって見積もり、そして以下のような 25 % の成分における免疫反応性細胞の数に従って、格付けした：

10

病巣 = 5 % 未満

＋ = 5 ～ 25 %

＋＋ = 25 ～ 50 %

＋＋＋ = 50 ～ 75 %

＋＋＋＋ = 75 % より上。

【0281】

528 抗体が、全ての腫瘍において強い反応性を示した一方で、D H 8 . 3 免疫染色を、d e 2 - 7 E G F R を発現する腫瘍に制限した (表 2)。F A C S およびロゼッティングアッセイにおける事前の観察と一貫して、m A b 806 は、非増幅 E G F R 遺伝子由来の w t E G F R 転写物を発現する神経膠腫とは反応しなかった (表 2)。m A b 806 に対する反応のパターンは、異種移植片研究において観察されたパターンと類似しており、そしてこの抗体が、細胞表面で発言される場合、d e 2 - 7 E G F R および増幅された E G F R を認識するが、w t E G F R は認識しないことを再度示唆した。

20

【0282】

(表 2)

(野生型 E G F R の存在について事前に分類された神経膠腫における M A b 528、D H 8 . 3 および 806 の免疫反応性、ならびに変異 d e 2 - 7 およびその増幅状態について)

30

【0283】

【表 5】

増幅	de2-7 EGFR 発現	528	DH 8.3	806
	いいえ	++++	-	-
	いいえ	++++	-	-*
	いいえ	++++	-	-
	いいえ	++	-	-
	いいえ	+++	-	-
	いいえ	++++	-	-
はい	いいえ	++++	-	++++
はい	いいえ	++++	-	+
はい	いいえ	++++	-	+++
はい	いいえ	++++	-	++++
はい	いいえ	++++	-	+ - +++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++++	++++
はい	はい	++++	++	++

10

20

* 病巣の染色

(実施例 13)

(正常組織における E G F R 免疫反応性)

d e 2 - 7 E G F R が、正常組織において発現されるか否かを決定するために、m A b 8 0 6 および D H 8 . 3 についての免疫組織化学的研究を、25 個の組織において実行した。d e 2 - 7 E G F R が正常組織に存在しないことを示唆する任意の試験された組織において、m A b 8 0 6 または D H 8 . 3 のいずれも強い免疫反応性を示さなかった (表 3)。上皮の表皮および粘性平滑細胞の基底細胞層に制限された m A b 8 0 6 を用いた扁桃におけるいくつかの生存可能な染色が存在する。胎盤において、栄養膜上皮の時折の免疫染色を、観察した。興味深いことに、高い内因性レベルの w t E G F R を発現する 2 つの組織 (肝臓および皮膚) は、任意の有意な m A b 8 0 6 反応性を示し損なった。全ての肝臓サンプルで反応性は観察されず、そして弱い不安定な病巣の反応性のみを、皮膚サンプル中の基底のケラチノサイトおよび扁桃粘膜の平滑上皮細胞において時折 (研究した全てのサンプルの 10 % 未満) 検出し、さらにこの抗体が、細胞の表面上で発現される w t E G F R に任意の有意な程度で結合しないことを実証した (表 3)。全ての組織は、528 抗体で見られる普遍的な染色によって確認されたとおり w t E G F R について陽性であった (表 3)。

30

40

【0284】

【表 6】

表 3

正常組織での 528, DH8.3 および 806 のバイオアベイラビリティ

組織	528	DH8-3	806
食道	pos	-	-
胃	pos	-	-
十二指腸	pos	-	-
小腸 / 十二指腸	pos	-	-
結腸	pos	-	-
肝臓	pos	-	-
唾液腺 (耳下腺)	pos	-	-
腎臓	pos	-	-
膀胱	pos	-	-
前立腺	pos	-	-
精巣	pos	-	-
子宮 (cx/endom)	pos	.*	-
ファロピーオ氏管	pos	-	-
卵巣	pos	-	-
胸部	pos	.*	-
胎盤	pos	-	-
末梢神経	pos	-	-
骨格筋	pos	-	-
甲状腺	pos	-	-
リンパ節	pos	-	-
脾臓	pos	-	-
扁桃	pos	-	- occ. 扁平上皮細胞の基底層 の弱い反応性
心臓	pos	-	-
肺	pos	-	-
皮膚	pos	-	- occ. 扁平上皮細胞の基底層 の弱い反応性

* 種々の組織におけるいくつかの基質の染色

(実施例 14)

(種々の腫瘍における EGF R 免疫反応性)

他の腫瘍型における de 2-7 EGF R の程度を、12 個の異なる悪性疾患を用いて試験した。528 抗体は、黒色腫およびセミノーマを除く分析された多くの腫瘍においてしばしば相同性染色を示した。存在する場合、DH8.3 免疫反応性を、時折の病巣の腫瘍細胞に制限し、これらはこの検出系を用いて脳の外側の腫瘍における de 2-7 EGF R 発現はほとんどないことを示した (表 4)。血管の病巣の染色、およびいくつかの腫瘍における DH8.3 抗体と結合性組織との可変性の拡散染色もまた、存在する (表 4)。この染色は、使用された抗体結合性に強く依存しており、そして非特異的なバックグラウンド反応と考えられた。mAb 806 は、64% の頭部腫瘍および頸部腫瘍、ならびに 50% の配癌において陽性染色を示した (表 4)。30% の場合において陽性である尿の腫瘍を除く全ての部位で mAb 806 の反応性は、ほとんど存在しなかった。頭部癌および頸部癌および肺癌は、DH8.3 抗体について陰性であるため、これらの腫瘍において mAb と共に見出される反応性は、EGF R 遺伝子増幅と関連し得る。

【0285】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 4

腫瘍パネルにおける 528, DH8.3 および 806 のモノクローナル抗体

腫瘍	528	DH8.3	806
悪性黒色腫転移	0/10	0/10	0/10
膀胱 (tcc, sqcc, adeno)	10/10 (7x+++, 2x+++, 1x+)	0/10*	3/10* (2x+++, 1x++)
乳腺	6/10 (3x+++, 3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
頭部 + 頸部癌 (sqcc)	11/11 (1x+++ - 10x+++)	0/11*	7/11 (3x+++, 3x+++, 1x+)
肺 (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 (10x+++ - 1x+++)	0/12*	6/12 (3x+++ 3x+++)
平滑筋肉腫	5/5 (4x+++, 1x+)	0/5	0/5
リボ肉腫	5/5 (2x+ 3x+++)	0/5	0/5*
滑液肉腫	4/5* (4x+++)	0/5	0/5*
Mfn 悪性線維組織球腫	4/5*	0/5*	0/5*
結腸癌	10/10 (9x+++, 1x+)	0/10*	0/10
セミノーマ	1/10*	1/10*	0/10
卵巣 (漿液・乳頭状)	4/5 (3x+++, 1x+)	0/5*	0/5

*病巣の染色

(実施例 15)

(EGFR 状態に対して非選択のヒトグリア芽細胞腫における免疫反応性)

mAb 806 の独特の特異性を確認し、そして反応性を評価するために、これを、528 抗体および DH8.3 抗体と、EGFR 状態に対して予備選択されていない 46 のグリア芽細胞腫のパネルにおいて比較した。この 528 抗体は、2 つ (No. 27 および No. 29) を除く全てのサンプルにおいて強力にかつ同質にポジティブである (44 / 46、95.7%)。これら 2 つの場合はまた、mAb 806 および mAb DH8.3 に対してもネガティブであった。mAb 806 は、27 / 46 (58.7%) のケースにおいてポジティブであり、そのうちの 22 ケースは、50% より多くの腫瘍において同質の免疫反応性を示した。DH8.3 抗体は、15 / 46 (32.6%) のグリア芽細胞腫においてポジティブであり、そのうちの 9 つは同質の免疫反応性を示した。これらの非選択の腫瘍の免疫組織化学染色を、表 5 に示す。

【0286】

1 つの場合 (No. 35) を除く全ての場合において、mAb 806 と DH8.3 との間に一致性が存在した。

【0287】

EGFR 増幅の存在についての分子的分析を、44 ケースにおいて行った (表 5)。これらのうち、30 ケースは、以前に確立された mAb 806 の免疫反応性の様式と同型を示した (co-type) : 例えば、16 の mAb 806 ネガティブなケースは、EGFR 増幅を全く示さず、そして 14 の EGFR が増幅したケースもまた、mAb 806 免疫ポジティブだった。しかし、806 免疫反応性を示した 13 のケースは、EGFR 増幅についてはネガティブであり、一方で 1 つの EGFR が増幅したケースは、mAb 806 ネガティブであった。これらの増幅ネガティブかつ 806 ポジティブの変異状態のさらなる分析は、以下に記載され、そして EGFR 増幅についてネガティブであり、かつ 806 によ

10

20

30

40

50

って認識される、13のケースの大部分についての説明を提供する。

【0288】

引き続いて、RT-PCRによって欠失変異の分子的分析を、41/46のケースに対して実施した(表5)。これらのうち、34ケースは、欠失変異に特異的なDH8.3と同型を示した: 12ケースは、RT-PCRおよび免疫組織化学の両方においてポジティブであり、そして22ケースはネガティブ/ネガティブであった。3つのケース(#2、#34、#40)は、欠失変異についてDH8.3ポジティブ/RT-PCRネガティブであり、そして3つのケース(#12、#18、#39)は、DH8.3ネガティブ/RT-PCRポジティブであった。本発明者らの以前の特異性の分析に基づいて予想された通り、mAb806の免疫反応性が、1つのケース(#35)を除く全てのDH8.3ポジティブな組織において、観察された。

【0289】

ケース#3もまた、変異を示した(表5においてA2と記される)、これは、de2-7変異の配列を含むが、このことは、801塩基の消失している古典的なde2-7欠失であるようではなかった(データは示さず)。このケースは、DH8.3反応性についてネガティブであったが、806と反応性を示し、このことは、806がさらなる可能性のある独特のEGFR変異を認識し得ることを示す。

【0290】

(表5)

(mAb528、mAb806およびmAb DH8.3を用いた、46の非選択のグリ
ア芽細胞腫の免疫組織化学分析)

【0291】

【表8】

#	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (det.)	ネガティブ	N	A2
4	++++	++++	ネガティブ	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	ネガティブ	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	A	5' MUT
9	++++	++++	ネガティブ	A	WT
10	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
11	++	++	++	A	5' MUT
12	++++	++	ネガティブ	A	5' MUT
13	++++	++++	ネガティブ	N	WT
14	++	ネガティブ	ネガティブ	Nd	nd

15	++	++	ネガティブ	N	WT
16	+	ネガティブ	ネガティブ	N	nd
17	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
18	++++	++++	ネガティブ	A	5' MUT
19	++++	++++	ネガティブ	N	WT
20	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
21	++++	++++	ネガティブ	N	WT
22	+++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	ネガティブ	A	WT
25	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
26	++++	++++	+++	A	5' MUT
27	ネガティブ	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
28	+++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
29	ネガティブ	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
30	++++	++++	ネガティブ	N	WT
31	++++ par det	ネガティブ	ネガティブ	N	nd
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	ネガティブ	++++	A	5' MUT
36	+++	++	+++	A	5' MUT
37	++++	+	+	A	5' MUT
38	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
39	++	ネガティブ	ネガティブ	N	5' MUT
40	++++	++++	+	A	WT
41	++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
42	++++	++++	ネガティブ	A	WT
43	++++	ネガティブ	ネガティブ	nd	nd
44	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
45	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	WT
46	++++	ネガティブ	ネガティブ	N	nd

10

20

30

* N = 増幅していない、A = 増幅した

+ WT = 野生型、5' - mut

nd = 非実施

806 抗体の反応性は、19/27 のケースまたは 70% を越えるケースにおいて、増幅した EGFR または de2-7 変異 EGFR と同型を示した。これらの 8 ケースのうちの 2 ケースはまた、DH8.3 反応性であったことに注目するべきである。

【0292】

(実施例 16)

(頭蓋内神経腫瘍腫瘍の組織的処置および分析)

抗 ΔEGFR モノクローナル抗体 mAb 806 の効率を試験するために、本発明者らは、頭蓋内 ΔEGFR 過剰発現 グリーマ異種移植片を有するヌードマウスを、mAb 806、アイソタイプコントロール IgG または PBS の頭蓋内注入で処置した。

40

【0293】

ヒト神経腫瘍細胞株 U87MG、LN-Z308 および A1207 (Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY より供与) を、ΔEGFR ウイルス、キナーゼ欠損 ΔEGFR (DK) ウイルス、または野生型 EGFR (wt EGFR) ウイルスで感染させた。同程度に高いレベルの EGFR を発現する集団を、蛍光活性化セルソーティングによって選択し、そしてそれぞれ、U87MG. ΔEGFR、U87MG. DK、U87MG. wt EGFR、LN-Z308. ΔEGFR、LN-Z308. DK、LN-Z308. wt EGFR、A1207

50

． Δ EGFR、A1207．DKおよびA1207．wtEGFRと称する。各々をG418（U87MG細胞株、 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ ；LN-Z308細胞株およびA1207細胞株、 $800\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を含む培地中で維持した。

【0294】

U87MG． Δ EGFR細胞をヌードマウスに頭蓋内移植し、そして同日に処置を開始した。 $5\mu\text{l}$ のPBS中の 10^5 個の細胞をヌードマウスの脳の右線条体中に移植した。mAb806、またはIgG2bアイソタイプコントロールを用いる全身処置を、移植後0日～14日に、1日おきに容量 $100\mu\text{l}$ 中ので 1mg のmAbの腹腔内注入によって行った。頭蓋内U87MG． Δ EGFR腫瘍の直接的な治療のために、 $10\mu\text{g}$ のmAb806、またはIgG2bアイソタイプコントロールを、容量 $5\mu\text{l}$ で、第1日に開始して5日間、1日おきに、腫瘍注入部位に注入した。 10

【0295】

PBSまたはアイソタイプコントロールIgGで処置した動物は、13日の生存中央値を有し、一方ではmAb806で処置したマウスは、21日までの生存中央値の61．5％の増加を有した（ $P<0.001$ ）。

【0296】

腫瘍確立後、移植後3日のマウスの処置はまた、コントロール群と比較して、mAb806処置動物の生存中央値を46．1％（13日～19日； $p<0.01$ ）延長した。

【0297】

これらのmAb806の抗腫瘍効果がU87MG． Δ EGFR異種移植片に対して延長するかどうかを決定するために、同様の処置を、LN-Z308． Δ EGFRおよびA1207． Δ EGFRの他の神経膠腫細胞異種移植片を有する動物に施行した。LN-Z308． Δ EGFR異種移植片を有するマウスのmAb806処置の生存中央値を、コントロールについての19日から58日に延長した（ $P<0.001$ ）。注目すべきは、mAb806処置動物の8匹のうち4匹が、60日を越えて生存したことである。A1207． Δ EGFR異種移植片を有する動物の生存中央値をまた、コントロールについての24日から29日に延長した（ $P<0.01$ ）。 20

【0298】

（mAb806処置は、 Δ EGFR過剰発現脳腫瘍の増殖を阻害する）

U87MG． Δ EGFR異種移植片およびLN-Z308． Δ EGFR異種移植片を有するマウスを、それぞれ9日および15日に安楽死させた。腫瘍切片を組織病理学的に分析して、そして腫瘍容量を決定した。動物の生存について観察された結果と一致して、mAb806処置は、U87MG． Δ EGFRのおよそ90％までの容量を有意に低減し（ $P<0.001$ ）、そしてLN-Z308． Δ EGFRは、コントロール群のものと比較して、95％より多くの異種移植片を低減した（ $P<0.001$ ）。同様の結果を、A1207． Δ EGFR腫瘍を有する動物について得た（65％容量の低減、 $P<0.01$ ）。 30

【0299】

（mAb806での腫瘍内処置は、U87MG． Δ EGFR脳腫瘍を有するマウスの生存を延長する）

U87MG． Δ EGFR異種移植片の処置に対する、mAb806の直接的腫瘍内注入の有効性もまた、決定した。移植後1日に、mAb806またはアイソタイプコントロールIgGの腫瘍内注入を動物に施した。コントロールの動物は、15日間生存し、一方でmAb806処置したマウスは、18日間生存し続けた（ $P<0.01$ ）。mAb806の腫瘍内処置はいくらか有効であるが、複数回の頭蓋内注入の困難さ、および感染のリスクの増大を伴う。従って、本発明者らは、さらなる研究のために全身処置に着目した。 40

【0300】

（mAb806処置は、U87MG．wtEGFR頭蓋内異種移植片を有するマウスの生存を僅かに延ばすが、U87MG頭蓋内異種移植片を有するマウスもU87MG．DK頭蓋内異種移植片を有するマウスも、生存を延ばさない）

mAb806による増殖阻害が Δ EGFRを発現する腫瘍に選択的であるかどうかを決定 50

するために、本発明者らはU87MG、U87MG．DK（キナーゼ欠損ΔEGFR）およびU87MG．wtEGFRの脳異種移植片を有する動物を処置した。mAb806処置は、低レベルの内在性の野生型EGFR（wtEGFR）を発現するU87MG腫瘍を移植されたマウスの生存も、低レベルの内在性wtEGFRに加えて、キナーゼ欠損ΔEGFRを過剰発現するU87MG．DK異種移植片を有する動物の生存も、延ばさなかった。mAb806処置は、wtEGFRを過剰発現するU87MG．wtEGFR腫瘍を有するマウスの生存を僅かに延ばした（ $P < 0.05$ 、コントロール群に対して、生存中央値23日 対 26日）。

【0301】

（mAb806の反応性は、インビボの抗腫瘍効果と相関がある）10
異なるレベルのEGFRまたは異なる型のEGFRを発現する腫瘍に対する、mAb806の異なる効果を理解するために、本発明者らは、FACS分析によって種々の腫瘍細胞とのmAb806の反応性を決定した。以前の報告と一致して、抗EGFRモノクローナル抗体528は、ΔEGFRおよびwtEGFRの両方を認識し、そしてU87MG細胞と比較して、U87MG．ΔEGFR細胞に対してより強い染色を実証した。対照的に、抗体EGFR．1は、U87MG．ΔEGFR細胞がU87MG細胞と同程度に弱い反応性であったので、wtEGFRと反応したが、ΔEGFRとは反応しなかった。このEGFR．1抗体は、U87MG．wtEGFR細胞がwtEGFRを過剰発現していたので、U87MG細胞よりもより強力にU87MG．wtEGFRと反応した。mAb806は、U87MG．ΔEGFR細胞およびU87MG．DK細胞と強力に反応し、そしてU20
87MG細胞とは反応しないが、U87MG．wtEGFRとは弱く反応した。このことは、mAb806が、過剰発現したwtEGFRに対して弱い交差活性を有するΔEGFRに対して選択的であることを示す。U87MG．wtEGFRとの反応性のこのレベルは、抗体処置によって媒介される生存延長に対して、量的および質的に類似であった。

【0302】

本発明者らはさらに、免疫沈降によってmAb806の特異性を決定した。種々の細胞株におけるEGFRを、抗体528、EGFR．1およびmAb806を用いて免疫沈降した。次いで、電気泳動によって分離されたタンパク質をブロットを、抗EGFR抗体C13（これは、wtEGFRならびにΔEGFRおよびDKを認識する）を用いて探索した。FACS分析と一致して、抗体528はwtEGFRおよび変異レセプターを認識し、30
一方で抗体EGFR．1は、wtEGFRと反応したが、変異種とは反応しなかった。さらに、U87MG．ΔEGFR細胞およびU87MG．DK細胞における変異レセプターのレベルは、U87MG．wtEGFR細胞におけるwtEGFRのレベルに合致した。しかし、抗体mAb806は、U87MG．ΔEGFR細胞およびU87MG．DK細胞から沈殿した大量の変異レセプターと比較して、U87MG．wtEGFR細胞溶解物からの少量のwtEGFRのみを沈殿可能であり、そしてU87MG細胞からは検出可能な量は沈殿出来なかった。まとめると、これらのデータは、mAb806が、細胞表面に過剰発現される場合にのみwtEGFRの小さな画分中にも存在する、ΔEGFRにおけるエピトープを認識することを示唆する。

【0303】

（mAb806処置は、U87MG．ΔEGFR脳腫瘍において、ΔEGFRの自己リン酸化を低減し、そしてBcl_Lの発現を下方制御する）40
本発明者らは、次に、mAb806による増殖阻害の背景にある機構を調査した。構成的に活性なキナーゼ活性およびΔEGFRのカルボキシル末端の自己リン酸化は、生物学的機能に必須であるので、本発明者らは、処理された動物およびコントロール動物由来の腫瘍において、ΔEGFRリン酸化状態を決定した。レセプターのレベルは、mAb806処置した異種移植片において僅かに減少するのみであったが、mAb806処置は、ΔEGFR自己リン酸化を劇的に低減することを見出した。本発明者らは以前に、レセプターの自己リン酸化が、ΔEGFR過剰発現腫瘍のアポトーシスを低減することに重要な役割を有する抗アポトーシス遺伝子Bcl_Lを上方制御することを示した。従って、本発50

明者らは、次に、B c l - X L の発現に対する m A b 8 0 6 の効果を決定した。m A b 8 0 6 処置動物からの Δ E G F R 腫瘍は、実際に、B c l - X L の低下したレベルを示した。

【0304】

(U 8 7 M G . Δ E G F R 腫瘍において、m A b 8 0 6 処置は、増殖および脈管新生を低下し、そしてアポトーシスを増大させる)

m A b 8 0 6 処置によって生じるインビボ抑制およびレセプターシグナル伝達に対するその生化学的效果を考へて、本発明者らは、コントロールまたは処置したマウス由来の腫瘍の増殖速度を決定した。m A b 8 0 6 処置した腫瘍の K i - 6 7 染色によって測定する増殖指標は、コントロール腫瘍の指標よりも有意に低かった ($P < 0.001$)。更に、T U N E L 染色を介したアポトーシス指標の分析は、コントロール腫瘍と比較して、m A b 8 0 6 処置した腫瘍におけるアポトーシス細胞の数の有意な増加を実証した ($P < 0.001$)。腫瘍の血管新生の範囲をまた、C D 3 1 に対する処置種およびコントロール種由来の腫瘍の免疫染色によって分析した。腫瘍の血管新生を定量するために、微小血管の領域 (M V A) を、コンピューター処理の画像解析を使用して測定した。m A b 8 0 6 処置した腫瘍は、コントロール腫瘍よりも 30% 未満の M V A を示した ($P < 0.001$)。レセプターと抗体との間の相互作用が炎症応答を導き得るかどうかを理解するために、本発明者らは、マクロファージマーカーの F 4 / 8 0、および N K 細胞マーカーのアシアロ G M 1 について腫瘍切片を染色した。マクロファージは、腫瘍マトリクス全体で認識され、そして特に m A b 8 0 6 処置した U 8 7 M G . Δ E G F R 腫瘍の周囲の辺りに蓄積した。本発明者らは、腫瘍中および腫瘍周辺に浸潤した、僅かな N K 細胞、および m A b 8 0 6 処置とアイソタイプコントロール腫瘍との間に有意な差異のないことを観察した。

【0305】

(実施例 17)

(m A b 8 0 6 および m A b 5 2 8 を用いる併用治療)

この研究が理解戴けてますか？この実施例は、他の前記の実施例とはいくらか異なる形式である。

【0306】

本明細書中に記載される実験は、本発明に従う抗体の効果を決定するために設計された、インビボ研究を記載する。

【0307】

メスのヌードマウス (4~6 週齢) を実験動物として使用した。マウスは、各々の腹側部において 3×10^6 個の腫瘍細胞の皮下 (s u b s c u t a n e o u s) 接種を受けた。この動物は、U 8 7 M G . D 2 - 7、U 8 7 M G . D K、または A 4 3 1 細胞のいずれか (こららの全ては前出に記載されている) を受けた。治療は、腫瘍が十分な大きさに成長した時に開始した。

【0308】

次いでマウスは、(i) リン酸緩衝化生理食塩水、(i i) m A b 8 0 6 (1 回の注入当たり 0.5 m g)、(i i i) m A b 5 2 8 (1 回の注入当たり 0.5 m g) または (i v) 両方の m A b の併用、のうちの 1 つの注入を受けた。「(i v)」に関して、異なる群のマウスが、各 m A b の 1 回の注入当たり 0.5 m g、または各 m A b の 1 回の注入当たり 0.25 m g を受けた。

【0309】

試験したマウスの第 1 群は、U 8 7 M G . D 2 - 7 の注入を受けた群であった。この処置プロトコルは、接種後 9 日に開始し、そして 1 週当たり 3 回を 2 週間続けた (すなわち、これらの動物に、細胞の注入を受けた後、9 日、11 日、13 日、16 日、18 日および 20 日に接種した)。処置プロトコルの開始時に、平均腫瘍直径は 1.15 mm^3 だった。各群は、50 匹のマウスを含み、各々は 2 つの腫瘍を有した。

【0310】

抗体 (各々、1 回の注入当たり 0.5 m g) の併用を受けたマウスの群内で、3 つの完全

な退行があった。他の全ての群においては退行は全くなかった。図 18 A は、結果を図示する。

【0311】

マウスの第 2 群においては、1 回の注入当たり各抗体 0.25 mg を含む併用治療を除き、注入された物質は同一である。この注入を、細胞接種後 10 日、12 日、14 日、17 日、19 日および 21 日に、施した。治療の開始時点で、平均腫瘍サイズは 114 mm^3 であった。結果を図 18 B に示す。

【0312】

マウスの第 3 群は、U87MG-DK の接種を受けた。治療剤の注入を、細胞の接種後 18 日に開始し、そして 20 日、22 日、25 日、27 日および 29 日まで続けた。処置開始時の平均腫瘍サイズは、 107 mm^3 だった。図 18 C は、結果の要約を示す。治療剤の注入は、第 1 群における注入と同一だった。 10

【0313】

最後に、マウスの第 4 群は、A431 細胞で接種されて、接種後 8 日、10 日、12 日および 14 日に、群 I および群 III における注入と同じ注入を受けた。開始時点で、平均腫瘍サイズは 71 mm^3 だった。結果を図 18 D に示す。

【0314】

これらの結果は、併用の抗体治療が腫瘍を低減させることにおいて相乗効果を示したことを示す。図 18 A を参照のこと。同様の効果は、図 18 B により、より低い用量で見られ、このことは、この効果が投薬レベルのみに起因するのではないことを示唆する。 20

【0315】

併用治療は、U87MG-DK の増殖を阻害しなかった（図 18 C）。このことは、抗体の免疫機能が、図 18 A および図 18 B において見られる低下の原因ではないことを示した。

【0316】

図 18 D に示されるように、併用治療はまた、A431 腫瘍に対する相乗的な有効性を提示し、4 用量が 60% の完全な応答比率を導いたことが、注目される。これらのデータは、mAb 806 によって認識される EGFR 分子が、528 によって阻害される EGFR 分子とは機能的に異なることを示唆する。

【0317】

(参考文献)

【0318】

【表 9】

1. Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII, *Cancer Res.* 57: 4130-40, 1997.
2. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer, *Br J Cancer.* 82: 186-94, 2000.
3. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., and et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas, *Cancer Res.* 55: 3140-8, 1995.

30

40

4. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas, *Cancer Res.* 53: 3217-20, 1993.
5. Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., and Collins, V. P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4309-13, 1992.
6. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 2965-9, 1992.
7. Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., and Shibuya, M. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors, *Jpn J Cancer Res.* 81: 773-9, 1990.
8. Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., and Shibuya, M. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors, *Mol Cell Biol.* 8: 1816-20, 1988.
9. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 8602-6, 1990.
10. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 7727-31, 1994.
11. Batra, S. K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C. J., Zhu, X., Humphrey, P. A., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Epidermal growth factor ligand-

10

20

30

- independent, unregulated, cell- transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene, *Cell Growth Differ.* 6: 1251-9, 1995.
12. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis, *Cancer Res.* 56: 5079-86, 1996.
 13. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target, *J Neurovirol.* 4: 148-58, 1998. 10
 14. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 4207-11, 1990.
 15. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., and Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor, *Br J Cancer.* 73: 1366-72, 1996. 20
 16. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody, *Int J Cancer.* 63: 537-43, 1995.
 17. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gurn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors, *Cancer Res.* 55: 5536-9, 1995. 30
 18. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtneess, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin, *J Clin Oncol.* 18: 904, 2000.

19. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas, *Neurosurgery*. 39: 478-83, 1996.
20. Ponten, J. and Macintyre, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta Pathol Microbiol Scand*. 74: 465-86, 1968.
21. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies, *Cancer Res*. 44: 1002-7, 1984.
22. Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor., *Growth Factors*. 18: 11-29, 2000.
23. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., and Bunn, P. A., Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess, *J Immunol Methods*. 72: 77-89, 1984.
24. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Caveness, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling, *J Biol Chem*. 272: 2927-35, 1997.
25. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res*. 57: 1510-5, 1997.
26. Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., and Gill, G. N. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice, *Cancer Res*. 46: 4701-5, 1986.

10

20

30

27. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials, *Ann Oncol.* 8: 1197-206, 1997.
28. den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In: P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition edition, pp. 2424-31. London: Academic Press, 1998.
29. Seymour, L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges, *Cancer Treat Rev.* 25: 301-12, 1999.
30. Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., and Schantz, S. P. Effects of anti-epidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer, *Otolaryngol Head Neck Surg.* 111: 633-43, 1994.
31. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., and Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model, *Clin Cancer Res.* 1: 1311-8, 1995.
32. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts, *Cancer Res.* 55: 4375-82, 1995.
33. Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N- succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res.* 56: 4970-7, 1996.
34. Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., and Geissler, F. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores, *Cancer Res.* 50: 1243-50, 1990.
35. Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent, *Nucl Med Biol.* 24: 639-47, 1997.
36. Mineo, C., Gill, G. N., and Anderson, R. G. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae, *J Biol Chem.* 274: 30636-43, 1999.
37. Gunther, N., Betzel, C., and Weber, W. The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor-ligand complex, *J Biol Chem.* 265: 22082-5, 1990.

(実施例 18)

(DE2-7 上皮細胞増殖因子レセプター (EGFR) に対して特異的な新規のモノクローナル抗体は、EGFR 遺伝子増幅を含有する細胞において発現される EGFR もまた認識する)

以下の実験は、Johns ら (2002) *Int. J. Cancer*, 98、および同時

継続中の出願番号第60/342、258号(2001年12月21日出願)(この両方の開示の全体が、本明細書において、適切な場合、本明細書中の図に相互参照される参考として援用される)において提示される。モノクローナル抗体mAb806を研究して、そしてEGFレセプターに関する結合特性に関係する追加データを得た。これは本明細書中の前の方に提示されるデータに追加して、そしてそれらの実証である。従って、以下の提示は特許出願および対応する刊行物において記載される、概要および物質を示す。

【0319】

モノクローナル抗体(MAb806)は、潜在的に、腫瘍細胞の表面上に発現したEGFRを標的化することに関連する困難さを打開する。MAb806は、de2-7EGFRでトランスフェクションされたU87MG神経膠腫細胞(U87MG, Δ2-7)に高親和性(約 $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)で結合したが、野生型EGFRを発現する親細胞には結合しなかった。この観察と一致して、MAb806は細胞外ドメインを含む野生型EGFRの可溶性バージョンに結合し得ない。対照的に、この細胞外ドメインのELISAプレートへの固定化は、MAb806の飽和かつ用量応答性の結合を導き、このことはMAb806が特定の条件下で野生型EGFRに結合し得ることを示唆する。MAb806はまた、EGFR遺伝子増幅に起因して多量のEGFRを発現するA431細胞の表面に結合した。興味深いことに、MAb806は、A431細胞により発現される総EGFR分子の10%のみを認識し、そして結合親和性はde2-7EGFRについて決定された親和性よりも低かった。MAb806は、U87MG, Δ2-7異種移植片を特異的に標的化し、そしてA431異種移植片は、注入後8hに検出されるU87MG, Δ2-7異種移植片におけるピークレベルで、ヌードマウスにおいて増殖した。親のU87MG異種移植片の特異的な標的化は、観察されなかった。U87MG, Δ2-7細胞への結合の後、MAb806をマクロピノサイトシス(macropinosyrosis)により直ちに内部移行させて、続いてリポソームに輸送した(初期の標的化ピークに貢献する可能性のあるプロセスが、異種移植片において観察された)。従って、MAb806を使用して、EGFR遺伝子増幅またはde2-7EGFRを含む腫瘍細胞を標的化し得るが、これは細胞表面に発現されない場合、野生型EGFRには結合しない。

【0320】

上記に論じられるように、MAb806はde2-7EGFRに特異的であるが、特有の接合部ペプチドからは明確に識別可能なエピトープに結合する。興味深いことに、MAb806は神経膠腫細胞の細胞表面上に発現される野生型EGFRを認識しなかったが、これはELISAプレート表面に固定された野生型EGFRの細胞外ドメインに実際に結合した。さらに、MAb806は、EGFR遺伝子の増幅を有するが、de2-7EGFRを発現しない、A431細胞の表面に結合した。従って、本発明者らの結果は、変異したレセプターを共発現する腫瘍が依然として好ましい標的化を示すが、MAb806を使用して、腫瘍のde2-7EGFRの状態に関係なく、増幅されたEGFRを有する腫瘍を特異的に標的化し得ることが、可能である。MAb806は遺伝子増幅の非存在下において野生型レセプターに結合しないので、現在開発されているEGFR抗体(¹⁸、¹⁹)に関係する潜在的な問題である、正常組織における取り込みは存在しない。

【0321】

(材料および方法)

(MAbおよび細胞株)

U87MG星状細胞腫細胞株は、先に詳細に記載されている²⁰。この細胞株を、de2-7EGFRを含むレトロウイルスで感染し、U87MG, Δ2-7細胞株を生成した。10のヒト扁平上皮癌腫A431細胞を、ATCC(Rockville, MD)から得た。これらの細胞株を、10%FCS(CSL, Melbourne, Australia)で補填したGlutaMAXTM(Life Technologies, Melbourne, Australia)とともにDMEM/F-12中で培養した。任意の公知のEGFR関連分子を発現しない、マウスpro-B細胞株BaF/3を、上記のように、de2-7EGFRでトランスフェクトした。DH8.3抗体(IgG1)は先

に記載されており、そしてde 2-7 EGFR中に見出される特有の接合部ペプチドを用いたマウスの免疫化の後に得た^{1 6}。MAb 806 (IgG2b)は、de 2-7 EGFRでトランスフェクトしたNR6マウス線維芽細胞を用いたマウスの免疫化の後に産生された。それは、さらなる特徴付けのために選択され、血球凝集アッセイは、NR6・ΔEGFR細胞に対しで高い力価を、しかしNR6・wt EGFR細胞に対しては低バックグラウンドを示した。de 2-7および野生型EGFRの両方を認識する528抗体は、先に記載され^{2 1}、そしてATCCから得たハイブリドーマを用い、Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne)において生産された。EGFRのCOOH末端ドメインに対して惹起されたポリクローナル抗体sc-03は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)から購入した。 10

【0322】

(その他の試薬)

野生型EGFRの組換え細胞外ドメイン (アミノ酸1-621) (sEGFR)は、先に記載^{2 2}のように生産された。de 2-7 EGFRからのビオチン化された特有の接合部ペプチド (ビオチン-LEEKKGNYVVTDH)は、標準的なFmoc化学により合成し、そして純度 (>96%)は、逆相HPLCおよび質量スペクトル分析 (Auspep, Melbourne, Australia)により決定した。

【0323】

(FACS分析)

細胞を、関係する抗体 (10 μg/ml)、次にフルオレセイン結合体化ヤギ抗マウスIgG (1:100希釈; Calbiochem, San Diego, CA)で標識した。FACSデータを、Coulter Epics Elite ESP上で、最小5,000事象を観察することにより得、そしてWindows (登録商標)用のEXPO (version 2)を用いて分析した。 20

【0324】

(ELISAアッセイ)

2つのタイプのELISAを用いて抗体の特異性を決定した。第1のアッセイでは、プレートをSegfr (0.1M炭酸緩衝液pH9.2中で10 μg/ml)で2時間コートし、そして次にPBS中の2%ヒト血清アルブミン (HSA)でブロックした。抗体を、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS)中の2%HSA中、漸増濃度で、ウェルに添加した (3連で)。結合した抗体は、基質としてABTS (Sigma, Sydney, Australia)を用い、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ヒツジ抗マウスIgG (Silenus, Melbourne, Australia)により検出し、そして405nmで吸光度を測定した。第2のアッセイでは、ビオチン化de 2-7特異的ペプチドを、ストレプトアビジン (Pierce, Rockford, Illinois)でプレコートしたELISAプレートに結合させた。抗体は、第1のアッセイにおけるように結合および検出した。 30

【0325】

(Scatchard分析)

抗体を、クロラミンT法により、^{1 2 5}I (Amrad, Melbourne, Australia)で標識し、そして免疫反応性をLindmoアッセイにより測定した^{2 3}。すべての結合アッセイは、1%HSA/PBS中で、1~2×10⁶生存U87MG・Δ2-7細胞またはA431細胞に対し、90分間4℃で穏やかに回転して実施した。10 ng/mlの^{1 2 5}I標識抗体の設定濃度を、漸増濃度の適切な非標識抗体の存在下で用いた。非特異的結合は、非標識抗体の10,000倍過剰の存在下で測定した。^{1 2 5}I-放射標識MAb 806またはDH8.3抗体のいずれも親U87MG細胞に結合しなかった。インキュベーションが終了した後、細胞を洗浄し、そしてCOBRA II γカウンタ (Packard Instrument Company, Meriden, 40

C T) を用い、結合した^{1 2 5}I-標識抗体についてカウントした。S c a t c h a r d 分析は、免疫反応性の補正の後に行った。

【0326】

(内在化アッセイ)

U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞を、M A b 8 0 6 または D H 8 . 3 抗体のいずれか (1 0 μ g / m l) と 1 時間 D M E M 中 4 ° C でインキュベートした。洗浄後、細胞を 3 7 ° C に予め暖められた D M E M に移し、そして 3 7 ° C でインキュベーションの後、種々の時点でアリコート採取した。内在化 (インターナリゼーション) を、氷冷洗浄緩衝液 (1 % H S A / P B S) 中でアリコートを直ちに洗浄することにより停止した。時間経過の終了時、細胞を上記のように F A C S によって染色した。内在化のパーセントは、以下の式を用いてゼロ時間に対する種々の時点における表面抗体染色を比較することにより算出した： 10

$$\text{内在化抗体のパーセント} = (\text{時間}_x \text{における平均蛍光-バックグラウンド蛍光}) / (\text{時間} 0 \text{における平均蛍光-バックグラウンド蛍光}) \times 100$$

この方法は、先に記載のような^{2 4}内在化を測定するためのヨウ素化抗体 (M A b 8 0 6) を用い、1 アッセイで有効にした。異なる時点での内在化率における差異は、S t u d e n t の t 検定を用いて比較した。

【0327】

(U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞の電子顕微鏡観察)

U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞を、ゼラチンでコートしたチャンバースライド (N u n c 、 N a p e r v i l l e 、 I L) 上で 8 0 % 集密まで増殖させ、そして次に氷冷 D M E M で洗浄した。次いで、細胞を M A b 8 0 6 または D H 8 . 3 抗体と、D M E M 中 4 5 分間 4 ° C でインキュベートした。洗浄後、細胞を、金結合体化 (2 0 n m 粒子) 抗マウス I g G (B B I n t e r n a t i o n a l 、 C a r d i f f 、 U K) と 4 ° C でさらに 3 0 分間インキュベートした。さらなる洗浄の後、予め暖めた D M E M / 1 0 % F C S を細胞に添加し、これを、1 ~ 6 0 分の種々の時間の間 3 7 ° C でインキュベートした。抗体の内在化は、氷冷培地により停止させ、そして細胞を、P B S / 0 . 1 % H S A 中 2 . 5 % グルタルアルデヒドで固定し、そして次に 2 . 5 % 四酸化オスmium 中で後固定した。アセトンの段階付けた系列により脱水した後、サンプルを E p o n / A r a l d i t e 樹脂中に包埋し、R e i c h e r t U l t r a c u t - S ミクロトーム (L e i c a) を用いて超薄片として切断し、そしてニッケルグリッド上に集めた。これら切片を、P h i l i p s 30

C M 1 2 透過電子顕微鏡上 8 0 k V で観察する前に、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色した。コートされたピット内に含まれる金粒子の統計分析は、 χ^2 検定を用いて実施した。

【0328】

(免疫沈降研究)

細胞を、1 6 時間、1 0 0 μ C i / m l の T r a n ^{3 5} S - L a b e l (I C N B i o m e d i c a l s 、 C A) と、5 % 透析 F C S で補填したメチオニン / システインなしの D M E M 中で標識した。P B S での洗浄の後、細胞を、溶解緩衝液 (1 % T r i t o n X - 1 0 0 、 3 0 m M H E P E S 、 1 5 0 m M N a C l 、 5 0 0 μ M A E B S F 、 1 5 0 n M アプロチニン、1 μ M E - 6 4 プロテアーゼインヒビター、0 . 5 m M E 40

D T A および 1 μ M ロイペプチン、p H 7 . 4) 中に 4 ° C で 1 時間置いた。溶解物を、1 2 , 0 0 0 g における 1 0 分間の遠心分離により清澄化し、次いで、P r o t e i n A - S e p h a r o s e の添加の前に、4 ° C で 3 0 分間、5 μ g の適切な抗体とインキュベートした。免疫沈降物を、溶解緩衝液で 3 回洗浄し、S D S サンプル緩衝液と混合し、4 ~ 2 0 % T r i s / グリシゲルを用いるゲル電気泳動により分離し、次にそれを乾燥し、そして X 線フィルムに曝した。

【0329】

(腫瘍をもつヌードマウスにおける生体分布)

腫瘍異種移植片を、 3×10^6 の U 8 7 M G 細胞、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞または A 4 3 1 細胞の皮下注射によってヌード B A L B / c マウス中に確立した。U 8 7 M G . Δ 2 50

ー7異種移植片におけるd e 2ー7 E G F R発現は、種々の時点で免疫組織化学により測定したとき、生体分布の期間を通じて安定なままである（データは示さず）。A 4 3 1細胞はまた、腫瘍異種移植片として増殖するとき、免疫組織化学により決定されるように、それらのM A b 8 0 6反応性を保持していた。U 8 7 M G細胞またはA 4 3 1細胞は、U 8 7 M G. Δ 2ー7細胞を1つの側に注射する7～10日前に、他方の側に注射した。なぜなら、d e 2ー7 E G F Rを発現する異種移植片についてより速い増殖速度が観察されたからである。抗体を放射線標識し、そして上記のように免疫反応性を評価し、そして腫瘍が100～200mg重量であったとき、後眼窩（r e t r o - o r b i t a l）経路によりマウス中に注射した。各マウスは、2つの異なる抗体（2μg／抗体）：2μCiの¹²⁵Iー標識M A b 8 0 6および2μCiの¹²⁵Iー標識D H 8. 3または528を受けた。示されなければ、5匹のマウスの群を、注射後の種々の時点で屠殺し、そして心臓穿刺により血液を得た。腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓および肺を解剖により得た。すべての組織を秤量し、そして2チャンネルの計数ウィンドウを用いて¹²⁵I活性および¹³¹I活性についてアッセイした。各抗体についてのデータは、注射用量標準に対する比較により決定されたグラム腫瘍あたりの注射用量のパーセント（% I D／g腫瘍）で表されるか、または血液／肝臓に対する腫瘍の比（すなわち、% I D／g腫瘍÷% I D／g血液または肝臓）に変換された。群間の差異は、S t u d e n tのt検定で分析した。放射線標識M A b 8 0 6注射の後、いくつかの腫瘍をホルマリン中に固定し、パラフィン中に包埋し、5μm切片に切断し、そして次にX線フィルム（A G F A、M o r t s e l、B e l g i u m）に曝し、オートラジオグラフィーにより抗体局在化を決定した。

【0330】

（結果）

（細胞株への抗体の結合）

M A b 8 0 6およびD H 8. 3抗体の特異性を確認するために、U 8 7 M G細胞およびU 8 7 M G. Δ 2ー7細胞への結合をF A C Sにより分析した。関連のないマウスI g G 2 bを、M A b 8 0 6のイソ型コントロールとして含め、そして528抗体を、これがd e 2ー7および野生型E G F Rの両方を認識するので含めた。528抗体のみがU 8 7 M G細胞株を染色し得たことは（図1）、これら細胞が野生型E G F Rを発現することを示す先の報告¹⁰と一致する。M A b 8 0 6およびD H 8. 3抗体の両方が関連のない抗体と類似の結合レベルを有したことは、それらが野生型レセプターを結合し得ないことを明確に示す（図1）。イソ型コントロール抗体のU 8 7 M G. Δ 2ー7細胞への結合は、U 8 7 M G細胞について観察されたそれと同様であった。M A b 8 0 6およびD H 8. 3抗体が、U 8 7 M G. Δ 2ー7細胞を免疫染色したことは、これらの抗体がd e 2ー7 E G F Rを特異的に認識することを示す（図1）。528抗体は、U 8 7 M G. Δ 2ー7を、親細胞より高い強度で染色した（図1）。なぜなら、この抗体が、これら細胞で同時発現されるd e 2ー7および野生型レセプターの両方を結合するからである。重要なことは、M A b 8 0 6がまた、B a F / 3. Δ 2ー7細胞株を結合したことであり、野生型E G F Rの同時発現はM A b 8 0 6反応性に必要ではないことを示す（図1に示される、しかしデータは本明細書中に示さず）。

【0331】

（E L I S Aアッセイにおける抗体の結合）

M A b 8 0 6およびD H 8. 3抗体の特異性をさらに特徴付けるために、それらの結合をE L I S Aにより調べた。M A b 8 0 6および528抗体の両方は、固定化された野生型s E G F Rに対し、用量依存性かつ飽和する結合曲線を示した（図2A）。d e 2ー7 E G F R中に見出された上記特有の接合部ペプチドがs E G F R内に含まれていないとき、M A b 8 0 6は、野生型E G F R配列内に位置するエピトープに結合されているはずである。528抗体の結合は、M A b 8 0 6について観察された結合よりおそらく低かった。なぜなら、それは、構造的決定基を認識するからである。予期されるように、D H 8. 3抗体は、10μg／mlまでの濃度でさえ野生型s E G F Rを一様に結合しなかった（図2A）。溶液中のs E G F Rは、528抗体の固定化されたs E G F Rへの結合を用量依

存様式で阻害したけれども、それは、MAb 806の結合を阻害し得なかった（図2B）。これは、MAb 806が、一旦ELISAプレート上に固定化された（立体構造変化を誘導し得るプロセス）野生型EGFRのみを結合し得ることを示唆する。BIAコアを用いて同様の結果が観察され、それによって、MAb 806は固定化sEGFRを結合したが、固定化されたMAb 806は、溶液中のsEGFRを結合し得なかった（データは示さず）。95℃における10分間の加熱による変性の後、溶液中のsEGFRは、MAb 806の固定化されたsEGFRへの結合を阻害し得（図2Cに示すが本明細書中にデータは示さない）、MAb 806は、特定の条件下で、野生型EGFRを結合し得ることを確認した。興味深いことに、この変性したsEGFRが、528抗体の結合を阻害し得なかったことは（図2Cに示すが本明細書中にデータは示さない）、この抗体が立体構造エピトープを認識することを示す。DH8.3抗体は、特有のde2-7EGFRペプチドに対し、用量依存性で、かつ飽和可能な結合を示した（図2D）。MAb 806または528抗体のいずれも、DH8.3の飽和結合を得るために用いた濃度より高い濃度でさえ、このペプチドに結合しなかったことは、MAb 806が、このペプチド内のエピトープ決定基を認識しないことをさらに示す。

【0332】

（抗体のScatchard分析）

各抗体の相対的親和性を決定するために、U87MG、Δ2-7細胞を用いてScatchard分析を実施した。MAb 806およびDH8.3抗体の両方は、ヨウ素化されたとき高い免疫反応性を保持し、そして代表的には、MAb 806については90%より大きく、そしてDH8.3抗体については45～50%であった。MAb 806は、de2-7EGFRレセプターに対して $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ の親和性を有し、その一方、DH8.3の親和性は、 $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ で数10倍、より低かった。いずれのヨウ素化抗体もU87MG親細胞に結合しなかった。MAb 806は、平均して細胞あたり 2.4×10^5 の結合部位を認識し、DH8.3抗体結合は平均して 5.2×10^5 部位であった。従って、抗体間でレセプター数が良好に一致していたのみならず、同じ細胞株上の異なるde2-7EGFR特異的抗体により測定されたような、細胞あたり 2.5×10^5 de2-7レセプターを示す先の報告25とも一致した。

【0333】

（U87MG、Δ2-7細胞による抗体の内在化）

標的細胞への結合後の抗体内在化の割合は、その腫瘍標的化性質および治療オプションの両方に影響する。その結果、本発明者らは、U87MG、Δ2-7細胞への結合後のMAb 806およびDH8.3抗体の内在化をFACSにより調べた。両方の抗体は比較的迅速な内在化を示し、MAb 806は10分で、そしてDH8.3は30分で定常状態に到達した（図3）。DH8.3の内在化は、割合（10分で、MAb 806の36.8%と比較して内在化DH8.3の80.5%、 $P < 0.01$ ）および60分における内在化総量（93.5%対30.4%、 $p < 0.001$ ）の点の両方で有意により高かった。MAb 806は、実施した4つのアッセイのすべてにおいて、20分に比較して30分および60分におけるわずかにより低いレベルの内在化を示した（図3）。この結果はまた、ヨウ素化MAb 806に基づく内在化アッセイを用いて確認された（データは示さず）。

【0334】

（抗体内在化の電子顕微鏡分析）

抗体間の内在化割合におけるこの差異が得られたので、抗体細胞内輸送の詳細な分析を、電子顕微鏡を用いて実施した。DH8.3抗体は、コートされたピットを經由して優先的に内在化したが（図19A）、MAb 806は、マクロピノサイトーシスにより内在化するようであった（図19B）。事実、MAb 806とインキュベートした細胞中で形成された32のコートされたピットの詳細な分析は、それらのいずれも抗体を含まなかったことを示した。対照的に、DH8.3とインキュベートした細胞からのすべてのコートされたピットの約20%は、複数の金粒子を含む数でもって抗体陽性であった。コートされたピット内に含まれた金粒子の総数の統計的分析は、この差異が高度に有意であったことを

見出した ($p < 0.01$)。20～30分後、両方の抗体は、形態学的にリソソームに似ている構造中に観察することができた (図19C)。これら構造内の細胞細片の存在はまた、それらのリソソーム性質と一致する。

【0335】

(腫瘍保持ヌードマウスにおける抗体の生体分布)

MAb 806およびDH8.3抗体の生体分布を、1つの側にU87MG異種移植片を、そして他方の側にU87MG. $\Delta 2-7$ 異種移植片を含むヌードマウス中で比較した。比較的短時間の期間をこの研究のために選択した。なぜなら、先の報告¹⁶は、DH8.3抗体が4～24時間の間で腫瘍標的化のピークレベルを示すことを証明していたからである。%ID/g腫瘍について、MAb 806は、U87MG. $\Delta 2-7$ 異種移植片において、8時間で18.6%ID/g腫瘍のそのピークレベルに到達し (図4A)、血液を除く任意のその他の組織よりかなり高かった。DH8.3もまた、8時間でピーク腫瘍レベルを示したが、そのレベルは、MAb 806と比較して統計的により低い ($p < 0.001$)。8%ID/g腫瘍であった (図4B)。両方の抗体のレベルは、24時間および48時間でゆっくりと傾斜した。¹²⁵Iで標識したMAb 806単独での注射後8時間で集めたU87MG. $\Delta 2-7$ 異種移植片組織切片のオートラジオグラフィは、生存腫瘍への抗体の局在化を明らかに示す (図20)。いずれの抗体もU87MG親異種移植片の特異的標的化は示さなかった (図4A、4B)。血液/肝臓に対する腫瘍の比に関し、MAb 806は、血液 (1.3の比) および肝臓 (6.1の比) の両方について、24時間で最高の比を示した (図5A、5B)。DH8.3抗体は、血液において8時間で最高の比 (0.38の比) そして肝臓において24時間で最高の比 (1.5の比) を有し (図5A、5B)、その両方は、MAb 806について得られた値よりかなり低い。

【0336】

(増幅されたEGFRを含む細胞へのMAb 806の結合)

MAb 806が、増幅されたレセプター遺伝子を含む細胞中で発現されたEGFRを認識し得るか否かを調べるために、A431細胞に対するその結合を分析した。FACS分析により、低いが、高度に再現性のあるA431細胞へのMAb 806の結合が観察された (図6)。DH8.3抗体がA431細胞を結合しなかったことは、MAb 806の結合が低レベルde2-7EGFR発現の結果ではなかったことを示す (図6)。予期されるように、抗EGFR528抗体は、A431細胞の強い染色を示した (図6)。3つのこのような実験の平均は、細胞あたり 2.4×10^5 レセプターとの $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性の値を与えた。従って、このレセプターに対する親和性は、de2-7EGFRに対する親和性より数10倍低かった。さらに、MAb 806は、A431細胞の表面上に見出されるEGFRの小部分のみを認識するようである。528抗体を用いて細胞あたり約 2×10^6 のレセプターが測定され、これは、多くの他の研究²⁶と一致する。これらの結果が単にA431細胞株に限定されなかったことを確実にするために、MAb 806反応性を、EGFR遺伝子の増幅を示す2つの他の細胞株中で調べた。HN5頭頸部細胞株²⁷およびMDA-468胸部癌細胞株²⁸の両方は、EGFR遺伝子の複数コピーを含むことが報告されている。これらの報告と一致して、528抗体は、両方の細胞株の強い染色を示した (図21)。A431細胞株とのように、MAb 806は、両方の細胞株を明らかに染色したが、528抗体で観察されたより低いレベルであった (図21)。従って、MAb 806結合は、単にA431細胞に限定されず、EGFR遺伝子の増幅を含む細胞について一般的な観察であるようである。

【0337】

(免疫沈降)

MAb 806反応性を、³⁵S標識化細胞を用いる免疫沈降によりさらに特徴付けた。sc-03抗体 (EGFRのc末端ドメインに特異的な市販のポリクローナル抗体) は、U87MG. $\Delta 2-7$ 細胞からの3つのバンドを免疫沈降させた；2つのde2-7EGFRバンドに対応するダブレットがこれらの細胞で観察され、そしてより大きい分子量バンドはwt EGFRに対応する (図22)。対照的に、MAb 806は、2つのde2-7

E G F R バンドを免疫沈降したが、w t E G F R は全くなかった。この s c - 0 3 抗体は、A 4 3 1 細胞からの w t E G F R に対応する 1 つのバンドを免疫沈降した (図 2 2)。M A b 8 0 6 もまた、A 4 3 1 細胞からの w t E G F R に対応する 1 つのバンドを免疫沈降した (図 2 2) が、F A C S および S c a t c h a r d データと一致して、M A b 8 0 6 により免疫沈降された E G F R の量は、細胞表面上に存在する総 E G F R より実質的に少なかった。M A b 8 0 6 および s c - 0 3 は、同様の量の d e 2 - 7 E G F R を免疫沈降したので、この結果は、M A b 8 0 6 抗体が、レセプターを過剰発現する細胞において、E G F R の一部分のみを認識するという観念を支持している。関連のない I g G 2 b (M A b 8 0 6 のイソ型コントロール) は、いずれの細胞株からの E G F R も免疫沈降しなかった (図 2 2)。同一の条件を用いて、M A b 8 0 6 は、親 U 8 7 M G 細胞からの E G F R を免疫沈降しなかった (データは示さず)。

10

【0338】

(M A b 8 0 6 による A 4 3 1 細胞のインビボ標的化)

第 2 の生体分布研究は、M A b 8 0 6 を用いて実施し、それが A 4 3 1 腫瘍異種移植片を標的にし得るか否かを決定した。この研究は、M A b 8 0 6 による U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片の標的化に関するより多くの情報を得るためにより長い時間経過に亘り実施し、これは、ポジティブコントロールとしてすべてのマウスに含められた。さらに、抗 E G F R 5 2 8 抗体を、A 4 3 1 異種移植片に対するポジティブコントロールとして含めた。なぜなら、先の研究^{2 1}が、ヌードマウスで増殖した A 4 3 1 細胞への、低い有意であるこの抗体の標的化を示していたからである。最初の 4 8 時間の間、M A b 8 0 6 は、初期実験で観察されたのとほぼ同じ標的化性質を示した (図 4 A と比較される図 7 A)。% I D / g 腫瘍に関し、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片中の M A b 8 0 6 のレベルは、2 4 時間の後にゆっくりと傾いたが、正常組織中で検出されたレベルより常に高く維持された。A 4 3 1 異種移植片中の取り込みは比較的低かったが、肝臓、脾臓、腎臓および肺のような正常組織中で観察されなかった、最初の 2 4 時間の間の % I D / g 腫瘍のわずかな増加が存在した (図 7 A)。% I D / g 腫瘍として表されたとき、5 2 8 抗体の取り込みは、両方の異種移植片において低かった (図 7 B)。^{1 2 5} I 標識 M A b 8 0 6 単独での注射の後 2 4 時間で集められた A 4 3 1 異種移植片組織切片のオートラジオグラフィは、腫瘍周縁の周囲あり、かつ壊死の中央領域にない生存腫瘍への抗体の局在化を明瞭に示す (図 2 3)。血液に対する腫瘍の比に関し、M A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片について 7 2 時間、そして A 4 3 1 異種移植片について 1 0 0 時間でピークとなった (図 8 A、8 B)。M A b 8 0 6 について、腫瘍：血液比は、A 4 3 1 腫瘍に関して 1 . 0 を超えることは決してなかったが、時間経過の全体に亘って増加し (図 8 B)、そして調べた他のすべての組織より高かったこと (データは示さず) は、標的化のレベルが低いことを示す。5 2 8 抗体についての血液に対する腫瘍の比は、A 4 3 1 異種移植片でより高いレベルが注記されたが、M A b 8 0 6 に類似のプロフィールを示した (図 8 A、8 B)。M A b 8 0 6 が、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片において、7 2 時間で 7 . 6 の肝臓に対する腫瘍の比のピークを有したことは、正常組織に比較したこれら腫瘍における優先的取り込みを明らかに示す (図 8 C)。M A b 8 0 6 についての器官に対する他の腫瘍の比は、肝臓において観察された比と類似した (データは示さず)。A 4 3 1 異種移植片における M A b 8 0 6 の肝臓に対する腫瘍の比のピークが、約 1 (1 o d) 時間において 2 . 0 であったことは、正常組織と比較して腫瘍のわずかに優先的な取り込みを再び示す (図 8 D)。

20

30

40

【0339】

(討論)

d e 2 - 7 E G F R 中に見出された特有の接合部ペプチドに対して惹起された先に記載の L 8 A 4 モノクローナル抗体は、M A b 8 0 6 に類似の様式で挙動する^{3 8}。d e 2 - 7 E G F R でトランスフェクトされた U 8 7 M G 細胞を用い、この抗体は、類似の内在化率 (M A b 8 0 6 について 1 時間で 3 0 % と比較して 1 時間で 3 5 %) を有し、そして d e 2 - 7 E G F R でトランスフェクトされた 3 T 3 線維芽細胞を用いるとき、匹敵するイン

50

ビボ標的化を示した (M A b 8 0 6 について 8 時間で 1 8 % I D / g 腫瘍と比較して 2 4 時間で 2 4 % I D / g 腫瘍のピーク) ^{2 5}。

【0 3 4 0】

おそらく、現存の E G F R 抗体と比較して最も重要な M A b 8 0 6 の利点は、M A b 8 0 6 が、細胞障害性因子に直接結合し得ることである。このアプローチは、現在の E G F R 特異的抗体を用いて可能ではない。なぜなら、これらの抗体は、肝臓を標的化し、そして細胞障害性結合が、ほとんど確実に、重篤な毒性を引き起こすからである。抗体への細胞障害性因子 (例えば、薬物 ^{4 1} または放射線同位体 ^{4 2}) の結合は、効力を改善し、そしてこれらの因子の全身的毒性を減少させる可能性を有する。腫瘍の殺傷を媒介する結合抗体の能力は、それが内部移行される可能性に依存する。従って、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞における M A b 8 0 6 を用いた場合に観察される迅速な内部移行は、M A b 8 0 6 がこのタイプのアプローチの理想的な候補であることを示唆する。 10

【0 3 4 1】

M A b 8 0 6 は、特有の接合ペプチドと会合していないエピトープに対する第 1 の d e 2 - 7 E G F R 特異的抗体であるという点において、新規である。これは、D H 8 . 3 (以前に記載された d e 2 - 7 E G F R 抗体) よりも優れた親和性および良好な腫瘍標的化特性を有する。しかし、重要な特性は、E G F R 遺伝子の増幅を示す腫瘍細胞の表面上で発現される E G F R 分子のサブセットを認識する能力である。このことは、M A b 8 0 6 が、独特の臨床的特性 (d e 2 - 7 および増幅された E G F R の両方を標的化するが、野生型レセプターは標的化しない能力) を有し得ることを示唆する。正確に実証される場合、この抗体は、肝臓のような器官を標的化せず、従って、E G F R (これは、細胞毒性因子の結合には使用され得ない) に対する現在の抗体よりも汎用性となる ^{1 8 , 1 9}。最終的に、M A b 8 0 6 は、d e 2 - 7 E G F R において見出される短縮により誘導されるコンフォメーション変化を分析するための有用な試薬であり得る。 20

【0 3 4 2】

(参考文献)

【0 3 4 3】

【表 1 0】

1. Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, et al. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. Cancer Res 1997;57:4130 -40.

2. Olapade-Olaopa EO, Moscatello DK, MacKay EH, et al. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;82:186–94.
3. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995;55:3140–8.
4. Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundareshan P, et al. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:3217–20.
5. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4309–13.
6. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2965–9.
7. Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:773–9.
8. Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 1988;8:1816–20.
9. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, et al. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified re-arranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8602–6.
10. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7727–31.
11. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995;6:1251–9.

10

20

30

40

12. Nagane M, Coufal F, Lin H, et al. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996;56:5079 –86.
13. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 1998;4:148 –58.
14. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4207–11. 10
15. Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1996;73:1366 –72.
16. Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1995; 63:537–43.
17. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:5536 –9. 20
18. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000;18:904 –14.
19. Faillot T, Magdelenat H, Mady E, et al. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* 1996;39:478 –83. 30
20. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968;74:465–86.
21. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, et al. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984;44:1002–7.

22. Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, et al. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 2000;18:11–29.
23. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984;72:77–89.
24. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927–35.
25. Reist CJ, Archer GE, Wikstrand CJ, et al. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1997;57:1510–5.
26. Santon JB, Cronin MT, MacLeod CL, et al. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. *Cancer Res* 1986;46:4701–5.
27. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991;64:251–4.
28. Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128:898–905.
29. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197–206.
30. den Eynde B, Scott AM. Tumor antigens. In: Delves PJ, Roitt IM, eds. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic Press, 1998. 2424–31.
31. Seymour L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. *Cancer Treat Rev* 1999;25:301–12.

10

20

30

40

32. Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, et al. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:633-43.

33. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311-8.

34. Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:5375-83.

10

35. Reist CJ, Garg PK, Alston KL, et al. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1996;56:4970-7.

36. Reist CJ, Archer GE, Kurpad SN, et al. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res* 1995;55:4375-82.

20

37. Press OW, DeSantes K, Anderson SK, et al. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res* 1990;50:1243-50.

38. Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. *Nucl Med Biol* 1997;24:639-47.

39. Mineo C, Gill GN, Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 1999;274:30636-43.

30

40. Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 2001;61:5355-61.

41. Trail PA, Bianchi AB. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 1999;11:584-8.

42. DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr Opin Immunol* 1999;11:563-9.

40

(実施例 19)

(レセプターに対する新規なモノクローナル抗体である、モノクローナル抗体 (mAb) 806 の全身投与による、変異上皮増殖因子レセプターを過剰発現する頭蓋内異種移植神経芽腫の増殖抑制)

この実施例は、ヌードマウスにおける頭蓋内異種移植神経芽腫の増殖に対する mAb 806 の評価を示す。以下は、Mishimara (2001) *Cancer Research*, 61: 5349-5354 に対応し、これに示されており、そしてこの刊行物

50

全体は、適切な場合、本明細書中の図面を相互参照と共に本明細書中で参考として援用され、そしてこの一部をなす。M i s h i m aらのデータおよび知見は、以下に記載される。

【0344】

m A b 806での全身処置は、腫瘍の容量を有意に減少し、そしてU87 MG, ΔEGFR神経芽腫、LN-Z308, ΔEGFR神経芽腫またはA1207神経芽腫（これらの各々は、高レベルのΔEGFRを発現する）の異種移植片を有するマウスの生存度を増加した。逆に、m A b 806処置は、親U87 MG腫瘍（これは低レベルの内在性野生型EGFRを発現した）またはU87 MG, DK腫瘍（これは、高レベルのキナーゼ欠失ΔEGFRを発現した）を有するマウスに対して効果的ではなかった。野生型EGFR過剰発現U87 MG神経芽腫（U87 MG, wtEGFR）を異種移植されたマウスの生存度のわずかな増加は、このような細胞との弱い交差反応性と一致するm A b 806によって、達成された。マウスにおけるU87 MG, ΔEGFR腫瘍の、m A b 806での処置は、腫瘍増殖および新脈管形成の両方の減少、ならびにアポトーシスの増加を引き起こした。機構的には、インビボのm A b 806処置は、構成的に活性なΔEGFRのリン酸化の減少を生じ、そしてアポトーシスプロテクターであるBcl-XLの下方制御された発現を引き起こした。これらのデータは、m A b 806処置が、ΔEGFRを発現する攻撃的な神経芽腫のための有用な生体治療剤であり得るという前臨床的証拠を提供する。

【0345】

本実施例は、新規のΔEGFR特異的m A bであるm A b 806での全身処置が、構成的に活性なΔEGFRのリン酸化の減少を引き起こし、それにより、ヌードマウスにおいてこの変異レセプターを過剰発現する頭蓋内に移植された神経芽腫の増殖を抑制し、そしてそれらの生存を延長することを実証する。腫瘍増殖の阻害は、増殖および新脈管形成の減少、ならびに腫瘍細胞のアポトーシスの増加により媒介された。この抑制は、ΔEGFRによる活発なシグナル伝達に影響を与えた。なぜなら、キナーゼ欠失ΔEGFR（DK）を過剰発現する細胞由来の頭蓋内異種移植片（これは、同様に、m A b 806により十分に認識される）は、同じ治療の後に有意には抑制されなかったからである。

【0346】

（材料および方法）

（細胞株）ヒト神経膠芽腫の一次移植は、培養物中の増殖されて再配置されたレセプターの発現を迅速に損失するので、現存の神経膠芽腫細胞株はこのような発現を示さない。ヒト腫瘍において観察される発現レベルに匹敵する発現レベルの維持を強いるために、U87 MG細胞、LN-Z308細胞およびA1207細胞（Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NYから寄贈）を、ΔEGFRウイルス、キナーゼ欠失ΔEGFR（DK）ウイルス、またはwtEGFRウイルス（これらはまた、以前に記載されたように（21）、G418に対する耐性を与えた）で感染した。類似のレベルの種々のEGFR対立遺伝子を発現する集団（これらの発現レベルは、25遺伝子コピーの増幅レベルにほぼ対応し；ヒト神経膠芽腫は、代表的に、短縮型レセプターの10～50遺伝子コピーの増幅レベルを有する）を、以前に記載されたようにして（21）、FACSによって選択し、そしてそれぞれ、U87 MG, ΔEGFR、U87 MG, DK、U87 MG, wtEGFR、LN-Z308, ΔEGFR、LN-Z308, DK、LN-Z308, wtEGFR、A1207, ΔEGFR、A1207, DK、およびA1207, wtEGFRと命名した。各々は、G418（U87 MG細胞株、400mg/ml；LN-Z308細胞株およびA1207細胞株、800mg/ml）を含む培地中で維持した。ΔEGFR特異的m A bであるm A b s. m A b 806（IgG2b, k）を、ΔEGFRを発現するNR6マウス線維芽細胞でのマウスの免疫の後に、生成した。これを、いくつかのクローンから選択した。なぜなら、赤血球凝集アッセイにより、これが、NR6, ΔEGFR細胞に対する高度な反応性、およびNR6, wtEGFR細胞に対する低い反応性を有し、そしてNR

6. 細胞に対しては反応性を有さなかったからである。

【0347】

(免疫沈降およびウエスタンブロット分析) 細胞を、溶解緩衝液 (50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、10% グリセロール、1% Triton X-100、2 mM EDTA、0.1% SDS、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、10 mM ナトリウム PPI、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド、2 mM Na_3VO_4 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、および 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アプロチニンを含む) を用いて溶解した。抗体を、細胞溶解物と共に、4°C で1時間インキュベートし、その後、プロテインAセファロースおよびプロテインGセファロースを添加した。免疫沈降物を、溶解緩衝液で2回、およびHNTG緩衝液 [50 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.1% Triton X-100、および10% グリセロール] で1回洗浄し、電気泳動し、そしてニトロセルロース膜に移した。ブロットを、抗EGFR抗体であるC13でプローブし、そしてタンパク質を、ECL化学発光検出システム (Amersham Pharmacia Biotech.) を使用して可視化した。沈降のために使用したmAbは、mAb 806、抗EGFR mAbクローン528 (Oncogene Research Products, Boston, MA)、またはクローンEGFR. 1 (Oncogene Research Products) であった。免疫ブロットにおける野生型および Δ EGFRの両方の検出のために使用したmAb、C13は、Dr. G. N. Gill (University of California, San Diego, CA) から提供された。Bcl-Xに対する抗体 (ウサギポリクローナル抗体; Transduction Laboratories, Lexington, KY) およびホスホチロシン (4G10、Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を、以前に記載されたようにして (26)、ウエスタンブロット分析のために使用した。

【0348】

(フローサイトメトリー分析) 細胞を、以前に記載されるようにして (21)、関連の抗体で標識し、次いで、フルオレセイン結合ヤギ抗マウスIgG (1:100希釈; Becton-Dickinson Pharmingen, San Diego, CA) で標識した染色した。細胞を、Cell Questソフトウェア (Becton-Dickinson Pharmingen) を使用するFACSCaliburで分析した。一次抗体について、以下のmAbを使用した: mAb 806、抗EGFR mAbクローン528、およびクローンEGFR. 1。マウスIgG2aまたはIgG2bを、アイソタイプコントロールとして使用した。

【0349】

(腫瘍治療) PBS 5 μl 中の、U87 MG. Δ EGFR細胞 (1×10^5) または 5×10^5 のLN-Z308. Δ EGFR、A1207. Δ EGFR、U87 MG、U87 MG. DKおよびU87 MG. wtEGFR細胞を、以前に記載されたようにして (27)、ヌードマウスの脳の右線条体に移植した。mAb 806、またはIgG2bアイソタイプコントロールを用いる全身治療を、移植後0日目から14日目まで一日おきに、100 μl の容量で、1 μg のmAbを腹腔内注射することによって、達成した。脳内U87 MG. Δ EGFR腫瘍の直接治療について、10 μg のmAb 806、またはIgG2bアイソタイプコントロールを、5 μl の容量で、1日目から始めて5日間、一日おきに、腫瘍注入部位に注射した。

【0350】

(免疫組織化学) 腫瘍における新脈管形成を評価するために、これらを、塩化亜鉛を含む溶液中に固定し、パラフィン包埋し、切片化し、そしてモノクローナルラット抗マウスCD31抗体 (Becton-Dickinson Pharmingen; 1:200) を用いて免疫染色した。腫瘍細胞増殖の評価を、Ki-67免疫組織化学によって、ホルマリンで固定してパラフィン包埋した腫瘍組織について実施した。パラフィン除去 (deparaffinization) および再水和の後、この組織切片を、メタノール中3

%の過酸化水素と共にインキュベートして、内在性ペルオキシダーゼをクエンチした。これらの切片を、ヤギ血清で30分間ブロックし、そして一次抗体と共に、4℃で一晩インキュベートした。次いで、これらの切片を、PBSで洗浄し、そしてビオチン化した二次抗体と共に30分間インキュベートした。PBSで数回洗浄した後、生成物を、色素原としてのジアミノベンジジンおよび対比染色としてのヘマトキシリンを含むストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼを使用して可視化した。増殖の測定値として、Ki-67標的指数を、強力な(3400)場における標識した核：全核の比として決定した。約2000個の核を、系統的ランダムサンプリングによって、各場合において計数した。マクロファージおよびNK細胞の染色について、緩衝化した4%のパラホルムアルデヒド溶液で固定した凍結切片を、それぞれ、ビオチン化mAb F4/80 (Serotec, Raleigh, NC) およびポリクローナルウサギ抗アシアロ (antiasialo) GM1 抗体 (Dako Chemicals, Richmond, VA) を使用して、免疫染色した。新脈管形成を、コンピューター分析を使用して、血管面積として定量した。この目的のために、切片を、抗CD31を使用して免疫染色し、そして対比染色を行わずに、コンピューター画像分析システムを使用して分析した。MVAを、以前に記載されるようにして(27)、CCDカラーカメラを使用して、3200倍の倍率でこれらの切片のデジタル画像を取り込むことによって、決定した。次いで、Image Pro Plus バージョン4.0ソフトウェア(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)を使用して、画像を分析し、そしてMVAを、各切片における全染色量を測定することによって、決定した。各スライドについて、4つの領域を評価した。この値を、各領域における全面積の割合として表した。結果を、少なくとも2人の観察者による各々の実験において、確認した(K. M., H-J. S. H.)。

【0351】

(TUNELアッセイ) 腫瘍組織中のアポトーシス細胞を、以前に記載されるようにして(27)、TUNEL方法を使用することによって検出した。TUNEL陽性細胞を、X400で計数した。そのアポトーシス指数を、各領域中のアポトーシス細胞数：全細胞数の比として計算した。

【0352】

(統計的分析) このデータを、インビボ生存アッセイ以外は、スチューデントt検定によって、有意性について分析し、これを、ウィルコクソン分析によって分析した。

【0353】

(結果)

(mAb 806の全身処置は、ΔEGFR過剰発現脳内神経芽腫瘍を有するマウスの生存を延長する)

抗ΔEGFR mAbであるmAb 806の効力を試験するために、本発明者らは、脳内ΔEGFR過剰発現神経芽腫異種移植片を有するヌードマウスを、mAb 806、アイソタイプコントロールのIgG、またはPBSの腹腔内注射を用いて処置した。U87 MG、ΔEGFR細胞を、ヌードマウスに脳内移植し、そして「材料および方法」において記載されるようにして、同日に処置を始めた。

【0354】

PBSまたはアイソタイプコントロールのIgGで処置された動物は、13日の中央生存期間を有し、一方、mAb 806で処置されたマウスは、21日まで、中央生存期間の61.5%の増加を有した($p < 0.001$; 図24A)。移植の3日後、腫瘍が確立された後のマウスの処置もまた、コントロール群の中央生存期間と比較して、46.1%だけ(13日から19日目; $P < 0.01$) mAb 806処置動物の中央生存期間を延長した(データは示さず)。mAb 806のこれらの抗腫瘍効果がU87 MG、ΔEGFR異種移植片を越えて延びるか否かを決定するために、本発明者らはまた、LN-Z308、ΔEGFRおよびA1207、ΔEGFRの他の神経芽腫細胞移植片を有する動物に対して同様の処置を行った。LN-Z308、ΔEGFR異種移植片を有するmAb 806で処置したマウスの中央生存期間は、コントロールについての19日間から58日

10

20

30

40

50

間に延びた ($P < 0.001$; 図24B)。驚くべきことに、mAb 806で処置した8匹の動物のうち4匹が、60日以上生存した(図24B)。A1207、 Δ EGFR異種移植片を有する動物の中央生存期間はまた、コントロールについての24日間から29日間にのびた ($P < 0.01$; データは示さず)。

【0355】

(mAb 806処置は、 Δ EGFR過剰発現脳腫瘍増殖を阻害する)

U87 MG、 Δ EGFR異種移植片およびLN-Z308、 Δ EGFR異種移植片を有するマウスを、それぞれ、9日目および15日目に殺傷した。腫瘍部分を、組織病理学的に分析し、そして腫瘍容量を、「材料および方法」において記載されるようにして決定した。動物の生存期間について観察された結果と一致して、mAb 806処置は、コントロール群の移植片の容量と比較して、U87 MG、 Δ EGFR移植片の容量を90%有意に減少し ($P < 0.001$; 図24C)、LN-Z308、 Δ EGFR移植片の容量を95%有意に減少した ($P < 0.001$; 図24D)。類似の結果を、A1207、 Δ EGFR腫瘍を有する動物について観察した(65%の容量減少; $P < 0.01$; データは示さず)。

【0356】

(mAb 806での腫瘍内処置は、U87 MG、 Δ EGFR脳腫瘍を有するマウスの生存期間を延長する)

本発明者らはまた、U87 MG、 Δ EGFR異種移植片の処置のためのmAb 806の直接腫瘍内注射の効力を決定した。「材料および方法」において記載されるようにして、動物に、mAb 806またはアイソタイプコントロールのIgGの腫瘍内注射を、移植の1日後に実施した。コントロール動物は、15日間生存し、一方、mAb 806で処置したマウスは、18日間生存し続けた ($P < 0.01$; 図24E)。mAb 806を用いる腫瘍内処置は、幾分か効果的であったが、これは複数回の頭蓋内注射および感染の危険性の増加という問題を伴った。従って、本発明者らは、さらなる研究のための全身処置に焦点をあてた。

【0357】

(mAb 806処置は、U87 MG、wtEGFRを有するマウスの生存期間をわずかに延長するが、U87 MG脳内異種移植片またはU87 MG、DK脳内異種移植片を有するマウスの生存期間は延長しない)

mAb 806による増殖阻害が、 Δ EGFRを発現する腫瘍に対して選択的であるか否かを決定するために、本発明者らは、U87 MG脳異種移植片、U87 MG、DK(キナーゼ欠失 Δ EGFR)脳異種移植片またはU87 MG、wtEGFR脳異種移植片を有する動物を、処置した。mAb 806処置は、U87 MG腫瘍(これは低レベルの内在性wtEGFRを発現する(22))を移植したマウスの生存期間(図25A)も、U87 MG、DK異種移植片(これは、低レベルの内因性wtEGFRに加えて、キナーゼ欠失 Δ EGFRを過剰発現する)を有する動物の生存期間(図25B)も延長しなかった。mAb 806処置は、U87 MG、wtEGFR腫瘍(これは、wtEGFRを過剰発現する)を有するマウスの生存期間をわずかに増加した ($P < 0.05$; 中央生存期間、23日 対 26日(コントロール群)) (図25C)。

【0358】

(mAb 806の反応性はインビボ抗腫瘍効果と相関する)

種々のレベルのEGFRまたは異なるタイプのEGFRを発現する腫瘍に対するmAb 806の差次的効果を理解するために、本発明者らは、FACS分析によって、種々の腫瘍細胞とのmAb 806反応性を決定した。以前の報告(21)と一致して、抗EGFR mAb 528は、 Δ EGFRおよびwtEGFRの両方を認識し、そしてU87 MG細胞と比較して、U87 MG、 Δ EGFR細胞のより強力な染色を示した(図26A、528)。逆に、抗体EGFR. 1は、 Δ EGFRと反応しなかったが、wtEGFRと反応した(21)。なぜなら、U87 MG、 Δ EGFR細胞は、U87 MG細胞と同程度に弱い反応性であったからである(図26A、パネルEGFR. 1)。このEGF

R. 1 抗体は、U 8 7 M G 細胞とよりも、U 8 7 M G. w t E G F R とより強く反応した。なぜなら、U 8 7 M G. w t E G F R 細胞は、w t E G F R を過剰発現したからである（図 2 6 A、パネル E G F R. 1）。m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G. Δ E G F R および U 8 7 M G. D K 細胞と激しく反応し、U 8 7 M G 細胞とは反応しなかったが、これは U 8 7 M G. w t E G F R と弱く反応し、このことは、m A b 8 0 6 が、過剰発現された w t E G F R に対する弱い交差活性を有する Δ E G F R について選択的であることを示した（図 2 6 A、パネル m A b 8 0 6）。このレベルの U 8 7 M G. w t E G F R との反応性は、抗体処置により媒介される生存期間の延長と定量的かつ定性的に類似していた（図 2 5 C）。

【0359】

本発明者らは、免疫沈降によって、m A b 8 0 6 の特異性をさらに決定した。種々の細胞株における E G F R を、抗体 5 2 8、E G F R. 1 および m A b 8 0 6 を用いて免疫沈降した。次いで、電気泳動で分離したタンパク質のプロットを、抗 E G F R 抗体、w t E G F R を認識する C 1 3、ならびに Δ E G F R および D K でプローブした（22）。F A C S 分析と一致して、抗体 5 2 8 は、w t E G F R および変異レセプターを認識し（図 2 6 B、パネル I P : 5 2 8）、一方、抗体 E G F R. 1 は、w t E G F R と反応したが、変異腫とは反応しなかった（図 2 6 B、パネル I P : E G F R. 1）。さらに、U 8 7 M G. Δ E G F R 細胞および U 8 7 M G. D K 細胞中の変異レセプターのレベルは、U 8 7 M G. w t E G F R 細胞中の w t E G F R のレベルに匹敵する（図 2 6 B、パネル I P : 5 2 8）。

【0360】

しかし、抗体 m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G. Δ E G F R 細胞および U 8 7 M G. D K 細胞から沈殿されるより大量の変異レセプターおよび U 8 7 M G 細胞から沈殿される検出不可能な量の変異レセプターと比較して、U 8 7 M G. w t E G F R 細胞溶解物由来の少量の w t E G F R のみを沈殿し得た（図 2 6 B、パネル I P : m A b 8 0 6）。まとめて、これらのデータは、m A b 8 0 6 が、Δ E G F R（これもまた、細胞表面上で過剰発現される場合にのみ、少量の w t E G F R 中に存在する）中のエピトープを認識することを示唆する。

【0361】

（m A b 8 0 6 処置は、Δ E G F R 自己リン酸化を減少し、そして U 8 7 M G. Δ E G F R 脳腫瘍における B c l - X L 発現を下方制御する） 30

m A b 8 0 6 による増殖阻害の基礎となる機構を、次に研究した。Δ E G F R の構成的に活性なキナーゼ活性および Δ E G F R の C O O H 末端の自己リン酸化は、生物学的機能に必須であるので（21、22、28、29）、Δ E G F R のリン酸化状態を、処置動物由来の腫瘍およびコントロール動物由来の腫瘍において決定した。図 2 7 A に示されるように、m A b 8 0 6 処置は、Δ E G F R 自己リン酸化を劇的に減少させたが、レセプターレベルは、m A b 8 0 6 処置した異種移植片においてわずかに減少しなかった。本発明者らは、レセプターの自己リン酸化は、抗アポトーシス遺伝子である B c l - X_L（これは Δ E G F R 過剰発現腫瘍のアポトーシスの減少において重要な役割を果たす）の上方制御を引き起こすことを以前に示している（28、29）。従って、B c l - X_L 発現 40 に対する m A b 8 0 6 処置の効果を、次に決定した。m A b 8 0 6 で処置した動物由来の Δ E G F R 腫瘍は、減少したレベルの B c l - X L を確かに示した（図 2 7 A）。

【0362】

（m A b 8 0 6 処置は、U 8 7 M G. Δ E G F R 腫瘍における増殖および新脈管形成を減少し、そしてこの腫瘍のアポトーシスを増加する）

m A b 8 0 6 処置により引き起こされるインビボ抑制およびレセプターシグナル伝達に対するその生物学的効果の観点から、本発明者らは、コントロールマウス由来の腫瘍または処置マウス由来の腫瘍の増殖速度を決定した。m A b 8 0 6 処置腫瘍の K i - 6 7 染色により測定される増殖指数は、コントロール腫瘍の増殖指数よりも有意に低かった（P < 0. 0 0 1 ; 図 2 8）。さらに、T U N E L 染色によるアポトーシス指数の分析により 50

、コントロール腫瘍と比較した、mAb 806 処置した腫瘍におけるアポトーシス細胞の数の有意な増加が実証された ($P < 0.001$; 図28)。腫瘍の血管形成の程度をまた、CD31 についての処置検体およびコントロール検体由来の腫瘍の免疫染色によって分析した。腫瘍の血管形成を定量するために、MVA を、コンピューター化画像分析を使用して測定した。mAb 806 処置した腫瘍は、コントロール腫瘍よりも、MVA の30%の減少を示した ($P < 0.001$; 図28)。レセプターと抗体との間の相互作用が、炎症応答を引き起こし得るか否かを理解するために、本発明者らは、マクロファージマーカーのF4/80、およびNK細胞マーカーのアシアロGM1 について、腫瘍切片を染色した。マクロファージを、腫瘍マトリクス全体にわたって特定し、そしてこれは、mAb 806 処置したU87 MG、ΔEGFR 腫瘍の周辺部の周りに特に堆積していた (図28)。本発明者らは、この腫瘍中およびこの周りに浸潤したわずかなNK細胞を観察したが、mAb 806 処置した腫瘍およびアイソタイプコントロール腫瘍との間の有意な差は観察されなかった (データは示さず)。

【0363】

(考察)

ΔEGFR は、神経膠腫の癌処置のために魅力的な、潜在的な治療標的であるようである。ΔEGFR が、悪い予後に関連する (25) のに対して、ΔEGFR の遺伝的阻害または薬学的阻害は、インビトロおよびインビボの両方において、ΔEGFR 過剰発現細胞の増殖を効果的に抑制する (29、30)。この変異体EGFR は細胞表面上で発現されるので、これは、抗体ベースの治療のための潜在的な標的を示し、ここで、本発明者らは、ヌードマウスにおける、異なる細胞のバックグラウンドのΔEGFR 過剰発現神経膠腫の頭蓋内異種移植片の処置について、新規の抗ΔEGFR mAb、mAb 806 の効果を試験した。mAb 806 の全身投与は、腫瘍増殖を阻害し、動物の生存を延長した。mAb 806 の効果は、各細胞株に対して明白であり、腫瘍のp53の状態に依存しなかった。なぜなら、U87 MG、ΔEGFR およびA1207、ΔEGFR は、野生型p53を発現するのに対して、LN-Z308、ΔEGFR は、p53ヌルであった。

【0364】

ΔEGFR の腫瘍形成性の増大は、COOH末端におけるその構成的に活性なキナーゼ活性およびチロシン自己リン酸化を介して媒介される (22、28、29)。mAb 806 で処置した腫瘍におけるΔEGFR のリン酸化は、有意に減少し、増殖は減少し、そしてアポトーシスは増加した。このことは、mAb 806 の抗腫瘍効果が、少なくとも部分的に、レセプターの固有の機能の阻害に起因し得ることを示唆する。ΔEGFR シグナル伝達は、抗アポトーシス遺伝子 (Bcl-XL) のアップレギュレーションを引き起こし (28)、そして、mAb 806 を用いた処置は、Bcl-XL 発現のダウンレギュレーションを生じた。このことは、mAb 806 の抗腫瘍効果が、ΔEGFR シグナル伝達の阻害を介して媒介されることをさらに示唆する。mAb 806 で処置した腫瘍におけるΔEGFR のレベルはまた、わずかに減少した (図27A) が、変異体レセプターの脱リン酸の程度と一致した程度またはこの生物学的効果の大きさを説明するために十分な程度までは減少しなかった。mAb 806 のこの抗腫瘍効果は、おそらく少なくとも部分的には、ΔEGFR の固有のシグナル伝達機能の阻害から生じる。この主張はまた、DK 腫瘍に対する抗腫瘍効果の欠損によって指示され、このDK腫瘍は、抗体へと結合するが、キナーゼ欠損性である。

【0365】

異なる抗ΔEGFR 抗体 (mAb Y10) の腫瘍内注射は、マウスの脳におけるΔEGFR 発現B16 黒色腫の増殖を、Fc/Fcレセプター依存性機構を介して阻害した (31)。これに関連して、mAb Y10 は、インビトロでマウスエフェクター細胞およびヒトエフェクター細胞の両方を用いて、抗体依存性マクロファージ細胞傷害性を媒介することを示した (17)。この抗体依存性マクロファージ細胞傷害性は、本発明者らのmAb 806 で処置した腫瘍において見出されたマクロファージ浸潤に関してほとんど効果を有さないが、mAb 806 の抗癌効果が、マクロファージ媒介性細胞傷害性によって

達成され得るかどうかに関する疑問が生じる。本発明者らは、このことがありそうにもないことであると考えている。なぜなら、マクロファージ浸潤はまた、U87 MG、DK（キナーゼ欠損性ΔEGFR）腫瘍のmAb 806処置の際に生じ、この腫瘍において、このmAb 806処置は、腫瘍増殖の調節において、効果がなかった。

【0366】

mAb 806は、過剰発現されたwt EGFRを用いた弱い交差反応性を有するΔEGFRに対して選択的であるようである。インビトロでの特異性に一致して、mAb 806処置は、ΔEGFR過剰発現腫瘍において非常に有効であったのに対して、このmAb 806処置は、非常により低く頑強であるが、再現可能であり、wt EGFRを過剰発現する腫瘍の増殖阻害を示した。しかし、mAb 806とその標的分子との間の単純な相互作用は、腫瘍増殖を阻害するために不十分である。なぜなら、mAb 806は、キナーゼ欠損性ΔEGFR（DR）レセプターおよびΔEGFRへと等しく良好に結合し得るが、このmAb 806は、DK発現腫瘍増殖に影響を与える効果はない。mAb 806に、細胞に通常存在する低レベルのwt EGFRと相互作用する能力がないことは、通常の組織と比較する場合、ΔEGFRを過剰発現した癌および、より少ない程度でwt EGFRを過剰発現した癌に対する大きな治療範囲を示唆する。 10

【0367】

mAb 806処置は、頭蓋内異種移植片の抑制に効果的であったが、ΔEGFR腫瘍が最終的に増殖し、永続的な回復は達成されないということは留意されるべきである。このことは、腫瘍の塊における不十分な抗体の分布から生じ得る。癌処置のために、他の治療モダリティ（例えば、毒素、アイソトープまたは薬物）と組合わせたmAbは、多くの場合において、抗体単独より効果的であることが示された（2, 3, 32-34）。wt EGFR抗体と化学療法薬物（例えば、ドキソルビシンおよびシスプラチン）との組合せはまた、抗腫瘍活性の強化を示した（35, 36）。腫瘍増殖と脈管形成の発達とで標的化される組合せ処置は、いずれかの処置単独よりも効果的に阻害された神経膠芽腫を有する（27）。このことは、化学療法薬物または脈管形成を調節する化合物とmAb 806の組合せが、mAb 806単独よりさらに効率的である可能性を上昇する。 20

【0368】

（参考文献）

【0369】

【表11】

1. Old, L. J. Immunotherapy for cancer. Sci. Am., 275: 102-109, 1996.

2. Weiner, L. M. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 41–50, 1999.
3. Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat. Rev.*, 26: 269–286, 2000.
4. Ashley, D. M., Batra, S. K., and Bigner, D. D. Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors. *J. Neurooncol.*, 35: 259–273, 1997.
5. Fan, Z., and Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67–73, 1998. 10
6. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and Press, M. F. Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (Wash. DC)*, 244: 707–712, 1989.
7. Harari, D., and Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 19: 6102–6114, 2000.
8. Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 60–70, 1999. 20
9. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., and Norton, L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14: 737–744, 1996.
10. Baselga, J. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37: 18–24, 2001. 30
11. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183–232, 1995.
12. Mendelsohn, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 3: 2703–2707, 1997.
13. Waksal, H. W. Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer.

Cancer Metastasis Rev., 18: 427–436, 1999.

14. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* (Baltimore), 39: 478–483, 1996.

15. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4: 148–158, 1998.

10

16. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2965–2969, 1992.

17. Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., and Bigner, D. D. Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 451–464, 1999.

18. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 3217–3220, 1993.

20

19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536–5539, 1995.

20. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186–194, 2000.

30

21. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727–7731, 1994.

22. Huang, H-J. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D.,

Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927–2935, 1997.

23. Mishima, K., Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion *in vivo*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40: 519, 1999.

24. Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.*, 56: 3859–3861, 1996.

25. Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery (Baltimore)*, 45: 1442–1453, 1999.

26. Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5724–5729, 1998.

27. Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8484–8489, 2000.

28. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56: 5079–5086, 1996.

29. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.*, 162 (Suppl. 1): S17–S21, 2001.

10

20

30

30. Halatsch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. F., and Ohnuma, T.
Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. *J. Neurosurg.*, 92: 297-305, 2000.
31. Sampson, J. H., Crouy, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
32. Trail, P. A., and Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.
33. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A., and Slamon, D. J. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*, 17: 2235-2249, 1998.
34. Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 58: 2825-2831, 1998.
35. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., and Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 85: 1327-1333, 1993.
36. Fan, , Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus *cis*-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.

10

20

30

40

50

(実施例 20)

(モノクローナル抗体 806 は、de 2-7 または増幅された上皮増殖因子レセプター (EGFR) のいずれかを発現する腫瘍異種移植片の増殖を阻害するが、野生型 EGFR を発現する腫瘍異種移植片の増殖は阻害しない)

以下の実施例は、Luwor ら、(2001) *Cancer Research*, 61; 5355-5361 にもまた示される、本発明者らによる、知見を示す。この刊行物の開示は、適切である場合、本明細書中の図を引用しながら、その全体が本明細書中に援用され、そして、本明細書の一部をなす。

【0370】

モノクローナル抗体 (mAb) 806 は、Δ 2-7 上皮増殖因子レセプター (de 2-7 EGFR または EGFR v III) に対して惹起され、EGFR の短縮バージョンは、神経膠腫に共通に発現された。意外にも、mAb 806 はまた、EGFR の増殖を示す細胞によって発現される EGFR に結合するが、遺伝子増幅の非存在下で、野生型レセプターを発現する細胞または正常組織によって発現される EGFR には結合しない。mAb 806 の独特の特異性は、現在の EGFR 抗体を超える利点を提供し、これら抗体全ては、ヒトにおいて肝臓および皮膚への有意な結合を示す。従って、本発明者らは、ヌードマウスにおいて増殖したヒト腫瘍異種移植片に対する、mAb 806 の抗腫瘍活性を試験した。U87 MG 異種移植片 (遺伝増幅の非存在下で約 10^5 の EGFR を内因的に発現する神経膠腫細胞株) は、mAb 806 によって阻害されなかった。対照的に、mAb

b 806は、予防的腫瘍モデルおよび確立された腫瘍モデルの両方を使用する用量依存の様式で、de2-7EGFRでトランスフェクトされたU87 MG異種移植片の増殖を有意に阻害した。重要なことには、野生型EGFRでトランスフェクトされたU87 MG細胞（これは、約 10^6 EGFR/細胞まで発現増加し、遺伝子増幅の状態を模倣する）はまた、ヌードマウス中で異種移植片として増殖する場合、mAb 806によって阻害された。mAb 806によって処置された異種移植片は全て、コントロール腫瘍において存在しなかった大きな壊死領域を示した。この異種移植片の生存能力の減少によって、レセプターのダウンレギュレーションまたはクロンの選択によって媒介されなかった。なぜなら、抗原発現のレベルは、コントロール群と処置された群との間で類似であったからである。mAb 806の抗腫瘍効果は、U87 MG細胞に限定されなかった。なぜなら、抗体は、新規かつ確立されたA431異種移植片（これは 10^6 EGFR/細胞を超えて発現する細胞株）の増殖を阻害したからであった。この研究は、mAb 806が、有意な抗腫瘍活性を保持することを実証する。 10

【0371】

de2-7EGFR特異的mAb 806は、短縮型de2-7EGFRを発現するNR6マウス線維芽細胞でマウスを免疫した後に、産生された。mAb 806は、de2-7EGFRでトランスフェクトされたU87 MG神経膠腫細胞株に結合するが、de2-7EGFRでトランスフェクトされた親U87 MG細胞株には結合しない。この親U87 MG細胞株は、遺伝子増幅を有さずにwtEGFRを発現する（3）。類似する結果は、U87 MG異種移植片を発現するde2-7EGFRの特異的な標的化を示すmAb 806を用いて、インビボで観察されたが、親U87 MG腫瘍では観察されなかった（3）。興味深いことに、mAb 806は、増幅されたEGFR遺伝子を含むA431細胞株の表面上のEGFR部分集合（約10%）を結合し得た。従って、de2-7EGFR短縮化によって生成された独特のペプチド結合を認識する他の全てのde2-7EGFR特異的抗体とは違って、mAb 806は、過剰発現されたwtEGFRでもまた見出されるエピトープに結合する。しかし、このエピトープが、好ましくはde2-7EGFRにおいて露出され、レセプターの小さな部分が、wtEGFR遺伝子増幅を含む細胞において発現されることは明らかである。重要なことには、高レベルの内因性wtEGFRを発現する正常組織（例えば、肝臓および皮膚）は、有意なmAb 806の結合を示さない。通常のレベルで発現される場合、de2-7EGFRおよび増幅されたwtEGFRの両方に結合するが、ネイティブなwtEGFRには結合しないmAb 806の独特の特徴に基づいて、本発明者らは、ヌードマウスで、異種移植片として増殖するいくつかの腫瘍細胞株に対するmAb 806の有効性を試験することを決定した。 20 30

【0372】

（材料および方法）

（細胞株およびモノクローナル抗体）

ヒト神経膠芽腫細胞株U87 MG（これは、wtEGFRを内因的に発現する）ならびにトランスフェクトされた細胞株U87 MG. Δ2-7およびU87 MG. wtEGFR（これらは、それぞれde2-7EGFRおよび過剰発現されたwtEGFRを発現する）は、以前に記載されている（16、23）。類表皮腫瘍細胞株A431は、以前に記載されている（24）。 40

【0373】

全ての細胞株を、10% FCS（CSL, Melbourne, Victoria, Australia）、2mMグルタミン（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）、およびペニシリン/ストレプトマイシン（Life Technologies, Inc., Grand Island, NY）を含むDMEM（DMEM/F12; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY）中に維持した。さらに、U87 MG. Δ2-7およびMG. wtEGFR細胞株を、400mg/mlのジェネティシン（Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Australia）中に維持した。 50

細胞株を、加湿された5%CO₂雰囲気中37℃で増殖させた。このmAb 806 (IgG2b)を、de2-7EGFRを発現するNR6マウス線維芽細胞を用いたマウスの免疫後、産生した。mAb 806を、de2-7EGFRを過剰発現する(1:2500の力価)、NR6細胞への結合を示したロゼットアッセイの後、選択した。mAb 528 (これは、de2-7EGFRおよびwtEGFRの両方を認識する)は、以前に記載されており(10)、American Type Culture Collection (Rockville, MD)から得られたハイブリドーマを使用して、Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Victoria, Australia)において産生した。DH8.3 mAb (これは、de2-7EGFRに対して特異的である)は、William Gullick教授 (University of Kent and Canterbury, Kent, United Kingdom)によって親切に提供された(19)。EGFRのOOH-末端ドメインへと指向されるポリクローナル抗体 (sc-03)を、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)から購入した。

10

【0374】

(レセプター発現のFACS分析)

培養された、親U87 MG細胞株およびトランスフェクトされたU87 MG細胞株を、wtEGFRおよびde2-7EGFR発現について、528抗体、806抗体、およびDH8.3抗体を使用して、分析した。細胞(1.3×10⁶)を、1% HSAを含有するPBS中、5mg/mlの、適切な抗体またはアイソタイプ適合性ネガティブコントロールと共に、4℃で30分間インキュベートした。PBS/1% HSAでの3回の洗浄後、細胞を、FITC結合ヤギ抗マウス抗体(1:100希釈; Calbiochem, San Diego, CA)と共に、4℃でさらに30分間インキュベートした。続いての3回の洗浄後、細胞を、Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL)上で、20,000事象の最小値を観察することによって分析し、Windows (登録商標)用のEXPO (バージョン2)を使用して分析した。

20

【0375】

(スキッチャード分析)

mAb 806を、クロラミンT法によって、¹²⁵I (Amrad, Melbourne, Victoria, Australia)で標識した。全ての結合アッセイを、1% HSA/PBS中で、1~2×10⁶の、生存するU87 MG、Δ2-7またはA431細胞に対して、穏やかに回転しながら、4℃で90分間実施した。10ng/ml ¹²⁵I標識mAb 806の設定濃度を、漸増濃度の非標識抗体の存在下で使用した。非特異的な結合を、10,000倍過剰の非標識化抗体の存在下で決定した。インキュベーションの後、細胞を、洗浄し、結合した¹²⁵I標識化mAb 806について、COBRA II γカウンター (Packard Instrument Company, Meriden, CT)を使用して計数した。スキッチャード分析を、免疫反応性について校正した後、実施した。

30

40

【0376】

(免疫沈降研究)

細胞を、5%の、透析されたFCSを補充されたメチオニン/システインを含有しないDMEM中、100mCi/mlのTran 35S-Label (ICN Biomedicals, Irvine, CA)を用いて16時間標識した。PBSで洗浄した後、細胞を、溶解緩衝液(1% Triton X-100、30mM HEPES、150mM NaCl、500mM 4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルホニルフロリド、150nM アプロチニン、1mM E-64プロテアーゼインヒビター、0.5mM EDTA、および1mM ロイペプチン、pH7.4)中に、4℃で1時間配置した。溶解物

50

を、12,000.3 gで10分間の遠心分離によって精製し、次いで、プロテインA-セファロースの添加の前に、5 mgの適切な抗体と共に、4℃で30分間インキュベートした。免疫沈降物を、溶解緩衝液で3回洗浄し、SDSサンプル緩衝液と混合し、7.5%ゲルを使用したゲル電気泳動によって分離し、次いで、それを乾燥させ、X線フィルム中に露光した。

【0377】

(異種移植片モデル)

以前の報告と一致して(23, 25)、de2-7EGFRでトランスフェクトされたU87 MG細胞は、wtEGFRでトランスフェクトした、親細胞およびU87 MG細胞より、より迅速に成長した。100 mlのPBS中の腫瘍細胞(3×10^6)を、4~6週齢の、雌性ヌードマウスの両脇腹へと、s.c.接種した(Animal Research Center, Western Australia, Perth, Australia)。mAb 806の治療効果を、予防腫瘍モデルおよび確立された腫瘍モデルの両方において調査した。予防モデルにおいて、2つの異種移植片を有する5匹のマウスは、0.1 mgまたは1 mgのmAb 806またはビヒクル(PBS)のいずれかでi.p.処置した(これを、腫瘍細胞接種の前の日に開始した)。処置を、1週間当たり3回で2週間、計6用量について継続した。確立されたモデルについて、腫瘍は、65 mm³(U87 MG, Δ2-7)、84 mm³(U87 MG)、73 mm³(U87 MG, wtEGFR)、または201 mm³(A431腫瘍)の平均体積に達した場合処置を開始した。腫瘍体積(mm³)は、式(長さ×幅²)/2を使用して決定し、ここで、長さは、最長軸であり、幅は、この長さに直角をなす測定値であった(26)。データを、各処置群に対して平均腫瘍体積6 SEとして示した。この研究プロジェクトは、Animal Ethics Committee of the Austin and Repatriation Medical Centreによって認可された。

【0378】

(腫瘍異種移植片の組織学的試験)

異種移植片を、示した時間に切除し、2等分した。半分を、パラフィン中に包埋する前に、10%ホルマリン/PBS中で固定した。次いで、4 mmの切片を、切り出し、慣用的な組織学的試験のためにH&Eを用いて染色した。もう半分を、組織Tek OCT化合物(Sakura Finetek, Torrance, CA)中に包埋し、液体窒素中で凍結させ、そして280℃で保存した。薄い(5-mm)凍結切片を、切り出し、10分間氷冷アセトン中で固定し、その後、さらに10分間空気乾燥させた。切片を、タンパク質ブロッキング試薬(Lipshaw Immunon, Pittsburgh, PA)中で10分間ブロッキングし、次いで、ビオチン化一次抗体(1 mg/ml)と共に、室温で30分間インキュベートした。全ての抗体を、製造業者の指示書のとおり、ECLタンパク質ビオチン化モジュール(Amersham, Baulkham Hills, NSW, Australia)を使用して、ビオチン化した。PBSでリンスした後、切片を、ストレプトアビジン西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体と共に、さらに30分間インキュベートした(Silenus, Melbourne, Victoria, Australia)。最終的なPBS洗浄の後、この切片を、過酸化水素存在下において、3-アミノ-9-エチルカルバゾール基質[0.1 M酢酸、0.1 M酢酸ナトリウム、0.02 M 3-アミノ-9-エチルカルバゾール(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)]に30分間曝露した。切片を、水でリンスし、ヘマトキシリンで5分間対比染色し、そしてマウントした。

【0379】

(統計学的分析)

インビボ腫瘍測定値(mm³)を、平均6 SEとして示す。所定の時点での処置群間の差異を、スチューデントのt検定を使用して、統計的有意性について試験した。

【0380】

(結果)

10

20

30

40

50

(細胞株への抗体の結合)

mAb 806の特異性を決定するために、このmAb 806の、U87MG細胞、U87MG.D2-7細胞、およびU87MG.wtEGFR細胞への結合を、FACSによって分析した。無関係のIgG2b(ヒト抗原A33に指向したmAb 100-310)は、mAb 806に対するアイソタイプコントロールとして含まれ、そして528抗体は、それがde2-7EGFRおよびwtEGFRの両方を認識するので、含まれる。528抗体のみが、親U87MG細胞株を染色することが可能であり(図29)、このことは、これらの細胞がwtEGFRを発現することを実証する以前の報告と一致した(16)。mAb 806が、コントロール抗体に類似する結合レベルを有し、このことは、明らかに、wtEGFRを結合することができないことを実証する(図29)。U87MG.D2-7細胞株およびU87MG.wtEGFR細胞株へのアイソタイプコントロール抗体の結合は、U87MG細胞について観察される結合と類似した。mAb 806は、U87MG.D2-7細胞およびU87MG.wtEGFR細胞を染色し、このことは、mAb 806がde2-7EGFRおよび過剰発現されたEGFRの部分集団を特異的に認識した(図29)ことを示した。期待されるように、528抗体は、U87MG.D2-7細胞株およびU87MG.wtEGFR細胞株の両方を染色した(図29)。U87MG.wtEGFR細胞を染色する528抗体の強度は、mAb 806抗体よりはるかに高く、このことは、mAb 806のみが、過剰発現されたEGFRの一部を認識することを示唆した。U87MG.wtEGFR細胞で観察されたmAb 806の反応性は、A431細胞(wtEGFR.3を過剰発現する別の細胞株)で観察される反応性に類似する。

【0381】

スキャッチャード分析を、U87MG.D2-7細胞およびA431細胞を使用して実施し、相対的親和性および各細胞株上のmAb 806に対する結合部位を決定した。mAb 806は、 $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ のde2-7EGFRレセプターに対する親和性を有し、平均(3つの別個の実験) 2.4×10^5 結合部位/細胞を認識した。対照的に、A431細胞上のwtEGFRに対するmAb 806の親和性は、ほんの $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であった。興味深いことに、mAb 806は、A431細胞の表面上の 2.3×10^5 結合部位を認識し、この数は、これらの細胞に見出されるEGFRの報告された数より、約10倍低い。本発明者らのA431細胞の表面上のEGFRの数を確認するために、本発明者らは、 ^{125}I -標識528抗体を使用して、スキャッチャード分析を実施した。期待されるように、この抗体は、A431細胞の表面上の約 2×10^6 部位への結合した。従って、mAb 806は、A431細胞の表面上のEGFRレセプターの一部を結合するだけのようである。重要なことには、 ^{125}I -標識化mAb 806は、細胞の数が、 1×10^7 まで増加した場合でさえも、全く親U87MG細胞へと結合しなかった。

【0382】

(免疫沈降)

mAb 806、sc-03(EGFRのCOOH末端ドメインに対して特異的な市販のポリクローナル抗体)およびIgG2bアイソタイプコントロールを使用した35S標識化の後、免疫沈降によって種々の細胞株における、mAb 806の反応性をさらに特徴付けた。sc-03抗体は、U87MG.Δ2-7細胞から3つのバンドを免疫沈降し、2つのde2-7EGFRのバンドに対応する二重のバンドがこれらの細胞において観察され、そして高分子量のバンドは、wtEGFRに対応した(図30)。対照的に、mAb 806が、2つのde2-7EGFRのバンドを免疫沈降したにも関わらず、wtEGFRは、完全に存在しなかった(図30)。U87MG.wtEGFR細胞およびA431細胞において見られるパターンは、本質的に同一であった。sc-03抗体は、両方の細胞株からwtEGFRに対応する単一のバンドを免疫沈降した(図30)。このmAb 806はまた、U87MG.wtEGFR細胞およびA431細胞の両方からwtEGFRに対応する単一のバンドを免疫沈降した(図30)。FACSおよびスキャッチャ

ードデータと一致して、mAb 806によって免疫沈降されるEGFRの量は、細胞表面に存在する全EGFRより実質的に少なかった。mAb 806およびsc-03が、類似する量のde2-7EGFRを免疫沈降したと仮定すれば、この結果は、mAb 806抗体のみが、レセプターを過剰発現する細胞においてEGFRの一部を認識するという概念を支持する。mAb 806抗体と528抗体との間の比較は、同一の反応性のパターンを示した（データは示さず）。無関係のIgG2b（mAb 806に対するアイソタイプコントロール）は、細胞株のいずれからもEGFRを免疫沈降しなかった（図30）。同一の条件を使用して、mAb 806は、親U87 MG細胞からEGFRを免疫沈降した（データは示さず）。

【0383】

10

（予防モデルにおけるmAb 806の有効性）

mAb 806を、予防移植片モデルにおけるU87 MG腫瘍およびU87 MG、 Δ 2-7腫瘍に対する有効性について試験した。抗体またはビヒクルを、腫瘍接種の1日前にi.p.投与し、1週間あたり3回で2週間、与えた（「材料および方法」を参照のこと）。1mg/1回注射の用量で、mAb 806は、wtEGFRを発現する親U87 MG異種移植片の増殖に対して効果を有さなかった（図9A）。対照的に、mAb 806は、U87 MG、 Δ 2-7異種移植片の増殖を、用量依存性様式で有意に阻害した（図9B）。腫瘍接種の20日後に、コントロール動物を屠殺した場合、平均的な腫瘍体積は、コントロール群については $1600 \pm 180 \text{ mm}^3$ であり、0.1mg/1回注射群については $500 \pm 95 \text{ mm}^3$ （ $P < 0.0001$ ）、および1mg/1回注射群につ

20

【0384】

（確立された異種移植片モデルにおけるmAb 806の有効性）

予防異種移植片モデルにおけるmAb 806の有効性が与えられた場合、確立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害するmAb 806の能力を試験した。抗体処置を、腫瘍が、U87 MG、 Δ 2-7異種移植片について 65 mm^3 の平均腫瘍体積（移植10日後）および親U87 MG異種移植片について 84 mm^3 の平均腫瘍体積（移植19日後）に到達した場合に、抗体処置が開始されることを除いて、予防モデルに記載されたとおりであった。もう一度、mAb 806は、1mg/1回注射の用量でさえも、親U87 MG異種移植片の増殖に対して効果を有さなかった（図10A）。対照的に、mAb 806は、用量依存性様式でU87 MG、 Δ 2-7異種移植片の増殖を有意に阻害した（図10B）。17日目において、コントロール動物を屠殺する1日前で、平均腫瘍体積は、コントロール群については $900 \pm 200 \text{ mm}^3$ であり、0.1mg/1回注射群については $400 \pm 60 \text{ mm}^3$ （ $P < 0.01$ ）であり、そして1mg/1回注射群については $220 \pm 60 \text{ mm}^3$ （ $P < 0.002$ ）であった。IgG2bアイソタイプコントロールを用いたU87 MG、 Δ 2-7異種移植片の処置は、腫瘍の増殖に効果を有さなかった（データは示さず）。

30

40

【0385】

mAb 806を用いて観察される増殖阻害が、de2-7EGFRを発現する細胞に限定されるかどうかを試験するために、U87 MG、wtEGFR異種移植片に対するmAb 806の効果をまた、確立されたモデルにおいて試験した。これらの細胞を、de2-7EGFRを発現しないEGFR遺伝子の増幅を含む腫瘍についてのモデルとして扱った。mAb 806処置を、腫瘍が、 73 mm^3 の平均腫瘍体積に到達した（移植22日後）場合に開始した。mAb 806は、ビヒクルで処置されたコントロール腫瘍と比較された場合、確立されたU87 MG、wtEGFR異種移植片の増殖を有意に阻害した（図10C）。コントロール動物が屠殺された日において、平均腫瘍体積は、コントロール群については $1000 \pm 300 \text{ mm}^3$ であり、1mg/1回注射で処置した群については

50

、 $500 \pm 80 \text{ mm}^3$ ($P < 0.04$)であった。

【0386】

(樹立された腫瘍の組織学的分析および免疫組織化学的分析) mAb 806で処理したU87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片およびmAb 806で処理したU87 MG、wt EGFR異種移植片と、コントロールのU87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片およびU87 MG、wt EGFR異種移植片との間の可能な組織学的差異を評価するために、ホルマリン固定しパラフィン包埋した切片を、H&Eで染色した(図31)。壊死領域が、mAb 806で処理したU87 MG、 $\Delta 2-7$ 由来の切片(mAb 806で処理したU87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片は、腫瘍接種の24日後に収集し、ビヒクルで処理した異種移植片は、18日目に収集した)およびU87 MG、wt EGFR異種移植片由来の切片(mAb 806異種移植片は、腫瘍接種の42日後に収集し、ビヒクルで処理した異種移植片は、37日目に収集した)において観察された(図31)。この結果は、多数の腫瘍異種移植片(各細胞株についてn5=4)において一貫して観察された。しかし、ビヒクルで処理したU87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片由来の切片およびビヒクルで処理したU87 MG、wt EGFR異種移植片由来の切片(n5=5)は、mAb 806処理後観察された同じ壊死領域を示さなかった(図31)。ビヒクルで処理した異種移植片およびmAb 806で処理した異種移植片を、同じ時間で取り出した。そしてこれらはまた、腫瘍壊死においてこれらの差異を示した(データは示さず)。従って、観察される壊死の増加は、mAb 806で処理された異種移植片について使用された、より長い増殖期間によって引き起こされたのではない。さらに、mAb 806で処理したU87 MG異種移植片由来の切片もまた、H&Eで染色した。そしてこれらは、いかなる壊死領域も示さなかった(データは示さず)。このことはさらに、mAb 806結合が、細胞生存度を減少させ、腫瘍異種移植片内で壊死の増加を生じるという仮説を支持する。

【0387】

U87 MG異種移植片、U87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片、およびU87 MG、wt EGFR異種移植片の切片の免疫組織化学分析が、mAb 806処理後のd2-7発現レベルおよびwt EGFR発現レベルを測定するために実施した(図32)。予期された通り、528抗体は、すべての異種移植片切片を染色した。処理した腫瘍とコントロール腫瘍との間で、強度の明らかな減少はなかった(図32)。U87 MG切片の染色は、mAb 806を用いては検出不可能であったが、U87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片切片およびU87 MG、wt EGFR異種移植片切片のポジティブ染色が、観察された(図32)。コントロールのU87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片およびU87 MG、wt EGFR異種移植片と、処理したU87 MG、 $\Delta 2-7$ 異種移植片およびU87 MG、wt EGFR異種移植片との間で、mAb 806染色強度の差異は存在しなかった。このことは、抗体処理が、mAb 806反応性を欠くクローン改変体の選択をもたらさないことを示唆する。

【0388】

(mAb 806でのA431異種移植片の処理) mAb 806の抗腫瘍効果がU87 MG細胞に限定されないことを示すために、この抗体を、A431異種移植片を含むマウスに投与した。これらの細胞は、増幅されたEGFR遺伝子を含み、そして約 2×10^6 個のレセプター/細胞を発現する。本発明者らは、mAb 806がこれらのEGFRのうちの約10%に結合し、そしてA431異種移植片を標的とすることを以前に示した(3)。mAb 806は、以前に記載された予防異種移植片モデルにて試験した場合に、A431異種移植片の増殖を有意に阻害した(図11A)。13日目に、コントロール動物を屠殺した場合、平均腫瘍体積は、ビヒクルで処理した群で $1400 \pm 150 \text{ mm}^3$ であり、1mg/注射処理群について $260 \pm 60 \text{ mm}^3$ であった($P < 0.0001$)。別個の実験において、用量0.1mgのmAbもまた、予防モデルにおいてA431異種移植片の増殖を有意に($P < 0.05$)を阻害した(データは示さず)。

【0389】

上記予防的A431異種移植片モデルにおけるmAb 806の効力を考慮して、樹立された腫瘍異種移植片の増殖を阻害する能力を試験した。抗体処理は、上記の予防モデルにおいて記載した通りであったが、但し、腫瘍が平均腫瘍体積 $200 \pm 20 \text{ mm}^3$ に達するまで抗体処理を開始しなかった。mAb 806は、樹立したA431異種移植片の増殖を有意に阻害した(図11B)。13日目(コントロール動物を屠殺した日である)に、平均腫瘍体積は、コントロール群について $1100 \pm 100 \text{ mm}^3$ であり、 $1 \text{ mg}/\text{注射群}$ については $450 \pm 70 \text{ mm}^3$ であった($P < 0.0001$)。

【0390】

本発明者らは、mAb 806が、wt EGFRを過剰発現する、de2-7 EGFRトランスフェクトU87 MG異種移植片とA431異種移植片との両方を標的とすることを以前に示した(3)。mAb 806は、約 10^5 個のEGFRを発現する(3)親U87 MG細胞を標的としなかった(16)。FACS、免疫組織化学および免疫沈降により評価した場合、本発明者らは、mAb 806がまた、 $> 10^6$ 個のEGFR/細胞を発現するU87 MG、wt EGFR細胞を特異的に結合可能であることをここに示す。従って、以前に観察されたA431細胞へのmAb 806の結合は、これらの細胞のいくらか通常ではない特性の結果ではなく、むしろwt EGFRの過剰発現と関連するより一般的な現象であるようである。

【0391】

(a) 本発明者らは、 1×10^5 個のwt EGFR/細胞を発現する親U87 MG細胞株へのmAb 806の結合(16)を、FACS、免疫沈降、免疫組織化学によっても、ヨウ素付加抗体を用いても、検出できなかった。実際、ヨウ素付加mAb 806は、 1×10^7 個の細胞を含むU87 MG細胞ペレットに結合しなかった。これは、 1×10^6 個のA431細胞を使用するスキッチャードデータに基づくと、低レベル抗体結合を検出するはずの条件である(すなわち、両方の場合で、レセプターの総数が類似している)。

【0392】

(b) スキッチャード分析は、mAb 806が、A431細胞の表面上の総EGFRのうちの10%にのみ結合したことを明らかに示した。mAb 806が、低親和性でこのwt EGFRと単に結合する場合、そのmAb 806は、そのレセプターのうちのかなり高い割合と結合しているはずである。

【0393】

(c) A431およびU87 MGの比較免疫沈降。mAb 806およびsc-03抗体を含むwt EGFR細胞株もまた、レセプターの部分集団のみが、mAb 806により認識されるという仮説を支持した。まとめると、これらの結果は、mAb 806が、EGFRを過剰発現する細胞の表面上のEGFR部分集団を認識するという知見を支持する。本発明者らは、mAb 806が、グリコシル化またはキナーゼ活性と関連する変化した生化学的特性を提示するかどうかを観察するために、mAb 806によるEGFR免疫沈降を現在分析中である。

【0394】

本明細書中に記載されるmAb 806を用いる異種移植片研究は、U87 MG、D2-7異種移植片増殖の用量依存性阻害を示す。対照的に、親U87 MG異種移植片がインビボでwt EGFRを発現し続けるという事実にも関わらず、親U87 MG異種移植片の阻害は、全く観察されなかった。mAb 806は、異種移植片の体積を有意に減少しただけでなく、このmAb 806はまた、その腫瘍内で有意な壊死を誘導した。上記のように、他のde2-7 EGFR特異的mAbが生成された(20~22)が、これは、ヒトde2-7 EGFR発現神経膠腫異種移植片に対してインビボでそのような抗体を首尾良く治療的に使用することを示す、最初の報告である。最近の報告は、de2-7 EGFR特異的Y10 mAbが、ヒトde2-7 EGFRのマウスホモログでトランスフェクトされたマウスB16黒色腫細胞に対して、インビボで抗腫瘍活性を有したことを示した(33)。Y10は、補体もエフェクター細胞も存在しない場合に、de2

ー 7 E G F Rを発現する B 1 6 黒色腫細胞のインビトロ細胞溶解 (> 9 0 %) を媒介した。そのインビトロでの観察とは対照的に、インビボでの Y 1 0 抗体の効力は、免疫応答性モデルにおいて異種移植片として増殖した B 1 6 黒色腫細胞を使用した場合、F c 機能を介して完全に媒介された。従って、細胞が腫瘍異種移植片として増殖された場合、インビトロで観察される直接の効果は、複製されないようである。

【0395】

E G F Rの過剰発現が、多数の種々の腫瘍において報告されており、そしてこの過剰発現は、ほとんどの神経膠腫において観察される (4、14)。レセプター遺伝子増幅により媒介されるその後の E G F R過剰発現は、細胞内シグナル伝達および細胞増殖を増加することによって増殖を有利にし得ることが提唱されている (34)。この U 8 7 M G細胞株を、w t E G F Rでトランスフェクトして、E G F R遺伝子増幅プロセスを模倣する神経膠腫細胞を生成した。樹立された U 8 7 M G. w t E G F R異種移植片を m A b 8 0 6 で処理すると、有意な増殖阻害を生じた。従って、m A b 8 0 6 はまた、E G F Rを過剰発現する細胞に対するインビボでの抗腫瘍活性を媒介する。興味深いことに、U 8 7 M G. w t E G F R異種移植片の m A b 8 0 6 による阻害は、U 8 7 M G. Δ 2 - 7 腫瘍を用いて観察されるよりも顕著ではない。このことは、m A b 8 0 6 が、過剰発現した w t E G F Rについてより低い親和性を有しており、そして細胞表面上に発現される低比率のレセプターにのみ結合するという事実を、おそらく反映する (3)。しかし、U 8 7 M G. w t E G F R異種移植片の体積に対するこの小さな効果にも関わらず、m A b 8 0 6 処理が、これらの異種移植片内で大きな壊死領域を生成したことが、注意されるべきである。m A b 8 0 6 が、U 8 7 M G由来細胞株の阻害のみを媒介するという可能性を排除するために、本発明者らは、A 4 3 1異種移植片に対する m A b 8 0 6 の効力を試験した。この扁平上皮細胞癌腫由来細胞株は、有意な E G F R遺伝子増幅を含み、これは、インビトロおよびインビボの両方で保持される。m A b 8 0 6 で A 4 3 1異種移植片を処理すると、予防モデルおよび樹立されたモデルの両方において、有意な増殖阻害を生じた。このことは、m A b 8 0 6 の抗腫瘍効果が、トランスフェクトされた U 8 7 M G細胞株に限定されないことを示す。

【0396】

抗体処理による A 4 3 1異種移植片増殖の完全な防止が、以前に報告されている。w t E G F R m A bである 5 2 8、2 2 5、および 4 2 5 は、すべて、腫瘍接種日または腫瘍接種 1 日後のいずれかに投与した場合に、A 4 3 1異種移植片の形成を防止した (9、10)。これらの w t E G F R抗体と m A b 8 0 6 との間のこの効力の差異の原因は、既知ではないが、細胞増殖阻害の機構に関連し得る。w t E G F R抗体は、E G F Rへのリガンド結合をブロックすることによって機能するが、これは、おそらく、m A b 8 0 6 については事実ではない。なぜなら、w t E G F R抗体は、A 4 3 1細胞の表面上の E G F R小部分集団にのみ結合するからである。リガンド非依存性 d e 2 - 7 E G F Rを発現する U 8 7 M G細胞に対する m A b 8 0 6 の有意な効力は、この抗体が、リガンドブロックを含まない機構によりその抗腫瘍活性を媒介するという知見を支持する。従って、本発明者らは、m A b 8 0 6 の抗腫瘍効果に寄与する非免疫学的機構および免疫学的機構を現在調査中である。非免疫学的機構は、レセプターレベルの微妙な変化、シグナル伝達のブロック、または不適切なシグナル伝達の誘導を包含し得る。

【0397】

以前、w t E G F R抗体と組み合わせた薬剤 (例えば、ドキソルビシンおよびシスプラチン) が、抗腫瘍活性の増強を生じた (35、36)。ドキソルビシンと m A b 5 2 8 との組み合わせは、樹立した A 4 3 1異種移植片の全体的な根絶を生じた一方、いずれかの薬剤単独での処理は、インビボでの一時的な増殖阻害しか生じなかった (36)。同様に、シスプラチンと、m A b 5 2 8 または 2 2 5 のいずれかとの組み合わせもまた、十分に樹立された A 4 3 1異種移植片の根絶をもたらした。これは、いずれかの薬剤での処理が使用された場合は観察されなかった (35)。従って、m A b 8 0 6 と化学療法剤との組み合わせを含む将来の研究は、異種移植片モデルを使用して計画される。

【0398】

おそらく、現在のEGFR抗体と比較したmAb 806の最も重要な利点であり得るのは、mAb 806に細胞傷害性因子を直接結合することが可能であることである。このアプローチは、現在のEGFR特異的抗体を用いて実現可能ではない。なぜなら、これらの抗体は、肝臓を標的とし、細胞傷害性結合体は、重篤な毒性をほとんど確実に誘導するからである。細胞傷害性薬剤（例えば、薬物（37）または放射性同位体（38））を抗体に結合体化することは、これらの薬剤の効力を改善しそして全体的毒性を減少する可能性を有する。この研究は、mAb 806は、de2-7 EGFRポジティブ異種移植片およびEGFR過剰発現腫瘍に対する有意なインビボ抗腫瘍活性を有することを明らかに示す。mAb 806の独特の特異性は、正常組織の取り込みと関連する限定を伴わない、多数の腫瘍型（特に、頭部および頸部の腫瘍および神経膠腫）を標的とする際の免疫治療能力を示唆する。

10

【0399】

(参考文献)

【0400】

【表12】

1. Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapies. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 717-722, 1997.
2. Fan, Z., and Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67-73, 1998.
3. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundaresan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.
4. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.
5. Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J. Clin. Pathol.*, 52: 574-580, 1999.
6. Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Tweardy, D. J. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 824-832, 1998.
7. Fan, Z., Masui, H., Altas, I., and Mendelsohn, J. Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 53: 4322-4328, 1993.

20

30

40

8. Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., and Asano, G. Inhibitory effect of anti-epidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer. *Cancer (Phila.)*, 77: 1639–1645, 1996.
9. Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z., and Koprowski, H. Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects. *Cancer Res.*, 47: 3692–3696, 1987.
10. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 44: 1002–1007, 1984.
11. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery*, 39: 478–483, 1996.
12. Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., *et al.* Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 97–104, 1991.
13. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtress, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J. Clin. Oncol.*, 18: 904, 2000.
14. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.*, 8: 1197–1206, 1997.
15. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. Identical splicing of

10

20

30

aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8602–8606, 1990.

16. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727–7731, 1994.

17. Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res.*, 60: 3081–3087, 2000.

10

18. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu,

D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186–194, 2000.

19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536–5539, 1995.

20

20. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., *et al.* Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.*, 55: 3140–3148, 1995.

21. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated FGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, 63: 537–543, 1995.

30

22. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., and Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer*, 73: 1366–1372, 1996.

23. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis.

Cancer Res., 56: 5079–5086, 1996.

24. Sato, J. D., Le, A. D., and Kawamoto, T. Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. *Methods Enzymol.*, 146: 63–81, 1987.

25. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927–2935, 1997.

10

26. Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., and Scott, A. M. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3621–3628, 2000.

20

27. Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., and Kumar, R. Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor α . *Cancer Res.*, 52: 3335–3339, 1992.

28. Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos, C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., *et al.* Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852. *J. Clin. Oncol.*, 12: 730–739, 1994.

30

29. Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., Mellstedt, H., and Boethius, J. Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 157–164, 1997.

30. Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., *et al.* Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase II trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22: 225-230, 1992.
31. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.*, 55: 4375-4382, 1995. 10
32. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.*, 57: 1510-1515, 1997. 20
33. Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
34. Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., and Buick, R. N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 251-257, 1987. 30
35. Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.
36. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., Jr., and Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1327-1333, 1993. 40
37. Trail, P. A., and Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.
38. DeNardo, S. J., Kroger, L. A., and DeNardo, G. L. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 563-569, 1999.

(実施例 2 1)

(キメラ 806 抗体の構築、発現、および分析)

50

キメラ抗体は、例えば、マウス、ラット、または他の種の重鎖および軽鎖の可変領域が、ヒトの重鎖領域および軽鎖領域に結合されている、分子の分類である。キメラ抗体は、組換え生成される。キメラ抗体の1つの利点は、キメラ抗体が、異種抗原性効果（非ヒト抗体（例えば、マウス、ラット、または他の種）の固有の免疫原性）を減少し得ることである。さらに、組換えにより調製されたキメラ抗体は、しばしば、特に高レベル発現ベクターを使用した場合に、大量に生成され得る。

【0401】

高レベル生成のために、ほとんどの広範に使用される哺乳動物発現系は、デヒドロ葉酸還元酵素欠損（「d h f r -」）チャイニーズハムスター卵巣細胞により与えられる遺伝子増幅手順を使用する系である。この系は、当業者に周知である。この系は、D H F R 酵素（デヒドロ葉酸からテトラヒドロ葉酸への変換を触媒する）をコードするデヒドロ葉酸還元酵素「d h f r」遺伝子に基づく。高生成を達成するために、d h f r - C H O 細胞を、機能的D H F R 遺伝子を所望のタンパク質をコードする遺伝子とともに含む発現ベクターで、トランスフェクトする。この場合、所望のタンパク質は、組換え抗体の重鎖および／または軽鎖である。

10

【0402】

競合的D H F R インヒビターであるメトトレキサート（M T X）の量を増加することによって、その組換え細胞は、d h f r 遺伝子を増幅することによって耐性を生じる。標準的な場合、使用される増幅単位は、d h f r 遺伝子のサイズよりもかなり大きく、結果として、その抗体の重鎖が、同時に増幅される。

20

【0403】

そのタンパク質（例えば、抗体鎖）の大スケール生成が望まれる場合、使用される細胞の発現レベルおよび安定性の両方が、重要である。長期培養において、組換えC H O 細胞集団は、その集団は単一の親クローンに由来するけれども、増幅の間にその特異的抗体生産性に関して均一性を失う。

【0404】

ニシストロン性発現ベクターを、このキメラ抗体の組換え発現において使用するために調製した。これらのニシストロン性発現ベクターは、「内部リボソーム侵入部位」すなわち「I R E S」を使用する。キメラ抗E G F Rの生成のためのこれらの構築物において、免疫グロブリン鎖および選択マーカーのc D N Aを、I R E Sを介して連結する。I R E Sは、細胞のトランス作用性因子の補助によって、そのm R N A中の内部開始因子コドンに小リボソームサブユニットを動員する、シス作用性エレメントである。I R E Sは、真核生物細胞におけるポリシストロン性転写単位からの2つ以上のタンパク質の発現を容易にする。選択マーカー遺伝子がc a p 依存性様式で翻訳されそして目的の遺伝子がI R E S 依存性様式で発現される、ニシストロン性発現ベクターの使用が、種々の実験的方法に適用されている。I R E S エレメントは、細胞形質転換のためのベクター、トランスジェニック動物の生成のためのベクター、組換えタンパク質生成のためのベクター、遺伝子治療のためのベクター、遺伝子トラッピングのためのベクター、および遺伝子ターゲッティングのためのベクター中に、首尾良く組み込まれている。

30

【0405】

（キメラ抗体806（c h 806）構築の要約）

このキメラ806抗体を、標準的な分子生物学的技術を使用して、親マウスハイブリドーマから806抗体のV H およびV L をクローニングすることによって生成した。その後、このV H およびV L を、p R E N 哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。このベクターの構成は、配列番号7および配列番号8に示される。そしてこのp R E N 哺乳動物発現ベクターを、増幅および発現のためにC H O （D H F R - / - v e）細胞中にトランスフェクトした。簡単に述べると、トリプシン処理した後、 4×10^6 個のC H O 細胞を、標準的な条件下でエレクトロポレーションを使用して、L C 発現ベクターおよびH C 発現ベクター各々10 μ g で同時トランスフェクトした。室温で10分間の休止期間の後、これらの細胞を、15 m l の培地（10%ウシ胎仔血清、添加物を含むヒポキサンチン／チ

40

50

ミジン補充物)に添加し、そして 15×10 cmの細胞培養ペトリ皿に移した。その後、この皿を、通常の条件下でインキュベーター中に2日間配置した。この時点で、ゲンタマイシンの添加、 5 nMメトトレキサートの添加、ウシ胎仔血清を透析した胎仔血清で置換すること、およびヒポキサンチン/チミジンの除去によって、その培地からLCおよびHCの両方で首尾良くトランスフェクトされたクローンについての選択が開始した。トランスフェクション後17日目に、選択下で増殖する個々のクローンを選択し、そしてキメラ806抗体の発現についてスクリーニングした。ELISAを、スクリーニングに使用した。ELISAは、変性可溶性EGFレセプター(変性EGFRは、806の結合を可能にすることが既知である)でELISAプレートをコーティングすることからなった。このアッセイによって、個々のクローンによる生成レベルのスクリーニングが可能になり、そしてまた、スクリーニングされる抗体の機能性についてのスクリーニングが可能になる。すべてのクローンが、機能性ch806を生成していることが示された。最良の生成クローンを採取し、そして増幅のために増殖させた。生成されるch806のレベルを増幅するために、最高の生成クローンを、より高濃度のメトトレキサート(100 nM対 5 nM)下での再選択に供した。これは、上記の手順を使用して行った。

10

【0406】

その後、 100 nM MTXで増殖するクローンを、Biological Proct ion Facility, Ludwig Institute, Melbourne, Australiaに、生成レベルの測定、血清の分離、細胞バンク登録のために渡した。この細胞株は、回転ビンにおいて、約 10 mg/リットルを安定して生成することが示された。

20

【0407】

pREN ch806 LC neoベクターの核酸配列が、配列番号7中に提供されている。pREN ch806 HC DHFRベクターの核酸配列が、配列番号8中に提供されている。

【0408】

図33は、IRESを使用する、ベクターpREN-HCおよびpREN-LCを示す。pRENニシストロン性ベクター系は、2002年2月13日出願の同時係属中の米国特許出願番号60/355,838に記載され開示されている。この米国特許出願は、その全体が参考として本明細書中に援用される。

30

【0409】

ch806を、FACS分析によって評価して、キメラ806が、マウス親抗体の結合特異性と同じ結合特異性を示すことを示した。分析は、野生型細胞(U87 MG親細胞)、EGFレセプターを過剰発現する細胞(A431細胞およびUA87 wt EGF R細胞)、およびUA87 Δ -7細胞を使用して実施した(データは示さず)。Mab806とch806とで類似する結合特異性を、EGFRを過剰発現する細胞と、de2-7 EGF Rを発現する細胞を使用して得た。野生型細胞において、結合は観察されなかった。スキャッチャード分析によって、U87 MG de2-7細胞を使用して、放射性標識ch806についての結合親和性 6.4×10^9 M⁻¹が示された(データは示さず)。

40

【0410】

ch806抗体の生体分布分析を、U87 MG-de2-7異種移植片腫瘍を保有するBALB/cヌードマウスにおいて実施し、そしてその結果を、図34に示す。マウスに、 5 μ gの放射性標識抗体を注射し、そしてそのマウスを、8時間、24時間、48時間、および74時間の時点あたり4匹のグループとして屠殺した。器官を収集し、秤量し、そして放射能を γ 計数管にて測定した。¹²⁵I標識ch806は、¹¹¹In標識ch806と比較して減少した腫瘍標的化を示した。¹¹¹In標識ch806は、高い腫瘍取り込みを有し、74時間にわたって蓄積する腫瘍保持を有する。74時間目に、¹¹¹In標識抗体は、約30%のID/g組織を示し、そして腫瘍：血液比4.0を示す(図35)。¹¹¹In標識ch806は、肝臓、脾臓、および腎臓において、いくらかの非

50

特異的保持を示す。これは、この同位体の使用について共通しており、そして時間とともに減少する。このことは、この結合が、c h 8 0 6 に非特異的であり、 ^{111}In 結合に起因することを支持する。

【0411】

キメラ抗体 c h 8 0 6 を、樹立された腫瘍モデルにおいて治療効力について評価した。100 μl の PBS 中の 3×10^6 個の U 8 7 M G . $\Delta 2-7$ 細胞を、4～6 週齢の雌ヌードマウス (Animal Research Center, Weatern Australia, Australia) の両方の側腹部に皮下接種した。この m A b 8 0 6 は、ポジティブコントロールとして含まれた。その結果を図 36 に示す。腫瘍が平均体積 50 mm^3 に達したときに処置を開始した。処置は、示される日に合計 5 回注射するため 10 に腹腔内投与される 1 mg の c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 からなった。腫瘍体積 (mm^3) を、式 (長さ $\times$ 幅²) / 2 を使用して測定した。この式において、長さは、最長の軸であり、幅は、その長さに対して直角の測定値である。データは、各処置群についての平均腫瘍体積 $\pm$ 標準誤差として表した。c h 8 0 6 および m A b 8 0 6 は、U 8 7 M G . $\Delta 2-7$ 異種移植片に対してほぼ同じ抗腫瘍活性を示した。

【0412】

(c h 8 0 6 免疫エフェクターの機能の分析)

(材料および方法)

(抗体および細胞株)

マウス抗-de 2-7 EGFRモノクローナル m A b 8 0 6、キメラ抗体 c h 8 0 6 (20 I g G₁) およびキメラ抗 G 2 5 0 モノクローナル抗体 c G 2 5 0 に一致したコントロールアイソタイプを、Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia により調製した。補体依存性細胞傷害 (CDC) アッセイおよび抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) アッセイの両方は、標的細胞として U 8 7 M G . de 2-7 および A 4 3 1 細胞を利用した。以前に記載された U 8 7 M G . de 2-7 細胞株は、de 2-7 EGFR を含むレトロウイルスに感染したヒト星状細胞腫細胞株である (Nishikawa, R. ら (1994) Proc Natl Acad Sci USA. 91: 7727-31)。ヒト扁平上皮癌 A 4 3 1 細胞を、Am 30 erican Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入した。全ての細胞株を、GlutamaxTM (Life Technologies, Melbourne, Australia) を含み、10% 熱失活 FCS (CSL, Melbourne, Australia)、100 単位/ml のペニシリン および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシンを補充した、DMEM/F-12 中で培養した。レトロウイルスによりトランスフェクトした U 8 7 M G . de 2-7 細胞についての選択を維持するために、400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の G 4 1 8 を培地に含ませた。

【0413】

(ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) エフェクター細胞の調製)

PBMC を、健康なボランティアドナーの血液から単離した。ヘパリン処理した全血を、 40 Ficoll-Hypaque (ICN Biomedical Inc., Ohio, USA) における密度遠心分離により分画した。PBMC 画分を収集し、そして 5% 熱失活 FCS を含む、100 U/ml のペニシリン および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン、2 mM L-グルタミンを補充した、RPMI⁺ 1640 で 3 回洗浄した。

【0414】

(標的細胞の調製)

CDC アッセイおよび ADCC アッセイを、以前に開示されている方法 (Nelson, D. L. ら (1991): J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. D. Margulies, E. M. Shevach および W. Strober (編)、Current Protocols in Immunology, 7. 27. 1 頁、New York: Greene Publishing Wiley Intersc 50

ience) の改変により行った。簡単には、 5×10^6 個の標的 U87MG、de 2-7 および A431 細胞を、 1×10^6 個の細胞あたり $50 \mu\text{Ci}^{51}\text{Cr}$ (Geneworks, Adelaide, Australia) で標識し、そして 37°C にて 2 時間インキュベートした。次いで、細胞を PBS (0.05M 、 $\text{pH} 7.4$) で 3 回洗浄し、そして培養培地を用いて 4 回目の洗浄を行った。標識細胞のアリコート (1×10^4 細胞/ $50 \mu\text{l}$) を、96 ウェルマイクロタイタープレート (NUNC, Roskilde, Denmark) の各ウェルに添加した。

【0415】

(CDC アッセイ)

$50 \mu\text{l}$ の標識した標的細胞に、 $50 \mu\text{l}$ の ch806 またはアイソタイプコントロール抗体 cG250 を、 $0.00315 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ の濃度範囲にわたって三連で添加し、そして氷上で 5 分間インキュベートした。次いで、 $5 \mu\text{l}$ の新たに調製した健康なドナーの補体 (血清) を添加して、1:3 の最終希釈の血清を得た。マイクロタイタープレートを 37°C にて 4 時間インキュベートした。遠心分離の後、上清中の放出された ^{51}Cr を、計数した (Cobra II automated Gamma Counter, Canberra Packard, Melbourne, Australia)。特異的溶解のパーセンテージを、実験的 ^{51}Cr 放出、総放出 ($50 \mu\text{l}$ の標的細胞 + $100 \mu\text{l}$ の 10% Tween 20) および自発的 ($50 \mu\text{l}$ の標的細胞 + $100 \mu\text{l}$ の培地) 放出から計算した。

【0416】

(ADCC アッセイ)

健康なドナー PBMC によりもたらされる Ch806-媒介 ADCC を、2 つの 4 時間の ^{51}Cr 放出アッセイにより測定した。第 1 のアッセイにおいて、標識した標的細胞を、エフェクター細胞と共に、96 ウェル「U」底マイクロプレート (NUNC, Roskilde, Denmark) 中に、50:1 のエフェクター/標的 (E:T) 細胞比でプレートした。ADCC 活性測定について、 $0.00315 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ (最終濃度) の試験抗体およびコントロール抗体を、各ウェルに三連で添加した。第 2 の ADCC アッセイにおいて、ch806 の ADCC 活性を、エフェクター:標的細胞の割合の範囲にわたって、一定の $1 \mu\text{g/ml}$ の試験抗体濃度で、親マウス mAb806 と比較した。両方のアッセイにおいて、マイクロタイタープレートを、 37°C にて 4 時間インキュベートし、次いで、 $50 \mu\text{l}$ の上清を各ウェルから収集し、そして放出された ^{51}Cr を、 γ 線計数 (Cobra II automated Gamma Counter, Canberra Packard, Melbourne, Australia) により決定した。このアッセイに含まれるコントロールは、自発的な放出 (培地単独) および総放出 (10% Tween 20/PBS) について収集される。同じサブクラスの抗体を有する適切なコントロールを、並行して実行した。

【0417】

細胞溶解 (細胞傷害性) パーセントを、以下の式に従って計算した:

$$\text{細胞傷害性パーセント} = (\text{サンプル計数} - \text{自発的放出}) / (\text{総放出} - \text{自発的放出}) \times 100$$

細胞傷害性パーセント (%) を、抗体の濃度 ($\mu\text{g/ml}$) に対してプロットした。

【0418】

(結果)

CDC 分析の結果を、図 37 に表す。最小の CDC 活性を、 $10 \mu\text{g/ml}$ までの ch806 の存在下で観察し、これは、アイソタイプコントロール cG250 で観察された CDC に匹敵する CDC を有する。

【0419】

50:1 の E:T 比での、標的 U87MG、de 2-7 細胞および A431 細胞に対する ch806 媒介 ADCC を、図 38 に示す。有効な ch806 特異的細胞傷害性を、標的 U87MG、de 2-7 細胞に対して示したが、最小の ADCC が、A431 細胞に対す

る c h 8 0 6 により媒介された。達成された細胞傷害性のレベルは、2つの細胞集団における c h 8 0 6 結合部位の数を反映する。標的 U 8 7 M G . d e 2 - 7 細胞は、c h 8 0 6 により特異的に認識される約 1×10^6 個の d e 2 - 7 E G F R を発現し、一方、A 4 3 1 細胞で発現した 1×10^6 個の野生型 E G F R 分子の1つのサブセットのみが、c h 8 0 6 により認識される（上記実施例を参照のこと）。

【0420】

さらなる A D C C 分析を、標的 U 8 7 M G . d e 2 - 7 細胞に対して $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の c h 8 0 6 により媒介される A D C C を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の親マウス m A b 8 0 6 によりもたらされる A D C C と比較するために行った。結果を図 3 9 に示す。m A b 8 0 6 のキメラ化は、25:1 および 50:1 の E:T 比でもたらされる 30% の細胞傷害性を超える、親マウス m A b により達成される A D C C の著しい改変をもたらす。 10

【0421】

親マウス m A b 8 0 6 免疫エフェクター機能の欠如は、キメラ化において著しく改変された。c h 8 0 6 は、良好に A D C C を媒介するが、最小の C D C 活性である。

【0422】

（実施例 2 2）

（キメラ抗体 c h 8 0 6 に対する抗イディオタイプ抗体の作製）

m A b 8 0 6 または c h 8 0 6 の臨床的評価を補助するために、実験室アッセイは、抗体の血清薬物動態学およびにマウスーヒトキメラ抗体に応答する任意の免疫の量をモニターすることを必要とする。マウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体（抗 i d）を作製し、そして患者血清サンプル中の c h 8 0 6 を測定するための E L I S A 試薬としての適合性について、およびヒト抗キメラ抗体免疫応答分析における陽性コントロールとしての使用のために特徴付けした。これらの抗イディオタイプ抗体はまた、患者において自然な抗 E G F R 抗体応答を生じさせる、治療用ワクチンまたは予防用ワクチンとして有用であり得る。 20

【0423】

抗イディオタイプ抗体を作製するための方法は、当該分野で周知である（B h a t t a c h a r y a - C h a t t e r j e e, C h a t t e r j e e ら、2001、U e m u r a ら、1994、S t e f f e n s, B o e r m a n ら、1997、S a f a および F o o n 2001、B r o w n および L i n g 1988）。 30

【0424】

マウスモノクローナル抗イディオタイプ抗体（抗 i d）を、簡潔に述べると、以下のよう に作製した。c h 8 0 6 で免疫したマウス由来の脾臓を、S P 2 / 0 - A G 1 4 プラズマ細胞腫細胞と融合し、そして抗体産生ハイブリドーマを、c h 8 0 6 に対する特異的な結合および抗原に対する競合結合についての E L I S A を通じて選択した（図 4 0）。25 個のハイブリドーマを、最初に選択し、そして、c h 8 0 6、m A b 8 0 6 に対する特異的な結合を実証し、そして c h 8 0 6 抗原結合活性または m A b 8 0 6 抗原結合活性を中和し得た、4つを L M H - 1 1 分泌抗体、L M H - 1 2 分泌抗体、L M H - 1 3 分泌抗体および L M H - 1 4 分泌抗体と命名した（図 4 1）。c h 8 0 6 / m A b 8 0 6 イディオトープまたは C D R 領域の認識を、精製したポリクローナルヒト I g G との交差反応を欠く 40 ことにより実証した。

【0425】

血清サンプル中の c h 8 0 6 の決定を補助するための容易に利用可能な可能な組換え抗原 d e 2 - 7 E G F R の非存在下で、8 0 6 の可変領域に同時に結合する新規の抗イディオタイプ c h 8 0 6 抗体の能力を、臨床サンプルにおいて c h 8 0 6 を測定するための、高感度の特異的な E L I S A の開発において、開発した（図 4 2）。捕捉のために L M H - 1 2 および検出のためにビオチン化 - L M H - 1 2 を用いて、有効な E L I S A は、 $3 \text{ ng}/\text{ml}$ の検出限界を用いて、血清中の c h 8 0 6 ($2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.6 \text{ ng}/\text{ml}$) を測定するための高度に再現性のある結合曲線を実証した。（ $n = 12$; $1 \sim 100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、変動係数 $< 25\%$; $100 \text{ ng}/\text{ml} \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、変動係数 $< 15\%$ ）。パッ 50

クグラウンド結合がないことは、試験された3つの健康な血清で明白であり、そして無視出来る結合が、アイソタイプコントロール h u 3 S 1 9 3 で観察された。ハイブリドーマは、高いレベルの抗体 L M H - 1 2 を産生し、そして大スケールの産生を、c h 8 0 6 の測定、および臨床試験サンプルにおける任意の免疫応答の定量化を可能にするために計画する (B r o w n および L i n g 1 9 8 8) 。

【0426】

(結果)

(マウス免疫およびハイブリドーマクローン選択)

免疫前の血清サンプルおよび免疫後の血清サンプルの免疫反応性は、高力価のマウス抗 c h 8 0 6 および抗 h u I g G m A b の開発を示した。c h 8 0 6 に結合するが h u I g G に結合しない抗体を産生する25個のハイブリドーマを最初に選択した。これらのハイブリドーマのいくつかの結合特性を、図42Aおよび42Bに示す。これらの抗 c h 8 0 6 ハイブリドーマのうち、高いアフィニティー結合を有する4つ(クローン3E3、5B8、9D6および4D8)を、引き続いて、限界希釈による単一の細胞からのクローン増殖を行い、そして、それぞれ、L u d w i g I n s t i t u t e f o r C a n c e r R e s e a r c h M e l b o u r n e H y b r i d o m a (L M H) - 1 1 、 - 1 2 、 - 1 3 、 および - 1 4 と命名した(図42)。

【0427】

(選択した抗イディオタイプ抗体の結合活性およびブロッキング活性)

2つのc h 8 0 6 抗体に同時に結合する抗 c h 8 0 6 抗体の能力は、血清 c h 8 0 6 レベルを決定するためのE L I S A における試薬としてのそれらの用途について望ましい特徴である。クローンのハイブリドーマである、L M H - 1 1 、 L M H - 1 2 、 L M H - 1 3 、 および L M H - 1 4 は、同時結合を実証した(データ示さず)。

【0428】

クローン増殖後、ハイブリドーマ培養上清を、s E G F R 6 2 1 との c h 8 0 6 または m A b 8 0 6 の抗原結合活性を中和する能力について、E L I S A により試験した。結果は、s E G F R でコートされたプレートに結合する c h 8 0 6 およびマウス m A b 8 0 6 の両方の溶液中でのブロッキングを有する、抗イディオタイプ m A b である L M H - 1 1 、 L M H - 1 2 、 L M H - 1 3 、 および L M H - 1 4 のアンタゴニスト活性を実証した (L M H - 1 1 、 L M H - 1 2 、 L M H - 1 3 について図41)。

【0429】

ローラーボトル中での大スケール培養の後、確立したクローンハイブリドーマである L M H - 1 1 、 L M H - 1 2 、 L M H - 1 3 、 および L M H - 1 4 の結合特異性は、E L I S A により変化した。L M H - 1 1 ~ L M H - 1 4 の抗体を、マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キットにより、アイソタイプ I g G 1 κ として同定した。

【0430】

(臨床的血清サンプル中の c h 8 0 6 : 薬物動態学的 E L I S A アッセイの開発)

血清サンプル中の c h 8 0 6 の決定を補助するために、806の可変領域に同時に結合する抗イディオタイプ c h 8 0 6 抗体の能力を、臨床用サンプル中の c h 8 0 6 についての高感度かつ特異的 E L I S A アッセイも開発において利用した。3つの精製したクローン L H M - 1 1 、 L H M - 1 2 および L H M - 1 3 (それぞれ、図49、B、およびC)を、血清中の c h 8 0 6 を捕捉し、そして結合した c h 8 0 6 を検出する能力について比較した。捕捉について L M H - 1 2 (1 0 μ g / m l) および検出についてビオチン化 L M H - 1 2 を用いて示された結果は、無視出来るバックグラウンド結合を有する、血清中の c h 8 0 6 に対する最も高い感受性 (3 n g / m l) を生じた。

【0431】

捕捉および検出に、それぞれ、1 μ g / m l の抗イディオタイプ L M H - 1 2 および 1 μ g / m l のビオチン化 L M H - 1 2 を用いる、最適な薬物動態学的 E L I S A 条件を確立することによって、方法の確認を行った。3つの別々の E L I S A を、4連で行って、3人の健康なドナー由来のドナー血清中、またはアイソタイプコントロール h u 3 S 1 9 3

を有する 1 % B S A / 培地の c h 8 0 6 を測定した。確認の結果を、図 4 3 に表し、そしてこの結果は、3 n g / m l の検出限界を有する血清において c h 8 0 6 (2 μ g / m l ~ 1 . 6 n g / m l) を測定するための高度に再現性のある結合曲線を実証する。(n = 1 2 ; 1 ~ 1 0 0 n g / m l 、変動係数 < 2 5 % ; 1 0 0 n g / m l ~ 5 μ g / m l 、変動係数 < 1 5 %) 。バックグラウンド結合がないことは、試験された 3 つの血清で明白であり、そして無視出来る結合が、アイソタイプコントロール h u 3 S 1 9 3 で観察された。

【 0 4 3 2 】

(参考文献)

これらは、本当は、実施例 1 7 の終りに組み込まれるべきであり、そして全ての実施例の終りに加えられるべきである。 10

【 0 4 3 3 】

【 表 1 3 】

Brown, G. and N. Ling (1988). Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume I. A Practical Approach. D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy." Curr Opin Mol Ther 3(1): 63-9.

Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000). "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." Growth Factors 18(1): 11-29 20

Safa, M. M. and K. A. Foon (2001). "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers." Semin Oncol 28(1): 68-92.

Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994). "Internal image anti-idiotypic antibodies related to renal-cell carcinoma- associated antigen G250." Int J Cancer 56(4): 609-14.

(実施例 2 3 糖質構造および抗体認識の評価)

実験を、m A b 8 0 6 抗体による、E G F R (増幅された E G F R および d e 2 - 7 E G F R の両方) の結合および認識における糖質構造の役割をさらに評価するために行った。 30

【 0 4 3 4 】

糖質構造が、m A b 8 0 6 エピトープに直接関与するか否かを決定するために、C H O 細胞において発現される組換え s E G F R 発現を、P N G a s e F を用いて処理して、N 連結グリコシル化を排除した。処置後、タンパク質を、S D S - P A G E で泳動し、膜に転写し、そして m A b 8 0 6 を用いて免疫ブロットした (図 4 4) 。予想されるように、脱グリコシル化 s E G F R は、S D S - P A G E 上でより速く泳動し、このことは、糖質が首尾よく除去されたことを示した。m A b 8 0 6 抗体は、脱グリコシル化物質を明白に結合し、このことは、抗体エピトープは本質的にペプチドであり、そしてグリコシル化エピトープではないことを実証した。

【 0 4 3 5 】

3 5 S で代謝的に標識した細胞株から調製した溶解物を、E G F R に対して指向された異なる抗体を用いて免疫沈降させた (図 4 5) 。予想されるように、5 2 8 抗体は、U 8 7 M G . Δ 2 ~ 7 細胞由来の 3 つのバンドを免疫沈降させた (上のバンドは、野生型 (w t) E G F R に対応し、2 つの下バンドは、d e 2 - 7 E G F R に対応する) 。これらの 2 つの d e 2 - 7 E G F R バンドは以前に報告されており、そして異なるグリコシル化を表すと考えられる (C h u ら (1 9 9 7) B i o c h e m . J . J u n 1 5 ; 3 2 4 (P t 3) : 8 8 5 - 8 6 1) 。対照的に、m A b 8 0 6 は、2 つの d e 2 - 7 E G F R バンドのみを免疫沈降させ、w t レセプターは、過剰な曝露の後でさえ完全に存在しなかった (データ示さず) 。興味深いことに、m A b 8 0 6 は、より低い d e 2 - 7 E G F R バンドとの増加した相対的反応性を示したが、5 2 8 抗体と比較した場合、上のバンド 40 50

との減少した反応性を示した。SC-03抗体（EGFRのC末端ドメインに対して指向された市販のウサギポリクローナル抗体）は、528抗体で見られたように3つのEGFRバンドを免疫沈降させたが、この抗体により免疫沈降されたレセプターの総量は、極めて少なかった。mAb806のコントロールとして無関係のIgG2b抗体を用いる場合、バンドは観察されなかった。

【0436】

528抗体は、wtレセプターに対応するU87MG、wtEGFR細胞から単一のバンドを免疫沈降させた（図45）。mAb806はまた、これらの細胞から単一のバンドを免疫沈降させたが、このEGFRバンドは、528反応性レセプターよりも明らかにより速く移動した。このSC-03抗体は、U87MG、wtEGFR細胞由来の両方のEGFR反応性バンドを免疫沈降させ、このことにより、さらに、mAb806および528は、これらの細胞からの全細胞溶解物中のEGFRの異なる形態を認識することを確認した。

10

【0437】

U87MG、wtEGFR細胞で確認されたように、528抗体は、A431細胞から単一のEGFRバンドを免疫沈降させた（図45）。この528反応性EGFRバンドは、これらの低パーセントゲル（6%）において非常にブロードであり、そして、このことは、恐らく、レセプターグリコシル化の多様性を反映している。単一のEGFRバンドはまた、mAb806での免疫沈降の後にも見られた。このEGFRバンドは、528のブロードな反応性バンドの全体よりも、かなり速くは移動しなかったが、これは、再現性のある様式でブロードな528バンドの先端に位置付けられた。U87MG、Δ2-7細胞溶解物とは異なり、A431溶解物からmAb806により免疫沈降されるEGFRの総量は、528抗体を用いるよりもかなり少なく、結果は、mAb806のみがこれらの細胞の表面上のEGFRの部分の認識することを示す、本発明者らのスクッチャードデータと一致した（上記実施例4を参照のこと）。SC-03での免疫沈降は、528抗体の場合の単一のブロードなEGFRバンドを生じた。類似の結果を、HN5細胞を用いて得た（データ示さず）。まとめると、このデータは、mAb806は、EGFRのより速い移動種と優先的に反応し、これは、レセプターの差次的なグリコシル化形態を表すことを示す。

20

【0438】

mAb806反応性をプロセスするどの段階のレセプターが、現れたかを決定するために、パルス／チェイス実験を実施した。A431およびU87MG、Δ2-7細胞を、35Sメチオニン／システインと5分間パルスし、次いで、mAb806または528を用いる免疫沈降の前の種々の時間で37℃にてインキュベートした（図46）。528抗体を用いるA431細胞における免疫沈降パターンは、EGFRに特異的な立体配座依存抗体に特有であった。少量のレセプターを、各時点で増加する標識EGFRの量を用いて、0分（すなわち、5分のパルスの後）で免疫沈降させた。時間と共にレセプターの分子量の同時増加もまた存在した。対照的に、mAb806反応性EGFR物質は、0分に高レベルで存在し、20分にピークに達し、次いで、さらに各時点で減少した。従って、mAb806は、プロセスの初期段階で見出されるEGFRの形態を優先的に認識することが明らかである。

30

40

【0439】

パルスし標識したU87MG、Δ2-7細胞において観察される抗体反応性は、さらに複雑である。0分での528抗体を用いる免疫沈降は、少量のより低いde2-7EGFRバンドを標識したことを示した（図46）。時間と共に増加した528反応性de2-7EGFRの下バンドの量は、60分でピークに達し、そして2時間および4時間でゆっくりと下降した。有意な量のde2-7EGFRの標識したより上のバンドは、60分まで検出されなかったが、この後、このレベルは、時間経過の終りまで増加し続けた。このことは、上のde2-7EGFRが、レセプターのより成熟した形態であることを明らかに示す。mAb806の反応性はまた、経時的研究の間で変化した。mAb806は、

50

d e 2 - 7 E G F R の下のバンドを優先的に沈降させた。実際に、標識の 4 時間後まで、有意なレベルの m A b 8 0 6 の上のバンドは見られなかった。

【0440】

上の実験は、m a b 8 0 6 が、未成熟のグリコシル化形態の d e 2 - 7 および w t E G F R と優先的に反応することを示唆する。この可能性は、³⁵S メチオニン / システインで一晩標識した異なる細胞株から E G F R を免疫沈降させ、次いで、得られた沈殿物を、エンドグリコシダーゼ H (E n d o H) 消化に供することにより試験した。この酵素は、タンパク質から、高マンノース型の糖質（すなわち、未成熟のグリコシル化）を優先的に除去する一方で、複雑な糖質（すなわち、グリコシル化）をインタクトなまま残す。528、m A b 8 0 6 および S C - 0 3 を用いる、標識された U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞溶解物の免疫沈降および E n d o H での消化は、類似の結果を与えた（図 4 7）。予想されるように、下の d e 2 - 7 E G F R バンドは、E n d o H 消化に非常に感受性であり、E n d o H 消化の後の S D S - P A G E においてより速く移動し、このバンドが、d e 2 - 7 E G F R の高マンノース形態を表すことを実証した。この上の d e 2 - 7 E G F R バンド上の糖質は、E n d o H 消化に対して本質的に耐性であり、このことは、E n d o H 消化の後の移動における非常にわずかな差異のみを示し、大部分の糖質構造が、複雑な型であることを示した。酵素消化の後の上のバンドの分子量の小さいが再現可能な減少は、上の d e 2 - 7 E G F R バンドが、主に複雑な型をとるが、これはいくつかの高マンノース構造を有することを示唆する。興味深いことに、これらの細胞はまた、528 免疫沈降の後に明らかに眼に見える、低い量の内因性の w t E G F R を発現する。E n d o H 消化の後の w t レセプターの分子量における小さいが注目すべき減少もまた存在し、このことは、高マンノース構造もまた含むことを示した。

【0441】

E n d o H 消化に対する免疫沈降した w t E G F R の感受性は、U 8 7 M G . w t E G F R 細胞および A 4 3 1 細胞の両方に類似した（図 4 7）。528 抗体により沈殿した材料の大部分は、E n d o H 酵素に対して耐性であったが、少量の材料は、高マンノース形態であった。再度、E n d o H 消化の後に w t E G F R の分子量の小さな減少が存在し、このことは、いくつかの高マンノース構造を含むことを示唆した。S C - 0 3 抗体を用いた結果は、528 抗体に類似していた。対照的に m A b 8 0 6 により沈降した E G F R の大部分は、U 8 7 M G . w t E G F R 細胞および A 4 3 1 細胞の両方において E n d o H に感受性であり、このことにより、m A b 8 0 6 が、E G F R の高マンノース形態を優先的に認識することを確認した。類似の結果を、H N - 5 細胞を用いて得た。ここで、m A b 8 0 6 により沈殿した物質の大部分は、E n d o H 消化に感受性であったが、m A b 5 2 8 および S C - 0 3 により沈降した物質の大部分は、E n d o H 消化に対して耐性であった（データ示さず）。

【0442】

A 4 3 1 細胞株の細胞表面ヨウ素化を、¹²⁵I を用いて行い、次いで、806 抗体を用いて免疫沈降させた。表面ヨウ素化のためのプロトコルは以下の通りである：細胞溶解、免疫沈降、E n d o H 消化、S D S - P A G E およびオートラジオグラフィーは、本明細書中で上に記載される通りである。標識のために、細胞を、10% F C S を含む培地中で増殖させ、E D T A で剥離させ、P B S で 2 回洗浄し、次いで、400 μ l の P B S に再懸濁した（約 2 ~ 3 × 10⁶ 細胞）。これに、15 μ l の ¹²⁵I (100 m C i / m l ストック)、100 μ l のウシラクトペルオキシダーゼ (1 m g / m l) ストック、10 μ l H₂O₂ (0.1% ストック) を添加し、そしてこれを、5 分間インキュベートした。次いで、さらに 10 μ l の H₂O₂ を、添加し、そしてインキュベーションをさらに 3 分間続けた。次いで、P B S で細胞を再度 3 回洗浄し、そして 1% T r i t o n 中に溶解した。ラクトペルオキシダーゼを用いる A 4 3 1 細胞株の細胞表面ヨウ素化、次いで 806 抗体を用いる免疫沈降は、上記の総細胞溶解物に類似して、A 4 3 1 細胞の細胞表面上に結合した 806 により認識される E G F R の主要な形態は、E n d o H 消化に対して感受性であったことを示した（図 4 8）。このことにより、A 4 3 1 細胞の細胞表面

上の 806 により結合される EGF R の形態は、Endo H 感受性形態であり、これにより高マンノース型であることを確認した。

【0443】

本発明は、本発明の精神または本質的特徴から逸脱することなく、他の形態で具現化され得るか、または他の方法で実行され得る。従って、本開示は、全ての局面を例示するためのものであるとみなされるべきであり、そして添付の特許請求の範囲により示される本発明の範囲を制限せず、そして等価な意味および範囲の中で起こる全ての変更は、本発明に包含されることが意図される。

【0444】

種々の参考文献を、本明細書を全体を通じて引用し、これらの各々は、その全体が本明細書中で参考として援用される。 10

【0445】

他の目的および利点は、以下の例示的な図面、および添付の特許請求の範囲に関する引き続き詳細な説明を見れば、当業者に明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0446】

【図1】図1は、神経膠腫細胞株のフローサイトメトリー分析の結果を示す。U87MG（薄灰色のヒストグラム）細胞およびU87MG. Δ2-7（暗灰色のヒストグラム）細胞を、示されるような無関係のIgG2b抗体（白抜きのヒストグラム）、DJ8.3（de2-7EGFRに特異的）、MAb806または528（野生型EGFRおよびde2-7EGFRの両方に結合する）のいずれかで染色した。 20

【図2-1】図2A~Cは、MAb806、DH8.3、または528抗体のELISAの結果を示す。（A）sEGFRをコートしたELISAプレートに対するMAb806（黒三角）、DH8.3（黒丸）、または528（黒四角）抗体の増加した濃度の結合。（B）溶液中でのsEGFRの濃度を増加させることによるsEGFRをコートしたELISAプレートに対するMAb806および528の結合の阻害。（C）de2-7連結ペプチドに対するDH8.3の増加した濃度の結合は、固定化された野生型sEGFRに対するmAb806および528抗体の結合曲線を示す。

【図2-2】図2Dおよび2Eは、C末端ビオチニル化ペプチドを用い、そして他の公知の抗体（とりわけ、de2-7EGFR変異体の連結ペプチドを認識するL8A4抗体） およびコントロールと共に、本発明のモノクローナル抗体を含む、BIAcore結合研究の結果を図示する。 30

【図3】図3は、MAb806およびDH8.3抗体のインターナリゼーションを示す。U87MG. Δ2-7細胞を、MAb806（黒三角）またはDH8.3（黒丸）と共に4℃にてプレインキュベートし、37℃に移し、そしてインターナリゼーションを、FACSにより決定した。データは、3つ（DH8.3）または4つ（MAb806）の別々の実験の各時点での平均インターナリゼーション±SEを示す。

【図4】図4Aおよび4Bは、U87MGおよびU87MG. Δ2-7異種移植片を保有するヌードマウスにおける放射標識された（a）¹²⁵I-MAb806および（b）¹²⁵I-DH8.3の生物分布（%ID/g腫瘍）を示す。各点は、1時間を除く5匹のマウスの平均±SEを示す（n=4）。 40

【図5】図5Aおよび5Bは、U87MG. Δ2-7異種移植片を保有するヌードマウスにおける、（a）腫瘍：血液または（b）腫瘍：肝臓の比として表される、放射標識された¹²⁵I-MAb806（白抜きのバー）および¹²⁵I-DH8.3（黒塗りのバー）の生物分布を示す。各バーは、n=4の場合の1時間を除く、5匹の平均±SEを示す。

【図6】図6は、EGFR遺伝子の増幅を含む細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。A431細胞を、MAb806、DH8.3、または528（黒のヒストグラム）のいずれかで染色し、そして無関係のIgG2b抗体（白抜きのヒストグラム）と比較した。

【図7】図7Aおよび7Bは、U87MG. Δ2-7およびA431異種移植片を保有す 50

るヌードマウスにおける放射標識された (a) ^{1 2 5} I - M A b 8 0 6 および (b) ^{1 3} ¹ I - 5 2 8 の生物分布 (% I D / g 腫瘍) を示す。

【図 8】図 8 A ~ D は、(a、c) U 8 7 M G Δ 2 - 7 および (b、d) A 4 3 1 異種移植片を保有するヌードマウスにおける、(a、b) 腫瘍：血液または (c、d) 腫瘍：肝臓の比として表される、放射標識された ^{1 2 5} I - M A b 8 0 6 (白抜きのバー) および ^{1 3} ¹ I - 5 2 8 (黒塗りのバー) および抗体の生物分布を示す。

【図 9】図 9 は、予防的モデルにおける、A) U 8 7 M G および B) U 8 7 M G . Δ 2 - 7 異種移植片の増殖率に対する m A b 8 0 6 の抗腫瘍効果を示す。3 × 1 0 ⁶ 個の U 8 7 M G または U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞を、第 0 日に、4 ~ 6 週齢の B A L B / c ヌードマウス (n = 5) の両方側に s . c . 注入した。マウスに、1 m g の m A b 8 0 6 (黒丸) ; 0 . 1 m g の m A b 8 0 6 (黒三角) ; またはビヒクル (白丸) のいずれかを、腫瘍細胞接種の 1 日前に開始して i . p . 注入した。注入を、矢印で示されるように、2 週間にわたって 1 週間に 3 回与えた。データを、平均腫瘍体積 ± S E として示す。 10

【図 1 0】図 1 0 は、確立されたモデルにおける、A) U 8 7 M G、B) U 8 7 M G . Δ 2 - 7 および C) U 8 7 M G . w t E G F R 異種移植片に対する m A b 8 0 6 の抗腫瘍効果を示す。3 × 1 0 ⁶ 個の U 8 7 M G、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 または U 8 7 M G . w t E G F R 細胞を、4 ~ 6 週齢の B A L B / c ヌードマウス (n = 5) の両方側に s . c . 注入した。マウスに、1 m g 用量の m A b 8 0 6 (黒丸) ; 0 . 1 m g 用量の m A b 8 0 6 (黒三角) ; またはビヒクル (白丸) のいずれかを、腫瘍が、平均腫瘍体積 6 5 ~ 8 0 m m ³ に達した場合に開始して、i . p . 注入した。注入を、矢印で示されるように、2 週間にわたって 1 週間に 3 回与えた。データを、平均腫瘍体積 ± S E として示す。 20

【図 1 1】図 1 1 は、A) 予防的モデルおよび B) 確立されたモデルにおける A 4 3 1 異種移植片に対する m A b 8 0 6 の抗腫瘍効果を示す。3 × 1 0 ⁶ 個の A 4 3 1 細胞を、4 ~ 6 週齢の B A L B / c ヌードマウス (n = 5) の両方側に s . c . 注入した。マウスに、1 m g 用量の m A b 8 0 6 (黒丸) ; またはビヒクル (白丸) のいずれかを、予防的モデルにおいて、腫瘍細胞接種の 1 日前または腫瘍が、平均腫瘍体積 2 0 0 m m ³ に達した場合に開始して、i . p . 注入した。注入を、矢印で示されるように、2 週間にわたって 1 週間に 3 回与えた。データを、平均腫瘍体積 ± S . E . として示す。

【図 1 2】図 1 2 は、予防的モデルにおける A 4 3 1 異種移植片に対する、A G 1 4 7 8 処置と組み合わせた m A b 8 0 6 処置の抗腫瘍効果を示す。データを、平均腫瘍体積 ± S . E . として示す。 30

【図 1 3】図 1 3 は、増加した濃度の A G 1 4 7 8 (0 . 5 u M および 5 u M) の存在下における、A 4 3 1 細胞に対する抗体 8 0 6 の結合を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、8 0 6 V H 遺伝子の核酸配列およびそのアミノ酸翻訳物 (それぞれ、配列番号 1 および配列番号 2) を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、8 0 6 V L 遺伝子の核酸配列およびそのアミノ酸翻訳物 (それぞれ、配列番号 3 および配列番号 4) を示す。

【図 1 6】図 1 6 は、K a b a t に従って番号付けられた V H 配列を示す (C D R を囲んでいる)。V H の重要な残基は、2 4、3 7、4 8、6 7、および 7 8 である。

【図 1 7】図 1 7 は、K a b a t に従って番号付けられた V L 配列を示す (C D R を囲んでいる)。V L の重要な残基は、3 6、4 6、5 7、および 7 1 である。 40

【図 1 8】図 1 8 A ~ D は、組み合わせ抗体治療 (特に、m A b 8 0 6 および 5 2 8 抗体) の治療効果を決定するために設計されたインビボ研究の結果を示す。マウスは、U 8 7 M G . Δ 2 - 7 (A および B)、U 8 7 M G . D K (C)、または A 4 3 1 (D) 細胞の接種を受けた。

【図 1 9】図 1 9 A ~ D は、電子顕微鏡によるインターナリゼーションの分析を示す。U 8 7 M G . Δ 2 - 7 細胞を、M A b 8 0 6 または D H 8 . 3 と共に、その後、金結合抗マウス I g G と共に、4 °C にてプレインキュベートし、3 7 °C に移し、そしてインターナリゼーションを、種々の時点で、電子顕微鏡により試験した。(A) 5 分後の、コーティングされたピット (矢印) に対する D H 8 . 3 抗体の局在化 ; (B) 2 分後の、巨視的飲作 50

用（矢印）によるMAb 806のインターナリゼーション；（C）20分後の、リソソーム（矢印）へのDH8.3の局在化；（D）30分後の、リソソーム（矢印）へのMAb 806の局在化。全ての画像の元の倍率は、 $\times 30,000$ である。

【図20】図20は、 ^{125} I-MAb 806の注入の8時間後に回収された、U87MG. Δ 2-7異種移植片切片のオートラジオグラフィーを示す。

【図21】図21は、EGFR遺伝子の増幅を含む細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。HN5およびMDA-468細胞を、無関係のIgG2b抗体（点線での白抜きのヒストグラム）、MAb 806（黒のヒストグラム）、または528（実線白抜きのヒストグラム）で染色した。DH8.3抗体は、両方の細胞株において完全に陰性であった（データは示していない）。

【図22】図22は、細胞株からのEGFRの免疫沈降を示す。EGFRを、MAb 806、sc-03抗体、またはIgG2bアイソタイプコントロールを用いて、 ^{35} S標識U87MG. Δ 2-7またはA431細胞から免疫沈降させた。側面の矢印は、de2-7およびwt EGFRの位置を示す。同一のバンドパターンを、3つの独立した実験において獲得した。

【図23】図23は、 ^{125} I-MAb 806の注入の24時間後に回収されたA431異種移植片切片のオートラジオグラフィーを示す。生存組織に対する局在化の領域を示す（矢印）。

【図24】図24AおよびBは、全身性mAb 806処置による、頭蓋内U87MG. Δ EGFR（A）およびLN-Z308. Δ EGFR（B）異種移植片を保有するヌードマウスの延長された生存性を示す。U87MG. Δ EGFR細胞（ 1×10^5 ）またはLN-Z308. Δ EGFR細胞（ 5×10^5 ）を、ヌードマウスの脳に移植し、そしてこの動物を、mAb 806、PBS、またはアイソタイプIgGのいずれかを用いて、移植後0日～第14日まで処置した。CおよびDは、mAb 806処置による頭蓋内腫瘍の増殖阻害を示す。mAb 806またはアイソタイプIgGコントロールのいずれかで処置したヌードマウス（5匹／群）を、U87MG. Δ EGFR（C）については第9日に、そしてLN-Z308. Δ EGFR（D）については第15日に安楽死させ、そしてそれらの脳を回収し、固定し、そして切り出した。データを、コントロールの腫瘍体積を100%と考えて算出した。値は、平均 $\pm$ SD、***、 $P < 0.001$ ；コントロール対mAb 806である。矢頭、腫瘍組織。Eは、腫瘍内mAb 806処置による頭蓋内U87MG. Δ EGFR異種移植片を保有するヌードマウスの延長された生存率を示す。U87MG. Δ EGFR細胞を、上記のように移植した。5 μ lの体積中の10mgのmAb 806またはアイソタイプIgGコントロールを、第1日で開始して1日おきに5回腫瘍注入部位に注入した。

【図25】図25は、mAb 806が、U87MG. wt EGFR脳腫瘍を有するマウスの生存性を延長させたが、U87MG. DK. またはU87MG脳腫瘍を有するマウスの生存性は延長させなかったことを示す。U87MG（A）、U87MG. DK（B）、またはU87MG. wt EGFR（C）細胞（ 5×10^5 ）を、ヌードマウス脳に移植し、そしてこの動物を、移植後0日から第14日までmAb 806で処置し、続いて、治療の中止後に観察した。

【図26】図26Aは、U87MG細胞株とのmAb 806の反応性のFACS分析を示す。U87MG、U87MG. Δ EGFR、U87MG. DK、およびU87MG. wt EGFR細胞を、抗EGFR mAb 528、EGFR. 1、および抗 Δ EGFR抗体、mAb 806で染色した。モノクローナルEGFR. 1抗体は、wt EGFRを排他的に認識し、そしてモノクローナル528抗体は、wt EGFRおよび Δ EGFRの両方と反応した。mAb 806は、U87MG. Δ EGFRおよびU87MG. DKと強力に反応し、そしてU87MG. wt EGFRと弱く反応した。横軸上のバーは、一次抗体の非存在下での細胞の最大染色を示す。結果を、3つの独立した実験において再現した。Bは、EGFR形態のmAb 806免疫沈降を示す。変異体およびwt EGFRを、（レーン1）U87MG、（レーン2）U87 Δ EGFR、（レーン3）U87MG. DK、および（

10

20

30

40

50

レーン4) U87MG, wtEGFR細胞から、抗EGFR抗体、528、またはEGFR、1、あるいは抗ΔEGFR抗体、mAb806を用いて免疫単離し、次いで、抗汎用EGFR抗体C13を用いてウェスタンブロットにより検出した。

【図27】図27は、mAb806による全身処置が、U87MG, ΔEGFR脳腫瘍におけるΔEGFRのリン酸化およびBcl-X_L発現を減少させることを示す。U87MG, ΔEGFR腫瘍を、mAb806処置の9日目に切り出し、液体窒素中で直ちに凍結させ、そして腫瘍溶解物の調製前に-80℃で保存した。Aは、ΔEGFRの発現および自己リン酸化の程度のウェスタンブロット分析を示す。30μgの腫瘍溶解物を、SDS-ポリアクリルアミドゲルに供し、ニトロセルロースメンブレンに移し、そして抗ホスホチロシンmAbでプローブし、次いで、剥離しそして抗EGFR抗体C13で再プローブした。Bは、Aにおけるような同一の腫瘍溶解物を用いることによるBcl-X_Lのウェスタンブロットを示す。メンブレンに、抗ヒトBcl-Xポリクローナル抗体をプローブした。レーン1および2、アイソタイプコントロールで処置したU87MG, ΔEGFR脳腫瘍；レーン3および4、mAb806で処置したU87MG, ΔEGFR脳腫瘍。 10

【図28】図28は、mAb806処置が、U87MG, ΔEGFR腫瘍において、増殖および血管形成の減少ならびにアポトーシスおよびマクロファージ蓄積の増加を誘導することを示す。腫瘍切片を、Ki-67について染色した。細胞増殖指数を、各グループの4匹のマウス由来の頭蓋内腫瘍における、4つの無作為に選択された高倍率場(×400)からのKi-67ポジティブである総細胞のパーセンテージにより評価した。データは、平均±SEである。アポトーシス細胞を、TUNELアッセイにより検出した。アポトーシス指数を、TUNELポジティブ細胞：各グループの4匹のマウス由来の頭蓋内腫瘍における、4つの無作為に選択された高倍率場(×400)からの総細胞比により評価した。データは、平均±SEである。腫瘍切片を、抗CD31抗体で免疫染色した。MVAを、各グループの4匹のマウス由来の頭蓋内腫瘍からの4つの無作為に選択された場(×200)からのコンピューター画像分析により分析した。mAb806処置したU87MG, ΔEGFR腫瘍におけるマクロファージの腫瘍周辺浸潤。腫瘍切片を、抗F4/80抗体で染色した。 20

【図29】図29は、親およびトランスフェクトU87MG神経膠腫細胞株のフローサイトメトリー分析を示す。細胞を、示されるように、無関係のIgG2b抗体(白抜きのヒストグラム)または528抗体またはmAb806(黒塗りのヒストグラム)のいずれかで染色した。 30

【図30】図30は、細胞株からのEGFRの免疫沈降を示す。EGFRを、³⁵S標識U87MG, wtEGFR、U87MG, Δ2-7、およびA431細胞から、mAb806(806)、sc-03抗体(c末端)、またはIgG2bアイソタイプコントロール(con)で免疫沈降させた。矢印は、de2-7およびwtEGFRの位置を示す。

【図31】図31は、U87MG, Δ2-7およびU87MG, wtEGFR異種移植片の例示的なH&E染色したパラフィン切片を示す。U87MG, Δ2-7(腫瘍接種の24日後に収集した)およびU87MG, wtEGFR(腫瘍接種の42日後に収集した)異種移植片を、上記図10において記載されるように処置されたマウスから切り出し、そしてH&Eで染色した。ビヒクル処置したU87MG, Δ2-7(腫瘍接種の18日後に収集した)およびU87MG, wtEGFR(腫瘍接種の37日後に収集した)異種移植片は、非常に小さな領域の壊死を示したが(左パネル)、広範な壊死(矢印)を、mAb806で処置したU87MG, Δ2-7およびU87MG, wtEGFR異種移植片の両方において観察した(右パネル)。 40

【図32】図32は、U87MG、U87MG, Δ2-7、およびU87MG, wtEGFR異種移植片由来の凍結切片におけるEGFR発現の免疫組織化学分析を示す。切片を、上記図31に記載される時点で収集した。異種移植片切片を、528抗体(左パネル)およびmAb806(右パネル)で免疫染色した。wtEGFR、増幅EGFR、またはde2-7EGFRのいずれに対する免疫反応性の減少も、mAb806で処置した異種移植片において観察されなかった。インビトロでのデータと一致して、親U87MG異種 50

移植片は、528抗体に対してポジティブであったが、mAb806染色に対してはネガティブであった。

【図33】図33は、作製されたニシストロン性発現構築物の概略図を示す。キメラ抗体鎖の転写物は、伸長因子-1プロモーターで開始し、そして強力な人工終結配列で終了する。IRES配列を、軽鎖のコード領域とNeoRのコード領域との間、および重鎖のコード領域とdhfr遺伝子のコード領域との間に導入した。

【図34】A) ¹ ² ⁵ IまたはB) ¹ ¹ ¹ Inのいずれかで放射性標識されたch806の生体分布分析を、U87MG-de2-7異種移植片腫瘍を有するBALB/cヌードマウスにおいて実施した。マウスに、5μgの放射性標識抗体を注射し、各時点について4匹のマウスの群において、8時間、28時間、48時間または74時間のいずれかにおいて屠殺した。器官を収集し、計量し、そしてγカウンターにて放射活性を測定した。 10

【図35】図35は、(A) %IDグラムの腫瘍組織および(B)血液に対する腫瘍の比率を示す。インジウム-111抗体は、約30%ID/グラムの組織および4.0の血液に対する腫瘍の比率を示す。

【図36】図36は、確立された腫瘍モデルにおけるキメラ抗体ch806の治療的効力を示す。100μlのPBS中の3×10⁶のU87MG、Δ2-7細胞を、4~6週齢メスヌードマウスの両脇腹に皮下接種した。mAb806を、ポジティブコントロールとして含めた。腫瘍が50mm³の平均容積に達した時に処置を開始し、この処置は、示された日における合計5回の注射について、腹腔内に投与された1mgのch806またはmAb806から構成された。データを、各処置群について平均腫瘍容積+/-S.E. 20

【図37】抗EGFRキメラIgG1抗体ch806およびコントロールcG250についての、標的A) U87MG、de2-7およびB) A431細胞に対するCDC活性。三連の決定の平均(バー; ±SD) %細胞傷害性が示される。

【図38】ch806およびアイソタイプコントロールcG250(0~10μg/ml)によって媒介される、50:1のエフェクター:標的細胞の比での標的A) U87MG、de2-7およびB) A431細胞に対するADCC。結果を、三連の決定の平均(バー; ±SD) %細胞傷害性として示す。

【図39】ある範囲のエフェクター:標的の比で、標的U87MG、de2-7細胞に対する、1μg/mlの親mAb806およびch806によって媒介されるADCC。 30
三連の決定の平均(バー; ±SD)を示す。

【図40】ch806に結合する抗体を産生するが、huIgGに結合する抗体は産生しない25個のハイブリドーマを、最初を選択した。高い親和性の結合を有するこれらの抗ch806ハイブリドーマのうち4個(クローン3E3、5B8、9D6および4D8)を、限界希釈によって単一の細胞からのクローン性増殖のために引き続き追跡し、そして、それぞれ、Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma (LMH)-11、LMH-12、LMH-13およびLMH-14と称した。さらに、huIgGに特異的なmAbを産生する2つのハイブリドーマもまたクローニングし、さらに特徴付けた:クローン2C10(LMH-15)および2B8(LMH-16)。 40

【図41】クローン性増殖後に、ハイブリドーマ培養物上清を、sEGFR621とch806またはmAb806との抗原結合特異性を中和する能力について、ELISAによって三連で試験した。平均(±SD)結果は、ch806およびマウスmAb806の両方の溶液中にて、sEGFRでコーティングされたプレートへの結合をブロックする、アイディオタイプmAb LMH-11、LMH-12、LMH-13およびLMH-14のアンタゴニスト活性を実証した(LMH-14は示さず)。

【図42】マイクロタイタープレートを、10μg/mlの精製したA) LMH-11、B) LMH-12およびC) LMH-13でコーティングした。3つの精製したクローンを、血清中または1%FCS/培地中のch806またはmAb806を捕捉するその能力について比較し、次いで、結合したch806またはmAb806を検出した。血清中 50

または1% FCS/培地中のアイソタイプコントロール抗体hu3S193およびm3S193を、二次結合体アビジン-HRPおよびABTS基質についてのコントロールに加えて、含めた。結果は、検出のためにビオチン化LMH-12 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を使用した三連のサンプルの平均 ($\pm \text{SD}$) として示され、そして捕捉および検出のために使用したLMH-12が、無視できるバックグラウンドの結合を伴って、血清中のch806 ($3 \text{ ng}/\text{ml}$) について最も高い感受性を有したことを示す。

【図43】捕捉および検出のために、それぞれ、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗イディオタイプLMH-12および $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化LMH-12を使用する、最適な薬物動態ELISA条件の検証。3回の別個のELISAを、血清中（上向き黒三角）または1% BSA/培地（下向き黒三角）におけるアイソタイプコントロールhu3S193と共に、3人の健康なドナー由来のドナー血清（黒丸）、または1% BSA/培地（黒四角）におけるch806を測定するために、四連で実施した。二次結合体アビジン-HRP（菱形）についてのコントロールおよびABTS基質（六角形）単独もまた、各ELISAと共に含めた。平均 ($\pm \text{SD}$) 結果は、 $3 \text{ ng}/\text{ml}$ の検出限界で、血清においてch806 ($2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 1.6 \text{ ng}/\text{ml}$) を測定するための、非常に再現性のある結合曲線を実証する ($n=12$; $1 \sim 100 \text{ ng}/\text{ml}$ 、変動係数 $<25\%$; $100 \text{ ng}/\text{ml} \sim 5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、変動係数 $<15\%$)。バックグラウンドの結合は、試験した3つの血清のいずれにおいても明白ではなく、そして無視できる結合が、アイソタイプコントロールhu3S193で観察された。

【図44】図44は、mAb806でブロットされたCHO細胞において発現された組換えsEGFRのイムノブロットを示す。組換えsEGFRを、N連結グリコシル化を除去（脱グリコシル化）するためにPNGase Fで処理したか、または処理しなかった（未処理）。このタンパク質を、SDS-PAGEで泳動し、そしてメンブレンに移し、そしてmAb806でイムノブロットした。

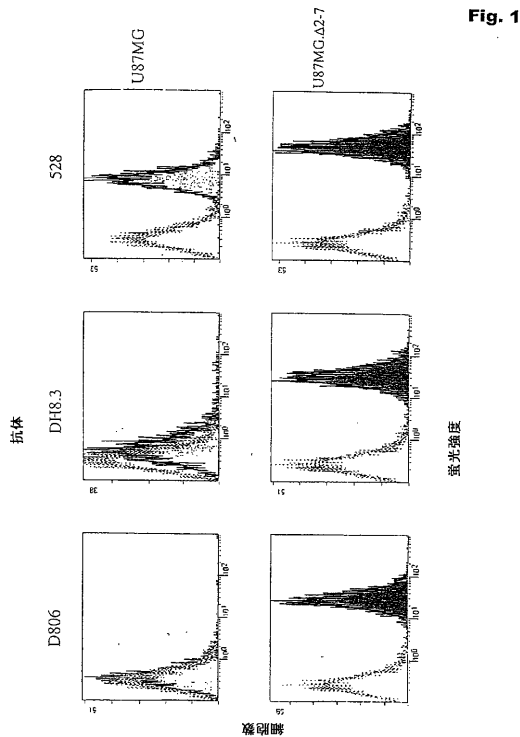
【図45】図45は、異なる抗体（SC-03抗体、806抗体および528抗体）を用いた、 ^{35}S 標識した細胞株（U87MG $\Delta 2-7$ 、U87MG-wt EGFRおよびA431）からのEGFRの免疫沈降を示す。

【図46】図46は、 ^{35}S メチオニン/システインでのパルス標識の後の異なる時点（時間0～240分）での、異なる細胞（A431およびU87MG $\Delta 2-7$ ）からのEGFRの免疫沈降を示す。抗体528および806が、免疫沈降のために使用される。

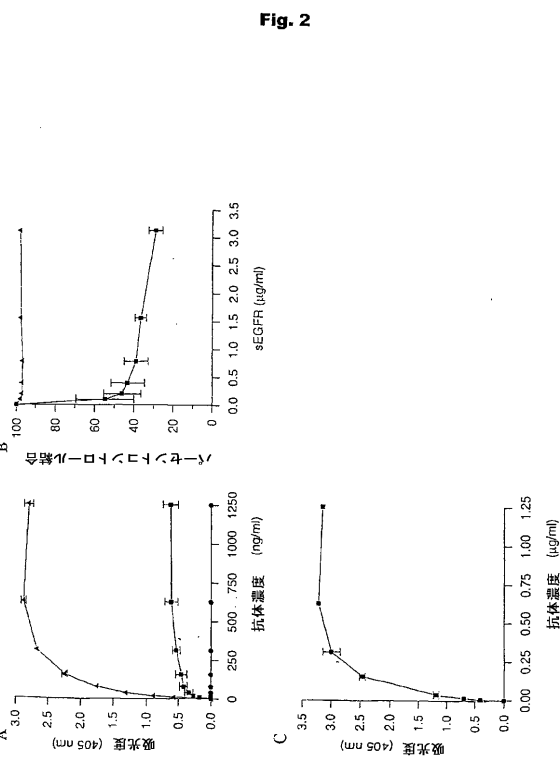
【図47】図47は、高マンノース型炭水化物を除去するためのEndo H消化の非存在下（-）およびEndo H消化の後（+）での、種々の抗体（SC-03、806および528）を用いた種々の細胞株（U87MG $\Delta 2-7$ 、U87MG-wt EGFRおよびA431）からのEGFRの免疫沈降を示す。

【図48】図48は、A431およびU87MG $\Delta 2-7$ 細胞株の細胞表面ヨウ素化、その後のEndo H消化を伴うかまたは伴わない806抗体での免疫沈降を示し、mAb806が結合した、A431細胞の細胞表面上のEGFRが、Endo H感受性形態であることを確認する。

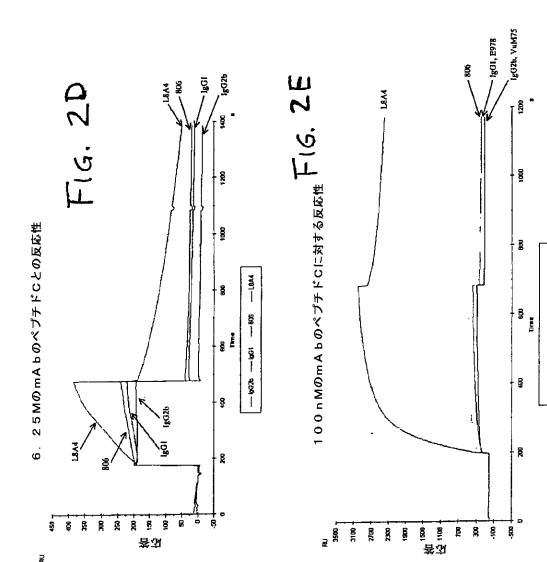
【図 1】



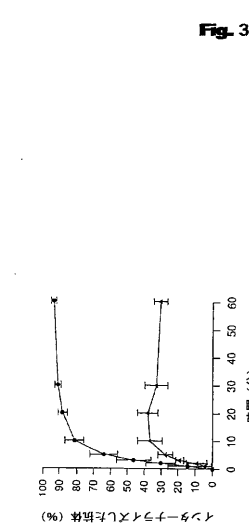
【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

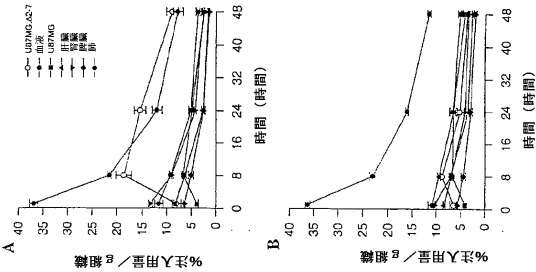


【図 3】



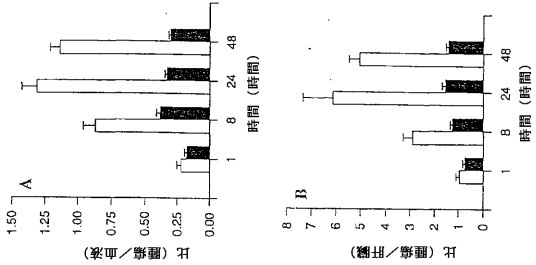
【図 4】

Fig. 4



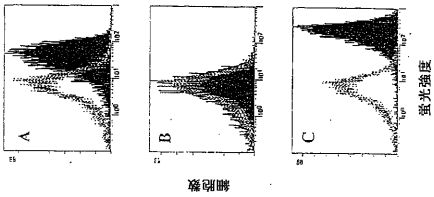
【図 5】

Fig. 5



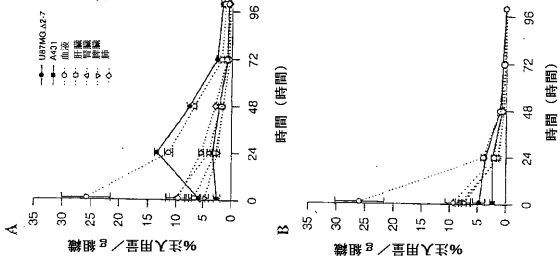
【図 6】

Fig. 6



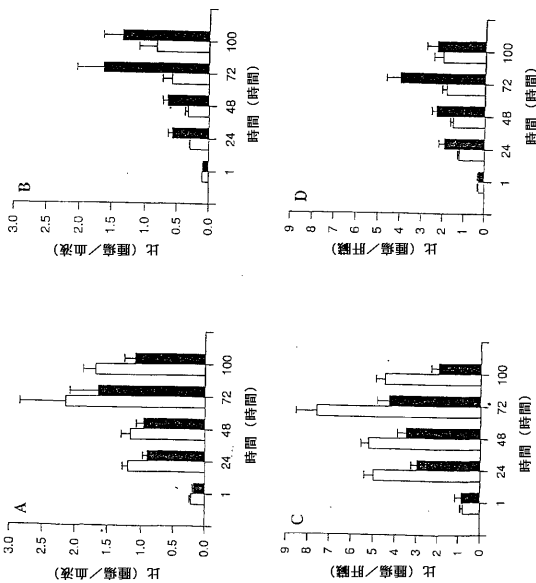
【図 7】

Fig. 7



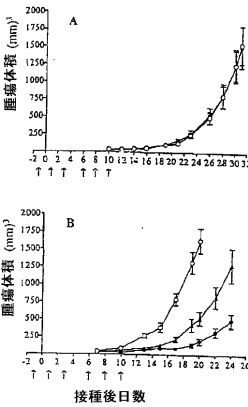
【図 8】

Fig. 8



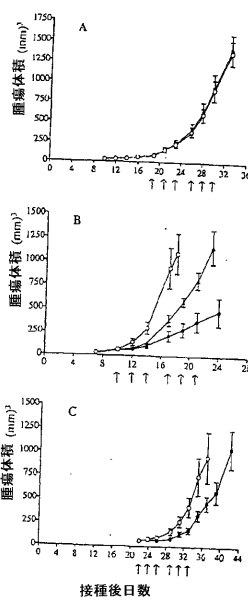
【図 9】

Fig. 9



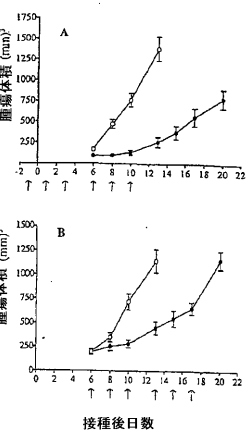
【図 10】

Fig. 10

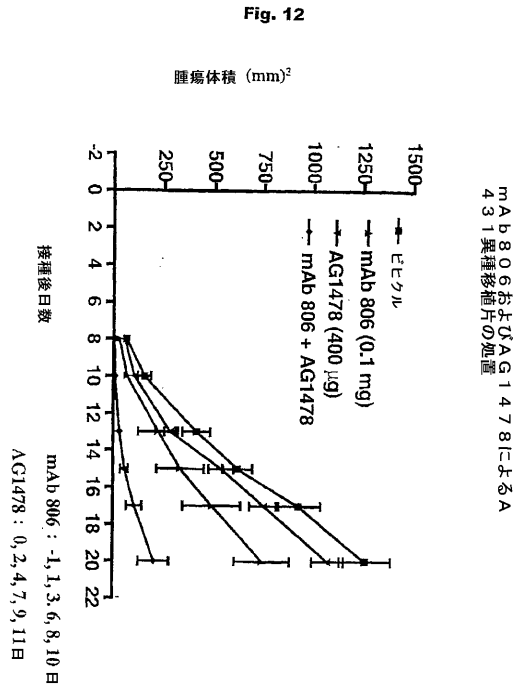


【図 11】

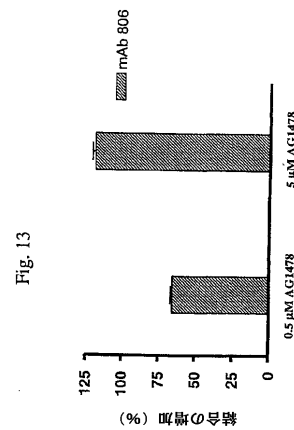
Fig. 11



【図 12】



【図 13】



【図 14】

Fig. 14

806 VH およびシグナルペプチドの DNA およびタンパク質配列

A. DNA 配列

ATGAGAGTGTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCTTTCTGGTGTCTGTCT
 GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCT
 GTCCCTCACTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCACTGATTTTGGCTGGA
 ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAACAAGCTGGAATGGATGGGCTACATAAG
 TTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCAATCTCTATCA
 CTCGAGACACATCCAGAACCAATTTCTCTGCACTTGAATTTCTGTGACTATT
 GAGGACACAGCCACATTTACTGTGTAAACGGCGGACCGGGTTTCTTATT
 GGGCCCAAGGACTCTGCTCACTGTCTCTGCA

青色で強調した部分は、シグナルペプチドである。
 残りの配列は、806 VH 領域である。

B. タンパク質配列

MRVLILLWLFTAFPGVLSVDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCT
 TVTQYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
 PSLKSRISITRDTSKNQFFLLQNSVTIEDTATYYCVTAGRG
 FPYWGQGTLLVTVSA

→ VH

【図 15】

Fig. 15

806 VL およびシグナルペプチドの DNA およびタンパク質

A. DNA 配列

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCAATCTTGTTGCTTTGGTTCCAGGTGCA
 AGATGTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCTCAATGCTGTATCTCTGGG
 AGACACAGTCAGCATCACTTCCATTCAAGTCAGGACATTAAACAGTAATATA
 GGGTGGTTGCAGCAGAGACCAAGGAAATCATTTAAGGGCTGATCTATCATG
 GAACCAACTTGGACGATGAAGTTCCATCAAGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGG
 AGCCGATTATTCTCTCAACATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTGCAGACT
 ATTAATGTGTACAGTATGCTCAGTTTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAG
 CTGGAATCAAACTG

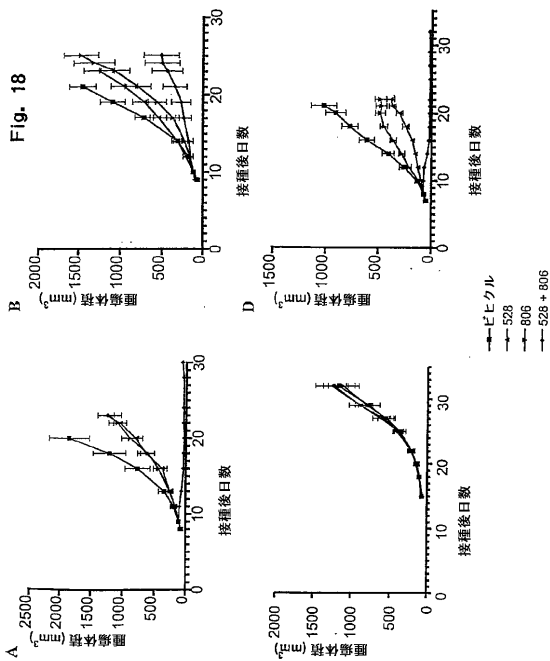
強調した部分は、シグナルペプチドである。
 残りの配列は、806 VL 領域である。

B. タンパク質配列

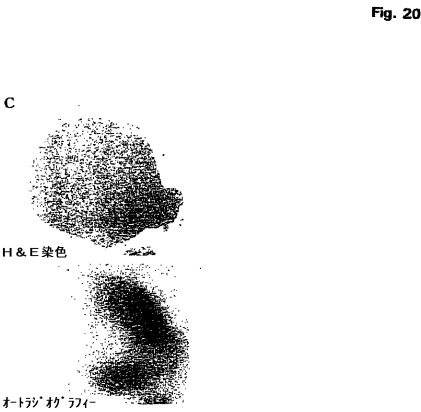
MVSTAQFLAEFLLLWEPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVS
 ITCSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTNLDDEVPSR
 FSGSGGADYSLTISSESEDFADYYCVQYQFPWTFGGG
 TKLEIKR

→ VL

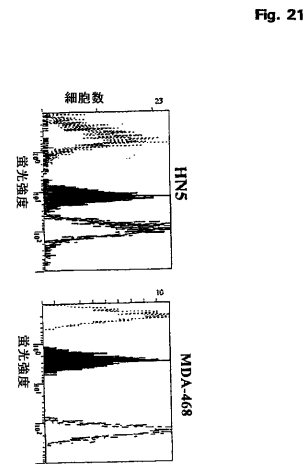
【図 1 8】



【図 2 0】



【図 2 1】



【図 2 3】



【図 24】

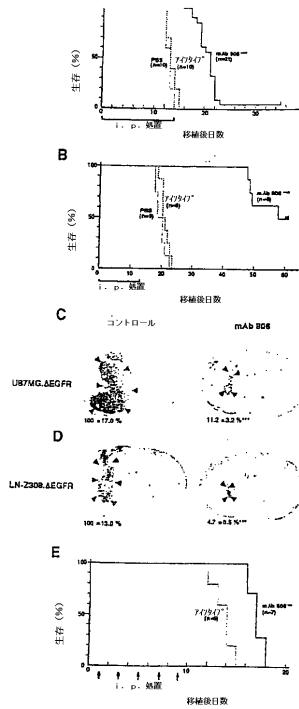


Fig. 24

【図 25】

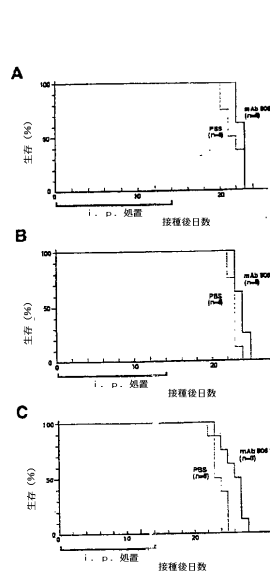


Fig. 25

【図 26】

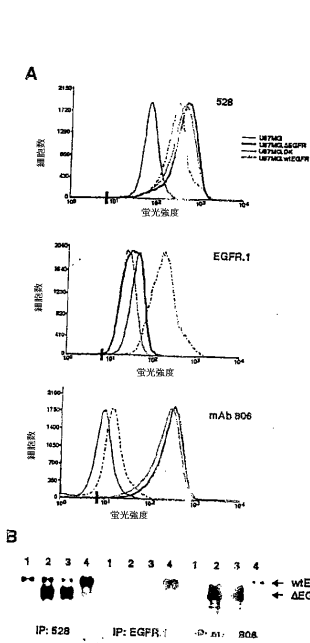


Fig. 26

【図 27】

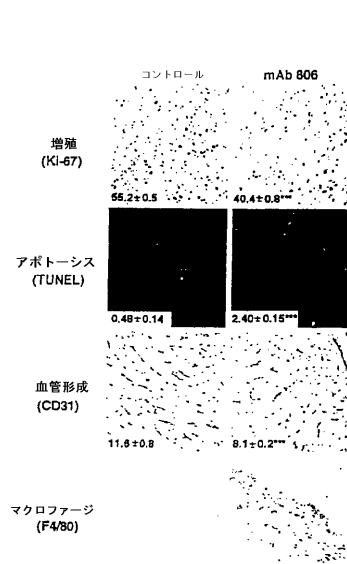
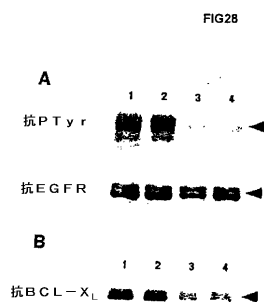


Fig. 27

【図 28】



【图 29】

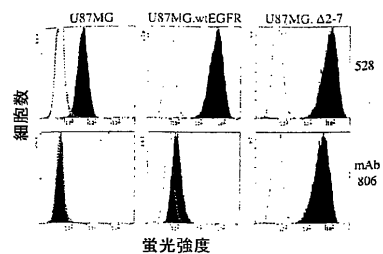
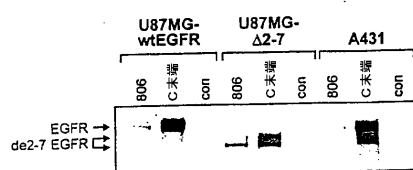
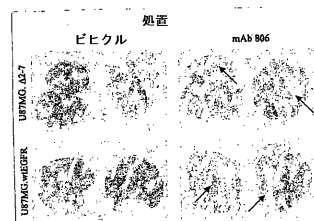


Fig. 29

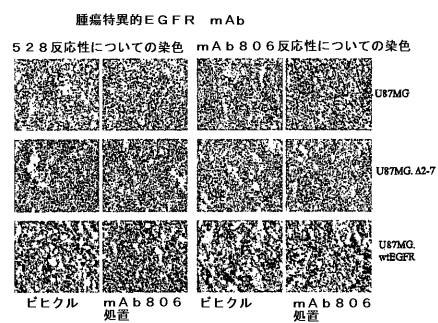
【図 30】



【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】



Fig. 33

【 図 3 4 】

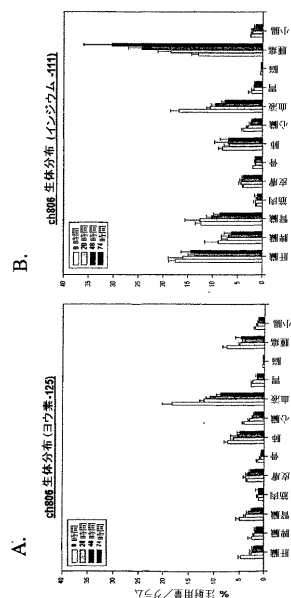


Fig. 34

【 図 3 6 】

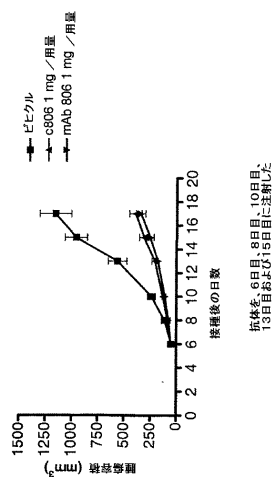


Fig. 36

【図 3 5】

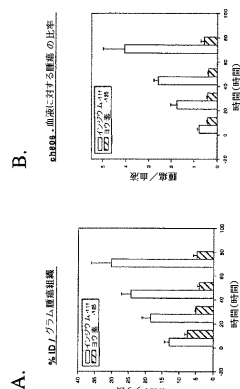


Fig. 35

【図 3 7】

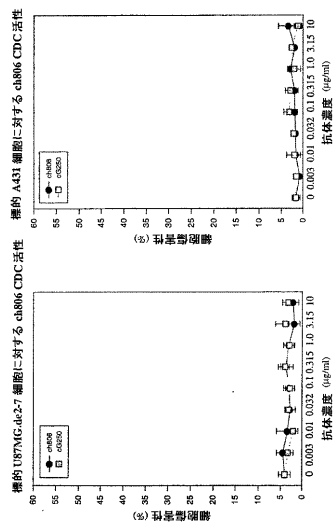
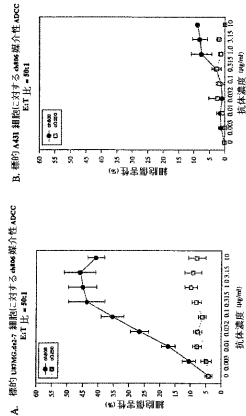


Fig. 37

【図 38】

Fig. 38



【図 39】

異なる比率で阻害剤と細胞内シグナル伝達経路の阻害剤との比率を調べる

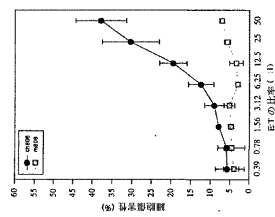
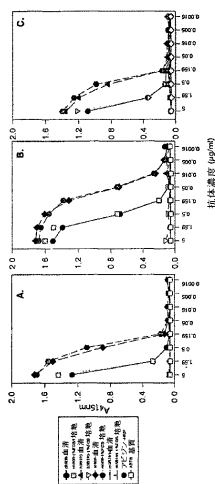


Fig. 39

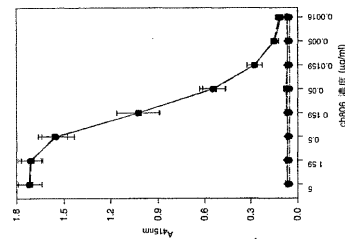
【図 42】

Fig. 42



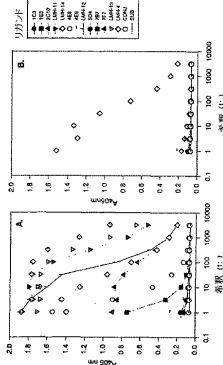
【図 43】

Fig. 43

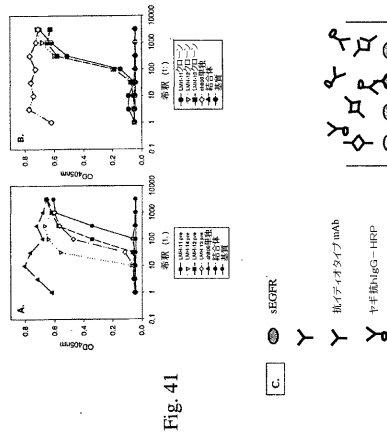


【図 40】

Fig. 40

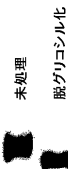


【図 41】



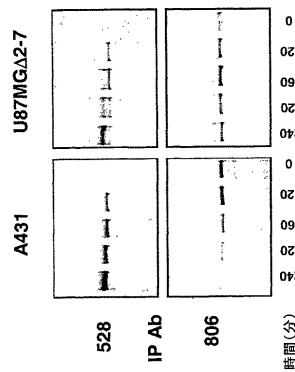
【図 44】

Fig. 44

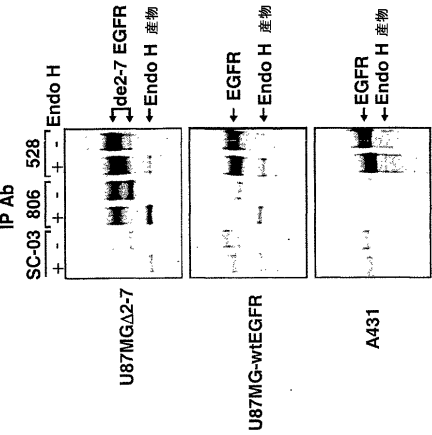


【図 46】

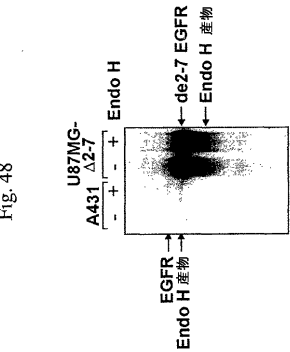
Fig. 46



【 図 4 7 】



【 図 4 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092771 A2(51) International Patent Classification⁷: C12N

(21) International Application Number: PCT/US02/15185

(22) International Filing Date: 13 May 2002 (13.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/290,410 11 May 2001 (11.05.2001) US
60/326,019 28 September 2001 (28.09.2001) US
60/342,258 21 December 2001 (21.12.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): LUDWIG
INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US];
605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US).

NY 10024 (US). **JOHNS, Terrance, Grant** [AU/AU]; 13
Dunfield Avenue, Mitcham, VIC 3132 (AU). **PANOUSIS,**
Con [AU/AU]; 77 Linskin Road, Macleod, VIC 3085
(AU). **SCOTT, Andrew, Mark** [AU/AU]; 367 Cotham
Road, Kew., VIC 3101 (AU). **RENNER, Christoph**
[DE/DE]; Ringstr. 8, 66424 Homburg/Saar (DE). **RIT-**
TER, Gerd [DE/US]; 430 East 63rd Street, Apt. 10A, New
York, NY 10021 (US). **JUNGBLUTH, Achim** [DE/US];
450 East 63rd Street Apt. 9D, New York, NY 10021 (US).
STOCKERT, Elisabeth [AU/US]; 436 East 77th Street,
New York, NY 10002 (US). **COLLINS, Peter** [DE/GB]; 67
panton Street, Cambridge, CB2 1HL (GB). **CAVENEE,**
Webster, K. [US/US]; 4657 vista de la Tierra, Del Mar, CA
92014 (US). **HUANG, Huei-Jen** [US/US]; P.O. Box 247,
Rancho Santa Fe, CA 92067 (US). **BURGESS, Anthony,**
Wilks [AU/AU]; 32 Range Street, Camberwell, VIC 3124
(AU). **NICE, Edouard, collins** [AU/AU]; 9, Odessa St,
St. Kilda, VIC 3124 (AU).

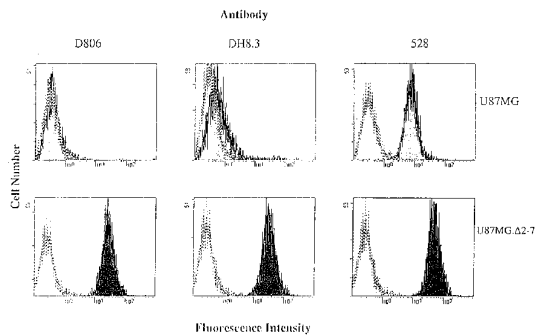
(74) Agent: JACKSON, David, A.; Klauber & Jackson, 411
Hackensack Avenue, Hackensack, NJ 07601 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **OLD, Lloyd, J.**
[US/US]; 606 West End Avenue, Apt. 6D, New York,(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

[Continued on next page]

(54) Title: SPECIFIC BINDING PROTEINS AND USES THEREOF



(57) Abstract: The invention relates to specific binding members, particularly antibodies and active fragments thereof, which recognize an aberrant post-translationally modified, particularly an aberrant glycosylated form of the EGFR. The binding members, particularly antibodies and fragments thereof, of the invention do not bind to EGFR on normal cells in the absence of amplification of the wild-type gene and are capable of binding the de2-7 EGFR at an epitope which is distinct from the junctional peptide. Antibodies of this type are exemplified by the novel antibody 806 whose VH and VL sequences are illustrated as SEQ ID Nos: 2 and 4 and chimeric antibodies thereof as exemplified by ch806.

WO 02/092771 A2

WO 02/092771 A2



CZ, DL, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

SPECIFIC BINDING PROTEINS AND USES THEREOF**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, which bind to amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) and to the de2-7 EGFR truncation of the EGFR. In particular, the epitope recognized by the specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, is enhanced or evident upon aberrant post-translational modification. These specific binding members are useful in the diagnosis and treatment of cancer. The binding members of the present invention may also be used in therapy in combination with chemotherapeutics or anti-cancer agents and/or with other antibodies or fragments thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The treatment of proliferative disease, particularly cancer, by chemotherapeutic means often relies upon exploiting differences in target proliferating cells and other normal cells in the human or animal body. For example, many chemical agents are designed to be taken up by rapidly replicating DNA so that the process of DNA replication and cell division is disrupted. Another approach is to identify antigens on the surface of tumor cells or other abnormal cells which are not normally expressed in developed human tissue, such as tumor antigens or embryonic antigens. Such antigens can be targeted with binding proteins such as antibodies which can block or neutralize the antigen. In addition, the binding proteins, including antibodies and fragments thereof, may deliver a toxic agent or other substance which is capable of directly or indirectly activating a toxic agent at the site of a tumor.

The EGFR is an attractive target for tumor-targeted antibody therapy because it is over-expressed in many types of epithelial tumors (27,28). Moreover, expression of the EGFR is associated with poor prognosis in a number of tumor types including stomach, colon, urinary bladder, breast, prostate, endometrium, kidney and brain (*e.g.*, glioma). Consequently, a number of EGFR antibodies have been reported in the literature with several undergoing clinical evaluation (18, 19, 29). Results from studies using EGFR mAbs in patients with head and neck cancer, squamous cell lung cancer, brain gliomas and malignant astrocytomas have been encouraging. The anti-tumor activity of most EGFR antibodies is enhanced by their ability to block ligand binding (30, 31). Such antibodies may mediate their efficacy through both modulation of cellular proliferation and antibody dependent immune functions (*e.g.* complement activation). The use of these antibodies, however, may be limited by uptake in organs that have high endogenous levels of EGFR such as the liver and skin (18, 19).

A significant proportion of tumors containing amplifications of the EGFR gene (*i.e.*, multiple copies of the EGFR gene) also co-express a truncated version of the receptor (13) known as de2-7 EGFR, Δ EGFR, or Δ 2-7 (terms used interchangeably herein) (2). The rearrangement seen in the de2-7 EGFR results in an in-frame mature mRNA lacking 801 nucleotides spanning exons 2-7 (6-9). The corresponding EGFR protein has a 267 amino acid deletion comprising residues 6-273 of the extracellular domain and a novel glycine residue at the fusion junction (9). This deletion, together with the insertion of a glycine residue, produces a unique junctional peptide at the deletion interface (9). The de2-7 EGFR (2) has been reported in a number of tumor types including glioma, breast, lung, ovarian and prostate (1-4). While this truncated receptor does not bind ligand, it possesses low constitutive activity and imparts a significant growth advantage to glioma cells grown as tumor xenografts in nude mice (10) and is able to transform NIH3T3 cells (11) and MCF-7 cells. The cellular mechanisms utilized by the de2-7 EGFR in glioma cells are not fully defined but are reported to include a decrease in apoptosis (12) and a small enhancement of proliferation (12).

WO 02/092771

PCT/US02/15185

As expression of this truncated receptor is restricted to tumor cells it represents a highly specific target for antibody therapy. Accordingly, a number of laboratories have reported the generation of both polyclonal (14) and monoclonal (3, 15, 16) antibodies specific to the unique peptide of de2-7 EGFR. A series of mouse mAbs, isolated following immunization with the unique de2-7 peptide, all showed selectivity and specificity for the truncated receptor and targeted de2-7 EGFR positive xenografts grown in nude mice (3, 25, 32).

However, one potential shortcoming of de2-7 EGFR antibodies is that only a proportion of tumors exhibiting amplification of the EGFR gene also express the de 2-7 EGFR (5). The exact percentage of tumors containing the de2-7 EGFR is not completely established, because the use of different techniques (*i.e.* PCR versus immunohistochemistry) and various antibodies, has produced a wide range of reported values for the frequency of its presence. Published data indicates that approximately 25-30% of gliomas express de2-7 EGFR with expression being lowest in anaplastic astrocytomas and highest in glioblastoma multiforme (6,13,17). The proportion of positive cells within de2-7 EGFR expressing gliomas has been reported to range from 37-86% (1). 27% of breast carcinomas and 17% of lung cancers were found to be positive for the de2-7 EGFR (1, 3, 13, 16). Thus, de2-7 EGFR specific antibodies would be expected to be useful in only a percentage of EGFR positive tumors.

Thus, while the extant evidence of activity of EGFR antibodies is encouraging, the observed limitations on range of applicability and efficacy reflected above remain. Accordingly, it would be desirable to develop antibodies and like agents that demonstrate efficacy with a broad range of tumors, and it is toward the achievement of that objective that the present invention is directed.

The citation of references herein shall not be construed as an admission that such is prior art to the present invention.

SUMMARY OF THE INVENTION

In a broad aspect, the present invention provides an isolated specific binding member, particularly an antibody or fragment thereof, which recognizes an EGFR epitope which does not demonstrate any amino acid sequence alterations or substitutions from wild type EGFR and which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and is not detectable in normal or wild type cells (the term "wild type cell" as used herein contemplates a cell that expresses endogenous EGFR but not the de 2-7 EGFR and the term specifically excludes a cell that overexpresses the EGFR gene; the term "wild type" refers to a genotype or phenotype or other characteristic present in a normal cell rather than in an abnormal or tumorigenic cell). In a further aspect, the present invention provides a specific binding member, particularly an antibody or fragment thereof, which recognizes an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and is not detectable in normal or wild type cells, wherein the epitope is enhanced or evident upon aberrant post translational modification or aberrant expression. In a particular nonlimiting exemplification provided herein, the EGFR epitope is enhanced or evident wherein post-translational modification is not complete or full to the extent seen with normal expression of EGFR in wild type cells. In one aspect, the EGFR epitope is enhanced or evident upon initial or simple carbohydrate modification or early glycosylation, particularly high mannose modification, and is reduced or not evident in the presence of complex carbohydrate modification.

The specific binding member, which may be an antibody or a fragment thereof, such as an immunogenic fragment thereof, does not bind to or recognize normal or wild type cells containing normal or wild type EGFR epitope in the absence of aberrant expression and in the presence of normal EGFR post-translational modification. More particularly, the specific binding member of the invention, may be an antibody or fragment thereof, which recognizes an EGFR epitope which is present in cells overexpressing EGFR (*e.g.*, EGFR gene is amplified) or expressing the de2-7 EGFR, particularly in the presence of aberrant post-translational modification, and that is not

WO 02/092771

PCT/US02/15185

detectable in cells expressing EGFR under normal conditions, particularly in the presence of normal post-translational modification.

The present inventors have discovered novel monoclonal antibodies, exemplified herein by the antibody designated mAb 806, which specifically recognize aberrantly expressed EGFR. In particular, the antibodies of the present invention recognize an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and is not detectable in normal or wild type cells, wherein the epitope is enhanced or evident upon aberrant post-translational modification. The antibodies of the present invention are further exemplified by the antibodies mAb 124 and mAb 1133 described herein. The novel antibodies of the invention also recognize amplified wild type EGFR and the de2-7 EGFR, yet bind to an epitope distinct from the unique junctional peptide of the de2-7 EGFR mutation. The antibodies of the present invention specifically recognize aberrantly expressed EGFR, including amplified EGFR and mutant EGFR (exemplified herein by the de2-7 mutation), particularly upon aberrant post-translational modification. Additionally, while mAb 806 does not recognize the EGFR when expressed on the cell surface of a glioma cell line expressing normal amounts of EGFR, it does bind to the extracellular domain of the EGFR (sEGFR) immobilized on the surface of ELISA plates, indicating the recognition of a conformational epitope. MAb 806 binds to the surface of A431 cells, which have an amplification of the EGFR gene but do not express the de2-7 EGFR. Importantly, mAb 806 did not bind significantly to normal tissues such as liver and skin, which express levels of endogenous, wild type (wt) EGFR that are higher than in most other normal tissues, but wherein EGFR is not aberrantly expressed or amplified.

The antibodies of the present invention can specifically categorize the nature of EGFR tumors or tumorigenic cells, by staining or otherwise recognizing those tumors or cells wherein aberrant EGFR expression, including EGFR amplification and/or EGFR mutation, particularly de2-7EGFR, is present. Further, the antibodies of the present invention, as exemplified by mAb 806, demonstrate significant *in vivo* anti-tumor

WO 02/092771

PCT/US02/15185

activity against tumors containing amplified EGFR and against de2-7 EGFR positive xenografts.

The unique specificity of mAb 806, whereby mAb 806 binds to the de2-7 EGFR and amplified EGFR but not the normal, wild type EGFR, provides diagnostic and therapeutic uses to identify, characterize and target a number of tumor types, for example, head and neck, breast, or prostate tumors and glioma, without the problems associated with normal tissue uptake that may be seen with previously known EGFR antibodies.

Accordingly, the invention provides specific binding proteins, such as antibodies, which bind to the de2-7 EGFR at an epitope which is distinct from the junctional peptide but which do not bind to EGFR on normal cells in the absence of amplification of the EGFR gene. By amplification, it is meant to include that the cell comprises multiple copies of the EGFR gene.

Preferably the epitope recognized by mAb 806 is located within the region comprising residues 273-501 of the mature normal or wild type EGFR sequence. Therefore, also provided are specific binding proteins, such as antibodies, which bind to the de2-7 EGFR at an epitope located within the region comprising residues 273-501 of the EGFR sequence. The epitope may be determined by any conventional epitope mapping techniques known to the person skilled in the art. Alternatively, the DNA sequence encoding residues 273-501 could be digested, and the resultant fragments expressed in a suitable host. Antibody binding could be determined as mentioned above.

In a preferred aspect, the antibody is one which has the characteristics of the antibody which the inventors have identified and characterized, in particular recognizing aberrantly expressed EGFR, as found in amplified EGFR and de2-7EGFR. In a particularly preferred aspect the antibody is the mAb 806, or active fragments thereof. In a further preferred aspect the antibody of the present invention comprises the VH

WO 02/092771

PCT/US02/15185

and VL amino acid sequences depicted in Figures 14 (SEQ ID NO:2) and Figures 15 (SEQ ID NO:4) respectively.

In another aspect, the invention provides an antibody capable of competing with the 806 antibody, under conditions in which at least 10% of an antibody having the VH and VL sequences of the 806 antibody is blocked from binding to de2-7EGFR by competition with such an antibody in an ELISA assay. In particular, anti-idiotypic antibodies are contemplated and are exemplified herein. The anti-idiotypic antibodies LMH-11, LMH-12 and LMH-13 are provided herein.

An isolated polypeptide consisting essentially of the epitope comprising residues 273-501 of the mature normal, wild type EGFR (residues 6-234 of mature de2-7 EGFR) forms another aspect of the present invention. The peptide of the invention is particularly useful in diagnostic assays or kits and therapeutically or prophylactically, including as a tumor or anticancer vaccine. Thus compositions of the peptide of the present invention include pharmaceutical compositions and immunogenic compositions.

The binding of an antibody to its target antigen is mediated through the complementarity-determining regions (CDRs) of its heavy and light chains, with the role of CDR3 being of particular importance. Accordingly, specific binding members based on the CDR3 regions of the heavy or light chain, and preferably both, of mAb806 will be useful specific binding members for *in vivo* therapy. The CDRs of the mAb 806 antibody are shown in Figures 16 and 17.

Accordingly, specific binding proteins such as antibodies which are based on the CDRs of the mAb 806 antibody identified, particularly the CDR 3 regions, will be useful for targeting tumors with amplified EGFR regardless of their de2-7 EGFR status. As mAb 806 does not bind significantly to normal, wild type receptor, there would be no significant uptake in normal tissue, a limitation of EGFR antibodies currently being developed (18, 19).

WO 02/092771

PCT/US02/15185

In the accompanying drawings, the nucleic acid sequence (SEQ ID NO:1) and translation (SEQ ID NO:2) thereof of the 806 VH gene is shown in Figure 14. The VL gene of the 806 antibody is shown as Figure 15 as nucleic acid sequence (SEQ ID NO:3) and predicted amino acid sequence (SEQ ID NO:4). In Figures 16 and 17, depicting the VH and VL polypeptide sequences of mAb 806, the CDRs are indicated in boxes.

In a further aspect, the present invention provides an isolated specific binding member capable of binding an antigen, wherein said specific binding member comprises a polypeptide binding domain comprising an amino acid sequence substantially as set out as residues 93-102 of SEQ ID NO:2. The invention further provides said isolated specific binding member which further comprises one or both of the polypeptide binding domains substantially as set out as residues 26-35A and 49-64 of SEQ ID NO:2, preferably both. One example of such an embodiment is the sequence substantially as shown in SEQ ID NO:2. In a preferred embodiment, the binding domains are carried by a human antibody framework.

In another aspect, the invention provides an isolated specific binding member capable of binding a tumor antigen, wherein said specific binding member comprises a polypeptide binding domain comprising a heavy chain sequence comprising at least the CDR3 sequence of SEQ ID NO:2, together with a light chain comprising CDRs whose amino acid sequences are substantially as found within SEQ ID NO:4. One example of such an embodiment is the sequence substantially as shown in SEQ ID NO:4. In a preferred embodiment, the CDRs are carried by a human antibody framework.

In further aspects, the invention provides an isolated nucleic acid which comprises a sequence encoding a specific binding member as defined above, and methods of preparing specific binding members of the invention which comprise expressing said

WO 02/092771

PCT/US02/15185

nucleic acids under conditions to bring about expression of said binding member, and recovering the binding member.

Yet a further aspect of the invention are compositions of such binding proteins with additional binding proteins, such as binding proteins which bind to EGFR, preferably inhibiting ligand binding thereto. Such compositions can be "one pot" cocktails, kits, and so forth, preferably formulated for ease of administration.

Specific binding members according to the invention may be used in a method of treatment or diagnosis of the human or animal body, such as a method of treatment of a tumor in a human patient which comprises administering to said patient an effective amount of a specific binding member of the invention.

The present invention also relates to a recombinant DNA molecule or cloned gene, or a degenerate variant thereof, which encodes an antibody of the present invention; preferably a nucleic acid molecule, in particular a recombinant DNA molecule or cloned gene, encoding the antibody VH which has a nucleotide sequence or is complementary to a DNA sequence shown in FIGURE 14 (SEQ ID NO:1). In another embodiment, the present invention also relates to a recombinant DNA molecule or cloned gene, or a degenerate variant thereof, preferably a nucleic acid molecule, in particular a recombinant DNA molecule or cloned gene, encoding the antibody VL which has a nucleotide sequence or is complementary to a DNA sequence shown in FIGURE 15 (SEQ ID NO:3).

The present invention also includes polypeptides or antibodies having the activities noted herein, and that display the amino acid sequences set forth and described above and in Figures 14 and 15 hereof and selected from SEQ ID NO:2 and 4.

In a further embodiment of the invention, the full DNA sequence of the recombinant DNA molecule or cloned gene provided herein may be operatively linked to an expression control sequence which may be introduced into an appropriate host. The

WO 02/092771

PCT/US02/15185

invention accordingly extends to unicellular hosts transformed with the cloned gene or recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence encoding the present VH and/or VL, or portions thereof, of the antibody, and more particularly, the VH and/or VL set forth above and in SEQ ID NO:1 and 3.

The present invention naturally contemplates several means for preparation of the antibodies and active fragments thereof, including as illustrated herein known recombinant techniques, and the invention is accordingly intended to cover such synthetic or chimeric antibody preparations within its scope. The isolation of the cDNA and amino acid sequences disclosed herein facilitates the reproduction of the antibody of the present invention by such recombinant techniques, and accordingly, the invention extends to expression vectors prepared from the disclosed DNA sequences for expression in host systems by recombinant DNA techniques, and to the resulting transformed hosts.

The present invention provides drugs or other entities, including antibodies such as anti-idiotypic antibodies, that are capable of binding to the antibody thereby modulating, inhibiting or potentiating the antibody activity. Thus, anti-idiotypic antibodies to mAb806 are provided and exemplified herein. Such anti-idiotypic antibodies would be useful in the development of drugs that would specifically bind the antibodies such as mAb806 or its epitope or that would potentiate its activity.

The diagnostic utility of the present invention extends to the use of the antibodies of the present invention in assays to characterize tumors or cellular samples or to screen for tumors or cancer, including *in vitro* and *in vivo* diagnostic assays.

In an immunoassay, a control quantity of the antibodies, or the like may be prepared and labeled with an enzyme, a specific binding partner and/or a radioactive element, and may then be introduced into a cellular sample. After the labeled material or its binding partner(s) has had an opportunity to react with sites within the sample, the

WO 02/092771

PCT/US02/15185

resulting mass may be examined by known techniques, which may vary with the nature of the label attached.

Specific binding members of the invention may carry a detectable or functional label. The specific binding members may carry a radioactive label, such as the isotopes ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{56}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{90}Tc and ^{186}Re . When radioactive labels are used, known currently available counting procedures may be utilized to identify and quantitate the specific binding members. In the instance where the label is an enzyme, detection may be accomplished by any of the presently utilized colorimetric, spectrophotometric, fluorospectrophotometric, amperometric or gasometric techniques known in the art.

The radiolabelled specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, are useful in *in vitro* diagnostics techniques and in *in vivo* radioimaging techniques. In a further aspect of the invention, radiolabelled specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, particularly radioimmunoconjugates, are useful in radioimmunotherapy, particularly as radiolabelled antibodies for cancer therapy. In a still further aspect, the radiolabelled specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, are useful in radioimmuno-guided surgery techniques, wherein they can identify and indicate the presence and/or location of cancer cells, precancerous cells, tumor cells, and hyperproliferative cells, prior to, during or following surgery to remove such cells.

Immunoconjugates or antibody fusion proteins of the present invention, wherein the specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, of the present invention are conjugated or attached to other molecules or agents further include, but are not limited to binding members conjugated to a chemical ablation agent, toxin, immunomodulator, cytokine, cytotoxic agent, chemotherapeutic agent or drug.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The present invention includes an assay system which may be prepared in the form of a test kit for the quantitative analysis of the extent of the presence of, for instance, amplified EGFR or de2-7EGFR. The system or test kit may comprise a labeled component prepared by one of the radioactive and/or enzymatic techniques discussed herein, coupling a label to the antibody, and one or more additional immunochemical reagents, at least one of which is a free or immobilized components to be determined or their binding partner(s).

In a further embodiment, the present invention relates to certain therapeutic methods which would be based upon the activity of the binding member, antibody, or active fragments thereof, or upon agents or other drugs determined to possess the same activity. A first therapeutic method is associated with the prevention or treatment of cancer, including but not limited to head and neck, breast, prostate and glioma.

In particular, the binding members and antibodies of the present invention, and in a particular embodiment: the 806 antibody whose sequences are presented in SEQ ID NOS: 2 and 4 herein, or active fragments thereof, and chimeric (bispecific) or synthetic antibodies derived therefrom can be prepared in pharmaceutical compositions, including a suitable vehicle, carrier or diluent, for administration in instances wherein therapy is appropriate, such as to treat cancer. Such pharmaceutical compositions may also include methods of modulating the half-life of the binding members, antibodies or fragments by methods known in the art such as pegylation. Such pharmaceutical compositions may further comprise additional antibodies or therapeutic agents.

Thus, a composition of the present invention may be administered alone or in combination with other treatments, therapeutics or agents, either simultaneously or sequentially dependent upon the condition to be treated. In addition, the present invention contemplates and includes compositions comprising the binding member, particularly antibody or fragment thereof, herein described and other agents or therapeutics such as anti-cancer agents or therapeutics, anti-EGFR agents or

WO 02/092771

PCT/US02/15185

antibodies, or immune modulators. More generally these anti-cancer agents may be tyrosine kinase inhibitors or phosphorylation cascade inhibitors, post-translational modulators, cell growth or division inhibitors (*e.g.* anti-mitotics), PDGFR inhibitors or signal transduction inhibitors. Other treatments or therapeutics may include the administration of suitable doses of pain relief drugs such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (*e.g.* aspirin, paracetamol, ibuprofen or ketoprofen) or opiates such as morphine, or anti-emetics. Thus, these agents may be anti-EGFR specific agents, such as AG1478, or may be more general anti-cancer and anti-neoplastic agents, non limiting examples including doxorubicin, carboplatin and cisplatin. In addition, the composition may be administered with immune modulators, such as interleukins, tumor necrosis factor (TNF) or other growth factors, cytokines or hormones such as dexamethasone which stimulate the immune response and reduction or elimination of cancer cells or tumors. The composition may also be administered with, or may include combinations along with other anti-EGFR antibodies, including but not limited to the anti-EGFR antibodies 528; 225; SC-03; 108 (ATCC HB9764) U.S. Patent No. 6,217,866; 14E1 (U.S. Patent No. 5,942,602); DH8.3; L8A4; Y10; HuMAX-EGFR (Genmab/Medarex); ICR62; and ABX-EGF (Abgenix).

The present invention also includes binding members, including antibodies and fragments thereof, which are covalently attached to or otherwise associated with other molecules or agents. These other molecules or agents include, but are not limited to, molecules (including antibodies or antibody fragments) with distinct recognition characteristics, toxins, ligands, and chemotherapeutic agents.

Other objects and advantages will become apparent to those skilled in the art from a review of the ensuing detailed description, which proceeds with reference to the following illustrative drawings, and the attendant claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figure 1 presents the results of flow cytometric analysis of glioma cell lines. U87MG (light gray histograms) and U87MG. Δ 2-7 (dark gray histograms) cells were stained with either an irrelevant IgG2b antibody (open histograms), DH8.3 (specific for de2-7 EGFR), MA8 806 or 528 (binds both wild type and de2-7 EGFR) as indicated.

Figures 2A-C present the results of ELISA of MA8 806, DH8.3 and 528 antibodies. (A) binding of increasing concentrations of MA8 806 ($\blacktriangle$) DH8.3 ($\bullet$) or 528 ($\blacksquare$) antibody to sEGFR coated ELISA plates. (B) inhibition of MA8 806 and 528 binding to sEGFR coated ELISA plates by increasing concentrations of sEGFR in solution. (C) binding of increasing concentrations of DH8.3 to the de2-7 junctional peptide illustrates binding curves for MA8 806 and 528 antibodies to immobilized wild-type sEGFR.

Figures 2D and 2E graphically present the results of BIAcore binding studies using C-terminal biotinylated peptide and including a monoclonal antibody of the invention, along with other known antibodies, among them the L8A4 antibody which recognizes the junction peptide of the de2-7 EGFR mutant, and controls.

Figure 3 depicts the internalization of MA8 806 and the DH8.3 antibody. U87MG. Δ 2-7 cells were pre-incubated with MA8 806 ($\blacktriangle$) or DH8.3 ($\bullet$) at 4°C, transferred to 37°C and internalization determined by FACS. Data represents mean internalization at each time point $\pm$ SE of 3 (DH8.3) or 4 (MA8 806) separate experiments.

Figures 4A and 4B illustrate biodistribution (% ID/g tumor) of radiolabeled (a) ^{125}I -MA8 806 and (b) ^{131}I -DH8.3 in nude mice bearing U87MG and U87MG. Δ 2-7 xenografts. Each point represents the mean of 5 mice $\pm$ SE except for 1 hr where n = 4.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figures 5A and 5B illustrate biodistribution of radiolabeled ^{125}I -MAb 806 (open bar) and ^{131}I -DH8.3 (filled bar) antibodies expressed as (a) tumor:blood or (b) tumor:liver ratios in nude mice bearing U87MG. Δ 2-7 xenografts. Each bar represents the mean of 5 mice $\pm$ SE except for 1 hr where n = 4

Figure 6 illustrates flow cytometric analysis of cell lines containing amplification of the EGFR gene. A431 cells were stained with either MAb 806, DH8.3 or 528 (black histograms) and compared to an irrelevant IgG2b antibody (open histogram)

Figures 7A and 7B illustrate biodistribution (% ID/g tumor) of radiolabeled (a) ^{125}I -MAb 806 and (b) ^{131}I -528 in nude mice bearing U87MG. Δ 2-7 and A431 xenografts.

Figures 8A - 8D illustrate biodistribution of radiolabeled ^{125}I -MAb 806 (open bar) and ^{131}I -528 (filled bar) and antibodies expressed as (a,b) tumor:blood or (c,d) tumor:liver ratios in nude mice bearing (a,c) U87MG. Δ 2-7 and (b,d) A431 xenografts.

Figure 9 illustrates anti-tumor effect of mAb 806 on A) U87MG and B) U87MG. Δ 2-7 xenograft growth rates in a preventative model. 3×10^5 U87MG or U87MG. Δ 2-7 cells were injected s.c. into both flanks of 4 - 6 week old BALB/c nude mice, (n=5) at day 0. Mice were injected i.p. with either 1 mg of mAb 806 ($\bullet$); 0.1 mg of mAb 806 ($\blacktriangle$); or vehicle ($\circ$) starting one day prior to tumor cell inoculation. Injections were given three times per week for two weeks as indicated by the arrows. Data are expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E.

Figure 10 illustrates the anti-tumor effect of mAb 806 on A) U87MG, B) U87MG. Δ 2-7 and C) U87MG.wtEGFR xenografts in an established model. 3×10^6 U87MG, U87MG. Δ 2-7, or U87MG.wtEGFR cells, were injected s.c. into both flanks of 4 - 6 week old BALB/c nude mice, (n=5). Mice were injected i.p. with either 1 mg doses of mAb 806 ($\bullet$); 0.1 mg doses of mAb 806 ($\blacktriangle$); or vehicle ($\circ$) starting when tumors had reached a mean tumor volume of 65 - 80 mm³. Injections were given three times per week for two weeks as indicated by the arrows. Data are expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figure 11 illustrates anti-tumor effect of mAb 806 on A431 xenografts in A) preventative and B) established models. 3×10^6 A431 cells were injected s.c. into both flanks of 4 – 6 week old BALB/c nude mice (n=5). Mice were injected i.p. with either 1 mg doses of mAb 806 (●); or vehicle (○), starting one day prior to tumor cell inoculation in the preventative model, or when tumors had reached a mean tumor volume of 200 mm³. Injections were given three times per week for two weeks as indicated by the arrows. Data are expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E.

Figure 12 illustrates the anti-tumor effect of treatment with mAb 806 combined with treatment with AG1478 on A431 xenografts in a preventative model. Data are expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E.

Figure 13 depicts antibody 806 binding to A431 cells in the presence of increasing concentrations of AG1478 (0.5uM and 5uM).

Figure 14 illustrates the nucleic acid sequence and the amino acid translation thereof of the 806 VH gene (SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, respectively).

Figure 15 illustrates the nucleic acid sequence and the amino acid translation thereof of the 806 VL gene (SEQ ID NO:3 and SEQ ID NO:4, respectively).

Figure 16 shows the VH sequence numbered according to Kabat, with the CDRs boxed. Key residues of the VH are 24, 37, 48, 67 and 78.

Figure 17 shows the VL sequence numbered according to Kabat, with the CDRs boxed. Key residues of the VL are 36, 46, 57 and 71.

Figure 18A – 18D shows the results of in vivo studies designed to determine the therapeutic effect of combination antibody therapy, particularly mAb806 and the 528 antibody. Mice received inoculations of U87MG.D2-7 (A and B), U87MG.DK (C), or A431 (D) cells.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figure 19 A-D Analysis of internalization by electron microscopy. U87MG. Δ 2-7 cells were pre-incubated with MAb 806 or DH8.3 followed by gold conjugated anti-mouse IgG at 4°C, transferred to 37°C and internalization examined at various time points by electron microscopy. (A) localization of the DH8.3 antibody to a coated pit (arrow) after 5 min; (B) internalization of MAb 806 by macropinocytosis (arrow) after 2 min; (C) localization of DH8.3 to lysosomes (arrow) after 20 min; (D) localization of MAb 806 to lysosomes (arrow) after 30 min. Original magnification for all images is X30,000.

Figure 20 Autoradiography of a U87MG. Δ 2-7 xenograft section collected 8 hr after injection of ^{125} I-MAb 806.

Figure 21 Flow cytometric analysis of cell lines containing amplification of the EGFR gene. HN5 and MDA-468 cells were stained with an irrelevant IgG2b antibody (open histogram with dashed line), MAb 806 (black histogram) or 528 (open histogram with closed lines). The DH8.3 antibody was completely negative on both cell lines (data not shown).

Figure 22 Immunoprecipitation of EGFR from cell lines. The EGFR was immunoprecipitated from ^{35} S-labeled U87MG. Δ 2-7 or A431 cells with MAb 806, sc-03 antibody or a IgG2b isotype control. Arrows at the side indicate the position of the de2-7 and wt EGFR. Identical banding patterns were obtained in 3 independent experiments.

Figure 23 Autoradiography of an A431 xenograft section collected 24 hr after injection of ^{125} I-MAb 806, areas of localization to viable tissue are indicated (arrows).

Figure 24 A and B, extended survival of nude mice bearing intracranial U87 MG. Δ EGFR (A) and LN-Z308. Δ EGFR (B) xenografts with systemic mAb 806 treatment. U87 MG. Δ EGFR cells (1×10^5) or LN-Z308. Δ EGFR cells (5×10^5) were

WO 02/092771

PCT/US02/15185

implanted into nude mice brains, and the animals were treated with either mAb 806, PBS, or isotype IgG from postimplantation days 0 through 14. **C** and **D**, growth inhibition of intracranial tumors by mAb 806 treatment. Nude mice (five per group), treated with either mAb 806 or the isotype IgG control, were euthanized on day 9 for U87 MG. Δ EGFR (**C**) and on day 15 for LN-Z308. Δ EGFR (**D**), and their brains were harvested, fixed, and sectioned. Data were calculated by taking the tumor volume of control as 100%. Values are mean $\pm$ SD. $***, P < 0.001$; control *versus* mAb 806. *Arrowheads*, tumor tissue. **E**, extended survival of nude mice bearing intracranial U87 MG. Δ EGFR xenografts with intratumoral mAb 806 treatment. U87 MG. Δ EGFR cells were implanted as described. Ten mg of mAb 806 or isotype IgG control in a volume of 5 μ l were injected at the tumor-injection site every other day starting at day 1 for five times.

Figure 25 mAb 806 extends survival of mice with U87 MG.wtEGFR brain tumors but not with U87 MG.DK. or U87 MG brain tumors. U87 MG (**A**), U87 MG.DK (**B**), or U87 MG.wtEGFR (**C**) cells (5×10^5) were implanted into nude mice brains, and the animals were treated with mAb 806 from postimplantation days 0 through 14 followed by observation after discontinuation of therapy.

Figure 26 A, FACS analysis of mAb 806 reactivity with U87 MG cell lines. U87 MG, U87 MG. Δ EGFR, U87 MG. DK, and U87 MG.wtEGFR cells were stained with anti-EGFR mAbs 528, EGFR.1, and anti- Δ EGFR antibody, mAb 806. Monoclonal EGFR.1 antibody recognized wtEGFR exclusively and monoclonal 528 antibody reacted with both wtEGFR and Δ EGFR. mAb 806 reacted intensively with U87 MG. Δ EGFR and U87 MG. DK and weakly with U87 MG.wtEGFR. *Bars on the abscissa*, maximum staining of cells in the absence of primary antibody. Results were reproduced in three independent experiments. **B**, mAb 806 immunoprecipitation of EGFR forms. Mutant and wtEGFR were immunoprecipitated with anti-EGFR antibodies, 528, or EGFR.1, or anti- Δ EGFR antibody, mAb 806, from (*Lane 1*) U87 MG, (*Lane 2*) U87 Δ EGFR, (*Lane 3*) U87 MG. DK, and (*Lane 4*) U87 MG.wtEGFR cells and were then detected by Western blotting with anti-pan EGFR antibody, C13.

Figure 27 Systemic treatment with mAb 806 decreases the phosphorylation of Δ EGFR and Bcl-X_L expression in U87 MG. Δ EGFR brain tumors. U87 MG. Δ EGFR tumors were resected at day 9 of mAb 806 treatment, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before tumor lysate preparation. **A**, Western blot analysis of expression and the degree of autophosphorylation of Δ EGFR. Thirty μ g of tumor lysates were subjected to SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with antiphosphotyrosine mAb, then were stripped and reprobed with anti-EGFR antibody, C13. **B**, Western blotting of Bcl-X_L by using the same tumor lysates as in **A**. Membranes were probed with antihuman Bcl-X polyclonal antibody. *Lanes 1 and 2*, U87 MG. Δ EGFR brain tumors treated with isotype control; *Lanes 3 and 4*, U87 MG. Δ EGFR brain tumors treated with mAb 806.

Figure 28 MAb 806 treatment leads to a decrease in growth and vasculogenesis and to increases in apoptosis and accumulating macrophages in U87 MG. Δ EGFR tumors. Tumor sections were stained for Ki-67. Cell proliferative index was assessed by the percentage of total cells that were Ki-67 positive from four randomly selected high-power fields (X400) in intracranial tumors from four mice of each group. Data are the mean $\pm$ SE. Apoptotic cells were detected by TUNEL assay. Apoptotic index was assessed by the ratio of TUNEL-positive cells:total number of cells from four randomly selected high-power fields (X400) in intracranial tumors from four mice of each group. Data are the mean $\pm$ SE. Tumor sections were immunostained with anti-CD31 antibody. MVAs were analyzed by computerized image analysis from four randomly selected fields (X200) from intracranial tumors from four mice of each group. Peritumoral infiltrates of macrophages in mAb 806-treated U87MG. Δ EGFR tumors. Tumor sections were stained with anti-F4/80 antibody.

Figure 29 Flow cytometric analysis of parental and transfected U87 MG glioma cell lines. Cells were stained with either an irrelevant IgG2b antibody (*open histograms*) or the 528 antibody or mAb 806 (*filled histograms*) as indicated.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figure 30 Immunoprecipitation of EGFR from cell lines. The EGFR was immunoprecipitated from ³⁵S-labeled U87 MG.wtEGFR, U87 MG. Δ2-7, and A431 cells with mAb806 (806), sc-03 antibody (*c-term*), or a IgG2b isotype control (*con*). Arrows, position of the de2-7 and wt EGFR.

Figure 31 Representative H&E-stained paraffin sections of U87 MG.Δ2-7 and U87MG.wtEGFR xenografts. U87 MG.Δ2-7 (collected 24 days after tumor inoculation) and U87 MG.wtEGFR (collected 42 days after tumor inoculation) xenografts were excised from mice treated as described in Fig. 10 above, and stained with H&E. Vehicle-treated U87 MG.Δ2-7 (collected 18 days after tumor inoculation) and U87 MG.wtEGFR (collected 37 days after tumor inoculation) xenografts showed very few areas of necrosis (*left panel*), whereas extensive necrosis (*arrows*) was observed in both U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR xenografts treated with mAb 806 (*right panel*).

Figure 32 Immunohistochemical analysis of EGFR expression in frozen sections derived from U87 MG, U87 MG.Δ2-7, and U87 MG.wtEGFR xenografts. Sections were collected at the time points described in Fig. 31 above. Xenograft sections were immunostained with the 528 antibody (*left panel*) and mAb 806 (*right panel*). No decreased immunoreactivity to either wt EGFR, amplified EGFR, or de2-7 EGFR was observed in xenografts treated with mAb 806. Consistent with the *in vitro* data, parental U87 MG xenografts were positive for 528 antibody but were negative for mAb 806 staining.

Figure 33. Schematic representation of generated bicistronic expression constructs. Transcription of the chimeric antibody chains is initiated by Elongation Factor-1 promoter and terminated by a strong artificial termination sequence. IRES sequences were introduced between coding regions of light chain and NeoR and heavy chain and dhfr gene.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figure 34. Biodistribution analysis of the ch806 radiolabeled with either A) ^{125}I or B) ^{111}In was performed in BALB/c nude mice bearing U87MG-de2-7 xenograft tumors. Mice were injected with 5 ug of radiolabeled antibody and in groups of 4 mice per time point, sacrificed at either 8, 28, 48 or 74 hours. Organs were collected, weighed and radioactivity measured in a gamma counter.

Figure 35. Depicts (A) the % ID gram tumor tissue and (B) the tumor to blood ratio. Indium-111 antibody shows approximately 30% ID/gram tissue and a tumor to blood ratio of 4.0.

Figure 36 depicts the therapeutic efficacy of chimeric antibody ch806 in an established tumor model. 3×10^6 U87MG. Δ 2-7 cells in 100ul of PBS were inoculated s.c. into both flanks of 4-6 week old female nude mice. The mAb806 was included as a positive control. Treatment was started when tumors had reached a mean volume of 50 mm^3 and consisted of 1 mg of ch806 or mAb806 given i.p. for a total of 5 injections on the days indicated. Data was expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E. for each treatment group.

Figure 37. CDC Activity on Target A) U87MG.de2-7 and B) A431 cells for anti-EGFR chimeric IgG1 antibodies ch806 and control cG250. Mean (bars; $\pm$ SD) percent cytotoxicity of triplicate determinations are presented.

Figure 38. ADCC on target A) U87MG.de2-7 and B) A431 cells at Effector: Target cell ratio of 50:1 mediated by ch806 and isotype control cG250 (0-10 ug/ml). Results are expressed as mean (bars; $\pm$ SD) percent cytotoxicity of triplicate determinations.

Figure 39. ADCC mediated by 1 ug/ml parental mAb 806 and ch806 on target U87MG.de2-7 cells over a range of Effector: Target ratios. Mean (bars; $\pm$ SD) of triplicate determinations are presented.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Figure 40. Twenty-five hybridomas producing antibodies that bound ch806 but not huIgG were initially selected. Four of these anti-ch806 hybridomas with high affinity binding (clones 3E3, 5B8, 9D6 and 4D8) were subsequently pursued for clonal expansion from single cells by limiting dilution and designated Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma (LMH) -11, -12, -13 and -14, respectively. In addition, two hybridomas that produced mAbs specific for huIgG were also cloned and characterized further: clones 2C10 (LMH-15) and 2B8 (LMH-16).

Figure 41. After clonal expansion, the hybridoma culture supernatants were examined in triplicate by ELISA for the ability to neutralize ch806 or mAb 806 antigen binding activity with sEGFR621. Mean ($\pm$ SD) results demonstrated the antagonist activity of anti-idiotypic mAbs LMH-11, -12, -13 and -14 with the blocking in solution of both ch806 and murine mAb 806 binding to plates coated with sEGFR (LMH-14 not shown).

Figure 42. Microtitre plates were coated with 10 μ g/ml purified A) LMH-11, B) LMH-12 and C) LMH-13. The three purified clones were compared for their ability to capture ch806 or mAb 806 in sera or 1% FCS/Media and then detect bound ch806 or mAb806. Isotype control antibodies hu3S193 and m3S193 in serum and 1% FCS/Media were included in addition to controls for secondary conjugate avidin-HRP and ABTS substrate. Results are presented as mean ($\pm$ SD) of triplicate samples using biotinylated-LMH-12 (10 μ g/ml) for detection and indicate LMH-12 used for capture and detection had the highest sensitivity for ch806 in serum (3 ng/ml) with negligible background binding.

Figure 43. Validation of the optimal pharmacokinetic ELISA conditions using 1 μ g/ml anti-idiotypic LMH-12 and 1 μ g/ml biotinylated LMH-12 for capture and detection, respectively. Three separate ELISAs were performed in quadruplicate to measure ch806 in donor serum (●) from three healthy donors or 1% BSA/media (■) with isotype control hu3S193 in serum (▲) or 1% BSA/media (▼). Controls for secondary conjugate avidin-HRP (◆) and ABTS substrate (hexagon) alone were also

WO 02/092771

PCT/US02/15185

included with each ELISA. Mean ($\pm$ SD) results demonstrate highly reproducible binding curves for measuring ch806 (2 μ g/ml – 1.6 ng/ml) in sera with a 3 ng/ml limit of detection. (n=12; 1-100 ng/ml, Coefficient of Variation < 25%; 100 ng/ml- 5 μ g/ml, Coefficient of Variation < 15%). No background binding was evident with any of the three sera tested and negligible binding was observed with isotype control hu3S193.

Figure 44 depicts an immunoblot of recombinant sEGFR expressed in CHO cells, blotted with mAb806. Recombinant sEGFR was treated with PNGaseF to remove N-linked glycosylation (deglycosylated), or untreated (untreated), the protein was run on SDS-PAGE, transferred to membrane and immunoblotted with mAb 806.

Figure 45 depicts immunoprecipitation of EGFR from ³⁵S-labelled cell lines (U87MG Δ 2-7, U87MG-wtEGFR, and A431) with different antibodies (SC-03, 806 and 528 antibodies).

Figure 46 depicts immunoprecipitation of EGFR from different cells (A431 and U87MG Δ 2-7) at different time points (time 0 to 240 minutes) after pulse-labelling with ³⁵S methionine/cysteine. Antibodies 528 and 806 are used for immunoprecipitation.

Figure 47 depicts immunoprecipitation of EGFR from various cell lines (U87MG Δ 2-7, U87MG-wtEGFR and A431) with various antibodies (SC-03, 806 and 528) in the absence of (-) and after Endo H digestion (+) to remove high mannose type carbohydrates.

Figure 48 depicts cell surface iodination of the A431 and U87MG Δ 2-7 cell lines followed by immunoprecipitation with the 806 antibody, and with or without Endo H digestion, confirming that the EGFR bound by mAb 806 on the cell surface of A431 cells is an EndoH sensitive form.

DETAILED DESCRIPTION

In accordance with the present invention there may be employed conventional molecular biology, microbiology, and recombinant DNA techniques within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

Therefore, if appearing herein, the following terms shall have the definitions set out below.

A. TERMINOLOGY

The term "specific binding member" describes a member of a pair of molecules which have binding specificity for one another. The members of a specific binding pair may be naturally derived or wholly or partially synthetically produced. One member of the pair of molecules has an area on its surface, or a cavity, which specifically binds to and is therefore complementary to a particular spatial and polar organisation of the other member of the pair of molecules. Thus the members of the pair have the property of binding specifically to each other. Examples of types of specific binding pairs are antigen-antibody, biotin-avidin, hormone-hormone receptor, receptor-ligand, enzyme-substrate. This application is concerned with antigen-antibody type reactions.

The term "aberrant expression" in its various grammatical forms may mean and include any heightened or altered expression or overexpression of a protein in a tissue,

WO 02/092771

PCT/US02/15185

e.g. an increase in the amount of a protein, caused by any means including enhanced expression or translation, modulation of the promoter or a regulator of the protein, amplification of a gene for a protein, or enhanced half-life or stability, such that more of the protein exists or can be detected at any one time, in contrast to a non-overexpressed state. Aberrant expression includes and contemplates any scenario or alteration wherein the protein expression or post-translational modification machinery in a cell is taxed or otherwise disrupted due to enhanced expression or increased levels or amounts of a protein, including wherein an altered protein, as in mutated protein or variant due to sequence alteration, deletion or insertion, or altered folding is expressed.

It is important to appreciate that the term "aberrant expression" has been specifically chosen herein to encompass the state where abnormal (usually increased) quantities/levels of the protein are present, irrespective of the efficient cause of that abnormal quantity or level. Thus, abnormal quantities of protein may result from overexpression of the protein in the absence of gene amplification, which is the case *e.g.* in many cellular/tissue samples taken from the head and neck of subjects with cancer, while other samples exhibit abnormal protein levels attributable to gene amplification.

In this latter connection, certain of the work of the inventors that is presented herein to illustrate the invention includes the analysis of samples certain of which exhibit abnormal protein levels resulting from amplification of EFGR. This therefore accounts for the presentation herein of experimental findings where reference is made to amplification and for the use of the terms "amplification/amplified" and the like in describing abnormal levels of EFGR. However, it is the observation of abnormal quantities or levels of the protein that defines the environment or circumstance where clinical intervention as by resort to the binding members of the invention is contemplated, and for this reason, the present specification considers that the term "aberrant expression" more broadly captures the causal environment that yields the corresponding abnormality in EFGR levels.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Accordingly, while the terms "overexpression" and "amplification" in their various grammatical forms are understood to have distinct technical meanings, they are to be considered equivalent to each other, insofar as they represent the state where abnormal EGFR protein levels are present in the context of the present invention. Consequently, the term "aberrant expression" has been chosen as it is believed to subsume the terms "overexpression" and "amplification" within its scope for the purposes herein, so that all terms may be considered equivalent to each other as used herein.

The term "antibody" describes an immunoglobulin whether natural or partly or wholly synthetically produced. The term also covers any polypeptide or protein having a binding domain which is, or is homologous to, an antibody binding domain. CDR grafted antibodies are also contemplated by this term.

As antibodies can be modified in a number of ways, the term "antibody" should be construed as covering any specific binding member or substance having a binding domain with the required specificity. Thus, this term covers antibody fragments, derivatives, functional equivalents and homologues of antibodies, including any polypeptide comprising an immunoglobulin binding domain, whether natural or wholly or partially synthetic. Chimeric molecules comprising an immunoglobulin binding domain, or equivalent, fused to another polypeptide are therefore included. Cloning and expression of chimeric antibodies are described in EP-A-0120694 and EP-A-0125023 and U.S. Patent Nos. 4,816,397 and 4,816,567.

It has been shown that fragments of a whole antibody can perform the function of binding antigens. Examples of binding fragments are (i) the Fab fragment consisting of VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) the Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iii) the Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single antibody; (iv) the dAb fragment (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) which consists of a VH domain; (v) isolated CDR regions; (vi) F(ab')₂ fragments, a

WO 02/092771

PCT/US02/15185

bivalent fragment comprising two linked Fab fragments (vii) single chain Fv molecules (scFv), wherein a VH domain and a VL domain are linked by a peptide linker which allows the two domains to associate to form an antigen binding site (Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988; Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) multivalent antibody fragments (scFv dimers, trimers and/or tetramers (Power and Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 9 (2000))(ix) bispecific single chain Fv dimers (PCT/US92/09965) and (x) "diabodies", multivalent or multispecific fragments constructed by gene fusion (WO94/13804; P. Holliger et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)).

An "antibody combining site" is that structural portion of an antibody molecule comprised of light chain or heavy and light chain variable and hypervariable regions that specifically binds antigen.

The phrase "antibody molecule" in its various grammatical forms as used herein contemplates both an intact immunoglobulin molecule and an immunologically active portion of an immunoglobulin molecule.

Exemplary antibody molecules are intact immunoglobulin molecules, substantially intact immunoglobulin molecules and those portions of an immunoglobulin molecule that contains the paratope, including those portions known in the art as Fab, Fab', F(ab')₂ and F(v), which portions are preferred for use in the therapeutic methods described herein.

Antibodies may also be bispecific, wherein one binding domain of the antibody is a specific binding member of the invention, and the other binding domain has a different specificity, *e.g.* to recruit an effector function or the like. Bispecific antibodies of the present invention include wherein one binding domain of the antibody is a specific binding member of the present invention, including a fragment thereof, and the other binding domain is a distinct antibody or fragment thereof, including that of a distinct anti-EGFR antibody, for instance antibody 528 (U.S.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Patent No. 4,943,533), the chimeric and humanized 225 antibody (U.S. Patent No. 4,943,533 and WO/9640210), an anti-de2-7 antibody such as DH8.3 (Hills, D. et al (1995) Int. J. Cancer 63(4):537-543), antibody L8A4 and Y10 (Reist, CJ et al (1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382; Foulon CF et al. (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460), ICR62 (Modjtahedi H et al (1993) Cell Biophys. Jan-Jun;22(1-3):129-46; Modjtahedi et al (2002) P.A.A.C.R. 55(14):3140-3148, or the antibody of Wikstrand et al (Wikstrand C. et al (1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148). The other binding domain may be an antibody that recognizes or targets a particular cell type, as in a neural or glial cell-specific antibody. In the bispecific antibodies of the present invention the one binding domain of the antibody of the invention may be combined with other binding domains or molecules which recognize particular cell receptors and/or modulate cells in a particular fashion, as for instance an immune modulator (e.g., interleukin(s)), a growth modulator or cytokine (e.g. tumor necrosis factor (TNF), and particularly, the TNF bispecific modality demonstrated in U.S.S.N. 60/355,838 filed February 13, 2002 incorporated herein in its entirety) or a toxin (e.g., ricin) or anti-mitotic or apoptotic agent or factor.

Fab and F(ab')₂ portions of antibody molecules may be prepared by the proteolytic reaction of papain and pepsin, respectively, on substantially intact antibody molecules by methods that are well-known. See for example, U.S. Patent No. 4,342,566 to Theofilopolous et al. Fab' antibody molecule portions are also well-known and are produced from F(ab')₂ portions followed by reduction of the disulfide bonds linking the two heavy chain portions as with mercaptoethanol, and followed by alkylation of the resulting protein mercaptan with a reagent such as iodoacetamide. An antibody containing intact antibody molecules is preferred herein.

The phrase "monoclonal antibody" in its various grammatical forms refers to an antibody having only one species of antibody combining site capable of immunoreacting with a particular antigen. A monoclonal antibody thus typically displays a single binding affinity for any antigen with which it immunoreacts. A monoclonal antibody may also contain an antibody molecule having a plurality of

WO 02/092771

PCT/US02/15185

antibody combining sites, each immunospecific for a different antigen; *e.g.*, a bispecific (chimeric) monoclonal antibody.

The term "antigen binding domain" describes the part of an antibody which comprises the area which specifically binds to and is complementary to part or all of an antigen. Where an antigen is large, an antibody may bind to a particular part of the antigen only, which part is termed an epitope. An antigen binding domain may be provided by one or more antibody variable domains. Preferably, an antigen binding domain comprises an antibody light chain variable region (VL) and an antibody heavy chain variable region (VH).

"Post-translational modification" may encompass any one of or combination of modification(s), including covalent modification, which a protein undergoes after translation is complete and after being released from the ribosome or on the nascent polypeptide cotranslationally. Post-translational modification includes but is not limited to phosphorylation, myristylation, ubiquitination, glycosylation, coenzyme attachment, methylation and acetylation. Post-translational modification can modulate or influence the activity of a protein, its intracellular or extracellular destination, its stability or half-life, and/or its recognition by ligands, receptors or other proteins. Post-translational modification can occur in cell organelles, in the nucleus or cytoplasm or extracellularly.

The term "specific" may be used to refer to the situation in which one member of a specific binding pair will not show any significant binding to molecules other than its specific binding partner(s). The term is also applicable where *e.g.* an antigen binding domain is specific for a particular epitope which is carried by a number of antigens, in which case the specific binding member carrying the antigen binding domain will be able to bind to the various antigens carrying the epitope.

The term "comprise" generally used in the sense of include, that is to say permitting the presence of one or more features or components.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The term "consisting essentially of" refers to a product, particularly a peptide sequence, of a defined number of residues which is not covalently attached to a larger product. In the case of the peptide of the invention referred to above, those of skill in the art will appreciate that minor modifications to the N- or C- terminal of the peptide may however be contemplated, such as the chemical modification of the terminal to add a protecting group or the like, *e.g.* the amidation of the C-terminus.

The term "isolated" refers to the state in which specific binding members of the invention, or nucleic acid encoding such binding members will be, in accordance with the present invention. Members and nucleic acid will be free or substantially free of material with which they are naturally associated such as other polypeptides or nucleic acids with which they are found in their natural environment, or the environment in which they are prepared (*e.g.* cell culture) when such preparation is by recombinant DNA technology practised *in vitro* or *in vivo*. Members and nucleic acid may be formulated with diluents or adjuvants and still for practical purposes be isolated - for example the members will normally be mixed with gelatin or other carriers if used to coat microtitre plates for use in immunoassays, or will be mixed with pharmaceutically acceptable carriers or diluents when used in diagnosis or therapy. Specific binding members may be glycosylated, either naturally or by systems of heterologous eukaryotic cells, or they may be (for example if produced by expression in a prokaryotic cell) unglycosylated.

Also, as used herein, the terms "glycosylation" and "glycosylated" includes and encompasses the post-translational modification of proteins, termed glycoproteins, by addition of oligosaccharides. Oligosaccharides are added at glycosylation sites in glycoproteins, particularly including N-linked oligosaccharides and O-linked oligosaccharides. N-linked oligosaccharides are added to an Asn residue, particularly wherein the Asn residue is in the sequence N-X-S/T, where X cannot be Pro or Asp, and are the most common ones found in glycoproteins. In the biosynthesis of N-linked glycoproteins, a high mannose type oligosaccharide (generally comprised of

dolichol, N-Acetylglucosamine, mannose and glucose is first formed in the endoplasmic reticulum (ER). The high mannose type glycoproteins are then transported from the ER to the Golgi, where further processing and modification of the oligosaccharides occurs. O-linked oligosaccharides are added to the hydroxyl group of Ser or Thr residues. In O-linked oligosaccharides, N-Acetylglucosamine is first transferred to the Ser or Thr residue by N-Acetylglucosaminyltransferase in the ER. The protein then moves to the Golgi where further modification and chain elongation occurs. O-linked modifications can occur with the simple addition of the OG1cNAc monosaccharide alone at those Ser or Thr sites which can also under different conditions be phosphorylated rather than glycosylated.

As used herein, "pg" means picogram, "ng" means nanogram, "ug" or "µg" mean microgram, "mg" means milligram, "ul" or "µl" mean microliter, "ml" means milliliter, "l" means liter.

The terms "806 antibody", "mAb806", "ch806" and any variants not specifically listed, may be used herein interchangeably, and as used throughout the present application and claims refer to proteinaceous material including single or multiple proteins, and extends to those proteins having the amino acid sequence data described herein and presented in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4, and the chimeric antibody ch806 which is incorporated in and forms a part of SEQ ID NOS: 7 and 8, and the profile of activities set forth herein and in the Claims. Accordingly, proteins displaying substantially equivalent or altered activity are likewise contemplated. These modifications may be deliberate, for example, such as modifications obtained through site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as those obtained through mutations in hosts that are producers of the complex or its named subunits. Also, the terms "806 antibody", "mAb806" and "ch806" are intended to include within their scope proteins specifically recited herein as well as all substantially homologous analogs and allelic variations.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The amino acid residues described herein are preferred to be in the "L" isomeric form. However, residues in the "D" isomeric form can be substituted for any L-amino acid residue, as long as the desired functional property of immunoglobulin-binding is retained by the polypeptide. NH₂ refers to the free amino group present at the amino terminus of a polypeptide. COOH refers to the free carboxy group present at the carboxy terminus of a polypeptide. In keeping with standard polypeptide nomenclature, *J. Biol. Chem.*, **243**:3552-59 (1969), abbreviations for amino acid residues are shown in the following Table of Correspondence:

<u>TABLE OF CORRESPONDENCE</u>		
<u>SYMBOL</u>	<u>AMINO ACID</u>	
<u>1-Letter</u>	<u>3-Letter</u>	
Y	Tyr	tyrosine
G	Gly	glycine
F	Phe	phenylalanine
M	Met	methionine
A	Ala	alanine
S	Ser	serine
I	Ile	isoleucine
L	Leu	leucine
T	Thr	threonine
V	Val	valine
P	Pro	proline
K	Lys	lysine
H	His	histidine
Q	Gln	glutamine
E	Glu	glutamic acid
W	Trp	tryptophan
R	Arg	arginine
D	Asp	aspartic acid
N	Asn	asparagine

WO 02/092771

PCT/US02/15185

C	Cys	cysteine

It should be noted that all amino-acid residue sequences are represented herein by formulae whose left and right orientation is in the conventional direction of amino-terminus to carboxy-terminus. Furthermore, it should be noted that a dash at the beginning or end of an amino acid residue sequence indicates a peptide bond to a further sequence of one or more amino-acid residues. The above Table is presented to correlate the three-letter and one-letter notations which may appear alternately herein.

A "replicon" is any genetic element (*e.g.*, plasmid, chromosome, virus) that functions as an autonomous unit of DNA replication *in vivo*; *i.e.*, capable of replication under its own control.

A "vector" is a replicon, such as plasmid, phage or cosmid, to which another DNA segment may be attached so as to bring about the replication of the attached segment.

A "DNA molecule" refers to the polymeric form of deoxyribonucleotides (adenine, guanine, thymine, or cytosine) in its either single stranded form, or a double-stranded helix. This term refers only to the primary and secondary structure of the molecule, and does not limit it to any particular tertiary forms. Thus, this term includes double-stranded DNA found, *inter alia*, in linear DNA molecules (*e.g.*, restriction fragments), viruses, plasmids, and chromosomes. In discussing the structure of particular double-stranded DNA molecules, sequences may be described herein according to the normal convention of giving only the sequence in the 5' to 3' direction along the nontranscribed strand of DNA (*i.e.*, the strand having a sequence homologous to the mRNA).

An "origin of replication" refers to those DNA sequences that participate in DNA synthesis.

A DNA "coding sequence" is a double-stranded DNA sequence which is transcribed and translated into a polypeptide *in vivo* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxyl) terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, prokaryotic sequences, cDNA from eukaryotic mRNA, genomic DNA sequences from eukaryotic (e.g., mammalian) DNA, and even synthetic DNA sequences. A polyadenylation signal and transcription termination sequence will usually be located 3' to the coding sequence.

Transcriptional and translational control sequences are DNA regulatory sequences, such as promoters, enhancers, polyadenylation signals, terminators, and the like, that provide for the expression of a coding sequence in a host cell.

A "promoter sequence" is a DNA regulatory region capable of binding RNA polymerase in a cell and initiating transcription of a downstream (3' direction) coding sequence. For purposes of defining the present invention, the promoter sequence is bounded at its 3' terminus by the transcription initiation site and extends upstream (5' direction) to include the minimum number of bases or elements necessary to initiate transcription at levels detectable above background. Within the promoter sequence will be found a transcription initiation site (conveniently defined by mapping with nuclease S1), as well as protein binding domains (consensus sequences) responsible for the binding of RNA polymerase. Eukaryotic promoters will often, but not always, contain "TATA" boxes and "CAT" boxes. Prokaryotic promoters contain Shine-Dalgarno sequences in addition to the -10 and -35 consensus sequences.

An "expression control sequence" is a DNA sequence that controls and regulates the transcription and translation of another DNA sequence. A coding sequence is "under the control" of transcriptional and translational control sequences in a cell when RNA polymerase transcribes the coding sequence into mRNA, which is then translated into the protein encoded by the coding sequence.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

A "signal sequence" can be included before the coding sequence. This sequence encodes a signal peptide, N-terminal to the polypeptide, that communicates to the host cell to direct the polypeptide to the cell surface or secrete the polypeptide into the media, and this signal peptide is clipped off by the host cell before the protein leaves the cell. Signal sequences can be found associated with a variety of proteins native to prokaryotes and eukaryotes.

The term "oligonucleotide," as used herein in referring to the probe of the present invention, is defined as a molecule comprised of two or more ribonucleotides, preferably more than three. Its exact size will depend upon many factors which, in turn, depend upon the ultimate function and use of the oligonucleotide.

The term "primer" as used herein refers to an oligonucleotide, whether occurring naturally as in a purified restriction digest or produced synthetically, which is capable of acting as a point of initiation of synthesis when placed under conditions in which synthesis of a primer extension product, which is complementary to a nucleic acid strand, is induced, i.e., in the presence of nucleotides and an inducing agent such as a DNA polymerase and at a suitable temperature and pH. The primer may be either single-stranded or double-stranded and must be sufficiently long to prime the synthesis of the desired extension product in the presence of the inducing agent. The exact length of the primer will depend upon many factors, including temperature, source of primer and use of the method. For example, for diagnostic applications, depending on the complexity of the target sequence, the oligonucleotide primer typically contains 15-25 or more nucleotides, although it may contain fewer nucleotides.

The primers herein are selected to be "substantially" complementary to different strands of a particular target DNA sequence. This means that the primers must be sufficiently complementary to hybridize with their respective strands. Therefore, the primer sequence need not reflect the exact sequence of the template. For example, a

WO 02/092771

PCT/US02/15185

non-complementary nucleotide fragment may be attached to the 5' end of the primer, with the remainder of the primer sequence being complementary to the strand. Alternatively, non-complementary bases or longer sequences can be interspersed into the primer, provided that the primer sequence has sufficient complementarity with the sequence of the strand to hybridize therewith and thereby form the template for the synthesis of the extension product.

As used herein, the terms "restriction endonucleases" and "restriction enzymes" refer to bacterial enzymes, each of which cut double-stranded DNA at or near a specific nucleotide sequence.

A cell has been "transformed" by exogenous or heterologous DNA when such DNA has been introduced inside the cell. The transforming DNA may or may not be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell. In prokaryotes, yeast, and mammalian cells for example, the transforming DNA may be maintained on an episomal element such as a plasmid. With respect to eukaryotic cells, a stably transformed cell is one in which the transforming DNA has become integrated into a chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eukaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cells containing the transforming DNA. A "clone" is a population of cells derived from a single cell or common ancestor by mitosis. A "cell line" is a clone of a primary cell that is capable of stable growth *in vitro* for many generations.

Two DNA sequences are "substantially homologous" when at least about 75% (preferably at least about 80%, and most preferably at least about 90 or 95%) of the nucleotides match over the defined length of the DNA sequences. Sequences that are substantially homologous can be identified by comparing the sequences using standard software available in sequence data banks, or in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

See, *e.g.*, Maniatis et al., *supra*; DNA Cloning, Vols. I & II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

It should be appreciated that also within the scope of the present invention are DNA sequences encoding specific binding members (antibodies) of the invention which code for *e.g.* an antibody having the same amino acid sequence as SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4, but which are degenerate to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4. By "degenerate to" is meant that a different three-letter codon is used to specify a particular amino acid. It is well known in the art that the following codons can be used interchangeably to code for each specific amino acid:

Phenylalanine (Phe or F)	UUU or UUC
Leucine (Leu or L)	UUA or UUG or CUU or CUC or CUA or CUG
Isoleucine (Ile or I)	AUU or AUC or AUA
Methionine (Met or M)	AUG
Valine (Val or V)	GUU or GUC or GUA or GUG
Serine (Ser or S)	UCU or UCC or UCA or UCG or AGU or AGC
Proline (Pro or P)	CCU or CCC or CCA or CCG
Threonine (Thr or T)	ACU or ACC or ACA or ACG
Alanine (Ala or A)	GCU or GCG or GCA or GCG
Tyrosine (Tyr or Y)	UAU or UAC
Histidine (His or H)	CAU or CAC
Glutamine (Gln or Q)	CAA or CAG
Asparagine (Asn or N)	AAU or AAC
Lysine (Lys or K)	AAA or AAG
Aspartic Acid (Asp or D)	GAU or GAC
Glutamic Acid (Glu or E)	GAA or GAG
Cysteine (Cys or C)	UGU or UGC
Arginine (Arg or R)	CGU or CGC or CGA or CGG or AGA or AGG
Glycine (Gly or G)	GGU or GGC or GGA or GGG
Tryptophan (Trp or W)	UGG

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Termination codon UAA (ochre) or UAG (amber) or UGA (opal)

It should be understood that the codons specified above are for RNA sequences. The corresponding codons for DNA have a T substituted for U.

Mutations can be made in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4 such that a particular codon is changed to a codon which codes for a different amino acid. Such a mutation is generally made by making the fewest nucleotide changes possible. A substitution mutation of this sort can be made to change an amino acid in the resulting protein in a non-conservative manner (*i.e.*, by changing the codon from an amino acid belonging to a grouping of amino acids having a particular size or characteristic to an amino acid belonging to another grouping) or in a conservative manner (*i.e.*, by changing the codon from an amino acid belonging to a grouping of amino acids having a particular size or characteristic to an amino acid belonging to the same grouping). Such a conservative change generally leads to less change in the structure and function of the resulting protein. A non-conservative change is more likely to alter the structure, activity or function of the resulting protein. The present invention should be considered to include sequences containing conservative changes which do not significantly alter the activity or binding characteristics of the resulting protein.

The following is one example of various groupings of amino acids:

Amino acids with nonpolar R groups

Alanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Proline, Phenylalanine, Tryptophan, Methionine

Amino acids with uncharged polar R groups

Glycine, Serine, Threonine, Cysteine, Tyrosine, Asparagine, Glutamine

Amino acids with charged polar R groups (negatively charged at Ph 6.0)

Aspartic acid, Glutamic acid

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Basic amino acids (positively charged at pH 6.0)

Lysine, Arginine, Histidine (at pH 6.0)

Another grouping may be those amino acids with phenyl groups:

Phenylalanine, Tryptophan, Tyrosine

Another grouping may be according to molecular weight (*i.e.*, size of R groups):

Glycine	75
Alanine	89
Serine	105
Proline	115
Valine	117
Threonine	119
Cysteine	121
Leucine	131
Isoleucine	131
Asparagine	132
Aspartic acid	133
Glutamine	146
Lysine	146
Glutamic acid	147
Methionine	149
Histidine (at pH 6.0)	155
Phenylalanine	165
Arginine	174
Tyrosine	181
Tryptophan	204

Particularly preferred substitutions are:

- Lys for Arg and vice versa such that a positive charge may be maintained;
- Glu for Asp and vice versa such that a negative charge may be maintained;

WO 02/092771

PCT/US02/15185

- Ser for Thr such that a free -OH can be maintained; and
- Gln for Asn such that a free NH₂ can be maintained.

Amino acid substitutions may also be introduced to substitute an amino acid with a particularly preferable property. For example, a Cys may be introduced a potential site for disulfide bridges with another Cys. A His may be introduced as a particularly "catalytic" site (*i.e.*, His can act as an acid or base and is the most common amino acid in biochemical catalysis). Pro may be introduced because of its particularly planar structure, which induces β -turns in the protein's structure.

Two amino acid sequences are "substantially homologous" when at least about 70% of the amino acid residues (preferably at least about 80%, and most preferably at least about 90 or 95%) are identical, or represent conservative substitutions.

A "heterologous" region of the DNA construct is an identifiable segment of DNA within a larger DNA molecule that is not found in association with the larger molecule in nature. Thus, when the heterologous region encodes a mammalian gene, the gene will usually be flanked by DNA that does not flank the mammalian genomic DNA in the genome of the source organism. Another example of a heterologous coding sequence is a construct where the coding sequence itself is not found in nature (*e.g.*, a cDNA where the genomic coding sequence contains introns, or synthetic sequences having codons different than the native gene). Allelic variations or naturally-occurring mutational events do not give rise to a heterologous region of DNA as defined herein.

The phrase "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that are physiologically tolerable and do not typically produce an allergic or similar untoward reaction, such as gastric upset, dizziness and the like, when administered to a human.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The phrase "therapeutically effective amount" is used herein to mean an amount sufficient to prevent, and preferably reduce by at least about 30 percent, preferably by at least 50 percent, preferably by at least 70 percent, preferably by at least 80 percent, preferably by at least 90%, a clinically significant change in the growth or progression or mitotic activity of a target cellular mass, group of cancer cells or tumor, or other feature of pathology. For example, the degree of EGFR activation or activity or amount or number of EGFR positive cells, particularly of antibody or binding member reactive or positive cells may be reduced.

A DNA sequence is "operatively linked" to an expression control sequence when the expression control sequence controls and regulates the transcription and translation of that DNA sequence. The term "operatively linked" includes having an appropriate start signal (e.g., ATG) in front of the DNA sequence to be expressed and maintaining the correct reading frame to permit expression of the DNA sequence under the control of the expression control sequence and production of the desired product encoded by the DNA sequence. If a gene that one desires to insert into a recombinant DNA molecule does not contain an appropriate start signal, such a start signal can be inserted in front of the gene.

The term "standard hybridization conditions" refers to salt and temperature conditions substantially equivalent to 5 x SSC and 65°C for both hybridization and wash. However, one skilled in the art will appreciate that such "standard hybridization conditions" are dependent on particular conditions including the concentration of sodium and magnesium in the buffer, nucleotide sequence length and concentration, percent mismatch, percent formamide, and the like. Also important in the determination of "standard hybridization conditions" is whether the two sequences hybridizing are RNA-RNA, DNA-DNA or RNA-DNA. Such standard hybridization conditions are easily determined by one skilled in the art according to well known formulae, wherein hybridization is typically 10-20°C below the predicted or determined T_m with washes of higher stringency, if desired.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

B. DETAILED DISCLOSURE.

The present invention provides a novel specific binding member, particularly an antibody or fragment thereof, including immunogenic fragments, which recognizes an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells wherein the epitope is enhanced or evident upon aberrant post-translational modification and not detectable in normal or wild type cells. In a particular but non-limiting embodiment, the binding member, such as the antibody, recognizes an EGFR epitope which is enhanced or evident upon simple carbohydrate modification or early glycosylation and is reduced or not evident in the presence of complex carbohydrate modification or glycosylation. The specific binding member, such as the antibody or fragment thereof, does not bind to or recognize normal or wild type cells containing normal or wild type EGFR epitope in the absence of overexpression and in the presence of normal EGFR post-translational modification.

The invention relates to a specific binding member, particularly an antibody or a fragment thereof, which recognizes an EGFR epitope which is present in cells expressing amplified EGFR or expressing the de2-7 EGFR and not detectable in cells expressing normal or wild type EGFR, particularly in the presence of normal post-translational modification.

It is further noted and herein demonstrated that an additional non-limiting observation or characteristic of the antibodies of the present invention is their recognition of their epitope in the presence of high mannose groups, which is a characteristic of early glycosylation or simple carbohydrate modification. Thus, altered or aberrant glycosylation facilitates the presence and/or recognition of the antibody epitope or comprises a portion of the antibody epitope.

Glycosylation includes and encompasses the post-translational modification of proteins, termed glycoproteins, by addition of oligosaccharides. Oligosaccharides are added at glycosylation sites in glycoproteins, particularly including N-linked

WO 02/092771

PCT/US02/15185

oligosaccharides and O-linked oligosaccharides. N-linked oligosaccharides are added to an Asn residue, particularly wherein the Asn residue is in the sequence N-X-S/T, where X cannot be Pro or Asp, and are the most common ones found in glycoproteins. In the biosynthesis of N-linked glycoproteins, a high mannose type oligosaccharide (generally comprised of dolichol, N-Acetylglucosamine, mannose and glucose is first formed in the endoplasmic reticulum (ER). The high mannose type glycoproteins are then transported from the ER to the Golgi, where further processing and modification of the oligosaccharides normally occurs. O-linked oligosaccharides are added to the hydroxyl group of Ser or Thr residues. In O-linked oligosaccharides, N-Acetylglucosamine is first transferred to the Ser or Thr residue by N-Acetylglucosaminyltransferase in the ER. The protein then moves to the Golgi where further modification and chain elongation occurs.

In a particular aspect of the invention and as stated above, the present inventors have discovered novel monoclonal antibodies, exemplified herein by the antibody designated mAb 806 and its chimeric ch806, which specifically recognize amplified wild type EGFR and the de2-7 EGFR, yet bind to an epitope distinct from the unique junctional peptide of the de2-7 EGFR mutation. The antibodies of the present invention specifically recognize overexpressed EGFR, including amplified EGFR and mutant EGFR (exemplified herein by the de2-7 mutation), particularly upon aberrant post-translational modification. Additionally, while mAb 806 does not recognize the normal, wild type EGFR expressed on the cell surface of glioma cells, it does bind to the extracellular domain of the EGFR immobilized on the surface of ELISA plates, indicating a conformational epitope with a polypeptide aspect. Importantly, mAb 806 did not bind significantly to normal tissues such as liver and skin, which express levels of endogenous wt EGFR that are higher than in most other normal tissues, but wherein EGFR is not overexpressed or amplified. Thus, mAb806 demonstrates novel and useful specificity, recognizing de2-7 EGFR and amplified EGFR, while not recognizing normal, wild type EGFR or the unique junctional peptide which is characteristic of de2-7 EGFR.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

In a preferred aspect, the antibody is one which has the characteristics of the antibody which the inventors have identified and characterized, in particular recognizing amplified EGFR and de2-7EGFR. In a particularly preferred aspect the antibody is the mAb 806, or active fragments thereof. In a further preferred aspect the antibody of the present invention comprises the VH and VL amino acid sequences depicted in Figure 14 (SEQ ID NO:2) and Figure 15 (SEQ ID NO:4) respectively.

Preferably the epitope of the specific binding member or antibody is located within the region comprising residues 273-501 of the mature normal or wild type EGFR sequence. Therefore, also provided are specific binding proteins, such as antibodies, which bind to the de2-7 EGFR at an epitope located within the region comprising residues 273-501 of the EGFR sequence. The epitope may be determined by any conventional epitope mapping techniques known to the person skilled in the art. Alternatively, the DNA sequence encoding residues 273-501 could be digested, and the resultant fragments expressed in a suitable host. Antibody binding could be determined as mentioned above.

In particular, the member will bind to an epitope comprising residues 273-501 of the mature normal or wild type EGFR. However other antibodies which show the same or a substantially similar pattern of reactivity also form an aspect of the invention. This may be determined by comparing such members with an antibody comprising the VH and VL domains shown in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4 respectively. The comparison will typically be made using a Western blot in which binding members are bound to duplicate blots prepared from a nuclear preparation of cells so that the pattern of binding can be directly compared.

In another aspect, the invention provides an antibody capable of competing with the 806 antibody, under conditions in which at least 10% of an antibody having the VH and VL sequences of the 806 antibody is blocked from binding to de2-7EGFR by competition with such an antibody in an ELISA assay. As set forth above, anti-idiotypic antibodies are contemplated and are illustrated herein.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

An isolated polypeptide consisting essentially of the epitope comprising residues 273-501 of the mature wild type EGFR (residues 6-234 of mature de2-7 EGFR) forms another aspect of the present invention. The peptide of the invention is particularly useful in diagnostic assays or kits and therapeutically or prophylactically, including as an anti-tumor or anti-cancer vaccine. Thus compositions of the peptide of the present invention include pharmaceutical composition and immunogenic compositions.

Diagnostic and Therapeutic Uses

The unique specificity of the specific binding members, particularly antibodies or fragments thereof, of the present invention, whereby the binding member(s) recognize an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and not detectable in normal or wild type cells and wherein the epitope is enhanced or evident upon aberrant post-translational modification and wherein the member(s) bind to the de2-7 EGFR and amplified EGFR but not the wt EGFR, provides diagnostic and therapeutic uses to identify, characterize, target and treat, reduce or eliminate a number of tumorigenic cell types and tumor types, for example head and neck, breast, lung, bladder or prostate tumors and glioma, without the problems associated with normal tissue uptake that may be seen with previously known EGFR antibodies. Thus, cells overexpressing EGFR (*e.g.* by amplification or expression of a mutant or variant EGFR), particularly those demonstrating aberrant post-translational modification may be recognized, isolated, characterized, targeted and treated or eliminated utilizing the binding member(s), particularly antibody(ies) or fragments thereof of the present invention.

The antibodies of the present invention can thus specifically categorize the nature of EGFR tumors or tumorigenic cells, by staining or otherwise recognizing those tumors or cells wherein EGFR overexpression, particularly amplification and/or EGFR mutation, particularly de2-7EGFR, is present. Further, the antibodies of the present invention, as exemplified by mAb 806 and chimeric antibody ch806, demonstrate

WO 02/092771

PCT/US02/15185

significant *in vivo* anti-tumor activity against tumors containing amplified EGFR and against de2-7 EGFR positive xenografts.

As outlined above, the inventors have found that the specific binding member of the invention recognises tumor-associated forms of the EGFR (de2-7 EGFR and amplified EGFR) but not the normal, wild-type receptor when expressed in normal cells. It is believed that antibody recognition is dependent upon an aberrant post-translational modification (*e.g.*, a unique glycosylation, acetylation or phosphorylation variant) of the EGFR expressed in cells exhibiting overexpression of the EGFR gene.

As described below, mAb 806 and ch806 have been used in therapeutic studies. mAb 806 and ch806 are shown to inhibit growth of overexpressing (*e.g.* amplified) EGFR xenografts and human de2-7 EGFR expressing xenografts of human tumors and to induce significant necrosis within such tumors.

Moreover, the antibodies of the present invention inhibit the growth of intracranial tumors in a preventative model. This model involves injecting glioma cells expressing de2-7 EGFR into nude mice and then injecting the antibody intracranially either on the same day or within 1 to 3 days, optionally with repeated doses. The doses of antibody are suitably about 10 μ g. Mice injected with antibody are compared to controls, and it has been found that survival of the treated mice is significantly increased.

Therefore, in a further aspect of the invention, there is provided a method of treatment of a tumor, a cancerous condition, a precancerous condition, and any condition related to or resulting from hyperproliferative cell growth comprising administration of a specific binding member of the invention.

Antibodies of the present invention are designed to be used in methods of diagnosis and treatment of tumors in human or animal subjects, particularly epithelial tumors.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

These tumors may be primary or secondary solid tumors of any type including, but not limited to, glioma, breast, lung, prostate, head or neck tumors.

Binding Member and Antibody Generation

The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal, antibody-producing cell lines can also be created by techniques other than fusion, such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. See, e.g., M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); see also U.S. Patent Nos. 4,341,761; 4,399,121; 4,427,783; 4,444,887; 4,451,570; 4,466,917; 4,472,500; 4,491,632; 4,493,890.

Panels of monoclonal antibodies produced against EGFR can be screened for various properties; i.e., isotype, epitope, affinity, etc. Of particular interest are monoclonal antibodies that mimic the activity of EGFR or its subunits. Such monoclonals can be readily identified in specific binding member activity assays. High affinity antibodies are also useful when immunoaffinity purification of native or recombinant specific binding member is possible.

Methods for producing polyclonal anti-EGFR antibodies are well-known in the art. See U.S. Patent No. 4,493,795 to Nestor et al. A monoclonal antibody, typically containing Fab and/or F(ab')₂ portions of useful antibody molecules, can be prepared using the hybridoma technology described in *Antibodies - A Laboratory Manual*, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988), which is incorporated herein by reference. Briefly, to form the hybridoma from which the monoclonal antibody composition is produced, a myeloma or other self-perpetuating cell line is fused with lymphocytes obtained from the spleen of a mammal hyperimmunized with an appropriate EGFR.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Splenocytes are typically fused with myeloma cells using polyethylene glycol (PEG) 6000. Fused hybrids are selected by their sensitivity to HAT. Hybridomas producing a monoclonal antibody useful in practicing this invention are identified by their ability to immunoreact with the present antibody or binding member and their ability to inhibit specified tumorigenic or hyperproliferative activity in target cells.

A monoclonal antibody useful in practicing the present invention can be produced by initiating a monoclonal hybridoma culture comprising a nutrient medium containing a hybridoma that secretes antibody molecules of the appropriate antigen specificity. The culture is maintained under conditions and for a time period sufficient for the hybridoma to secrete the antibody molecules into the medium. The antibody-containing medium is then collected. The antibody molecules can then be further isolated by well-known techniques.

Media useful for the preparation of these compositions are both well-known in the art and commercially available and include synthetic culture media, inbred mice and the like. An exemplary synthetic medium is Dulbecco's minimal essential medium (DMEM; Dulbecco et al., *Virology* 8:396 (1959)) supplemented with 4.5 gm/l glucose, 20 mM glutamine, and 20% fetal calf serum. An exemplary inbred mouse strain is the Balb/c.

Methods for producing monoclonal anti-EGFR antibodies are also well-known in the art. See Niman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4949-4953 (1983). Typically, the EGFR or a peptide analog is used either alone or conjugated to an immunogenic carrier, as the immunogen in the before described procedure for producing anti-EGFR monoclonal antibodies. The hybridomas are screened for the ability to produce an antibody that immunoreacts with the EGFR present in tumorigenic, abnormal or hyperproliferative cells. Other anti-EGFR antibodies include but are not limited to the HuMAX-EGFR antibody from Genmab/Medarex, the 108 antibody (ATCC HB9764) and U.S. Patent No. 6,217,866, and antibody 14E1 from Schering AG (U.S. Patent No. 5,942,602).

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Recombinant Binding Members, Chimerics, Bispecifics and Fragments

In general, the CDR3 regions, comprising amino acid sequences substantially as set out as the CDR3 regions of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4 will be carried in a structure which allows for binding of the CDR3 regions to an tumor antigen. In the case of the CDR3 region of SEQ ID NO:4, this is preferably carried by the VL region of SEQ ID NO:4.

By "substantially as set out" it is meant that that CDR3 regions of the invention will be either identical or highly homologous to the specified regions of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4. By "highly homologous" it is contemplated that only a few substitutions, preferably from 1 to 8, preferably from 1 to 5, preferably from 1 to 4, or from 1 to 3 or 1 or 2 substitutions may be made in the CDRs.

The structure for carrying the CDR3s of the invention will generally be of an antibody heavy or light chain sequence or substantial portion thereof in which the CDR3 regions are located at locations corresponding to the CDR3 region of naturally occurring VH and VL antibody variable domains encoded by rearranged immunoglobulin genes. The structures and locations of immunoglobulin variable domains may be determined by reference to Kabat, E.A. *et al*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987, and updates thereof, now available on the Internet (<http://immuno.bme.nyu.edu>).

Preferably, the amino acid sequence substantially as set out as residues 93-102 of SEQ ID NO:2 is carried as the CDR3 in a human heavy chain variable domain or a substantial portion thereof, and the amino acid sequences substantially as set out as residues 24-34, 50-56 and 89-97 of SEQ ID NO:4 are carried as the CDRs 1-3 respectively in a human light chain variable domain or a substantial portion thereof.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The variable domains may be derived from any germline or rearranged human variable domain, or may be a synthetic variable domain based on consensus sequences of known human variable domains. The CDR3-derived sequences of the invention, as defined in the preceding paragraph, may be introduced into a repertoire of variable domains lacking CDR3 regions, using recombinant DNA technology.

For example, Marks *et al* (BioTechnology, 1992, 10:779-783) describe methods of producing repertoires of antibody variable domains in which consensus primers directed at or adjacent to the 5' end of the variable domain area are used in conjunction with consensus primers to the third framework region of human VH genes to provide a repertoire of VH variable domains lacking a CDR3. Marks *et al* further describe how this repertoire may be combined with a CDR3 of a particular antibody. Using analogous techniques, the CDR3-derived sequences of the present invention may be shuffled with repertoires of VH or VL domains lacking a CDR3, and the shuffled complete VH or VL domains combined with a cognate VL or VH domain to provide specific binding members of the invention. The repertoire may then be displayed in a suitable host system such as the phage display system of WO92/01047 so that suitable specific binding members may be selected. A repertoire may consist of from anything from 10^4 individual members upwards, for example from 10^6 to 10^8 or 10^{10} members.

Analogous shuffling or combinatorial techniques are also disclosed by Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), who describes the technique in relation to a β -lactamase gene but observes that the approach may be used for the generation of antibodies.

A further alternative is to generate novel VH or VL regions carrying the CDR3-derived sequences of the invention using random mutagenesis of, for example, the mAb806 VH or VL genes to generate mutations within the entire variable domain. Such a technique is described by Gram *et al* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), who used error-prone PCR.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Another method which may be used is to direct mutagenesis to CDR regions of VH or VL genes. Such techniques are disclosed by Barbas *et al.*, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) and Schier *et al.* (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

All the above described techniques are known as such in the art and in themselves do not form part of the present invention. The skilled person will be able to use such techniques to provide specific binding members of the invention using routine methodology in the art.

A substantial portion of an immunoglobulin variable domain will comprise at least the three CDR regions, together with their intervening framework regions. Preferably, the portion will also include at least about 50% of either or both of the first and fourth framework regions, the 50% being the C-terminal 50% of the first framework region and the N-terminal 50% of the fourth framework region. Additional residues at the N-terminal or C-terminal end of the substantial part of the variable domain may be those not normally associated with naturally occurring variable domain regions. For example, construction of specific binding members of the present invention made by recombinant DNA techniques may result in the introduction of N- or C-terminal residues encoded by linkers introduced to facilitate cloning or other manipulation steps. Other manipulation steps include the introduction of linkers to join variable domains of the invention to further protein sequences including immunoglobulin heavy chains, other variable domains (for example in the production of diabodies) or protein labels as discussed in more detail below.

Although in a preferred aspect of the invention specific binding members comprising a pair of binding domains based on sequences substantially set out in SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4 are preferred, single binding domains based on either of these sequences form further aspects of the invention. In the case of the binding domains based on the sequence substantially set out in SEQ ID NO:2, such binding domains may be used as targeting agents for tumor antigens since it is known that

WO 02/092771

PCT/US02/15185

immunoglobulin VH domains are capable of binding target antigens in a specific manner.

In the case of either of the single chain specific binding domains, these domains may be used to screen for complementary domains capable of forming a two-domain specific binding member which has in vivo properties as good as or equal to the mAb806 antibody disclosed herein.

This may be achieved by phage display screening methods using the so-called hierarchical dual combinatorial approach as disclosed in U.S. Patent 5,969,108 in which an individual colony containing either an H or L chain clone is used to infect a complete library of clones encoding the other chain (L or H) and the resulting two-chain specific binding member is selected in accordance with phage display techniques such as those described in that reference. This technique is also disclosed in Marks *et al, ibid*.

Specific binding members of the present invention may further comprise antibody constant regions or parts thereof. For example, specific binding members based on SEQ ID NO:4 may be attached at their C-terminal end to antibody light chain constant domains including human C_k or C_λ chains, preferably C_λ chains. Similarly, specific binding members based on SEQ ID NO:2 may be attached at their C-terminal end to all or part of an immunoglobulin heavy chain derived from any antibody isotype, *e.g.* IgG, IgA, IgE, IgD and IgM and any of the isotype sub-classes, particularly IgG1, IgG2b, and IgG4. IgG1 is preferred.

The advent of monoclonal antibody (mAb) technology 25 years ago has provide an enormous repertoire of useful research reagents and created the opportunity to use antibodies as approved pharmaceutical reagents in cancer therapy, autoimmune disorders, transplant rejection, antiviral prophylaxis and as anti-thrombotics (Glennie and Johnson 2000). The application of molecular engineering to convert murine mAbs into chimeric mAbs (mouse V-region, human C-region) and humanised reagents

WO 02/092771

PCT/US02/15185

where only the mAb complementarity-determining regions (CDR) are of murine origin has been critical to the clinical success of mAb therapy. The engineered mAbs have markedly reduced or absent immunogenicity, increased serum half-life and the human Fc portion of the mAb increases the potential to recruit the immune effectors of complement and cytotoxic cells (Clark 2000). Investigations into the biodistribution, pharmacokinetics and any induction of an immune response to clinically administered mAbs requires the development of analyses to discriminate between the pharmaceutical and endogenous proteins.

The antibodies, or any fragments thereof, may also be conjugated or recombinantly fused to any cellular toxin, bacterial or other, *e.g.* pseudomonas exotoxin, ricin, or diphtheria toxin. The part of the toxin used can be the whole toxin, or any particular domain of the toxin. Such antibody-toxin molecules have successfully been used for targeting and therapy of different kinds of cancers, see *e.g.* Pastan, *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24;1333(2):C1-6; Kreitman et al., *N Engl J Med*. 2001 Jul 26;345(4):241-7; Schnell et al., *Leukemia*. 2000 Jan;14(1):129-35; Ghetie et al., *Mol Biotechnol*. 2001 Jul;18(3):251-68.

Bi- and tri-specific multimers can be formed by association of different scFv molecules and have been designed as cross-linking reagents for T-cell recruitment into tumors (immunotherapy), viral retargeting (gene therapy) and as red blood cell agglutination reagents (immunodiagnostics), see *e.g.* Todorovska et al., *J Immunol Methods*. 2001 Feb 1;248(1-2):47-66; Tomlinson et al., *Methods Enzymol*. 2000;326:461-79; McCall et al., *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6112-7.

Fully human antibodies can be prepared by immunizing transgenic mice carrying large portions of the human immunoglobulin heavy and light chains. These mice, examples of such mice are the Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) (US Patent Nos. 6,075,181 and 6,150,584), the HuMAb-Mouse™ (Medarex, Inc./GenPharm) (US patent 5545806 and 5569825), the TransChromo Mouse™ (Kirin) and the KM Mouse™ (Medarex/Kirin), are well known within the art. Antibodies can then be

WO 02/092771

PCT/US02/15185

prepared by, *e.g.* standard hybridoma technique or by phage display. These antibodies will then contain only fully human amino acid sequences.

Fully human antibodies can also be generated using phage display from human libraries. Phage display may be performed using methods well known to the skilled artisan, as in Hoogenboom et al and Marks et al (Hoogenboom HR and Winter G. (1992) *J Mol Biol.* 227(2):381-8; Marks JD et al (1991) *J Mol Biol.* 222(3):581-97; and also U.S. Patents 5885793 and 5969108).

Therapeutic Antibodies and Uses

The *in vivo* properties, particularly with regard to tumor:blood ratio and rate of clearance, of specific binding members of the invention will be at least comparable to mAb806. Following administration to a human or animal subject such a specific binding member will show a peak tumor to blood ratio of $> 1:1$. Preferably at such a ratio the specific binding member will also have a tumor to organ ratio of greater than $1:1$, preferably greater than $2:1$, more preferably greater than $5:1$. Preferably at such a ratio the specific binding member will also have an organ to blood ratio of $< 1:1$ in organs away from the site of the tumor. These ratios exclude organs of catabolism and secretion of the administered specific binding member. Thus in the case of scFvs and Fabs (as shown in the accompanying examples), the binding members are secreted via the kidneys and there is greater presence here than other organs. In the case of whole IgGs, clearance will be at least in part, via the liver. The peak localisation ratio of the intact antibody will normally be achieved between 10 and 200 hours following administration of the specific binding member. More particularly, the ratio may be measured in a tumor xenograft of about 0.2 - 1.0 g formed subcutaneously in one flank of an athymic nude mouse.

Antibodies of the invention may be labelled with a detectable or functional label. Detectable labels include, but are not limited to, radiolabels such as the isotopes ^3H ,

WO 02/092771

PCT/US02/15185

¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ²¹¹At, ¹⁹⁸Au, ⁶⁷Cu, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ⁹⁰Tc and ¹⁸⁶Re, which may be attached to antibodies of the invention using conventional chemistry known in the art of antibody imaging. Labels also include fluorescent labels and labels used conventionally in the art for MRI-CT imaging. They also include enzyme labels such as horseradish peroxidase. Labels further include chemical moieties such as biotin which may be detected via binding to a specific cognate detectable moiety, *e.g.* labelled avidin.

Functional labels include substances which are designed to be targeted to the site of a tumor to cause destruction of tumor tissue. Such functional labels include cytotoxic drugs such as 5-fluorouracil or ricin and enzymes such as bacterial carboxypeptidase or nitroreductase, which are capable of converting prodrugs into active drugs at the site of a tumor.

Also, antibodies including both polyclonal and monoclonal antibodies, and drugs that modulate the production or activity of the specific binding members, antibodies and/or their subunits may possess certain diagnostic applications and may for example, be utilized for the purpose of detecting and/or measuring conditions such as cancer, precancerous lesions, conditions related to or resulting from hyperproliferative cell growth or the like. For example, the specific binding members, antibodies or their subunits may be used to produce both polyclonal and monoclonal antibodies to themselves in a variety of cellular media, by known techniques such as the hybridoma technique utilizing, for example, fused mouse spleen lymphocytes and myeloma cells. Likewise, small molecules that mimic or antagonize the activity(ies) of the specific binding members of the invention may be discovered or synthesized, and may be used in diagnostic and/or therapeutic protocols.

The radiolabelled specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, are useful in *in vitro* diagnostics techniques and in *in vivo* radioimaging techniques and in radioimmunotherapy. In the instance of *in vivo* imaging, the specific binding members of the present invention may be conjugated to an imaging

WO 02/092771

PCT/US02/15185

agent rather than a radioisotope(s), including but not limited to a magnetic resonance image enhancing agent, wherein for instance an antibody molecule is loaded with a large number of paramagnetic ions through chelating groups. Examples of chelating groups include EDTA, porphyrins, polyamines crown ethers and polyoximes. Examples of paramagnetic ions include gadolinium, iron, manganese, rhenium, europium, lanthanum, holmium and terbium. In a further aspect of the invention, radiolabelled specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, particularly radioimmunoconjugates, are useful in radioimmunotherapy, particularly as radiolabelled antibodies for cancer therapy. In a still further aspect, the radiolabelled specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, are useful in radioimmuno-guided surgery techniques, wherein they can identify and indicate the presence and/or location of cancer cells, precancerous cells, tumor cells, and hyperproliferative cells, prior to, during or following surgery to remove such cells.

Immunoconjugates or antibody fusion proteins of the present invention, wherein the specific binding members, particularly antibodies and fragments thereof, of the present invention are conjugated or attached to other molecules or agents further include, but are not limited to binding members conjugated to a chemical ablation agent, toxin, immunomodulator, cytokine, cytotoxic agent, chemotherapeutic agent or drug.

Radioimmunotherapy (RAIT) has entered the clinic and demonstrated efficacy using various antibody immunoconjugates. ¹³¹I labeled humanized anti-carcinoembryonic antigen (anti-CEA) antibody hMN-14 has been evaluated in colorectal cancer (Behr TM et al (2002) Cancer 94(4Suppl):1373-81) and the same antibody with ⁹⁰Y label has been assessed in medullary thyroid carcinoma (Stein R et al (2002) Cancer 94(1):51-61). Radioimmunotherapy using monoclonal antibodies has also been assessed and reported for non-Hodgkin's lymphoma and pancreatic cancer (Goldenberg DM (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2):195-201; Gold DV et al (2001) Crit Rev Oncol Hematol 39 (1-2) 147-54). Radioimmunotherapy methods

with particular antibodies are also described in U.S. Patent 6,306,393 and 6,331,175. Radioimmunoguided surgery (RIGS) has also entered the clinic and demonstrated efficacy and usefulness, including using anti-CEA antibodies and antibodies directed against tumor-associated antigens (Kim JC et al (2002) *Int J Cancer* 97(4):542-7; Schneebaum S et al (2001) *World J Surg* 25(12):1495-8; Avital S et al (2000) *Cancer* 89(8):1692-8; McIntosh DG et al (1997) *Cancer Biother Radiopharm* 12 (4):287-94).

Antibodies of the present invention may be administered to a patient in need of treatment via any suitable route, usually by injection into the bloodstream or CSF, or directly into the site of the tumor. The precise dose will depend upon a number of factors, including whether the antibody is for diagnosis or for treatment, the size and location of the tumor, the precise nature of the antibody (whether whole antibody, fragment, diabody, etc), and the nature of the detectable or functional label attached to the antibody. Where a radionuclide is used for therapy, a suitable maximum single dose is about 45 mCi/m², to a maximum of about 250 mCi/m². Preferable dosage is in the range of 15 to 40 mCi, with a further preferred dosage range of 20 to 30 mCi, or 10 to 30 mCi. Such therapy may require bone marrow or stem cell replacement. A typical antibody dose for either tumor imaging or tumor treatment will be in the range of from 0.5 to 40 mg, preferably from 1 to 4 mg of antibody in F(ab')₂ form. Naked antibodies are preferable administered in doses of 20 to 1000 mg protein per dose, or 20 to 500 mg protein per dose, or 20 to 100 mg protein per dose. This is a dose for a single treatment of an adult patient, which may be proportionally adjusted for children and infants, and also adjusted for other antibody formats in proportion to molecular weight. Treatments may be repeated at daily, twice-weekly, weekly or monthly intervals, at the discretion of the physician.

These formulations may include a second binding protein, such as the EGFR binding proteins described *supra*. In an especially preferred form, this second binding protein is a monoclonal antibody such as 528 or 225, discussed *infra*.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Pharmaceutical and Therapeutic Compositions

Specific binding members of the present invention will usually be administered in the form of a pharmaceutical composition, which may comprise at least one component in addition to the specific binding member.

Thus pharmaceutical compositions according to the present invention, and for use in accordance with the present invention, may comprise, in addition to active ingredient, a pharmaceutically acceptable excipient, carrier, buffer, stabiliser or other materials well known to those skilled in the art. Such materials should be non-toxic and should not interfere with the efficacy of the active ingredient. The precise nature of the carrier or other material will depend on the route of administration, which may be oral, or by injection, e.g. intravenous.

Pharmaceutical compositions for oral administration may be in tablet, capsule, powder or liquid form. A tablet may comprise a solid carrier such as gelatin or an adjuvant. Liquid pharmaceutical compositions generally comprise a liquid carrier such as water, petroleum, animal or vegetable oils, mineral oil or synthetic oil. Physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol may be included.

For intravenous, injection, or injection at the site of affliction, the active ingredient will be in the form of a parenterally acceptable aqueous solution which is pyrogen-free and has suitable pH, isotonicity and stability. Those of relevant skill in the art are well able to prepare suitable solutions using, for example, isotonic vehicles such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Lactated Ringer's Injection. Preservatives, stabilisers, buffers, antioxidants and/or other additives may be included, as required.

A composition may be administered alone or in combination with other treatments, therapeutics or agents, either simultaneously or sequentially dependent upon the

WO 02/092771

PCT/US02/15185

condition to be treated. In addition, the present invention contemplates and includes compositions comprising the binding member, particularly antibody or fragment thereof, herein described and other agents or therapeutics such as anti-cancer agents or therapeutics, hormones, anti-EGFR agents or antibodies, or immune modulators. More generally these anti-cancer agents may be tyrosine kinase inhibitors or phosphorylation cascade inhibitors, post-translational modulators, cell growth or division inhibitors (*e.g.* anti-mitotics), or signal transduction inhibitors. Other treatments or therapeutics may include the administration of suitable doses of pain relief drugs such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (*e.g.* aspirin, paracetamol, ibuprofen or ketoprofen) or opiates such as morphine, or anti-emetics. The composition can be administered in combination (either sequentially (*i.e.* before or after) or simultaneously) with tyrosine kinase inhibitors (including, but not limited to AG1478 and ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorubicin, temozolomide, cisplatin, carboplatin, nitrosoureas, procarbazine, vincristine, hydroxyurea, 5-fluoruracil, cytosine arabinoside, cyclophosphamide, epipodophyllotoxin, carmustine, lomustine, and/or other chemotherapeutic agents. Thus, these agents may be anti-EGFR specific agents, or tyrosine kinase inhibitors such as AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, or SU-6668 or may be more general anti-cancer and anti-neoplastic agents such as doxorubicin, cisplatin, temozolomide, nitrosoureas, procarbazine, vincristine, hydroxyurea, 5-fluoruracil, cytosine arabinoside, cyclophosphamide, epipodophyllotoxin, carmustine, or lomustine. In addition, the composition may be administered with hormones such as dexamethasone, immune modulators, such as interleukins, tumor necrosis factor (TNF) or other growth factors or cytokines which stimulate the immune response and reduction or elimination of cancer cells or tumors. An immune modulator such as TNF may be combined together with a member of the invention in the form of a bispecific antibody recognizing the 806 EGFR epitope as well as binding to TNF receptors. The composition may also be administered with, or may include combinations along with other anti-EGFR antibodies, including but not limited to the anti-EGFR antibodies 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 and ABX-EGF.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Previously the use of agents such as doxorubicin and cisplatin in conjunction with anti-EGFR antibodies have produced enhanced anti-tumor activity (Fan *et al.*, 1993; Baselga *et al.*, 1993). The combination of doxorubicin and mAb 528 resulted in total eradication of established A431 xenografts, whereas treatment with either agent alone caused only temporary in vivo growth inhibition (Baselga *et al.*, 1993). Likewise, the combination of cisplatin and either mAb 528 or 225 also led to the eradication of well established A431 xenografts, which was not observed when treatment with either agent was used (Fan *et al.*, 1993).

Conventional Radiotherapy

In addition, the present invention contemplates and includes therapeutic compositions for the use of the binding member in combination with conventional radiotherapy. It has been indicated that treatment with antibodies targeting EGF receptors can enhance the effects of conventional radiotherapy (Milas *et al.*, Clin Cancer Res. 2000 Feb; 6(2):701-8, Huang *et al.*, Clin Cancer Res. 2000 Jun; 6(6):2166-74).

As demonstrated herein, combinations of the binding member of the present invention, particularly an antibody or fragment thereof, preferably the mAb806, ch806 or a fragment thereof, and anti-cancer therapeutics, particularly anti-EGFR therapeutics, including other anti-EGFR antibodies, demonstrate effective therapy, and particularly synergy, against xenografted tumors. In the examples, it is demonstrated that the combination of AG1478 and mAb 806 results in significantly enhanced reduction of A431 xenograft tumor volume in comparison with treatment with either agent alone. AG1478 (4-(3-chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline) is a potent and selective inhibitor of the EGF receptor kinase and is particularly described in United States Patent No. 5,457,105, incorporated by reference herein in its entirety (see also, Liu, W. *et al.* (1999) J. Cell Sci. 112:2409; Eguchi, S. *et al.* (1998) J. Biol. Chem. 273:8890; Levitsky, A. and Gazit, A. (1995) Science 267:1782). The specification examples further demonstrate therapeutic synergy of the 806 antibody with other anti-EGFR antibodies, particularly with the 528 anti-EGFR antibody.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The present invention further contemplates therapeutic compositions useful in practicing the therapeutic methods of this invention. A subject therapeutic composition includes, in admixture, a pharmaceutically acceptable excipient (carrier) and one or more of a specific binding member, polypeptide analog thereof or fragment thereof, as described herein as an active ingredient. In a preferred embodiment, the composition comprises an antigen capable of modulating the specific binding of the present binding member/antibody with a target cell.

The preparation of therapeutic compositions which contain polypeptides, analogs or active fragments as active ingredients is well understood in the art. Typically, such compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions. However, solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection can also be prepared. The preparation can also be emulsified. The active therapeutic ingredient is often mixed with excipients which are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the composition can contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents which enhance the effectiveness of the active ingredient.

A polypeptide, analog or active fragment can be formulated into the therapeutic composition as neutralized pharmaceutically acceptable salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the polypeptide or antibody molecule) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed from the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, and the like.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The therapeutic polypeptide-, analog- or active fragment-containing compositions are conventionally administered intravenously, as by injection of a unit dose, for example. The term "unit dose" when used in reference to a therapeutic composition of the present invention refers to physically discrete units suitable as unitary dosage for humans, each unit containing a predetermined quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required diluent; *i.e.*, carrier, or vehicle.

The compositions are administered in a manner compatible with the dosage formulation, and in a therapeutically effective amount. The quantity to be administered depends on the subject to be treated, capacity of the subject's immune system to utilize the active ingredient, and degree of EGFR binding capacity desired. Precise amounts of active ingredient required to be administered depend on the judgment of the practitioner and are peculiar to each individual. However, suitable dosages may range from about 0.1 to 20, preferably about 0.5 to about 10, and more preferably one to several, milligrams of active ingredient per kilogram body weight of individual per day and depend on the route of administration. Suitable regimes for initial administration and booster shots are also variable, but are typified by an initial administration followed by repeated doses at one or more hour intervals by a subsequent injection or other administration. Alternatively, continuous intravenous infusion sufficient to maintain concentrations of ten nanomolar to ten micromolar in the blood are contemplated.

Pharmaceutical compositions for oral administration may be in tablet, capsule, powder or liquid form. A tablet may comprise a solid carrier such as gelatin or an adjuvant. Liquid pharmaceutical compositions generally comprise a liquid carrier such as water, petroleum, animal or vegetable oils, mineral oil or synthetic oil. Physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol may be included.

For intravenous, injection, or injection at the site of affliction, the active ingredient will be in the form of a parenterally acceptable aqueous solution which is pyrogen-free and has suitable pH, isotonicity and stability. Those of relevant skill in the art are well able to prepare suitable solutions using, for example, isotonic vehicles such as Sodium Chloride Injection, Ringer's Injection, Lactated Ringer's Injection. Preservatives, stabilisers, buffers, antioxidants and/or other additives may be included, as required.

Diagnostic Assays

The present invention also relates to a variety of diagnostic applications, including methods for detecting the presence of stimuli such as aberrantly expressed EGFR, by reference to their ability to be recognized by the present specific binding member. As mentioned earlier, the EGFR can be used to produce antibodies to itself by a variety of known techniques, and such antibodies could then be isolated and utilized as in tests for the presence of particular EGFR activity in suspect target cells.

Diagnostic applications of the specific binding members of the present invention, particularly antibodies and fragments thereof, include *in vitro* and *in vivo* applications well known and standard to the skilled artisan and based on the present description. Diagnostic assays and kits for *in vitro* assessment and evaluation of EGFR status, particularly with regard to aberrant expression of EGFR, may be utilized to diagnose, evaluate and monitor patient samples including those known to have or suspected of having cancer, a precancerous condition, a condition related to hyperproliferative cell growth or from a tumor sample. The assessment and evaluation of EGFR status is also useful in determining the suitability of a patient for a clinical trial of a drug or for the administration of a particular chemotherapeutic agent or specific binding member, particularly an antibody, of the present invention, including combinations thereof, versus a different agent or binding member. This type of diagnostic monitoring and assessment is already in practice utilizing antibodies against the HER2 protein in breast cancer (Hercep Test, Dako Corporation), where the assay is also used to

WO 02/092771

PCT/US02/15185

evaluate patients for antibody therapy using Herceptin. *In vivo* applications include imaging of tumors or assessing cancer status of individuals, including radioimaging.

As suggested earlier, the diagnostic method of the present invention comprises examining a cellular sample or medium by means of an assay including an effective amount of an antagonist to an EGFR /protein, such as an anti- EGFR antibody, preferably an affinity-purified polyclonal antibody, and more preferably a mAb. In addition, it is preferable for the anti- EGFR antibody molecules used herein be in the form of Fab, Fab', F(ab')₂ or F(v) portions or whole antibody molecules. As previously discussed, patients capable of benefiting from this method include those suffering from: cancer, a pre-cancerous lesion, a viral infection, pathologies involving or resulting from hyperproliferative cell growth or other like pathological derangement. Methods for isolating EGFR and inducing anti- EGFR antibodies and for determining and optimizing the ability of anti-EGFR antibodies to assist in the examination of the target cells are all well-known in the art.

Preferably, the anti-EGFR antibody used in the diagnostic methods of this invention is an affinity purified polyclonal antibody. More preferably, the antibody is a monoclonal antibody (mAb). In addition, the anti-EGFR antibody molecules used herein can be in the form of Fab, Fab', F(ab')₂ or F(v) portions of whole antibody molecules.

As described in detail above, antibody(ies) to the EGFR can be produced and isolated by standard methods including the well known hybridoma techniques. For convenience, the antibody(ies) to the EGFR will be referred to herein as Ab₁ and antibody(ies) raised in another species as Ab₂.

The presence of EGFR in cells can be ascertained by the usual *in vitro* or *in vivo* immunological procedures applicable to such determinations. A number of useful procedures are known. Three such procedures which are especially useful utilize either the EGFR labeled with a detectable label, antibody Ab₁ labeled with a

WO 02/092771

PCT/US02/15185

detectable label, or antibody Ab₂ labeled with a detectable label. The procedures may be summarized by the following equations wherein the asterisk indicates that the particle is labeled, and "R" stands for the EGFR:

A. $R^* + Ab_1 = R^*Ab_1$

B. $R + Ab^* = RAb_1^*$

C. $R + Ab_1 + Ab_2^* = RAb_1Ab_2^*$

The procedures and their application are all familiar to those skilled in the art and accordingly may be utilized within the scope of the present invention. The "competitive" procedure, Procedure A, is described in U.S. Patent Nos. 3,654,090 and 3,850,752. Procedure C, the "sandwich" procedure, is described in U.S. Patent Nos. RE 31,006 and 4,016,043. Still other procedures are known such as the "double antibody," or "DASP" procedure.

In each instance above, the EGFR forms complexes with one or more antibody(ies) or binding partners and one member of the complex is labeled with a detectable label. The fact that a complex has formed and, if desired, the amount thereof, can be determined by known methods applicable to the detection of labels.

It will be seen from the above, that a characteristic property of Ab₂ is that it will react with Ab₁. This is because Ab₁ raised in one mammalian species has been used in another species as an antigen to raise the antibody Ab₂. For example, Ab₂ may be raised in goats using rabbit antibodies as antigens. Ab₂ therefore would be anti-rabbit antibody raised in goats. For purposes of this description and claims, Ab₁ will be referred to as a primary or anti-EGFR antibody, and Ab₂ will be referred to as a secondary or anti-Ab₁ antibody.

The labels most commonly employed for these studies are radioactive elements, enzymes, chemicals which fluoresce when exposed to ultraviolet light, and others.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

A number of fluorescent materials are known and can be utilized as labels. These include, for example, fluorescein, rhodamine, auramine, Texas Red, AMCA blue and Lucifer Yellow. A particular detecting material is anti-rabbit antibody prepared in goats and conjugated with fluorescein through an isothiocyanate.

The EGFR or its binding partner(s) such as the present specific binding member, can also be labeled with a radioactive element or with an enzyme. The radioactive label can be detected by any of the currently available counting procedures. The preferred isotope may be selected from ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ and ^{186}Re .

Enzyme labels are likewise useful, and can be detected by any of the presently utilized colorimetric, spectrophotometric, fluorospectrophotometric, amperometric or gasometric techniques. The enzyme is conjugated to the selected particle by reaction with bridging molecules such as carbodiimides, diisocyanates, glutaraldehyde and the like. Many enzymes which can be used in these procedures are known and can be utilized. The preferred are peroxidase, β -glucuronidase, β -D-glucosidase, β -D-galactosidase, urease, glucose oxidase plus peroxidase and alkaline phosphatase. U.S. Patent Nos. 3,654,090; 3,850,752; and 4,016,043 are referred to by way of example for their disclosure of alternate labeling material and methods.

A particular assay system that may be advantageously utilized in accordance with the present invention, is known as a receptor assay. In a receptor assay, the material to be assayed such as the specific binding member, is appropriately labeled and then certain cellular test colonies are inoculated with a quantity of both the labeled and unlabeled material after which binding studies are conducted to determine the extent to which the labeled material binds to the cell receptors. In this way, differences in affinity between materials can be ascertained.

Accordingly, a purified quantity of the specific binding member may be radiolabeled and combined, for example, with antibodies or other inhibitors thereto, after which

WO 02/092771

PCT/US02/15185

binding studies would be carried out. Solutions would then be prepared that contain various quantities of labeled and unlabeled uncombined specific binding member, and cell samples would then be inoculated and thereafter incubated. The resulting cell monolayers are then washed, solubilized and then counted in a gamma counter for a length of time sufficient to yield a standard error of <5%. These data are then subjected to Scatchard analysis after which observations and conclusions regarding material activity can be drawn. While the foregoing is exemplary, it illustrates the manner in which a receptor assay may be performed and utilized, in the instance where the cellular binding ability of the assayed material may serve as a distinguishing characteristic.

An assay useful and contemplated in accordance with the present invention is known as a "cis/trans" assay. Briefly, this assay employs two genetic constructs, one of which is typically a plasmid that continually expresses a particular receptor of interest when transfected into an appropriate cell line, and the second of which is a plasmid that expresses a reporter such as luciferase, under the control of a receptor/ligand complex. Thus, for example, if it is desired to evaluate a compound as a ligand for a particular receptor, one of the plasmids would be a construct that results in expression of the receptor in the chosen cell line, while the second plasmid would possess a promoter linked to the luciferase gene in which the response element to the particular receptor is inserted. If the compound under test is an agonist for the receptor, the ligand will complex with the receptor, and the resulting complex will bind the response element and initiate transcription of the luciferase gene. The resulting chemiluminescence is then measured photometrically, and dose response curves are obtained and compared to those of known ligands. The foregoing protocol is described in detail in U.S. Patent No. 4,981,784 and PCT International Publication No. WO 88/03168, for which purpose the artisan is referred.

In a further embodiment of this invention, commercial test kits suitable for use by a medical specialist may be prepared to determine the presence or absence of aberrant expression of EGFR, including but not limited to amplified EGFR and/or an EGFR

WO 02/092771

PCT/US02/15185

mutation, in suspected target cells. In accordance with the testing techniques discussed above, one class of such kits will contain at least the labeled EGFR or its binding partner, for instance an antibody specific thereto, and directions, of course, depending upon the method selected, e.g., "competitive," "sandwich," "DASP" and the like. The kits may also contain peripheral reagents such as buffers, stabilizers, etc.

Accordingly, a test kit may be prepared for the demonstration of the presence or capability of cells for aberrant expression or post-translational modification of EGFR, comprising:

- (a) a predetermined amount of at least one labeled immunochemically reactive component obtained by the direct or indirect attachment of the present specific binding member or a specific binding partner thereto, to a detectable label;
- (b) other reagents; and
- (c) directions for use of said kit.

More specifically, the diagnostic test kit may comprise:

- (a) a known amount of the specific binding member as described above (or a binding partner) generally bound to a solid phase to form an immunosorbent, or in the alternative, bound to a suitable tag, or plural such end products, etc. (or their binding partners) one of each;
- (b) if necessary, other reagents; and
- (c) directions for use of said test kit.

In a further variation, the test kit may be prepared and used for the purposes stated above, which operates according to a predetermined protocol (e.g. "competitive," "sandwich," "double antibody," etc.), and comprises:

- (a) a labeled component which has been obtained by coupling the specific binding member to a detectable label;
- (b) one or more additional immunochemical reagents of which at least one reagent is a ligand or an immobilized ligand, which ligand is selected from the group consisting of:

WO 02/092771

PCT/US02/15185

- (i) a ligand capable of binding with the labeled component (a);
- (ii) a ligand capable of binding with a binding partner of the labeled component (a);
- (iii) a ligand capable of binding with at least one of the component(s) to be determined; and
- (iv) a ligand capable of binding with at least one of the binding partners of at least one of the component(s) to be determined; and
- (c) directions for the performance of a protocol for the detection and/or determination of one or more components of an immunochemical reaction between the EGFR, the specific binding member, and a specific binding partner thereto.

In accordance with the above, an assay system for screening potential drugs effective to modulate the activity of the EGFR, the aberrant expression or post-translational modification of the EGFR, and/or the activity or binding of the specific binding member may be prepared. The receptor or the binding member may be introduced into a test system, and the prospective drug may also be introduced into the resulting cell culture, and the culture thereafter examined to observe any changes in the S-phase activity of the cells, due either to the addition of the prospective drug alone, or due to the effect of added quantities of the known agent(s).

Nucleic Acids

The present invention further provides an isolated nucleic acid encoding a specific binding member of the present invention. Nucleic acid includes DNA and RNA. In a preferred aspect, the present invention provides a nucleic acid which codes for a polypeptide of the invention as defined above, including a polypeptide as set out as residues 93-102 of SEQ ID NO:2 or 26-35A, 49-64 and 93-102 of SEQ ID NO:2, a polypeptide as set out in residues 24-34, 50-56 and 89-97 of SEQ ID NO:4, and the entire polypeptides of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The present invention also provides constructs in the form of plasmids, vectors, transcription or expression cassettes which comprise at least one polynucleotide as above.

The present invention also provides a recombinant host cell which comprises one or more constructs as above. A nucleic acid encoding any specific binding member as provided itself forms an aspect of the present invention, as does a method of production of the specific binding member which method comprises expression from encoding nucleic acid therefor. Expression may conveniently be achieved by culturing under appropriate conditions recombinant host cells containing the nucleic acid. Following production by expression a specific binding member may be isolated and/or purified using any suitable technique, then used as appropriate.

Specific binding members and encoding nucleic acid molecules and vectors according to the present invention may be provided isolated and/or purified, e.g. from their natural environment, in substantially pure or homogeneous form, or, in the case of nucleic acid, free or substantially free of nucleic acid or genes origin other than the sequence encoding a polypeptide with the required function. Nucleic acid according to the present invention may comprise DNA or RNA and may be wholly or partially synthetic.

Systems for cloning and expression of a polypeptide in a variety of different host cells are well known. Suitable host cells include bacteria, mammalian cells, yeast and baculovirus systems. Mammalian cell lines available in the art for expression of a heterologous polypeptide include Chinese hamster ovary cells, HeLa cells, baby hamster kidney cells, NSO mouse melanoma cells and many others. A common, preferred bacterial host is *E.coli*.

The expression of antibodies and antibody fragments in prokaryotic cells such as *E.coli* is well established in the art. For a review, see for example Plückthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991). Expression in eukaryotic cells in culture is also

available to those skilled in the art as an option for production of a specific binding member, see for recent reviews, for example Raff, M.E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J., et al. (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

Suitable vectors can be chosen or constructed, containing appropriate regulatory sequences, including promoter sequences, terminator sequences, polyadenylation sequences, enhancer sequences, marker genes and other sequences as appropriate. Vectors may be plasmids, viral e.g. phage, or phagemid, as appropriate. For further details see, for example, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2nd edition, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Many known techniques and protocols for manipulation of nucleic acid, for example in preparation of nucleic acid constructs, mutagenesis, sequencing, introduction of DNA into cells and gene expression, and analysis of proteins, are described in detail in *Short Protocols in Molecular Biology*, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992. The disclosures of Sambrook et al. and Ausubel et al. are incorporated herein by reference.

Thus, a further aspect of the present invention provides a host cell containing nucleic acid as disclosed herein. A still further aspect provides a method comprising introducing such nucleic acid into a host cell. The introduction may employ any available technique. For eukaryotic cells, suitable techniques may include calcium phosphate transfection, DEAE-Dextran, electroporation, liposome-mediated transfection and transduction using retrovirus or other virus, e.g. vaccinia or, for insect cells, baculovirus. For bacterial cells, suitable techniques may include calcium chloride transformation, electroporation and transfection using bacteriophage.

The introduction may be followed by causing or allowing expression from the nucleic acid, e.g. by culturing host cells under conditions for expression of the gene.

In one embodiment, the nucleic acid of the invention is integrated into the genome (e.g. chromosome) of the host cell. Integration may be promoted by inclusion of

WO 02/092771

PCT/US02/15185

sequences which promote recombination with the genome, in accordance with standard techniques.

The present invention also provides a method which comprises using a construct as stated above in an expression system in order to express a specific binding member or polypeptide as above.

As stated above, the present invention also relates to a recombinant DNA molecule or cloned gene, or a degenerate variant thereof, which encodes a specific binding member, particularly antibody or a fragment thereof, that possesses an amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2 and/or SEQ ID NO:4; preferably a nucleic acid molecule, in particular a recombinant DNA molecule or cloned gene, encoding the binding member or antibody has a nucleotide sequence or is complementary to a DNA sequence provided in SEQ ID NO: 1 and/or SEQ ID NO:3.

Another feature of this invention is the expression of the DNA sequences disclosed herein. As is well known in the art, DNA sequences may be expressed by operatively linking them to an expression control sequence in an appropriate expression vector and employing that expression vector to transform an appropriate unicellular host.

Such operative linking of a DNA sequence of this invention to an expression control sequence, of course, includes, if not already part of the DNA sequence, the provision of an initiation codon, ATG, in the correct reading frame upstream of the DNA sequence.

A wide variety of host/expression vector combinations may be employed in expressing the DNA sequences of this invention. Useful expression vectors, for example, may consist of segments of chromosomal, non-chromosomal and synthetic DNA sequences. Suitable vectors include derivatives of SV40 and known bacterial plasmids, e.g., *E. coli* plasmids col E1, pCR1, pBR322, pMB9 and their derivatives, plasmids such as RP4; phage DNAs, e.g., the numerous derivatives of phage λ , e.g.,

WO 02/092771

PCT/US02/15185

NM989, and other phage DNA, *e.g.*, M13 and filamentous single stranded phage DNA; yeast plasmids such as the 2 μ plasmid or derivatives thereof; vectors useful in eukaryotic cells, such as vectors useful in insect or mammalian cells; vectors derived from combinations of plasmids and phage DNAs, such as plasmids that have been modified to employ phage DNA or other expression control sequences; and the like.

Any of a wide variety of expression control sequences -- sequences that control the expression of a DNA sequence operatively linked to it -- may be used in these vectors to express the DNA sequences of this invention. Such useful expression control sequences include, for example, the early or late promoters of SV40, CMV, vaccinia, polyoma or adenovirus, the *lac* system, the *trp* system, the *TAC* system, the *TRC* system, the *LTR* system, the major operator and promoter regions of phage λ , the control regions of fd coat protein, the promoter for 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, the promoters of acid phosphatase (*e.g.*, Pho5), the promoters of the yeast α -mating factors, and other sequences known to control the expression of genes of prokaryotic or eukaryotic cells or their viruses, and various combinations thereof.

A wide variety of unicellular host cells are also useful in expressing the DNA sequences of this invention. These hosts may include well known eukaryotic and prokaryotic hosts, such as strains of *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, fungi such as yeasts, and animal cells, such as CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W and L-M cells, African Green Monkey kidney cells (*e.g.*, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, and BMT10), insect cells (*e.g.*, Sf9), and human cells and plant cells in tissue culture.

It will be understood that not all vectors, expression control sequences and hosts will function equally well to express the DNA sequences of this invention. Neither will all hosts function equally well with the same expression system. However, one skilled in the art will be able to select the proper vectors, expression control sequences, and hosts without undue experimentation to accomplish the desired expression without

WO 02/092771

PCT/US02/15185

departing from the scope of this invention. For example, in selecting a vector, the host must be considered because the vector must function in it. The vector's copy number, the ability to control that copy number, and the expression of any other proteins encoded by the vector, such as antibiotic markers, will also be considered.

In selecting an expression control sequence, a variety of factors will normally be considered. These include, for example, the relative strength of the system, its controllability, and its compatibility with the particular DNA sequence or gene to be expressed, particularly as regards potential secondary structures. Suitable unicellular hosts will be selected by consideration of, *e.g.*, their compatibility with the chosen vector, their secretion characteristics, their ability to fold proteins correctly, and their fermentation requirements, as well as the toxicity to the host of the product encoded by the DNA sequences to be expressed, and the ease of purification of the expression products.

Considering these and other factors a person skilled in the art will be able to construct a variety of vector/expression control sequence/host combinations that will express the DNA sequences of this invention on fermentation or in large scale animal culture.

It is further intended that specific binding member analogs may be prepared from nucleotide sequences of the protein complex/subunit derived within the scope of the present invention. Analogs, such as fragments, may be produced, for example, by pepsin digestion of specific binding member material. Other analogs, such as muteins, can be produced by standard site-directed mutagenesis of specific binding member coding sequences. Analogs exhibiting "specific binding member activity" such as small molecules, whether functioning as promoters or inhibitors, may be identified by known *in vivo* and/or *in vitro* assays.

As mentioned above, a DNA sequence encoding a specific binding member can be prepared synthetically rather than cloned. The DNA sequence can be designed with the appropriate codons for the specific binding member amino acid sequence. In

WO 02/092771

PCT/US02/15185

general, one will select preferred codons for the intended host if the sequence will be used for expression. The complete sequence is assembled from overlapping oligonucleotides prepared by standard methods and assembled into a complete coding sequence. See, e.g., Edge, *Nature*, **292**:756 (1981); Nambair et al., *Science*, **223**:1299 (1984); Jay et al., *J. Biol. Chem.*, **259**:6311 (1984).

Synthetic DNA sequences allow convenient construction of genes which will express specific binding member analogs or "muteins". Alternatively, DNA encoding muteins can be made by site-directed mutagenesis of native specific binding member genes or cDNAs, and muteins can be made directly using conventional polypeptide synthesis.

A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins is described in Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science*, **244**:182-188 (April 1989). This method may be used to create analogs with unnatural amino acids.

The present invention extends to the preparation of antisense oligonucleotides and ribozymes that may be used to interfere with the expression of the EGFR at the translational level. This approach utilizes antisense nucleic acid and ribozymes to block translation of a specific mRNA, either by masking that mRNA with an antisense nucleic acid or cleaving it with a ribozyme.

Antisense nucleic acids are DNA or RNA molecules that are complementary to at least a portion of a specific mRNA molecule. (See Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988.) In the cell, they hybridize to that mRNA, forming a double stranded molecule. The cell does not translate an mRNA in this double-stranded form. Therefore, antisense nucleic acids interfere with the expression of mRNA into protein. Oligomers of about fifteen nucleotides and molecules that hybridize to the AUG initiation codon will be particularly efficient, since they are easy to synthesize and are likely to pose fewer problems than larger molecules when introducing them into --

WO 02/092771

PCT/US02/15185

producing cells. Antisense methods have been used to inhibit the expression of many genes *in vitro* (Marcus-Sekura, 1988; Hambor et al., 1988).

Ribozymes are RNA molecules possessing the ability to specifically cleave other single stranded RNA molecules in a manner somewhat analogous to DNA restriction endonucleases. Ribozymes were discovered from the observation that certain mRNAs have the ability to excise their own introns. By modifying the nucleotide sequence of these RNAs, researchers have been able to engineer molecules that recognize specific nucleotide sequences in an RNA molecule and cleave it (Cech, 1988). Because they are sequence-specific, only mRNAs with particular sequences are inactivated.

Investigators have identified two types of ribozymes, *Tetrahymena*-type and "hammerhead"-type. (Hasselhoff and Gerlach, 1988) *Tetrahymena*-type ribozymes recognize four-base sequences, while "hammerhead"-type recognize eleven- to eighteen-base sequences. The longer the recognition sequence, the more likely it is to occur exclusively in the target mRNA species. Therefore, hammerhead-type ribozymes are preferable to *Tetrahymena*-type ribozymes for inactivating a specific mRNA species, and eighteen base recognition sequences are preferable to shorter recognition sequences.

The DNA sequences described herein may thus be used to prepare antisense molecules against, and ribozymes that cleave mRNAs for EGFRs and their ligands.

The invention may be better understood by reference to the following non-limiting Examples, which are provided as exemplary of the invention. The following examples are presented in order to more fully illustrate the preferred embodiments of the invention and should in no way be construed, however, as limiting the broad scope of the invention.

EXAMPLE 1**ISOLATION OF ANTIBODIES****MATERIALS****Cell lines**

For immunization and specificity analyses, several cell lines, native or transfected with either the normal, wild type or "wtEGFR" gene or the Δ EGFR gene carrying the Δ 2-7 deletion mutation were used: Murine fibroblast cell line NR6, NR6 Δ EGFR (transfected with Δ EGFR) and NR6 $_{wtEGFR}$ (transfected with wtEGFR), human glioblastoma cell line U87MG (expressing low levels of endogenous wtEGFR), U87MG $_{wtEGFR}$ (transfected with wtEGFR), U87MG Δ EGFR (transfected with Δ EGFR), and human squamous cell carcinoma cell line A431 (expressing high levels of wtEGFR)[38]. Cell lines and transfections were described previously (Nishikawa R., et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91(16):7727-7731).

The U87MG astrocytoma cell line (20), which endogenously expresses low levels of the wt EGFR, was infected with a retrovirus containing the Δ 2-7 EGFR to produce the U87MG. Δ 2-7 cell line (10). The transfected cell line U87MG.wtEGFR was produced as described in Nagane et al 1996 (Cancer Res., 56: 5079-5086). Whereas U87MG cells express approximately 1×10^5 EGFR, U87MG.wtEGFR cells express approximately 1×10^6 EGFR, and thus mimic the situation seen with gene amplification.

Human squamous carcinoma A431 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD). All cell lines were cultured in DMEM/F-12 with GlutaMAXTM (Life Technologies, Melbourne, Australia) supplemented with 10% FCS (CSL, Melbourne, Australia).

Reagents

Biotinylated unique junctional peptides (Biotin-LEEKKGNVYVTDH (SEQ ID NO: 5) and LEEKKGNVYVTDH-Biotin (SEQ ID NO: 6)) from Δ 2-7 EGFR were

WO 02/092771

PCT/US02/15185

synthesized by standard Fmoc chemistry and purity (>96%) determined by reverse phase HPLC and mass spectral analysis (Auspep, Melbourne, Australia).

Antibodies used in studies

In order to compare our findings with other reagents, additional mAbs were included in our studies. These reagents were mAb 528 to the wtEGFR (Sato, J.D. et al. (1983) Mol. Biol. Med. 1(5):511-529) and DH8.3, which was generated against a synthetic peptide spanning the junctional sequence of the $\Delta 2-7$ EGFR deletion mutation. The DH8.3 antibody (IgG1) has been described previously (Hills et al, 1995, Int. J. Cancer 63(4): 537-543) and was obtained following immunization of mice with the unique junctional peptide found in $\Delta 2-7$ EGFR (16). The 528 antibody, which recognizes both $\Delta 2-7$ and wild type EGFR, has been described previously (21) and was produced in the Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) using a hybridoma obtained from ATCC HB-8509. SC-03 is an affinity purified rabbit polyclonal antibody raised against a carboxy terminal peptide of the EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

GENERATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES

The murine fibroblast line NR6 $_{\Delta EGFR}$ was used as immunogen. Mouse hybridomas were generated by immunizing BALB/c mice five times subcutaneously at 2- to 3-week intervals, with $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ cells in adjuvant. Complete Freund's adjuvant was used for the first injection. Thereafter, incomplete Freund's adjuvant (Difco) was used. Spleen cells from immunized mice were fused with mouse myeloma cell line SP2/0. Supernatants of newly generated clones were screened in hemadsorption assays for reactivity with cell line NR6, NR6 $_{wtEGFR}$, and NR6 $_{\Delta EGFR}$ and then analyzed by hemadsorption assays with human glioblastoma cell lines U87MG, U87MG $_{wtEGFR}$, and U87MG $_{\Delta EGFR}$. Selected hybridoma supernatants were subsequently tested by western blotting and further analyzed by immunohistochemistry. Newly generated mAbs showing the expected reactivity pattern were purified.

Five hybridomas were established and three, clones 124 (IgG2a), 806 (IgG2b) and 1133 (IgG2a) were selected for further characterization based on high titer with NR6 $_{\Delta EGFR}$ and low background on NR6 and NR6 $_{wtEGFR}$ cells in the hemagglutination assay. In a subsequent hemagglutination analysis, these antibodies showed no reactivity (undiluted supernatant $\leq 10\%$) with the native human glioblastoma cell line U87MG and U87MG $_{wtEGFR}$, but were strongly reactive with U87MG $_{\Delta EGFR}$; less reactivity was seen with A431. By contrast, in FACS analysis, 806 was unreactive with native U87MG and intensively stained U87MG $_{\Delta EGFR}$ and to a lesser degree U87MG $_{wtEGFR}$ indicating binding of 806 to both, $\Delta EGFR$ and wtEGFR (see below).

In Western blot assays, mAbs 124, 806 and 1133 were then analyzed for reactivity with wtEGFR and $\Delta EGFR$. Detergent lysates were extracted from NR6 $_{\Delta EGFR}$, U87MG $_{\Delta EGFR}$ as well as from A431. All three mAbs showed a similar reactivity pattern with cell lysates staining both the wtEGFR (170 kDa) and $\Delta EGFR$ protein (140 kDa). As a reference reagent, mAb R.I known to be reactive with the wtEGFR (Waterfield M.D. et al. (1982) J. Cell Biochem. 20(2):149-161) was used instead of mAb 528, which is known to be non-reactive in western blot analysis. Mab R.I showed reactivity with wt and $\Delta EGFR$. All three newly generated clones showed reactivity with $\Delta EGFR$ and less intense with wtEGFR. DH8.3 was solely positive in the lysate of U87MG $_{\Delta EGFR}$ and NR6 $_{\Delta EGFR}$.

The immunohistochemical analysis of clones 124, 806, and 1133 as well as mAb 528 and mAb DH8.3 on xenograft tumors U87MG, U87MG $_{\Delta EGFR}$, and A431 are shown in **Table 1**. All mAbs showed strong staining of xenograft U87MG $_{\Delta EGFR}$. Only mAb 528 showed weak reactivity in the native U87MG xenograft. In A431 xenografts, mAb 528 showed strong homogeneous reactivity. MAb 124, 806, and 1133 revealed reactivity with mostly the basally located cells of the squamous cell carcinoma of A431 and did not react with the upper cell layers or the keratinizing component. DH8.3 was negative in A431 xenografts.

TABLE 1

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Immunohistochemical Analysis of Antibodies 528, DH8.3, and 124, 806 and 1133

Mab	xenograft AU87MG _{wtEGFR}	xenograft A431	xenograft U87MG (native)
528	pos.	pos.	pos. (focal staining)
mAb-124	pos.	pos. (predominantly basal cells)	-
mAb-806	pos.	pos. (predominantly basal cells)	-
mAb-1133	pos.	pos. (predominantly basal cells)	-
DH8.3	pos.	-	-

minor stromal staining due to detection of endogenous mouse antibodies

EXAMPLE 2
BINDING OF ANTIBODIES TO CELL LINES BY FACS

In order to determine the specificity of mAb 806, its binding to U87MG, U87MG.Δ2-7 and U87MG.wtEGFR cells was analyzed by flow activated cell sorting (FACS). Briefly, cells were labelled with the relevant antibody (10 µg/ml) followed by fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100 dilution; Calbiochem San Diego, USA). FACS data was obtained on a Coulter Epics Elite ESP by observing a minimum of 5,000 events and analysed using EXPO (version 2) for Windows. An irrelevant IgG2b was included as an isotype control for mAb 806 and the 528 antibody was included as it recognizes both the Δ2-7 and wt EGFR.

Only the 528 antibody was able to stain the parental U87MG cell line (Figure 1) consistent with previous reports demonstrating that these cells express the wt EGFR (Nishikawa et al, 1994). MAb 806 and DH8.3 had binding levels similar to the control antibody, clearly demonstrating that they are unable to bind the wt receptor (Figure 1). Binding of the isotype control antibody to U87MG.Δ2-7 and U87MG.wtEGFR cells was similar as that observed for the U87MG cells.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

MAb 806 stained U87MG.Δ2-7 and U87MG.wtEGFR cells, indicating that mAb 806 specifically recognizes the de2-7 EGFR and amplified EGFR (**Figure 1**). DH8.3 antibody stained U87MG.Δ2-7 cells, confirming that DH8.3 antibody specifically recognizes the de2-7 EGFR (**Figure 1**). As expected, the 528 antibody stained both the U87MG.Δ2-7 and U87MG.wtEGFR cell lines (**Figure 1**). As expected, the 528 antibody stained U87MG.Δ2-7 with a higher intensity than the parental cell as it binds both the de2-7 and wild type receptors that are co-expressed in these cells (**Figure 1**). Similar results were obtained using a protein A mixed hemadsorption which detects surface bound IgG by appearance of Protein A coated with human red blood cells (group O) to target cells. Monoclonal antibody 806 was reactive with U87MG.Δ2-7 cells but showed no significant reactivity (undiluted supernatant less than 10%) with U87MG expressing wild type EGFR.

EXAMPLE 3

BINDING OF ANTIBODIES IN ASSAYS

To further characterize the specificity of mAb 806 and the DH8.3 antibody, their binding was examined by ELISA. Two types of ELISA were used to determine the specificity of the antibodies. In the first assay, plates were coated with sEGFR (10 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer pH 9.2) for 2 h and then blocked with 2% human serum albumin (HSA) in PBS. sEGFR is the recombinant extracellular domain (amino acids 1-621) of the wild type EGFR, and was produced as previously described (22). Antibodies were added to wells in triplicate at increasing concentration in 2% HSA in phosphate-buffered saline (PBS). Bound antibody was detected by horseradish peroxidase conjugated sheep anti-mouse IgG (Silenus, Melbourne, Australia) using ABTS (Sigma, Sydney, Australia) as a substrate and the absorbance measured at 405 nm.

Both mAb 806 and the 528 antibody displayed dose-dependent and saturating binding curves to immobilized wild type sEGFR (**Figure 2A**). As the unique junctional

WO 02/092771

PCT/US02/15185

peptide found in the de2-7 EGFR is not contained within the sEGFR, mAb 806 must be binding to an epitope located within the wild type EGFR sequence. The binding of the 528 antibody was lower than that observed for mAb 806. As expected the DH8.3 antibody did not bind the wild type sEGFR even at concentrations up to 10 µg/ml (**Figure 2A**). While sEGFR in solution inhibited the binding of the 528 antibody to immobilized sEGFR in a dose-dependent fashion, it was unable to inhibit the binding of mAb 806 (**Figure 2B**). This suggests that mAb 806 can only bind wild type EGFR once immobilized on ELISA plates, a process that may induce conformational changes. Similar results were observed using a BIAcore whereby mAb 806 bound immobilized sEGFR but immobilized mAb 806 was not able to bind sEGFR in solution (data not shown). The DH8.3 antibody exhibited dose-dependent and saturable binding to the unique de2-7 EGFR peptide (**Figure 2C**).

In the second assay, the biotinylated de2-7 specific peptide (Biotin-LEEKKGNVYVTDH (SEQ ID NO: 5)) was bound to ELISA plates precoated with streptavidin (Pierce, Rockford, Illinois). Antibodies were bound and detected as in the first assay. Neither mAb 806 nor the 528 antibody bound to the peptide, even at concentrations higher than those used to obtain saturation binding of DH8.3, further indicating that mAb 806 does not recognize an epitope determinant within this peptide.

To further demonstrate that mAb 806 recognizes an epitope distinct from the junction peptide, additional experiments were performed. C-terminal biotinylated de2-7 peptide (LEEKKGNVYVTDH-Biotin (SEQ ID NO: 6)) was utilized in studies with mAb806 and mAb L8A4, generated against the de2-7 peptide (Reist, CJ et al (1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382; Foulon CF et al. (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460).

Reagents used in Peptide Studies:

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Junction Peptide : LEEKKGNVVTDH-OH (Biosource, Camarillo, CA);
Peptide C: LEEKKGNVVTDH(K-Biot)-OH (Biosource, Camarillo, CA);
sEGFR: CHO-cell-derived recombinant soluble extracellular domain (aa 1-621)
of the wild type EGFR (LICR Melbourne);
mAb 806: mouse monoclonal antibody, IgG_{2b} (LICR NYB);
mAb L8A4: mouse monoclonal antibody, IgG₁ (Duke University);
IgG₁ isotype control mAb ;
IgG_{2b} isotype control mAb

Peptide C was immobilized on a Streptavidin microsensor chip at a surface density of 350RU (+/- 30RU). Serial dilutions of mAbs were tested for reactivity with the peptide. Blocking experiments using non-biotinylated peptide were performed to assess specificity.

mAb L8A4 showed strong reactivity with Peptide C even at low antibody concentrations (6.25 nM) (Figure 2D). mAb 806 did not show detectable specific reactivity with peptide C up to antibody concentrations of 100nM (highest concentration tested) (Figures 2D and 2E). It was expected that mAb L8A4 would react with Peptide C because the peptide was used as the immunogen in the generation of mAb L8A4. Addition of the Junction Peptide (non-biotinylated, 50 ug/ml) completely blocks the reactivity of mAb L8A4 with Peptide C, confirming the antibody's specificity for the junction peptide epitope.

In a second set of BIAcore experiments, sEGFR was immobilized on a CM microsensor chip at a surface density of ~4000RU. Serial dilutions of mAbs were tested for reactivity with sEGFR.

mAb 806 was strongly reactive with denaturated sEGFR while mAb L8A4 did not react with denaturated sEGFR. Reactivity of mAb 806 with denaturated sEGFR decreases with decreasing antibody concentrations. It was expected that mAb L8A4

WO 02/092771

PCT/US02/15185

does not react with sEGFR because mAb L8A4 was generated using the junction peptide as the immunogen and sEGFR does not contain the junction peptide.

Dot-blot immune stain experiments were also performed. Serial dilutions of peptide were spotted in 0.5µl onto a PVDF or nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 2% BSA in PBS, and then probed with 806, L8A4, DH8.3 and control antibodies. Antibodies L8A4 and DH8.3 bound to peptide on the membranes (data not shown). Mab806 did not bind peptide at concentrations where L8A4 clearly showed binding (data not shown). Control antibodies were also negative for peptide binding.

mAb 806 bound to the wtEGFR in cell lysates following immunoblotting (results not shown). This is different from the results obtained with DH8.3 antibody, which reacted with de2-7 EGFR but not wtEGFR. Thus, mAb 806 can recognize the wtEGFR following denaturation but not when the receptor is in its natural state on the cell surface.

EXAMPLE 4

SCATCHARD ANALYSIS

A Scatchard analysis using U87MG.Δ2-7 cells was performed following correction for immunoreactivity in order to determine the relative affinity of each antibody. Antibodies were labelled with ¹²⁵I (Amrad, Melbourne, Australia) by the chloramine T method and immunoreactivity determined by Lindmo assay (23). All binding assays were performed in 1% HSA/PBS on 1-2 x 10⁶ live U87MG.Δ2-7 or A431 cells for 90 min at 4°C with gentle rotation. A set concentration of 10 ng/ml ¹²⁵I-labeled antibody was used in the presence of increasing concentrations of the appropriate unlabeled antibody. Non-specific binding was determined in the presence of 10,000-fold excess of unlabeled antibody. After the incubation was completed, cells were washed and counted for bound ¹²⁵I-labeled antibody using a COBRA II gamma counter (Packard Instrument Company, Meriden, USA).

Both mAb 806 and the DH8.3 antibody retained high immunoreactivity when iodinated and was typically greater than 90% for mAb 806 and 45-50% for the DH8.3 antibody. mAb 806 had an affinity for the de2-7 EGFR receptor of $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ whereas the affinity of DH8.3 was some 10-fold lower at $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Neither ^{125}I -radiolabeled mAb 806 nor the ^{125}I -radiolabeled DH8.3 antibody bound to parental U87MG cells. mAb 806 recognized an average of 2.4×10^5 binding sites per cell with the DH8.3 antibody binding an average of 5.2×10^5 sites. Thus, there was not only good agreement in receptor number between the antibodies, but also with a previous report showing 2.5×10^5 de2-7 receptors per cell as measured by a different de2-7 EGFR specific antibody on the same cell line (25).

EXAMPLE 5

INTERNALIZATION OF ANTIBODIES BY U87MG. Δ 2-7 CELLS

The rate of antibody internalization following binding to a target cell influences both its tumor targeting properties and therapeutic options. Consequently, the inventors examined the internalization of mAb 806 and the DH8.3 antibody following binding to U87MG. Δ 2-7 cells by FACS. U87MG. Δ 2-7 cells were incubated with either mAb 806 or the DH8.3 antibody (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 1 h in DMEM at 4°C. After washing, cells were transferred to DMEM pre-warmed to 37°C and aliquots taken at various time points following incubation at 37°C. Internalization was stopped by immediately washing aliquots in ice-cold wash buffer (1% HSA/PBS). At the completion of the time course cells were stained by FACS as described above. Percentage internalization was calculated by comparing surface antibody staining at various time points to zero time using the formula: percent antibody internalized = (mean fluorescence at time x background fluorescence)/(mean fluorescence at time 0 - background fluorescence) x 100. This method was validated in one assay using an iodinated antibody (mAb 806) to measure internalization as previously described (24). Differences in internalization rate at different time points were compared using Student's t-test.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Both antibodies showed relatively rapid internalization reaching steady-state levels at 10 min for mAb 806 and 30 min for DH8.3 (Figure 3). Internalization of DH8.3 was significantly higher both in terms of rate (80.5% of DH8.3 internalized at 10 min compared to 36.8% for mAb 806, $p < 0.01$) and total amount internalized at 60 min (93.5% versus 30.4%, $p < 0.001$). mAb 806 showed slightly lower levels of internalization at 30 and 60 min compared to 20 min in all 4 assays performed (Figure 3). This result was also confirmed using an internalization assay based on iodinated mAb 806.

EXAMPLE 6

ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS OF ANTIBODY INTERNALIZATION

Given the above noted difference in internalization rates between the antibodies, a detailed analysis of antibody intracellular trafficking was performed using electron microscopy.

U87MG.Δ2-7 cells were grown on gelatin coated chamber slides (Nunc, Naperville, IL) to 80% confluence and then washed with ice cold DMEM. Cells were then incubated with mAb 806 or the DH8.3 antibody in DMEM for 45 min at 4°C. After washing, cells were incubated for a further 30 min with gold-conjugated (20 nm particles) anti-mouse IgG (BBInternational, Cardiff, UK) at 4°C. Following a further wash, pre-warmed DMEM/10% FCS was added to the cells, which were incubated at 37°C for various times from 1-60 min. Internalization of the antibody was stopped by ice-cold media and cells fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS/0.1 % HSA and then post-fixed in 2.5% osmium tetroxide. After dehydration through a graded series of acetone, samples were embedded in Epon/ Araldite resin, cut as ultra-thin sections with a Reichert Ultracut-S microtome (Leica) and collected on nickel grids. The sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before being viewed on a

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Philips CM12 transmission electron microscope at 80 kV. Statistical analysis of gold grains contained within coated pits was performed using a Chi-square test.

While the DH8.3 antibody was internalized predominantly via coated-pits, mAb 806 appeared to be internalized by macropinocytosis (Figure 19). In fact, a detailed analysis of 32 coated pits formed in cells incubated with mAb 806 revealed that none of them contained antibody. In contrast, around 20% of all coated-pits from cells incubated with DH8.3 were positive for antibody, with a number containing multiple gold grains. A statistical analysis of the total number of gold grains contained within coated-pits found that the difference was highly significant ($p < 0.01$). After 20-30 min both antibodies could be seen in structures that morphologically resemble lysosomes. The presence of cellular debris within these structures was also consistent with their lysosome nature.

EXAMPLE 7

BIODISTRIBUTION OF ANTIBODIES IN TUMOR BEARING NUDE MICE

The biodistribution of mAb 806 and the DH8.3 antibody was compared in nude mice containing U87MG xenografts on one side and U87MG.Δ2-7 xenografts on the other. A relatively short time period was chosen for this study as a previous report demonstrated that the DH8.3 antibody shows peak levels of tumor targeting between 4-24 h (16).

Tumor xenografts were established in nude BALB/c mice by s.c. injection of 3×10^6 U87MG, U87MG.Δ2-7 or A431 cells. de2-7 EGFR expression in U87MG.Δ2-7 xenografts remained stable throughout the period of biodistribution. Also, A431 cells retained their mAb 806 reactivity when grown as tumor xenografts as determined by immunohistochemistry (data not shown). U87MG or A431 cells were injected on one side 7-10 days before U87MG.Δ2-7 cells were injected on the other side because of the faster growth rate observed for de2-7 EGFR expressing xenografts. Antibodies were radiolabeled and assessed for immunoreactivity as described above and were

injected into mice by the retro-orbital route when tumors were 100-200 mg in weight. Each mouse received two different antibodies (2 µg per antibody): 2 µCi of ¹²⁵I-labeled mAb 806 and 2 µCi of ¹³¹I labelled DH8.3 or 528. Unless indicated, groups of 5 mice were sacrificed at various time points post-injection and blood obtained by cardiac puncture. The tumors, liver, spleen, kidneys and lungs were obtained by dissection. All tissues were weighed and assayed for ¹²⁵I and ¹³¹I activity using a dual-channel counting Window. Data was expressed for each antibody as % ID/g tumor determined by comparison to injected dose standards or converted into tumor to blood/liver ratios (i.e. % ID/g tumor divided by % ID/g blood or liver). Differences between groups were analysed by Student's t-test.

In terms of % ID/g tumor, mAb 806 reached its peak level in U87MG.Δ2-7 xenografts of 18.6 % m/g tumor at 8 h (**Figure 4A**), considerably higher than any other tissue except blood. While DH 8.3 also showed peak tumor levels at 8 h, the level was a statistically ($p < 0.001$) lower 8.8 % m/g tumor compared to mAb 806 (**Figure 4B**). Levels of both antibodies slowly declined at 24 and 48 h. Neither antibody showed specific targeting of U87MG parental xenografts (**Figure 4A,B**). With regards to tumor to blood/liver ratios, mAb 806 showed the highest ratio at 24 h for both blood (ratio of 1.3) and liver (ratio of 6.1) (**Figure 5A,B**). The DH8.3 antibody had its highest ratio in blood at 8 h (ratio of 0.38) and at 24 h in liver (ratio of 1.5) (**Figure 5 A,B**), both of which are considerably lower than the values obtained for mAb 806.

As described above, levels of mAb 806 in the tumor peaked at 8 hours. While this peak is relatively early compared to many tumor-targeting antibodies, it is completely consistent with other studies using de2-7 EGFR specific antibodies which all show peaks at 4-24 hours post-injection when using a similar dose of antibody (16, 25, 33). Indeed, unlike the earlier reports, the 8 h time point was included on the assumption that antibody targeting would peak rapidly. The % ID/g tumor seen with mAb 806 was similar to that reported for other de2-7 EGFR specific antibodies when using standard iodination techniques (16, 24, 32). The reason for the early peak is probably

WO 02/092771

PCT/US02/15185

two-fold. Firstly, tumors expressing the de2-7 EGFR, including the transfected U87MG cells, grow extremely rapidly as tumor xenografts. Thus, even during the relatively short period of time used in these biodistribution studies, the tumor size increases to such an extent (5-10 fold increase in mass over 4 days) that the % ID/g tumor is reduced compared with slow growing tumors. Secondly, while internalization of mAb 806 was relatively slow compared to DH8.3, it is still rapid with respect to many other tumor antibody/antigen systems. Internalized antibodies undergo rapid proteolysis with the degradation products being excreted from the cell (34). This process of internalization, degradation and excretion reduces the amount of iodinated antibody retained within the cell. Consequently, internalizing antibodies display lower levels of targeting than their non-internalizing counterparts. The electron microscopy data reported herein demonstrates that internalized mAb 806 is rapidly transported to lysosomes where rapid degradation presumably occurs. This observation is consistent with the swift expulsion of iodine from the cell.

The previously described L8A4 monoclonal antibody directed to the unique junctional peptide found in the de2-7 EGFR, behaves in a similar fashion to mAb 806 (35). Using U87MG cells transfected with the de2-7 EGFR, this antibody had a similar internalization rate (35% at 1 hour compared to 30% at 1 hour for mAb 806) and displayed comparable *in vivo* targeting when using 3T3 fibroblasts transfected with de2-7 EGFR (peak of 24 % ID/g tumor at 24 hours compared to 18 % ID/g tumor at 8 hours for mAb 806) (25). Interestingly, *in vivo* retention of this antibody in tumor xenografts was enhanced when labeled with N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridine carboxylate (25). This labeled prosthetic group is positively charged at lysosomal pH and thus has enhanced cellular retention (33). Enhanced retention is potentially useful when considering an antibody for radioimmunotherapy and this method could be used to improve retention of iodinated mAb 806 or its fragments.

EXAMPLE 8

BINDING OF mAb 806 TO CELLS CONTAINING AMPLIFIED EGFR

To examine if mAb 806 could recognize the EGFR expressed in cells containing an amplified receptor gene, its binding to A431 cells was analysed. As described previously, A431 cells are human squamous carcinoma cells and express high levels of wtEGFR. Low, but highly reproducible, binding of mAb 806 to A431 cells was observed by FACS analysis (Figure 6). The DII8.3 antibody did not bind A431 cells, indicating that the binding of mAb 806 was not the result of low level de2-7 EGFR expression (Figure 6). As expected, the anti-EGFR 528 antibody showed strong staining of A431 cells (Figure 6). Given this result, binding of mAb 806 to A431 was characterized by Scatchard analysis. While the binding of iodinated mAb 806 was comparatively low, it was possible to get consistent data for Scatchard. The average of such experiments gave a value for affinity of $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ with 2.4×10^5 receptors per cell. Thus the affinity for this receptor was some 10-fold lower than the affinity for the de2-7 EGFR. Furthermore, mAb 806 appears to only recognize a small portion of EGFR found on the surface of A431 cells. Using the 528 antibody, the inventors measured approximately 2×10^6 receptors per cell which is in agreement with numerous other studies(26).

Recognition of the wild type sEGFR by mAb 806 clearly requires some denaturation of the receptor in order to expose the epitope. The extent of denaturation required is only slight as even absorption of the wild type sEGFR on to a plastic surface induced robust binding of mAb 806 in ELISA assays. As mAb 806 only bound approximately 10% of the EGFR on the surface of A431 cells, it is tempting to speculate that this subset of receptors may have an altered conformation similar to that induced by the de2-7 EGFR truncation. Indeed, the extremely high expression of the EGFR mediated by gene amplification in A431 cells, may cause some receptors to be incorrectly processed leading to altered conformation. Interestingly, semi-quantitative immunoblotting of A431 cell lysates with mAb 806 showed that it could recognize most of the A431 EGF receptors following SDS-PAGE and western transfer. This result further supports the argument that mAb 806 is binding to a subset of receptors on the surface of A431 cells that have an altered conformation. These observations in A431 cells are consistent with the immunohistochemistry data demonstrating that

mAb 806 binds gliomas containing amplification of the EGFR gene. As mAb 806 binding was completely negative on parental U87MG cells it would appear this phenomenon may be restricted to cells containing amplified EGFR although the level of "denatured" receptor on the surface of U87MG cells may be below the level of detection. However, this would seem unlikely as iodinated mAb 806 did not bind to U87MG cell pellets containing up to 1×10^7 cells.

EXAMPLE 9

IN VIVO TARGETING OF A431 CELLS BY Mab 806

A second biodistribution study was performed with mAb 806 to determine if it could target A431 tumor xenografts. The study was conducted over a longer time course in order obtain more information regarding the targeting of U87MG.Δ2-7 xenografts by mAb 806, which were included in all mice as a positive control. In addition, the anti-EGFR 528 antibody was included as a positive control for the A431 xenografts, since a previous study demonstrated low but significant targeting of this antibody to A431 cells grown in nude mice (21).

During the first 48 h, mAb 806 displayed almost identical targeting properties as those observed in the initial experiments (Figure 7A compared with Figure 4A). In terms of % ID/g tumor, levels of mAb 806 in U87MG.Δ2-7 xenografts slowly declined after 24 h but always remained higher than levels detected in normal tissue. Uptake in the A431 xenografts was comparatively low, however there was a small increase in % ID/g tumor during the first 24 h not observed in normal tissues such as liver, spleen, kidney and lung (Figure 7A). Uptake of the 528 antibody was very low in both xenografts when expressed as % ID/g tumor (Figure 7B) partially due to the faster clearance of this antibody from the blood. In terms of tumor to blood ratio mAb 806 peaked at 72 h for U87MG.Δ2-7 xenografts and 100 h for A431 xenografts (Figure 8A,B). While the tumor to blood ratio for mAb 806 never surpassed 1.0 with respect to the A431 tumor, it did increase throughout the entire time course (Figure 8B) and

WO 02/092771

PCT/US02/15185

was higher than all other tissues examined (data not shown) indicating low levels of targeting.

The tumor to blood ratio for the 528 antibody showed a similar profile to mAb 806 although higher levels were noted in the A431 xenografts (Figure 8A,B). mAb 806 had a peak tumor to liver ratio in U87MG.Δ2-7 xenografts of 7.6, at 72 h, clearly demonstrating preferential uptake in these tumors compared to normal tissue (Figure 8C). Other tumor to organ ratios for mAb 806 were similar to those observed in the liver (data not shown). The peak tumor to liver ratio for mAb 806 in A431 xenografts was 2.0 at 100 h, again indicating a slight preferential uptake in tumor compared with normal tissue (Figure 8D).

EXAMPLE 10

THERAPY STUDIES

The effects of mAb806 were assessed in two xenograft models of disease -- a preventative model and an established tumor model.

Xenograft Models

Consistent with previous reports (Nishikawa et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(16); 7727-7731) U87MG cells transfected with de2-7 EGFR grew more rapidly than parental cells and U87MG cells transfected with the wt EGFR. Therefore, it was not possible to grow both cell types in the same mice.

3×10^6 tumor cells in 100 µl of PBS were inoculated subcutaneously, into both flanks of 4 – 6 week old female nude mice (Animal Research Centre, Western Australia, Australia). Therapeutic efficacy of mAb 806 was investigated in both preventative and established tumor models. In the preventative model, 5 mice with 2 xenografts each were treated intraperitoneally, with either 1 or 0.1 mg of mAb 806 or vehicle (PBS) starting the day before tumor cell inoculation. Treatment was continued for a total of 6 doses, 3 times per week for 2 weeks. In the established model, treatment

was started when tumors had reached a mean volume of $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ (U87MG.Δ2-7), $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ (U87MG), $73 \pm 7.5 \text{ mm}^3$ (U87MG.wtBGF) or $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$ (A431 tumors). Tumor volume in mm^3 was determined using the formula $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$, where length was the longest axis and width the measurement at right angles to the length (Scott et al, 2000). Data was expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E. for each treatment group. Statistical analysis was performed at given time points using Student's t test. Animals were euthanased when the xenografts reached an approximate volume of 1.5 cm^3 and the tumors excised for histological examination. This research project was approved by the Animal Ethics Committee of the Austin and Repatriation Medical Centre.

Histological Examination of Tumor Xenografts

Xenografts were excised and bisected. One half was fixed in 10% formalin/PBS before being embedded in paraffin. Four micron sections were then cut and stained with haematoxylin and eosin (H&E) for routine histological examination. The other half was embedded in Tissue Tek® OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Thin (5 micron) cryostat sections were cut and fixed in ice-cold acetone for 10 min followed by air drying for a further 10 min. Sections were blocked in protein blocking reagent (Lipshaw Immunon, Pittsburgh U.S.A.) for 10 min and then incubated with biotinylated primary antibody (1 mg/ml), for 30 min at room temperature (RT). All antibodies were biotinylated using the ECL protein biotinylation module (Amersham, Baulkham Hills, Australia), as per the manufactures instructions. After rinsing with PBS, sections were incubated with a streptavidin horseradish peroxidase complex for a further 30 min (Silenus, Melbourne, Australia). Following a final PBS wash the sections were exposed to 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) substrate (0.1 M acetic acid, 0.1 M sodium acetate, 0.02 M AEC (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)) in the presence of hydrogen peroxide for 30 min. Sections were rinsed with water and counterstained with hematoxylin for 5 min and mounted.

Efficacy of mAb 806 in Preventative Model

MAB 806 was examined for efficacy against U87MG and U87MG. Δ 2-7 tumors in a preventative xenograft model. Antibody or vehicle were administered i.p. the day before tumor inoculation and was given 3 times per week for 2 weeks. MAB 806 had no effect on the growth of parental U87MG xenografts, which express the wt EGFR, at a dose of 1 mg per injection (**Figure 9A**). In contrast, mAb 806 significantly inhibited the growth of U87MG. Δ 2-7 xenografts in a dose dependent manner (**Figure 9B**). At day 20, when control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1637 \pm 178.98 \text{ mm}^3$ for the control group, a statistically smaller $526 \pm 94.74 \text{ mm}^3$ for the 0.1 mg per injection group ($p < 0.0001$) and $197 \pm 42.06 \text{ mm}^3$ for the 1 mg injection group ($p < 0.0001$). Treatment groups were sacrificed at day 24 at which time the mean tumor volumes was $1287 \pm 243.03 \text{ mm}^3$ for the 0.1 mg treated group and $492 \pm 100.8 \text{ mm}^3$ for the 1 mg group.

Efficacy of mAb 806 in Established Xenograft Model

Given the efficacy of mAb 806 in the preventative xenograft model, its ability to inhibit the growth of established tumor xenografts was then examined. Antibody treatment was as described in the preventative model except that it commenced when tumors had reached a mean tumor volume of $65 \pm 6.42 \text{ mm}^3$ for the U87MG. Δ 2-7 xenografts and $84 \pm 9.07 \text{ mm}^3$ for the parental U87MG xenografts. Once again, mAb 806 had no effect on the growth of parental U87MG xenografts at a dose of 1 mg per injection (**Figure 10A**). In contrast, mAb 806 significantly inhibited the growth of U87MG. Δ 2-7 xenografts in a dose dependent manner (**Figure 10B**). At day 17, one day before control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $935 \pm 215.04 \text{ mm}^3$ for the control group, $386 \pm 57.51 \text{ mm}^3$ for the 0.1 mg per injection group ($p < 0.01$) and $217 \pm 58.17 \text{ mm}^3$ for the 1 mg injection group ($p < 0.002$).

To examine whether the growth inhibition observed with mAb 806 was restricted to cell expressing Δ 2-7 EGFR, its efficacy against U87MG.wtEGFR tumor xenografts was examined in an established model. These cells serve as a model for tumors containing amplification of the EGFR gene without Δ 2-7 EGFR expression. MAB 806 treatment commenced when tumors had reached a mean tumor volume of $73 \pm$

WO 02/092771

PCT/US02/15185

7.5 mm³. mAb 806 significantly inhibited the growth of established U87MG.wtEGFR xenografts when compared to control tumors treated with vehicle (Figure 10C). On the day control animals were sacrificed, the mean tumor volume was 960 ± 268.9 mm³ for the control group and 468 ± 78.38 mm³ for the group treated with 1 mg injections ($p < 0.04$).

Histological and Immunohistochemical Analysis of Established Tumors

To evaluate potential histological differences between mAb 806-treated and control U87MG. Δ 2-7 and U87MG.wtEGFR xenografts (collected at days 24 and 42 respectively), formalin-fixed, paraffin embedded sections were stained with H&E. Areas of necrosis were seen in sections from both U87MG. Δ 2-7 (collected 3 days after treatment finished), and U87MG.wtEGFR xenografts (collected 9 days after treatment finished) treated with mAb 806. This result was consistently observed in a number of tumor xenografts ($n=4$). However, analysis of sections from xenografts treated with control did not display the same areas of necrosis seen with mAb 806 treatment. Sections from mAb 806 or control treated U87MG xenografts were also stained with H&E and revealed no differences in cell viability between the two groups, further supporting the hypothesis that mAb 806 binding induces decreased cell viability/necrosis within tumor xenografts.

An immunohistochemical analysis of U87MG, U87MG. Δ 2-7 and U87MG.wtEGFR xenograft sections was performed to determine the levels of de2-7 and wt EGFR expression following mAb806 treatment. Sections were collected at days 24 and 42 as above, and were immunostained with the 528 or 806 antibodies. As expected the 528 antibody stained all xenograft sections with no obvious decrease in intensity between treated and control tumors. Staining of U87MG sections was undetectable with the mAb 806, however positive staining of U87MG. Δ 2-7 and U87MG.wtEGFR xenograft sections was observed. There was no difference in mAb 806 staining density between control and treated U87MG. Δ 2-7 and U87MG.wtEGFR xenografts suggesting that antibody treatment does not down regulate de2-7 or wt EGFR expression.

Treatment of A431 Xenografts with mAb 806

To demonstrate that the anti-tumor effects of mAb 806 were not restricted to U87MG cells, the antibody was administered to mice with A431 xenografts. These cells contain an amplified EGFR gene and express approximately 2×10^6 receptors per cell. As described above, mAb 806 binds about 10% of these EGFR and targets A431 xenografts. MAb 806 significantly inhibited the growth of A431 xenografts when examined in the previously described preventative xenograft model (Figure 11A). At day 13, when control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1385 \pm 147.54 \text{ mm}^3$ in the control group and $260 \pm 60.33 \text{ mm}^3$ for the 1 mg injection treatment group ($p < 0.0001$).

In a separate experiment, a dose of 0.1 mg mAb also significantly inhibited the growth of A431 xenografts in a preventative model.

Given the efficacy of mAb 806 in the preventative A431 xenograft model, its ability to inhibit the growth of established tumor xenografts was examined. Antibody treatment was as described in the preventative model except it was not started until tumors had reached a mean tumor volume of $201 \pm 19.09 \text{ mm}^3$. MAb 806 significantly inhibited the growth of established tumor xenografts (Figure 11B). At day 13, when control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1142 \pm 120.06 \text{ mm}^3$ for the control group and $451 \pm 65.58 \text{ mm}^3$ for the 1 mg injection group ($p < 0.0001$).

In summary, the therapy studies with mAb 806 described here clearly demonstrated dose dependent inhibition of U87MG. Δ 2-7 xenograft growth. In contrast, no inhibition of parental U87MG xenografts was observed despite the fact they continue to express the wt EGFR in vivo. MAb 806 not only significantly reduced xenograft volume, it also induced significant necrosis within the tumor. This is the first report showing the successful therapeutic use of such an antibody in vivo against a human Δ 2-7 EGFR expressing glioma xenografts.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Gene amplification of the EGFR has been reported in a number of different tumors and is observed in approximately 50% of gliomas (Voldberg et al, 1997). It has been proposed that the subsequent EGFR over-expression mediated by receptor gene amplification may confer a growth advantage by increasing intracellular signalling and cell growth (Filmus et al, 1987). The U87MG cell line was transfected with the wt EGFR in order to produce a glioma cell that mimics the process of EGFR gene amplification. Treatment of established U87MG.wtEGFR xenografts with mAb 806 resulted in significant growth inhibition. Thus, mAb 806 also mediates in vivo anti-tumor activity against cells containing amplification of the EGFR gene. Interestingly, mAb 806 inhibition of U87MG.wtEGFR xenografts appears to be less effective than that observed with U87MG. Δ 2-7 tumors. This probably reflects the fact that mAb 806 has a lower affinity for the amplified EGFR and only binds a small proportion of receptors expressed on the cell surface. However, it should be noted that despite the small effect on U87MG.wtEGFR xenograft volumes, mAb 806 treatment produced large areas of necrosis within these xenografts. To rule out the possibility that mAb 806 only mediates inhibition of the U87MG derived cell lines we tested its efficacy against A431 xenografts. This squamous cell carcinoma derived cell line contains significant EGFR gene amplification which is retained both in vitro and in vivo. Treatment of A431 xenografts with mAb 806 produced significant growth inhibition in both a preventative and established model, indicating the anti-tumor effects of mAb 806 are not restricted to transfected U87MG cell lines.

EXAMPLE 11

COMBINATION THERAPY TREATMENT OF A431 XENOGRAPTS WITH MAb806 AND AG1478

The anti-tumor effects of mAb 806 combined with AG1478 was tested in mice with A431 xenografts. AG1478 (4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline) is a potent and selective inhibitor of the EGFR kinase versus HER2-neu and platelet-derived growth factor receptor kinase (Calbiochem Cat. No. 658552). Three controls were included: treatment with vehicle only, vehicle + mAb806 only and vehicle +

WO 02/092771

PCT/US02/15185

AG1478 only. The results are illustrated in **Figure 12**. 0.1mg mAb806 was administered at 1 day prior to xenograft and 1, 3, 6, 8 and 10 days post xenograft. 400 µg AG1478 was administered at 0, 2, 4, 7, 9, and 11 days post xenograft.

Both AG1478 and mAb806, when administered alone produced a significant reduction of tumor volume. However, in combination, the reduction of tumor volume was greatly enhanced.

In addition, the binding of mAb806 to EGFR of A431 cells was evaluated in the absence and presence of AG1478. Cells were placed in serum free media overnight, then treated with AG1478 for 10 min at 37°C, washed twice in PBS then lysed in 1% Triton and lysates prepared. The lysates were prepared as described in Example 20 herein. Lysate was then assessed for 806 reactivity by an ELISA is a modified version of an assay described by Schooler and Wiley, Analytical Biochemistry 277,135-142 (2000). Plates were coated with 10 µg/ml of mAb 806 in PBS/EDTA overnight at room temperature and then washed twice. Plates were then blocked with 10% serum albumin/PBS for 2 hours at 37°C and washed twice. A 1:20 cell lysate was added in 10% serum albumin/PBS for 1 hour at 37°C, then washed four times. Anti-EGFR (SC-03 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)) in 10% serum albumin/PBS was reacted 90 min at room temperature, the plate washed four times, and anti-rabbit-HRP (1:2000 if from Silenus) in 10% serum albumin/PBS was added for 90 min at room temperature, washed four times, and color developed using ABTS as a substrate. It was found that mAb806 binding is significantly increased in the presence of increasing amounts of AG1478 (**Figure 13**).

EXAMPLE 12

IMMUNOREACTIVITY IN HUMAN GLIOBLASTOMAS PRE-TYPED FOR EGFR STATUS

Given the high incidence of EGFR expression, amplification and mutation in glioblastomas, a detailed immunohistochemical study was performed in order to assess the specificity of 806 in tumors other than xenografts. A panel of 16 glioblastomas was analyzed by immunohistochemistry. This panel of 16 glioblastomas was pre-typed by RT-PCR for the presence of amplified wild-type EGFR and de2-7 EGFR expression. Six of these tumors expressed only the wt EGFR transcript, 10 had wtEGFR gene amplification with 5 of these showing wild-type EGFR transcripts only, and 5 both wild-type EGFR and de2-7 gene transcript. Immunohistochemical analysis was performed using 5mm sections of fresh frozen tissue applied to histology slides and fixed for 10 minutes in cold acetone. Bound primary antibody was detected with biotylated horse anti-mouse antibody followed by an avidin-biotin-complex reaction. Diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) was used as chromogen. The extent of the immunohistochemical reactivity in tissues was estimated by light microscopy and graded according to the number of immunoreactive cells in 25% increments as follows:

Focal = less than 5%

+ = 5-25%

++ = 25-50%

+++ = 50-75%

++++ = >75%

The 528 antibody showed intense reactivity in all tumors, while DH 8.3 immunostaining was restricted to those tumors expressing the de2-7 EGFR (Table 2). Consistent with the previous observations in FACS and rosetting assays, mAb 806 did not react with the glioblastomas expressing the wtEGFR transcript from non-amplified EGFR genes (Table 2). This pattern of reactivity for mAb 806 is similar to that observed in the xenograft studies and again suggests that this antibody recognizes the de2- 7 and amplified EGFR but not the wtEGFR when expressed on the cell surface.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

TABLE 2

Immunoreactivity of MAbs 528, DH8.3 and 806 on glioblastomas pretyped for the presence of wild type EGFR and mutated de2-7 EGFR and for their amplification status.

Amplification	de2-7 EGFR Expression	528	DH 8.3	806
	No	++++	-	-
	No	++++	-	-*
	No	++++	-	-
	No	++	-	-
	No	+++	-	-
	No	++++	-	-
Yes	No	++++	-	++++
Yes	No	++++	-	+
Yes	No	++++	-	+++
Yes	No	++++	-	++++
Yes	No	++++	-	+ - ++++
Yes	Yes	++++	++++	++++
Yes	Yes	++++	++++	++++
Yes	Yes	++++	++++	++++
Yes	Yes	++++	++++	++++
Yes	Yes	++++	++	++

* focal staining

EXAMPLE 13**EGFR IMMUNOREACTIVITY IN NORMAL TISSUE**

In order to determine if the de2-7 EGFR is expressed in normal tissue, an immunohistochemical study with mAb 806 and DH8.3 was conducted in a panel of 25 tissues. There was no strong immunoreactivity with either mAb 806 or DH8.3 in any tissue tested, suggesting that the de2-7 EGFR is absent in normal tissues (Table 3). There was some variable staining present in tonsils with mAb 806 that was restricted to the basal cell layer of the epidermis and mucosal squamous cells of the epithelium. In placenta, occasional immunostaining of the trophoblast epithelium was observed. Interestingly, two tissues that express high endogenous levels of wtEGFR, the liver and skin, failed to show any significant mAb 806 reactivity. No reactivity was observed with the liver samples at all, and only weak and inconsistent focal reactivity was detected occasionally (in no more than 10% of all samples studied) in basal keratinocytes in skin samples and in the squamous epithelium of the tonsil mucosa, further demonstrating that this antibody does not bind the wtEGFR expressed on the surface of cells to any significant extent (Table 3). All tissues were positive for the wtEGFR as evidenced by the universal staining seen with the 528 antibody (Table 3).

WO 02/092771

PCT/US02/15185

TABLE 3

Reactivity of 582, DH8.3 and 806 on normal tissues.

TISSUE	582	DH8.3	806
Esophagus	pos	-	-
Stomach	pos	-	-
Duodenum	pos	-	-
Small intestine/duodenum	pos	-	-
Colon	pos	-	-
Liver	pos	-	-
Salivary glands (parotid)	pos	-	-
Kidney	pos	-	-
Urinary bladder	pos	-	-
Prostate	pos	-	-
Testis	pos	-	-
Uterus (cx/endom)	pos	- ³⁶	-
Fallopian tube	pos	-	-
Ovary	pos	-	-
Breast	pos	-*	-
Placenta	pos	-	-
Peripheral nerve	pos	-	-
Skeletal muscle	pos	-	-
Thyroid gland	pos	-	-
Lymph node	pos	-	-
Spleen	pos	-	-
Tonsil	pos	-	- occ. weak reactivity of basal layer of squamous epithelium
Heart	pos	-	-
Lung	pos	-	-
Skin	pos	-	- occ. weak reactivity of basal layer of squamous epithelium

* some stromal staining in various tissue

EXAMPLE 14**EGFR IMMUNOREACTIVITY IN VARIOUS TUMORS**

The extent of de2-7 EGFR in other tumor types was examined using a panel of 12 different malignancies. The 528 antibody showed often homogeneous staining in many tumors analysed except melanoma and seminoma. When present, DH8.3 immunoreactivity was restricted to the occasional focal tumor cell indicating there is little if any de2-7 EGFR expression in tumors outside the brain using this detection system (**Table 4**). There was also focal staining of blood vessels and a varying diffuse staining of connective tissue with the DH8.3 antibody in some tumors (**Table 4**). This staining was strongly dependent on antibody concentration used and was considered nonspecific background reactivity. The mAb 806 showed positive staining in 64% of head and neck tumors and 50% of lung carcinomas (**Table 4**). There was little mAb 806 reactivity elsewhere except in urinary tumors that were positive in 30% of cases. Since the head and neck and lung cancers were negative for the DH8.3 antibody the reactivity seen with the mAb in these tumors maybe associated with EGFR gene amplification.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

TABLE 4

Monoclonal antibodies 528, DH8.3 and 806 on tumor panel.

Tumor	528	DH8.3	806
Malignant melanoma	0/10	0/10	0/10
metastases			
Urinary bladder (cc, sqcc, adeno)	10/10 (7x++++, 2x+++, 1x+)	0/10*	3/10* (2x++++, 1x++)
Mammary gland	6/10 (3x++++, 3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
Head + neck cancer (sqcc)	11/11 (x+++ - 10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++, 3x+++, 1x+)
Lung (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 (10x++++, 1x+++)	0/12*	6/12 (3x++++, 3x+++)
Leiomyosarcoma	5/5 (4x++++, 1x+)	0/5	0/5
Liposarcoma	5/5 (2x + 3x +++)	0/5	0/5*
Synovial sarcoma	4/5* (4x +++)	0/5	0/5*
Mffh Malignant fibrous histiocytoma	4/5*	0/5*	0/5*
Colonic carcinoma	10/10 (2x++++, 1x+)	0/10*	0/10
Serous carcinoma	1/10*	1/10*	0/10
Ovary (serous-papillary)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5

*focal staining

EXAMPLE 15
IMMUNOREACTIVITY IN HUMAN GLIOBLASTOMAS UNSELECTED
FOR EGFR STATUS

In order to confirm the unique specificity and to evaluate the reactivity of mAb 806, it was compared to the 528 and DH8.3 antibodies in a panel of 46 glioblastomas not preselected for their EGFR status. The 528 antibody was strongly and homogeneously positive in all samples except two (No.27 and 29) (44/46, 95.7%). These two cases were also negative for mAb806 and mAb DH8.3. The mAb 806 was positive in 27/46 (58.7%) cases, 22 of which displayed homogeneous immunoreactivity in more than 50% of the tumor.. The DH8.3 antibody was positive in 15/46 (32.6%) glioblastomas, 9 of which showed homogeneous immunoreactivity. The immunochemical staining of these unselected tumors is tabulated in **Table 5**.

There was concordance between mAb 806 and DH8.3 in every case except one (No.35).

A molecular analysis for the presence of EGFR amplification was done in 44 cases (**Table 5**). Of these, 30 cases co-typed with the previously established mAb 806 immunoreactivity pattern: e.g. 16 mAb 806-negative cases revealed no EGFR amplification and 14 EGFR-amplified cases were also mAb 806 immunopositive. However, 13 cases, which showed 806 immunoreactivity, were negative for EGFR amplification while 1 EGFR-amplified case was mAb 806 negative. Further analysis of the mutation status of these amplification negative and 806 positive cases is described below and provides explanation for most of the 13 cases which were negative for EGFR amplification and were recognized by 806.

Subsequently, a molecular analysis of the deletion mutation by RT-PCR was performed on 41/46 cases (**Table 5**). Of these, 34 cases co-typed with DH8.3 specific

WO 02/092771

PCT/US02/15185

for the deletion mutation: 12 cases were positive in both RT-PCR and immunohistochemistry and 22 cases were negative/negative. Three cases (#2, #34, #40) were DH8.3 positive/RT-PCR negative for the deletion mutation and three cases (#12, #18, #39) were DH8.3 negative/RT-PCR positive. As expected based on our previous specificity analysis, mAb 806 immunoreactivity was seen in all DH8.3-positive tissues except in one case (#35).

Case #3 also revealed a mutation (designated A2 in **Table 5**), which included the sequences of the de2-7 mutation but this did not appear to be the classical de2-7 deletion with loss of the 801 bases (data not shown). This case was negative for DH8.3 reactivity but showed reactivity with 806, indicating that 806 may recognize an additional and possibly unique EGFR mutation.

TABLE 5

Immunohistochemical analysis of 46 unselected glioblastomas with mAbs 528, 806, and DH8.3

#	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	5' MUT
1	++++	++++	++	A	5' MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (det.)	neg.	N	A2
4	++++	++++	neg.	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	neg.	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	A	5' MUT
9	++++	++++	neg.	A	WT
10	++++	neg.	neg.	N	WT
11	++	++	++	A	5' MUT
12	++++	++	neg.	A	5' MUT
13	++++	++++	neg.	N	WT
14	++	neg.	neg.	Nd	nd

WO 02/092771

PCT/US02/15185

15	++	++	neg.	N	WT
16	+	neg.	neg.	N	nd
17	++++	neg.	neg.	N	WT
18	++++	++++	neg.	A	5' MUT
19	++++	++++	neg.	N	WT
20	++++	neg.	neg.	N	WT
21	++++	++++	neg.	N	WT
22	+++	neg.	neg.	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	neg.	A	WT
25	++++	neg.	neg.	N	WT
26	++++	++++	+++	<u>A</u>	5' MUT
27	neg.	neg.	neg.	N	WT
28	+++	neg.	neg.	N	WT
29	neg.	neg.	neg.	N	WT
30	++++	++++	neg.	N	WT
31	++++ par det	neg.	neg.	N	nd
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	neg.	++++	<u>A</u>	5' MUT
36	+++	++	+++	<u>A</u>	5' MUT
37	++++	+	+	<u>A</u>	5' MUT
38	++++	neg.	neg.	N	WT
39	++	neg.	neg.	N	5' MUT
40	++++	++++	+	<u>A</u>	WT
41	++	neg.	neg.	N	WT
42	++++	++++	neg.	A	WT
43	++++	neg.	neg.	nd	nd
44	++++	neg.	neg.	N	WT
45	++++	neg.	neg.	N	WT
46	++++	neg.	neg.	N	nd

* N = not amplified, A=amplified,
 *WT = wildtype, 5'-mut
 nd = not done

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The 806 antibody reactivity co-typed with amplified or de2-7 mutant EGFR in 19/27 or over 70% of the cases. It is notable that 2 of these 8 cases were also DH8.3 reactive.

EXAMPLE 16

SYSTEMIC TREATMENT AND ANALYSIS OF INTRACRANIAL GLIOMA TUMORS

To test the efficacy of the anti- Δ EGFR monoclonal antibody, mAb 806, we treated nude mice bearing intracranial Δ EGFR-overexpressing glioma xenografts with intraperitoneal injections of mAb806, the isotype control IgG or PBS.

The human glioblastoma cell lines U87MG, LN-Z308 and A1207 (gift from Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) were infected with Δ EGFR, kinase-deficient Δ EGFR (DK), or wild-type EGFR (wtEGFR) viruses. Populations expressing similar high levels of EGFRs were selected by fluorescence-activated cell sorting and designated as U87MG. Δ EGFR, U87MG.DK, U87MG.wtEGFR, LN-Z308. Δ EGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308. wtEGFR, A1207. Δ EGFR, A1207.DK and A1207.wtEGFR, respectively. Each was maintained in medium containing G418 (U87MG cell lines, 400 μ g/ml; LN-Z308 and A1207 cell lines, 800 μ g/ml).

U87MG. Δ EGFR cells were implanted intracranially into nude mice and the treatments began on the same day. 10^5 cells in 5 μ l PBS were implanted into the right corpus striatum of nude mice brains. Systemic therapy with mAb 806, or the IgG2b isotype control, was accomplished by i.p. injection of 1 mg of mAbs in a volume of 100 μ l every other day from post-implantation day 0 through 14. For direct therapy of intracerebral U87MG. Δ EGFR tumors, 10 μ g of mAb 806, or the IgG2b isotype control, in a volume of 5 μ l were injected at the tumor-injection site every other day starting at day 1 for 5 days.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Animals treated with PBS or isotype control IgG had a median survival of 13 days, whereas mice treated with mAb 806 had a 61.5% increase in median survival up to 21 days ($P<0.001$).

Treatment of mice 3 days post-implantation, following tumor establishment, also extended the median survival of the mAb 806 treated animals by 46.1% (from 13 days to 19 days; $P<0.01$) compared to that of the control groups.

To determine whether these antitumor effects of mAb 806 extended beyond U87MG. Δ EGFR xenografts, similar treatments were administered to animals bearing other glioma cell xenografts of LN-Z308. Δ EGFR and A1207. Δ EGFR. The median survival of mAb 806 treated mice bearing LN-Z308. Δ EGFR xenografts was extended from 19 days for controls to 58 days ($P<0.001$). Remarkably, four of eight mAb 806 treated animals survived beyond 60 days. The median survival of animals bearing A1207. Δ EGFR xenografts was also extended from 24 days for controls to 29 days ($P<0.01$).

MAb 806 Treatment Inhibits Δ EGFR-overexpressing Brain Tumor Growth.

Mice bearing U87MG. Δ EGFR and LN-Z308. Δ EGFR xenografts were euthanized at day 9 and day 15, respectively. Tumor sections were histopathologically analyzed and tumor volumes were determined. Consistent with the results observed for animal survival, mAb 806 treatment significantly reduced the volumes by about 90% of U87MG. Δ EGFR ($P<0.001$) and LN-Z308. Δ EGFR by more than 95% ($P<0.001$) xenografts in comparison to that of the control groups. Similar results were obtained for animals bearing A1207. Δ EGFR tumors (65% volume reduction, $P<0.01$).

Intratumoral Treatment with mAb 806 Extends Survival of Mice Bearing

U87MG. Δ EGFR Brain Tumors.

The efficacy of direct intratumoral injection of mAb 806 for the treatment of U87MG. Δ EGFR xenografts was also determined. Animals were given intratumoral injections of mAb 806 or isotype control IgG one day post-implantation. Control

WO 02/092771

PCT/US02/15185

animals survived for 15 days, whereas mAb 806 treated mice remained alive for 18 days ($P < 0.01$). While the intratumoral treatment with mAb 806 was somewhat effective, it entailed the difficulties of multiple intracranial injections and increased risk of infection. We therefore focused on systemic treatments for further studies.

MAb 806 Treatment Slightly Extends Survival of Mice Bearing U87MG.wtEGFR but not U87MG or U87MG.DK Intracranial Xenografts.

To determine whether the growth inhibition by mAb 806 was selective for tumors expressing Δ EGFR, we treated animals bearing U87MG, U87MG.DK (kinase-deficient Δ EGFR) and U87MG.wtEGFR brain xenografts. MAb 806 treatment did not extend survival of mice implanted with U87MG tumors which expressed a low level of endogenous wild-type EGFR (wtEGFR), or animals bearing U87MG.DK xenografts which overexpressed a kinase-deficient Δ EGFR in addition to a low level of endogenous wtEGFR. The mAb 806 treatment slightly extended the survival of mice bearing U87MG.wtEGFR tumors ($P < 0.05$, median survival 23 days versus 26 days for the control groups) which overexpressed wtEGFR.

MAb 806 Reactivity Correlates with In Vivo Anti-tumor Efficacy.

To understand the differential effect of mAb 806 on tumors expressing various levels or different types of EGFR, we determined mAb 806 reactivity with various tumor cells by FACS analysis. Consistent with previous reports, the anti-EGFR monoclonal antibody 528 recognized both Δ EGFR and wtEGFR, and demonstrated stronger staining for U87MG. Δ EGFR cells compared to U87MG cells. In contrast, antibody EGFR.1 reacted with wtEGFR but not Δ EGFR, as U87MG. Δ EGFR cells were as weakly reactive as U87MG cells. This EGFR.1 antibody reacted with U87MG.wtEGFR more intensively than U87MG cells, as U87MG.wtEGFR cells overexpressed wtEGFR. While mAb 806 reacted intensely with U87MG. Δ EGFR and U87MG.DK cells and not with U87MG cells, it reacted weakly with U87MG.wtEGFR, indicating that mAb 806 is selective for Δ EGFR with a weak cross-activity to overexpressed wtEGFR. This level of reactivity with U87MG.wtEGFR was quantitatively and qualitatively similar to the extension of

WO 02/092771

PCT/US02/15185

survival mediated by the antibody treatment.

We further determined mAb 806 specificity by immunoprecipitation. EGFRs in various cell lines were immunoprecipitated with antibody 528, EGFR.1 and mAb 806. Blots of electrophoretically-separated proteins were then probed with the anti-EGFR antibody, C13, which recognizes wtEGFR as well as Δ EGFR and DK. Consistent with the FACS analysis antibody 528 recognized wtEGFR and mutant receptors, while antibody EGFR.1 reacted with wtEGFR but not the mutant species. Moreover, the levels of mutant receptors in U87MG. Δ EGFR and U87MG.DK cells are comparable to those of wtEGFR in the U87MG.wtEGFR cells. However, antibody mAb 806 was able to precipitate only a small amount of the wtEGFR from the U87MG.wtEGFR cell lysates as compared with the larger amount of mutant receptor precipitated from U87MG. Δ EGFR and U87MG.DK cells, and an undetectable amount from the U87MG cells. Collectively, these data suggest that mAb 806 recognizes an epitope in Δ EGFR which also exists in a small fraction of wtEGFR only when it is overexpressed on cell surface.

MAb 806 Treatment Reduces Δ EGFR Autophosphorylation and Down-regulates Bcl-X_L Expression in U87MG. Δ EGFR Brain Tumors.

We next investigated the mechanisms underlying the growth inhibition by mAb 806. Since the constitutively active kinase activity and autophosphorylation of the carboxyl terminus of Δ EGFR are essential for its biological functions we determined Δ EGFR phosphorylation status in tumors from treated and control animals. It was found that mAb 806 treatment dramatically reduced Δ EGFR autophosphorylation, even though receptor levels were only slightly decreased in the mAb 806 treated xenografts. We have previously shown that receptor autophosphorylation causes up-regulation of the antiapoptotic gene, Bcl-X_L, which plays a key role in reducing apoptosis of Δ EGFR overexpressing tumors. Therefore, we next determined the effect of mAb 806 treatment on Bcl-X_L expression. Δ EGFR tumors from mAb 806 treated animals did indeed show reduced levels of Bcl-X_L.

MAb 806 Treatment Decreases Growth and Angiogenesis, and Increases Apoptosis in U87MG.ΔEGFR Tumors.

In light of the *in vivo* suppression caused by mAb 806 treatment and its biochemical effects on receptor signaling, we determined the proliferation rate of tumors from control or treated mice. The proliferative index, measured by Ki-67 staining of the mAb 806-treated tumors, was significantly lower than that of the control tumors ($P < 0.001$). In addition, analysis of the apoptotic index through TUNEL staining demonstrated a significant increase in the number of apoptotic cells in mAb 806 treated tumors as compared with the control tumors ($P < 0.001$). The extent of tumor vascularization was also analyzed by immunostaining of tumors from treated and control specimens for CD31. To quantify tumor vascularization, microvascular areas (MVA) were measured using computerized image analysis. MAb 806 treated tumors showed 30% less MVA than control tumors ($P < 0.001$). To understand whether interaction between receptor and antibody may elicit an inflammatory response, we stained tumor sections for the macrophage marker, F4/80, and the NK cell marker, asialo GM1. Macrophages were identified throughout the tumor matrix and especially accumulated around the mAb 806 treated-U87MG.ΔEGFR tumor periphery. We observed a few NK cells infiltrated in and around the tumors and no significant difference between mAb 806 treated and isotype-control tumors.

EXAMPLE 17

COMBINATION IMMUNOTHERAPY WITH mAb806 AND mAb528

Are you sure this works. The example is in a somewhat different format to the others preceding it

The experiments set forth herein describe *in vivo* work designed to determine the efficacy of antibodies in accordance with this invention.

Female nude mice, 4-6 weeks old, were used as the experimental animals. Mice received subcutaneous inoculations of 3×10^6 tumor cells in each of their flanks.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

The animals received either U87MG.D2-7, U87MG.DK, or A431 cells, all of which are described, *supra*. Therapy began when tumors had grown to a sufficient size.

Mice then received injections of one of (i) phosphate buffered saline, (ii) mAb 806 (0.5mg/injection), (iii) mAb 528 (0.5mg/injection), or (iv) a combination of both mAbs. With respect to "(iv)," different groups of mice received either 0.5mg/injection of each mAb, or 0.25mg/injection of each mAb.

The first group of mice examined were those which had received U87MG.D2-7 injections. The treatment protocol began 9 days after inoculation, and continued, 3 times per week for 2 weeks (*i.e.*, the animals were inoculated 9, 11, 13, 16, 18 and 20 days after they were injected with the cells). At the start of the treatment protocol, the average tumor diameter was 115mm^3 . Each group contained 50 mice, each with two tumors.

Within the group of mice which received the combination of antibodies (0.5 mg/injection of each), there were three complete regressions. There were no regressions in any of the other groups. **Figure 18A** shows the results graphically.

In a second group of mice, the injected materials were the same, except the combination therapy contained 0.25mg of each antibody per injection. The injections were given 10, 12, 14, 17, 19 and 21 days after inoculation with the cells. At the start of the therapy the average tumor size was 114mm^3 . Results are shown in **Figure 18B**.

The third group of mice received inoculations of U87MG.DK. Therapeutic injections started 18 days after inoculation with the cells, and continued on days 20, 22, 25, 27 and 29. The average tumor size at the start of the treatment was 107mm^3 . **Figure 18C** summarizes the results. The therapeutic injections were the same as in the first group.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Finally, the fourth group of mice, which had been inoculated with A431 cells, received injections as in groups I and III, at 8, 10, 12 and 14 days after inoculation. At the start, the average tumor size was 71mm³. Results are shown in **Figure 18D**.

The results indicated that the combination antibody therapy showed a synergistic effect in reducing tumors. See **Figure 18A**. A similar effect was seen at a lower dose, as per **Figure 18B**, indicating that the effect is not simply due to dosing levels.

The combination therapy did not inhibit the growth of U87MG.DK (**Figure 18C**), indicating that antibody immune function was not the cause for the decrease seen in **Figures 18A and 18B**.

It is noted that, as shown in **Figure 18D**, the combination therapy also exhibited synergistic efficacy on A431 tumors, with 4 doses leading to a 60% complete response rate. These data suggest that the EGFR molecule recognized by mAb806 is functionally different from that inhibited by 528.

References

1. Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII, *Cancer Res.* 57: 4130-40, 1997.
2. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer, *Br J Cancer.* 82: 186-94, 2000.
3. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., and et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas, *Cancer Res.* 55: 3140-8, 1995.

4. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas, *Cancer Res.* 53: 3217-20, 1993.
5. Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., and Collins, V. P. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4309-13, 1992.
6. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 2965-9, 1992.
7. Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., and Shibuya, M. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors, *Jpn J Cancer Res.* 81: 773-9, 1990.
8. Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., and Shibuya, M. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors, *Mol Cell Biol.* 8: 1816-20, 1988.
9. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 8602-6, 1990.
10. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 7727-31, 1994.
11. Batra, S. K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C. J., Zhu, X., Humphrey, P. A., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Epidermal growth factor ligand-

- independent, unregulated, cell- transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene, *Cell Growth Differ.* 6: 1251-9, 1995.
12. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis, *Cancer Res.* 56: 5079-86, 1996.
 13. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target, *J Neurovirol.* 4: 148-58, 1998.
 14. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 4207-11, 1990.
 15. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., and Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor, *Br J Cancer.* 73: 1366-72, 1996.
 16. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody, *Int J Cancer.* 63: 537-43, 1995.
 17. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors, *Cancer Res.* 55: 5536-9, 1995.
 18. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtneess, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin, *J Clin Oncol.* 18: 904, 2000.

19. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas, *Neurosurgery*. 39: 478-83, 1996.
20. Ponten, J. and Macintyre, E. H. Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta Pathol Microbiol Scand*. 74: 465-86, 1968.
21. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies, *Cancer Res*. 44: 1002-7, 1984.
22. Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor., *Growth Factors*. 18: 11-29, 2000.
23. Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., and Bunn, P. A., Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess, *J Immunol Methods*. 72: 77-89, 1984.
24. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Caveness, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling, *J Biol Chem*. 272: 2927-35, 1997.
25. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res*. 57: 1510-5, 1997.
26. Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., and Gill, G. N. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice, *Cancer Res*. 46: 4701-5, 1986.

27. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials, *Ann Oncol.* 8: 1197-206, 1997.
28. den Eynde, B. and Scott, A. M. Tumor Antigens. In: P. J. DeVries and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition edition, pp. 2424-31. London: Academic Press, 1998.
29. Seymour, L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges, *Cancer Treat Rev.* 25: 301-12, 1999.
30. Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., and Schantz, S. P. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer, *Otolaryngol Head Neck Surg.* 111: 633-43, 1994.
31. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P., and Mendelsohn, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model, *Clin Cancer Res.* 1: 1311-8, 1995.
32. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts, *Cancer Res.* 55: 4375-82, 1995.
33. Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res.* 56: 4970-7, 1996.
34. Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., and Geissler, F. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores, *Cancer Res.* 50: 1243-50, 1990.
35. Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal

WO 02/092771

PCT/US02/15185

antibody; comparison with its murine parent, Nucl Med Biol. 24: 639-47, 1997.

36. Mireo, C., Gill, G. N., and Anderson, R. G. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae, J Biol Chem. 274: 30636-43, 1999.
37. Gunther, N., Betzel, C., and Weber, W. The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor-ligand complex, J Biol Chem. 265: 22082-5, 1990.

EXAMPLE 18

NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR THE DE2-7 EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) THAT ALSO RECOGNIZES THE EGFR EXPRESSED IN CELLS CONTAINING AMPLIFICATION OF THE EGFR GENE

The following experiments were presented in Johns et al, (2002) Int. J. Cancer, **98**, and in co-pending application Serial No. 60/342,258 filed December 21, 2001, the entire disclosure of both of which are incorporated herein by reference with cross referencing to the Figures herein where appropriate. The monoclonal antibody mAb 806 was studied and additional data respecting its binding characteristics as to the EGF receptor were developed, which is in addition to and corroborative of the data presented earlier herein. Accordingly, the following represents a review and presentation of the material set forth in the patent application and corresponding publication.

Monoclonal antibody (MAb 806) potentially overcomes the difficulties associated with targeting the EGFR expressed on the surface of tumor cells. MAb 806 bound to de2-7 EGFR transfected U87MG glioma cells (U87MG.Δ2-7) with high affinity ($\sim 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), but did not bind parental cells that express the wild type EGFR. Consistent with this observation, MAb 806 was unable to bind a soluble version of the wild type EGFR containing the extracellular domain. In contrast, immobilization of this

WO 02/092771

PCT/US02/15185

extracellular domain to ELISA plates induced saturating and dose response binding of MAb 806, suggesting that MAb 806 can bind the wild type EGFR under certain conditions. MAb 806 also bound to the surface of A431 cells, which due to an amplification of the EGFR gene express large amounts of the EGFR. Interestingly, MAb 806 only recognized 10% of the total EGFR molecules expressed by A431 cells and the binding affinity was lower than that determined for the de2-7 EGFR. MAb 806 specifically targeted U87MG.Δ2-7 and A431 xenografts grown in nude mice with peak levels in U87MG.Δ2-7 xenografts detected 8 h after injection. No specific targeting of parental U87MG xenografts was observed. Following binding to U87MG.Δ2-7 cells, MAb 806 was rapidly internalized by macropinocytosis and subsequently transported to lysosomes, a process that probably contributes to the early targeting peak observed in the xenografts. Thus, MAb 806 can be used to target tumor cells containing amplification of the EGFR gene or de2-7 EGFR but does not bind to the wild type EGFR when expressed on the cell surface.

As discussed above, MAb 806 is specific for the de2-7 EGFR yet binds to an epitope distinct from the unique junctional peptide. Interestingly, while MAb 806 did not recognize the wild type EGFR expressed on the cell surface of glioma cells, it did bind to the extracellular domain of the wild type EGFR immobilized on the surface of ELISA plates. Furthermore, MAb 806 bound to the surface of A431 cells, which have an amplification of the EGFR gene but do not express the de2-7 EGFR. Therefore, it is possible that MAb 806 could be used to specifically target tumors with amplified EGFR regardless of their de2-7 EGFR status, although our results suggest tumors coexpressing the mutated receptor would still show preferential targeting. As MAb 806 does not bind wild type receptor in the absence of gene amplification, there would be no uptake in normal tissue, a potential problem associated with EGFR antibodies currently being developed.^{18,19}

MATERIAL AND METHODS

MAbs and cell lines

The U87MG astrocytoma cell line has been described in detail previously.²⁰ This cell line was infected with a retrovirus containing the de2-7 EGFR to produce the U87MG.Δ2-7 cell line.¹⁰ Human squamous carcinoma A431 cells were obtained from ATCC (Rockville, MD). These cell lines were cultured in DMEM/F-12 with GlutaMAX™ (Life Technologies, Melbourne, Australia) supplemented with 10% FCS (CSL, Melbourne, Australia). The murine pro-B cell line BaF/3, which does not express any known EGFR related molecules, was transfected with de2-7 EGFR as described above. The DH8.3 antibody (IgG1) has been described previously and was obtained following immunization of mice with the unique junctional peptide found in de2-7 EGFR.¹⁶ MAb 806 (IgG2b) was produced following immunization of mice with NR6 mouse fibroblasts transfected with the de2-7 EGFR. It was selected for further characterization as hemagglutination assays showed a high titer against NR6.ΔEGFR cells but low backgrounds on NR6.wtEGFR cells. The 528 antibody, which recognizes both de2-7 and wild type EGFR, has been described previously²¹ and was produced in the Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) using a hybridoma obtained from ATCC. The polyclonal antibody sc-03 directed to the COOH-terminal domain of the EGFR was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Other reagents

The recombinant extracellular domain (amino acids 1–621) of the wild type EGFR (sEGFR) was produced as previously described.²² The biotinylated unique junctional peptide (Biotin-LEEKKGNVVTIDH) from de2-7 EGFR was synthesized by standard Fmoc chemistry and purity (>96%) determined by re-verse phase HPLC and mass spectral analysis (Auspep, Melbourne, Australia).

FACS analysis

Cells were labeled with the relevant antibody (10 µg/ml) followed by fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100 dilution; Calbiochem, San Diego, CA). FACS data was obtained on a Coulter Epics Elite ESP by observing a minimum of 5,000 events and analyzed using EXPO (version 2) for Windows.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

ELISA assays

Two types of ELISA were used to determine the specificity of the antibodies. In the first assay, plates were coated with Segfr (10 µg/ml in 0.1 M carbonate buffer pH 9.2) for 2 hr and then blocked with 2% human serum albumin (HSA) in PBS. Antibodies were added to wells in triplicate at increasing concentration in 2% HSA in phosphate-buffered saline (PBS). Bound antibody was detected by horseradish peroxidase conjugated sheep anti-mouse IgG (Silenus, Melbourne, Australia) using ABTS (Sigma, Sydney, Australia) as a substrate and the absorbance measured at 405 nm. In the second assay, the biotinylated de2-7 specific peptide was bound to ELISA plates precoated with streptavidin (Pierce, Rock-ford, Illinois). Antibodies were bound and detected as in the first assay.

Scatchard analysis

Antibodies were labeled with ¹²⁵I (Amrad, Melbourne, Australia) by the chloramine T method and immunoreactivity determined by Lindmo assay.²³ All binding assays were performed in 1% HSA/PBS on 1–2 X 10⁶ live U87MG.Δ2-7 or A431 cells for 90 min at 4°C with gentle rotation. A set concentration of 10 ng/ml ¹²⁵I-labeled antibody was used in the presence of increasing concentrations of the appropriate unlabeled antibody. Non-specific binding was determined in the presence of 10,000-fold excess of unlabeled antibody. Neither ¹²⁵I-radiolabeled MAb 806 or the DH8.3 antibody bound to parental U87MG cells. After the incubation was completed, cells were washed and counted for bound ¹²⁵I-labeled antibody using a COBRA II gamma counter (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Scatchard analysis was done following correction for immunoreactivity.

Internalization assay

U87MG.Δ2-7 cells were incubated with either MAb 806 or the DH8.3 antibody (10 µg/ml) for 1 hr in DMEM at 4°C. After washing, cells were transferred to DMEM pre-warmed to 37°C and aliquots taken at various time points following incubation at 37°C. Internalization was stopped by immediately washing aliquots in ice-cold wash

WO 02/092771

PCT/US02/15185

buffer (1% HSA/PBS). At the completion of the time course cells were stained by FACS as described above. Percentage internalization was calculated by comparing surface antibody staining at various time points to zero time using the formula: percent antibody internalized = (mean fluorescence at time_x - background fluorescence)/(mean fluorescence at time₀ - background fluorescence) X 100. This method was validated in 1 assay using an iodinated antibody (MAb 806) to measure internalization as previously described.²⁴ Differences in internalization rate at different time points were compared using Student's t-test.

Electron microscopy of U87MG.Δ2-7 cells

U87MG.Δ2-7 cells were grown on gelatin coated chamber slides (Nunc, Naperville, IL) to 80% confluence and then washed with ice cold DMEM. Cells were then incubated with MAb 806 or the DHS.3 antibody in DMEM for 45 min at 4°C. After washing, cells were incubated for a further 30 min with gold-conjugated (20 nm particles) anti-mouse IgG (BBInternational, Cardiff, UK) at 4°C. Following a further wash, pre-warmed DMEM/10% FCS was added to the cells, which were incubated at 37°C for various times from 1–60 min. Internalization of the antibody was stopped by ice-cold media and cells fixed with 2.5% glutaraldehyde in PBS/0.1% HSA and then postfixed in 2.5% osmium tetroxide. After dehydration through a graded series of acetone, samples were embedded in Epon/Araldite resin, cut as ultrathin sections with a Reichert Ultracut-S microtome (Leica) and collected on nickel grids. The sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before being viewed on a Philips CM12 transmission electron microscope at 80 kV. Statistical analysis of gold grains contained within coated pits was performed using a χ^2 test.

Immunoprecipitation studies

Cells were labeled for 16 hr with 100 μ Ci/ml of Tran³⁵ S-Label (ICN Biomedicals, CA) in DMEM without methionine/cysteine supplemented with 5% dialyzed FCS. After washing with PBS, cells were placed in lysis buffer (1% Triton X-100, 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 μ M AEBSF, 150 nM aprotinin, 1 μ M E-64 protease inhibitor, 0.5 mM EDTA and 1 μ M leupeptin, pH 7.4) for 1 hr at 4°C. Lysates were

WO 02/092771

PCT/US02/15185

clarified by centrifugation for 10 min at 12,000g, then incubated with 5 µg of appropriate antibody for 30 min at 4°C before the addition of Protein A-Sepharose. Immunoprecipitates were washed 3 times with lysis buffer, mixed with SDS sample buffer, separated by gel electrophoresis using a 4–20% Tris/glycine gel that was then dried and exposed to X-ray film.

Biodistribution in tumor bearing nude mice

Tumor xenografts were established in nude BALB/c mice by s.c. injection of 3×10^6 U87MG, U87MG.Δ2-7 or A431 cells. de2-7 EGFR expression in U87MG.Δ2-7 xenografts remains stable throughout the period of biodistribution as measured by immunohistochemistry at various time points (data not shown). A431 cells also retained their MAb 806 reactivity when grown as tumor xenografts as determined by immunohistochemistry. U87MG or A431 cells were injected on 1 side 7–10 days before U87MG.Δ2-7 cells were injected on the other side because of the faster growth rate observed for de2-7 EGFR expressing xenografts. Antibodies were radiolabeled and assessed for immunoreactivity as described above and were injected into mice by the retro-orbital route when tumors were 100–200 mg in weight. Each mouse received 2 different antibodies (2 µg per antibody): 2 µCi of ^{125} I-labeled MAb 806 and 2 µCi of ^{131} I-labeled DH8.3 or 528. Unless indicated, groups of 5 mice were sacrificed at various time points post-injection and blood obtained by cardiac puncture. The tumors, liver, spleen, kidneys and lungs were obtained by dissection. All tissues were weighed and assayed for ^{125} I and ^{131} I activity using a dual-channel counting window. Data was expressed for each antibody as percentage injected dose per gram tumor (% ID/g tumor) determined by comparison to injected dose standards or converted into tumor to blood/liver ratios (*i.e.*, % ID/g tumor ÷ % ID/g blood or liver). Differences between groups were analyzed by Student's t-test. After injection of radiolabeled MAb 806, some tumors were fixed in formalin, embedded in paraffin, cut into 5 µm sections and then exposed to X-ray film (AGFA, Mortsel, Belgium) to determine antibody localization by autoradiography.

RESULTS

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Binding of antibodies to cell lines

In order to confirm the specificity of MAb 806 and the DH8.3 antibody, binding to U87MG and U87MG. Δ 2-7 cells was analyzed by FACS. An irrelevant murine IgG2b was included as an isotype control for MAb 806 and the 528 antibody was included as it recognizes both the Δ 2-7 and wild type EGFR. Only the 528 antibody was able to stain the U87MG cell line (**Figure 1**) consistent with previous reports demonstrating that these cells express the wild type EGFR.¹⁰ Both MAb 806 and the DH8.3 antibody had binding levels similar to the irrelevant antibody, clearly demonstrating they are unable to bind the wild type receptor (**Figure 1**). Binding of the isotype control antibody to U87MG. Δ 2-7 cells was similar as that observed for the U87MG cells. MAb 806 and the DH8.3 antibody immunostained U87MG. Δ 2-7 cells, indicating that these antibodies specifically recognize the Δ 2-7 EGFR (**Figure 1**). The 528 antibody stained U87MG. Δ 2-7 with a higher intensity than the parental cell as it binds both the Δ 2-7 and wild type receptors that are co-expressed in these cells (**Figure 1**). Importantly, MAb 806 also bound the BaF/3. Δ 2-7 cell line, demonstrating that the co-expression of wild type EGFR is not a requirement for MAb 806 reactivity (**Figure 1** but data not shown herein).

Binding of antibodies in ELISA assays

To further characterize the specificity of MAb 806 and the DH8.3 antibody, their binding was examined by ELISA. Both MAb 806 and the 528 antibody displayed dose-dependent and saturating binding curves to immobilized wild type sEGFR (**Figure 2A**). As the unique junctional peptide found in the Δ 2-7 EGFR is not contained within the sEGFR, MAb 806 must be binding to an epitope located within the wild type EGFR sequence. The binding of the 528 antibody was probably lower than that observed for MAb 806 as it recognizes a conformational determinant. As expected the DH8.3 antibody did not bind the wild type sEGFR even at concentrations up to 10 μ g/ml (**Figure 2A**). Although sEGFR in solution inhibited the binding of the 528 antibody to immobilized sEGFR in a dose-dependent fashion, it was unable to inhibit the binding of MAb 806 (**Figure 2B**). This suggests that MAb 806 can only bind wild type EGFR once immobilized on ELISA plates, a process that

may induce conformational changes. Similar results were observed using a BIAcore whereby MAb 806 bound immobilized sEGFR but immobilized MAb 806 was not able to bind sEGFR in solution (data not shown). Following denaturation by heating for 10 min at 95°C, sEGFR in solution was able to inhibit the binding of MAb 806 to immobilized sEGFR (**Figure 2C** but data not shown herein), confirming that MAb 806 can bind the wild type EGFR under certain conditions. Interestingly, the denatured sEGFR was unable to inhibit the binding of the 528 antibody (**Figure 2C** but data not shown herein), demonstrating that this antibody recognizes a conformational epitope. The DH8.3 antibody exhibited dose-dependent and saturable binding to the unique de2-7 EGFR peptide (**Figure 2D**). Neither MAb 806 or the 528 antibody bound to the peptide, even at concentrations higher than those used to obtain saturation binding of DH8.3, further indicating MAb 806 does not recognize an epitope determinant within this peptide.

Scatchard analysis of antibodies

A Scatchard analysis was performed using U87MG.Δ2-7 cells in order to determine the relative affinity of each antibody. Both MAb 806 and the DH8.3 antibody retained high immunoreactivity when iodinated and was typically greater than 90% for MAb 806 and 45-50% for the DH8.3 antibody. MAb 806 had an affinity for the de2-7 EGFR receptor of $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ whereas the affinity of DH8.3 was some 10-fold lower at $1.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Neither iodinated antibody bound to U87MG parental cells. MAb 806 recognized an average of 2.4×10^5 binding sites per cell with the DH8.3 antibody binding an average of 5.2×10^5 sites. Thus, there was not only good agreement in receptor number between the antibodies, but also with a previous report showing 2.5×10^5 de2-7 receptors per cell as measured by a different de2-7 EGFR specific antibody on the same cell line.²⁵

Internalization of antibodies by U87MG.Δ2-7 cells

The rate of antibody internalization following binding to a target cell influences both its tumor targeting properties and therapeutic options. Consequently, we examined the internalization of MAb 806 and the DH8.3 antibody following binding to U87MG.Δ2-

7 cells by FACS. Both antibodies showed relatively rapid internalization reaching steady-state levels at 10 min for MAb 806 and 30 min for DH8.3 (**Figure 3**). Internalization of DH8.3 was significantly higher both in terms of rate (80.5% of DH8.3 internalized at 10 min compared to 36.8% for MAb 806, $p < 0.01$) and total amount internalized at 60 min (93.5% vs. 30.4%, $p < 0.001$). MAb 806 showed slightly lower levels of internalization at 30 and 60 min compared to 20 min in all 4 assays performed (**Figure 3**). This result was also confirmed using an internalization assay based on iodinated MAb 806 (data not shown).

Electron microscopy analysis of antibody internalization

Given this difference in internalization rates between the antibodies, a detailed analysis of antibody intracellular trafficking was performed using electron microscopy. Although the DH8.3 anti-body was internalized predominantly via coated-pits (**Figure 19A**), MAb 806 appeared to be internalized by macropinocytosis (**Figure 19B**). In fact, a detailed analysis of 32 coated pits formed in cells incubated with MAb 806 revealed that none of them contained antibody. In contrast, around 20% of all coated-pits from cells incubated with DH8.3 were positive for antibody, with a number containing multiple gold grains. A statistical analysis of the total number of gold grains contained within coated-pits found that the difference was highly significant ($p < 0.01$). After 20–30 min both antibodies could be seen in structures that morphologically resemble lysosomes (**Figure 19C**). The presence of cellular debris within these structures is also consistent with their lysosome nature.

Biodistribution of antibodies in tumor bearing nude mice

The biodistribution of MAb 806 and the DH8.3 antibody was compared in nude mice containing U87MG xenografts on 1 side and U87MG.Δ2-7 xenografts on the other. A relatively short time period was chosen for this study as a previous report demonstrated that the DH8.3 antibody shows peak levels of tumor targeting between 4–24 hr.¹⁶ In terms of % ID/g tumor, MAb 806 reached its peak level in U87MG.Δ2-7 xenografts of 18.6% ID/g tumor at 8 hr (**Figure 4A**), considerably higher than any other tissue except blood. Although DH 8.3 also showed peak tumor levels at 8 hr, the

level was a statistically ($p < 0.001$) lower 8.8 % ID/g tumor compared to MAb 806 (**Figure 4B**). Levels of both antibodies slowly declined at 24 and 48 hr. Autoradiography of U87MG.Δ2-7 xenograft tissue sections collected 8 hr after injection with ^{125} I-labeled MAb 806 alone, clearly illustrates localization of antibody to viable tumor (**Figure 20**). Neither antibody showed specific targeting of U87MG parental xenografts (**Figure 4A, 4B**). With regards to tumor to blood/liver ratios, MAb 806 showed the highest ratio at 24 hr for both blood (ratio of 1.3) and liver (ratio of 6.1) (**Figure 5A, 5B**). The DH8.3 antibody had its highest ratio in blood at 8 hr (ratio of 0.38) and at 24 hr in liver (ratio of 1.5) (**Figure 5A, 5B**), both of which are considerably lower than the values obtained for MAb 806.

Binding of MAb 806 to cells containing amplified EGFR

To examine if MAb 806 could recognize the EGFR expressed in cells containing an amplified receptor gene, its binding to A431 cells was analyzed. Low, but highly reproducible, binding of MAb 806 to A431 cells was observed by FACS analysis (**Figure 6**). The DH8.3 antibody did not bind A431 cells, indicating that the binding of MAb 806 was not the result of low level de2-7 EGFR expression (**Figure 6**). As expected, the anti-EGFR 528 antibody showed strong staining of A431 cells (**Figure 6**). The average of 3 such experiments gave a value for affinity of $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ with 2.4×10^5 receptors per cell. Thus the affinity for this receptor was some 10-fold lower than the affinity for the de2-7 EGFR. Furthermore, MAb 806 appears to only recognize a small portion of EGFR found on the surface of A431 cells. Using the 528 antibody approximately 2×10^6 receptors per cell were measured, which is in agreement with numerous other studies.²⁶ To ensure that these results were not simply restricted to the A431 cell line, MAb 806 reactivity was examined in 2 other cells lines exhibiting amplification of the EGFR gene. Both the HN5 head and neck cell line²⁷ and the MDA-468 breast cancer cell line²⁸ have been reported to contain multiple copies of the EGFR gene. Consistent with these reports, the 528 antibody displayed intense staining of both cell lines (**Figure 21**). As with the A431 cell line, the MAb 806 clearly stained both cell lines but at a lower level than that observed with the 528 antibody (**Figure 21**). Thus, MAb 806 binding is not simply restricted to

WO 02/092771

PCT/US02/15185

A431 cells but appears to be a general observation for cells containing amplification of the EGFR gene.

Immunoprecipitations

MAb 806 reactivity was further characterized by immunoprecipitation using ³⁵S-labeled cells. The sc-03 antibody (a commercial polyclonal antibody specific for the c-terminal domain of the EGFR) immunoprecipitated 3 bands from U87MG.Δ2-7 cells; a doublet corresponding to the 2 de2-7 EGFR bands observed in these cells and a higher molecular weight band corresponding to the wt EGFR (**Figure 22**). In contrast, while MAb 806 immunoprecipitated the 2 de2-7 EGFR bands, the wt EGFR was completely absent. The sc-03 antibody immunoprecipitated a single band corresponding to the wt EGFR from A431 cells (**Figure 22**). The MAb 806 also immunoprecipitated a single band corresponding to the wt EGFR from A431 cells (**Figure 22**) but consistent with the FACS and Scatchard data, the amount of EGFR immunoprecipitated by MAb 806 was substantially less than the total EGFR present on the cell surface. Given that MAb 806 and the sc-03 immunoprecipitated similar amounts of the de2-7 EGFR, this result supports the notion that the MAb 806 antibody only recognizes a portion of the EGFR in cells overexpressing the receptor. An irrelevant IgG2b (an isotype control for MAb 806) did not immunoprecipitate EGFR from either cell line (**Figure 22**). Using identical conditions, MAb 806 did not immunoprecipitate the EGFR from the parental U87MG cells (data not shown).

In vivo targeting of A431 cells by MAb 806

A second biodistribution study was performed with MAb 806 to determine if it could target A431 tumor xenografts. The study was conducted over a longer time course in order to obtain more information regarding the targeting of U87MG.Δ2-7 xenografts by MAb 806, which were included in all mice as a positive control. In addition, the anti-EGFR 528 antibody was included as a positive control for the A431 xenografts, since a previous study demonstrated low but significant targeting of this antibody to A431 cells grown in nude mice.²¹ During the first 48 hr, MAb 806 displayed almost identical targeting properties as those observed in the initial experiments (**Figure**

WO 02/092771

PCT/US02/15185

7Acompared with **Figure 4A**). In terms of % ID/g tumor, levels of MAb 806 in U87MG.Δ2-7 xenografts slowly declined after 24 hr but always remained higher than levels detected in normal tissue. Uptake in the A431 xenografts was comparatively low, however, there was a small increase in % ID/g tumor during the first 24 hr not observed in normal tissues such as liver, spleen, kidney and lung (**Figure 7A**). Uptake of the 528 antibody was low in both xenografts when expressed as % ID/g tumor (**Figure 7B**). Autoradiography of A431 xenograft tissue sections collected 24 hr after injection with ¹²⁵I-labeled MAb 806 alone, clearly illustrates localization of antibody to viable tumor around the periphery of the tumor and not central areas of necrosis (**Figure 23**). In terms of tumor to blood ratio MAb 806 peaked at 72 hr for U87MG.Δ2-7 xenografts and 100 hr for A431 xenografts (**Figure 8A, 8B**). Although the tumor:blood ratio for MAb 806 never surpassed 1.0 with respect to the A431 tumor, it did increase through-out the entire time course (**Figure 8B**) and was higher than all other tissues examined (data not shown) indicating low levels of targeting. The tumor to blood ratio for the 528 antibody showed a similar profile to MAb 806 although higher levels were noted in the A431 xenografts (**Figure 8A, 8B**). MAb 806 had a peak tumor to liver ratio in U87MG.Δ2-7 xenografts of 7.6 at 72 hr, clearly demonstrating preferential uptake in these tumors compared to normal tissue (**Figure 8C**). Other tumor to organ ratios for MAb 806 were similar to those observed in the liver (data not shown). The peak tumor to liver ratio for MAb 806 in A431 xenografts was 2.0 at 10d hr, again indicating a slight preferential uptake in tumor compared with normal tissue (**Figure 8D**).

DISCUSSION

The previously described L8A4 monoclonal antibody directed to the unique junctional peptide found in the de2-7 EGFR, behaves in a similar fashion to MAb 806.³⁸ Using U87MG cells transfected with the de2-7 EGFR, this antibody had a similar internalization rate (35% at 1 hr compared to 30% at 1 hr for MAb 806) and displayed comparable *in vivo* targeting when using 3T3 fibroblasts transfected with de2-7 EGFR

WO 02/092771

PCT/US02/15185

(peak of 24% ID/g tumor at 24 hr compared to 18% ID/g tumor at 8 hr for MAb 806).²⁵

Perhaps the most important advantage of MAb 806 compared to current EGFR antibodies, is that MAb 806 can be directly conjugated to cytotoxic agents. This approach is not feasible with current EGFR specific antibodies as they target the liver and cytotoxic conjugation would almost certainly induce severe toxicity. Conjugation of cytotoxic agents such as drugs⁴¹ or radioisotopes⁴² to antibodies has the potential to improve efficacy and reduce the systemic toxicity of these agents. The ability of a conjugated antibody to mediate tumor kill is dependent upon its potential to be internalized. Thus, the rapid internalization observed with MAb 806 in U87MG.Δ2-7 cells, suggests MAb 806 is an ideal candidate for this type of approach.

MAb 806 is novel in that it is the first de2-7 EGFR specific antibody directed to an epitope not associated with the unique junctional peptide. It has superior affinity and better tumor targeting properties than DH8.3, a previously described de2-7 EGFR antibody. An important property, however, is its ability to recognize a subset of EGFR molecules expressed on the surface of tumor cells exhibiting amplification of the EGFR gene. This suggests that MAb 806 may possess a unique clinical property; the ability to target both de2-7 and amplified EGFR but not wild type receptors. If proven correct, this antibody would not target organs such as liver and therefore would be more versatile than current antibodies directed to the EGFR,^{18,19} which cannot be used for the coupling of cytotoxic agents. Finally, MAb 806 may be a useful reagent for analyzing the conformational changes induced by the truncation found in de2-7 EGFR.

REFERENCES

1. Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, et al. Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res* 1997;57:4130-40.

2. Olapade-Olaopa EO, Moscatello DK, MacKay EH, et al. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2000;82:186-94.
3. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995;55:3140-8.
4. Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundareshan P, et al. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1993;53:3217-20.
5. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4309-13.
6. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2965-9.
7. Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:773-9.
8. Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 1988;8:1816-20.
9. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, et al. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified re-arranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:8602-6.
10. Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7727-31.
11. Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995;6:1251-9.

12. Nagane M, Coufal F, Lin H, et al. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996;56:5079-86.
13. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 1998;4:148-58.
14. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, et al. Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4207-11.
15. Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1996;73:1366-72.
16. Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1995;63:537-43.
17. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995;55:5536-9.
18. Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000;18:904-14.
19. Faillot T, Magdelenat H, Mady E, et al. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* 1996;39:478-83.
20. Ponten J, Macintyre EH. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968;74:465-86.
21. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, et al. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984;44:1002-7.

22. Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, et al. Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 2000;18:11-29.
23. Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984;72:77-89.
24. Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927-35.
25. Reist CJ, Archer GE, Wikstrand CJ, et al. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1997;57:1510-5.
26. Santon JB, Cronin MT, MacLeod CL, et al. Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. *Cancer Res* 1986;46:4701-5.
27. Kwok TT, Sutherland RM. Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991;64:251-4.
28. Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128:898-905.
29. Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997;8:1197-206.
30. den Eynde B, Scott AM. Tumor antigens. In: Delves PJ, Roitt IM, eds. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic Press, 1998. 2424-31.
31. Seymour L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. *Cancer Treat Rev* 1999;25:301-12.

32. Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, et al. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:633-43.
33. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995;1:1311-8.
34. Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276:5375-83.
35. Reist CJ, Garg PK, Alston KL, et al. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1996;56:4970-7.
36. Reist CJ, Archer GE, Kurpad SN, et al. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res* 1995;55:4375-82.
37. Press OW, DeSantes K, Anderson SK, et al. Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res* 1990;50:1243-50.
38. Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. *Nucl Med Biol* 1997;24:639-47.
39. Mineo C, Gill GN, Anderson RG. Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 1999;274:30636-43.
40. Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 2001;61:5355-61.
41. Trail PA, Bianchi AB. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 1999;11:584-8.

42. DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr Opin Immunol* 1999;11:563-9.

EXAMPLE 19

GROWTH SUPPRESSION OF INTRACRANIAL XENOGRAFTED GLIOBLASTOMAS OVEREXPRESSING MUTANT EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTORS BY SYSTEMIC ADMINISTRATION OF MONOCLONAL ANTIBODY (mAb) 806, A NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY DIRECTED TO THE RECEPTOR

This example presents the evaluation of mAb 806 on the growth of intracranial xenografted gliomas in nude mice. The following corresponds to and was presented in Mishima et al, (2001) *Cancer Research*, **61**:5349-5354, and the entire publication is incorporated herein by reference with cross referencing to the Figures herein where appropriate, and made a part hereof. The data and findings of Mishima et al. are set forth below.

Systemic treatment with mAb 806 significantly reduced the volume of tumors and increased the survival of mice bearing xenografts of U87 MG. Δ EGFR, LN-Z308. Δ EGFR, or A1207 gliomas, each of which expresses high levels of Δ EGFR. In contrast, mAb 806 treatment was ineffective with mice bearing the parental U87 MG tumors, which expressed low levels of endogenous wild-type EGFR, or U87 MG.DK tumors, which expressed high levels of kinase-deficient Δ EGFR. A slight increase of survival of mice xenografted with a wild-type EGFR-overexpressing U87 MG glioma (U87 MG.wtEGFR) was effected by mAb 806 concordant with its weak cross-reactivity with such cells. Treatment of U87 MG. Δ EGFR tumors in mice with mAb 806 caused decreases in both tumor growth and angiogenesis, as well as increased apoptosis. Mechanistically, *in vivo* mAb 806 treatment resulted in reduced phosphorylation of the constitutively active Δ EGFR and caused down-regulated expression of the apoptotic protector, Bcl-XL. These data provide preclinical

WO 02/092771

PCT/US02/15185

evidence that mAb 806 treatment may be a useful biotherapeutic agent for those aggressive gliomas that express Δ EGFR.

The present example demonstrates that systemic treatment with the novel Δ EGFR-specific mAb, mAb 806, causes reduced phosphorylation of the constitutively active Δ EGFR and thereby suppresses growth of intracranially implanted gliomas overexpressing this mutant receptor in nude mice and extends their survival. The inhibition of tumor growth was mediated by a decrease in proliferation and angiogenesis and increased apoptosis of the tumor cells. This suppression affected active signaling by Δ EGFR because intracranial xenografts that were derived from cells overexpressing kinase-deficient Δ EGFR (DK), which are recognized equally well by mAb 806, were not significantly suppressed after the same therapy.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines. Because primary explants of human glioblastomas rapidly lose expression of amplified, rearranged receptors in culture, no existing glioblastoma cell lines exhibit such expression. To force maintenance of expression levels comparable with those seen in human tumors, U87 MG, LN-Z308, and A1207 (gift from Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) cells were infected with Δ EGFR, kinase-deficient Δ EGFR (DK), or wtEGFR viruses which also conferred resistance to G418 as described previously (21). Populations expressing similar levels of the various *EGFR* alleles (these expression levels correspond approximately to an amplification level of 25 gene copies; human glioblastomas typically have amplification levels from 10 to 50 gene copies of the truncated receptor) were selected by FACS as described previously (21) and designated as U87 MG. Δ EGFR, U87 MG.DK, U87 MG.wtEGFR, LN-Z308. Δ EGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308.wtEGFR, A1207. Δ EGFR, A1207.DK, and A1207.wtEGFR, respectively. Each was maintained in medium containing G418 (U87 MG cell lines, 400 mg/ml; LN-Z308 and A1207 cell lines, 800 mg/ml). mAbs. mAb 806 (IgG2b, k), a Δ EGFR specific mAb, was produced after immunization of mice with NR6 mouse fibroblasts expressing the Δ EGFR. It was selected from several clones because hemagglutination

assays showed that it had a high reactivity against NR6.ΔEGFR cells, low reactivity for NR6.wtEGFR cells, and none for NR6 cells.

Immunoprecipitation and Western Blot Analysis. Cells were lysed with lysis buffer containing 50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 10 mM sodium PP_i, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM Na₃VO₄, 5 µg/ml leupeptin, and 5 µg/ml aprotinin. Antibodies were incubated with cell lysates at 4°C for 1 h before the addition of protein-A and -G Sepharose. Immuno-precipitates were washed twice with lysis buffer and once with HNTG buffer [50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol], electrophoresed, and transferred to nitrocellulose membranes. Blots were probed with the anti-EGFR antibody, C13, and proteins were visualized using the ECL chemiluminescent detection system (Amersham Pharmacia Biotech.). The mAbs used for precipitation were mAb 806, anti-EGFR mAb clone 528 (Oncogene Research Products, Boston, MA), or clone EGFR.1 (Oncogene Research Products). A mAb, C13, used for detection of both wild-type and ΔEGFR on immunoblots was provided by Dr. G. N. Gill (University of California, San Diego, CA). Antibodies to Bcl-X (rabbit poly-clonal antibody; Transduction Laboratories, Lexington, KY) and phosphotyrosine (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) were used for Western blot analysis as described previously (26).

Flow Cytometry Analysis. Cells were labeled with the relevant antibody followed by fluorescein-conjugated goat antimouse IgG (1:100 dilution; Becton-Dickinson PharMingen, San Diego, CA) as described previously (21). Stained cells were analyzed with a FACSCalibur using Cell Quest software (Becton-Dickinson PharMingen). For the first antibody, the following mAbs were used: mAb 806, anti-EGFR mAb clone 528, and clone EGFR.1. Mouse IgG2a or IgG2b was used as an isotype control.

Tumor Therapy. U87 MG. Δ EGFR cells (1×10^5) or 5×10^5 LN-Z308. Δ EGFR, A1207. Δ EGFR, U87 MG, U87 MG.DK, and U87 MG.wtEGFR cells in 5 μ l of PBS were implanted into the right corpus striatum of nude mice brains as described previously (27). Systemic therapy with mAb 806, or the IgG2b isotype control, was accomplished by i.p. injection of 1 μ g of mAbs in a volume of 100 μ l every other day from postimplantation day 0 through 14. For direct therapy of intracerebral U87 MG. Δ EGFR tumors, 10 μ g of mAb 806, or the IgG2b isotype control, in a volume of 5 μ l were injected at the tumor-injection site every other day starting at day 1 for 5 days.

Immunohistochemistry. To assess angiogenesis in tumors, they were fixed in a solution containing zinc chloride, paraffin embedded, sectioned, and immunostained using a monoclonal rat antimouse CD31 antibody (Becton-Dickinson PharMingen; 1:200). Assessment of tumor cell proliferation was performed by Ki-67 immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissues. After deparaffinization and rehydration, the tissue sections were incubated with 3% hydrogen peroxide in methanol to quench endogenous peroxidase. The sections were blocked for 30 min with goat serum and incubated overnight with the primary antibody at 4°C. The sections were then washed with PBS and incubated with a biotinylated secondary antibody for 30 min. After several washes with PBS, products were visualized using streptavidin horseradish peroxidase with diaminobenzidine as chromogen and hematoxylin as the counterstain. As a measure of proliferation, the Ki-67 labeling index was determined as the ratio of labeled:total nuclei in high-power (3400) fields. Approximately 2000 nuclei were counted in each case by systematic random sampling. For macrophage and NK cell staining, frozen sections, fixed with buffered 4% paraformaldehyde solution, were immunostained using bio-tinylated mAb F4/80 (Serotec, Raleigh, NC) and polyclonal rabbit anti-sialo GM1 antibody (Dako Chemicals, Richmond, VA), respectively. Angiogenesis was quantitated as vessel area using computerized analysis. For this purpose, sections were immunostained using anti-CD31 and were analyzed using a computerized image analysis system without counterstain. MVAs were determined by capturing digital

WO 02/092771

PCT/US02/15185

images of the sections at 3200 magnification using a CCD color camera as described previously (27). Images were then analyzed using Image Pro Plus version 4.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) and MVA was determined by measuring the total amount of staining in each section. Four fields were evaluated for each slide. This value was represented as a percentage of the total area in each field. Results were confirmed in each experiment by at least two observers (K. M., H-J. S. H.).

TUNEL Assay. Apoptotic cells in tumor tissue were detected by using the TUNEL method as described previously (27). TUNEL-positive cells were counted at X400. The apoptotic index was calculated as a ratio of apoptotic cell number:total cell number in each field.

Statistical Analysis. The data were analyzed for significance by Student's *t* test, except for the *in vivo* survival assays, which were analyzed by Wilcoxon analysis.

RESULTS

Systemic Treatment of mAb 806 Extends the Survival of Mice Bearing Δ EGFR-overexpressing Intracranial Glioma Tumors.

To test the efficacy of the anti- Δ EGFR mAb, mAb 806, we treated nude mice bearing intracranial Δ EGFR-overexpressing glioma xenografts with i.p. injections of mAb 806, the isotype control IgG, or PBS. U87 MG- Δ EGFR cells were implanted intracranially into nude mice, and the treatments began on the same day as described in "Materials and Methods."

Animals treated with PBS or isotype control IgG had a median survival of 13 days, whereas mice treated with mAb 806 had a 61.5% increase in median survival up to 21 days ($P < 0.001$; **Figure 24A**). Treatment of mice 3 days postimplantation, after tumor establishment, also extended the median survival of the mAb 806-treated animals by 46.1% (from 13 days to 19 days; $P < 0.01$) compared with that of the control groups

(data not shown). To determine whether these antitumor effects of mAb 806 extended beyond U87 MG. Δ EGFR xenografts, we also did similar treatments of animals bearing other glioma cell xenografts of LN-Z308. Δ EGFR and A1207. Δ EGFR. The median survival of mAb 806-treated mice bearing LN-Z308. Δ EGFR xenografts was extended from 19 days for controls to 58 days ($P < 0.001$; **Figure 24B**). Remarkably, four of eight mAb 806-treated animals survived beyond 60 days (**Figure 24B**). The median survival of animals bearing A1207. Δ EGFR xenografts was also extended from 24 days for controls to 29 days ($P < 0.01$; data not shown).

mAb 806 Treatment Inhibits Δ EGFR-overexpressing Brain Tumor Growth.

Mice bearing U87 MG. Δ EGFR and LN-Z308. Δ EGFR xenografts were killed at day 9 and day 15, respectively. Tumor sections were histopathologically analyzed, and tumor volumes were determined as described in "Materials and Methods." Consistent with the results observed for animal survival, mAb 806 treatment significantly reduced the volumes of U87 MG. Δ EGFR by 90% ($P < 0.001$; **Figure 24C**), and of LN-Z308. Δ EGFR by 95% ($P < 0.001$; **Figure 24D**), of xenografts in comparison with those of the control groups. Similar results were obtained for animals bearing A1207. Δ EGFR tumors (65% volume reduction; $P < 0.01$; data not shown).

Intratumoral Treatment with mAb 806 Extends Survival of Mice Bearing U87 MG. Δ EGFR Brain Tumors.

We also determined the efficacy of direct intratumoral injection of mAb 806 for the treatment of U87 MG. Δ EGFR xenografts. Animals were given intratumoral injections of mAb 806 or isotype control IgG at 1 day postimplantation, as described in "Materials and Methods." Control animals survived for 15 days, whereas mAb 806 treated mice remained alive for 18 days ($P < 0.01$; **Figure 24E**). Although the intratumoral treatment with mAb 806 was somewhat effective, it entailed the difficulties of multiple intracranial injections and of increased risk of infection. We, therefore, focused on systemic treatments for additional studies.

mAb 806 Treatment Slightly Extends Survival of Mice Bearing U87 MG.wtEGFR but not of Mice Bearing U87 MG or U87 MG.DK Intracranial Xenografts.

To determine whether the growth inhibition by mAb 806 was selective for tumors expressing Δ EGFR, we treated animals bearing U87 MG, U87 MG.DK (kinase-deficient Δ EGFR) or U87 MG.wtEGFR brain xenografts. mAb 806 treatment did not extend the survival of mice implanted with U87 MG tumors (Figure 25A), which expressed a low level of endogenous wtEGFR (22), or of animals bearing U87 MG.DK xenografts, which overexpressed a kinase-deficient Δ EGFR in addition to a low level of endogenous wtEGFR (Figure 25B). The mAb 806 treatment slightly extended the survival of mice bearing U87 MG.wtEGFR tumors ($P < 0.05$; median survival, 23 days *versus* 26 days for the control groups), which overexpressed wtEGFR (Figure 25C).

mAb 806 Reactivity Correlates with *in Vivo* Antitumor Efficacy.

To understand the differential effect of mAb 806 on tumors expressing various levels or different types of EGFR, we determined mAb 806 reactivity with various tumor cells by FACS analysis. Consistent with previous reports (21), the anti-EGFR mAb 528 recognized both Δ EGFR and wtEGFR and demonstrated stronger staining for U87 MG. Δ EGFR cells compared with U87 MG cells (Figure 26A, 528). In contrast, antibody EGFR.1 reacted with wtEGFR but not with Δ EGFR (21), because U87 MG. Δ EGFR cells were as weakly reactive as U87 MG cells (Figure 26A, panel EGFR.1). This EGFR.1 antibody reacted with U87 MG.wtEGFR more intensively than with U87 MG cells, because U87 MG.wtEGFR cells overexpressed wtEGFR (Figure 26A, panel EGFR.1). Although mAb 806 reacted intensively with U87 MG. Δ EGFR and U87 MG.DK cells and not with U87 MG cells, it reacted weakly with U87 MG.wtEGFR, which indicated that mAb 806 is selective for Δ EGFR with a weak cross-activity to overexpressed wtEGFR (Figure 26A, panel mAb 806). This level of reactivity with U87 MG.wtEGFR was quantitatively and qualitatively similar to the extension of survival mediated by the antibody treatment (Figure 25C).

We further determined mAb 806 specificity by immunoprecipitation. EGFRs in various cell lines were immunoprecipitated with antibody 528, EGFR.1, and mAb 806. Blots of electrophoretically separated proteins were then probed with the anti-EGFR antibody, C13, which recognizes wtEGFR as well as Δ EGFR and DK (22). Consistent with the FACS analysis, antibody 528 recognized wtEGFR and mutant receptors (**Figure 26B**-panel IP: 528), whereas antibody EGFR.1 reacted with wtEGFR but not with the mutant species (**Figure 26B**, panel IP: EGFR.1). Moreover, the levels of mutant receptors in U87 MG. Δ EGFR and U87 MG.DK cells are comparable with those of wtEGFR in the U87 MG.wtEGFR cells (**Figure 26B**, panel IP: 528).

However, antibody mAb 806 was able to precipitate only a small amount of the wtEGFR from the U87 MG.wtEGFR cell lysates as compared with the larger amount of mutant receptor precipitated from U87 MG. Δ EGFR and U87 MG.DK cells, and an undetectable amount from the U87 MG cells (**Figure 26B**, panel IP: mAb 806). Collectively, these data suggest that mAb 806 recognizes an epitope in Δ EGFR that also exists in a small fraction of wtEGFR only when it is overexpressed on the cell surface.

mAb 806 Treatment Reduces Δ EGFR Autophosphorylation and Down-Regulates Bcl-X_L Expression in U87 MG. Δ EGFR Brain Tumors.

The mechanisms underlying the growth inhibition by mAb 806 were next investigated. Because the constitutively active kinase activity and autophosphorylation of the COOH terminus of Δ EGFR are essential for its biological functions (21, 22, 28, 29), Δ EGFR phosphorylation status was determined in tumors from treated and control animals. As shown in **Figure 27A**, mAb 806 treatment dramatically reduced Δ EGFR autophosphorylation, although receptor levels were only slightly decreased in the mAb 806-treated xenografts. We have previously shown that receptor autophosphorylation causes up-regulation of the antiapoptotic gene, *Bcl-X_L*, which plays a key role in reducing apoptosis of Δ EGFR-overexpressing tumors (28, 29). Therefore, the effect of mAb 806 treatment on *Bcl-X_L* expression was next

WO 02/092771

PCT/US02/15185

determined. Δ EGFR tumors from mAb 806-treated animals did indeed show reduced levels of Bcl-XL (Figure 27A).

mAb 806 Treatment Decreases Growth and Angiogenesis and Increases Apoptosis in U87 MG- Δ EGFR Tumors.

In light of the *in vivo* suppression caused by mAb 806 treatment and its biochemical effects on receptor signaling, we determined the proliferation rate of tumors from control or treated mice. The proliferative index, measured by Ki-67 staining of the mAb 806-treated tumors, was significantly lower than that of the control tumors ($P < 0.001$; Figure 28). In addition, analysis of the apoptotic index through TUNEL staining demonstrated a significant increase in the number of apoptotic cells in mAb 806-treated tumors as compared with the control tumors ($P < 0.001$; Figure 28). The extent of tumor vascularization was also analyzed by immunostaining of tumors from treated and control specimens for CD31. To quantify tumor vascularization, MVAs were measured using computerized image analysis. mAb 806-treated tumors showed 30% less MVA than did control tumors ($P < 0.001$; Figure 28). To understand whether interaction between receptor and antibody may elicit an inflammatory response, we stained tumor sections for the macrophage marker, F4/80, and the NK cell marker, asialo GM1. Macrophages were identified throughout the tumor matrix and especially accumulated around the mAb 806-treated-U87 MG- Δ EGFR-tumor periphery (Figure 28). We observed few NK cells infiltrated in and around the tumors and no significant difference between mAb 806-treated and isotype-control tumors (data not shown).

DISCUSSION

Δ EGFR appears to be an attractive potential therapeutic target for cancer treatment of gliomas. It is correlated with poor prognosis (25), whereas its genetic or pharmacological inhibition effectively suppresses growth of Δ EGFR-overexpressing cells both *in vitro* and *in vivo* (29, 30). Because this mutant EGFR is expressed on the cell surface, it represents a potential target for antibody-based therapy, and, here, we

WO 02/092771

PCT/US02/15185

tested the efficacy of a novel anti- Δ EGFR mAb, mAb 806, on the treatment of intracranial xenografts of Δ EGFR -overexpressing gliomas of different cellular backgrounds in nude mice. The systemic administration of mAb 806 inhibited tumor growth and extended animal survival. The effect of mAb 806 was evident for each cell line and was independent of the p53 status of the tumors, because U87 MG, Δ EGFR and A1207, Δ EGFR expressed wild-type p53, whereas LN-Z308, Δ EGFR was p53-null.

The enhanced tumorigenicity of Δ EGFR is mediated through its constitutively active kinase activity and tyrosine autophosphorylation at the COOH terminus (22, 28, 29). Phosphorylation of Δ EGFR in mAb 806-treated tumors was significantly decreased, proliferation was reduced, and apoptosis was elevated, which suggests that the antitumor effect of mAb 806 is, at least in part, attributable to the inhibition of the intrinsic function of the receptor. The Δ EGFR signaling caused up-regulation of the antiapoptotic gene, *Bcl-X L* (28), and treatment with mAb 806 resulted in down-regulation of *Bcl-X L* expression, which further suggests that the antitumor effect of mAb 806 is mediated through the inhibition of Δ EGFR signaling. The level of Δ EGFR in the mAb 806-treated tumors was also slightly reduced (**Figure 27A**), but not to a degree that was consistent with the degree of dephosphorylation of the mutant receptor or sufficient to explain the magnitude of its biological effect. The antitumor effect of mAb 806 is likely to result, at least in part, from the inhibition of the intrinsic signaling function of Δ EGFR. This assertion is also supported by the lack of antitumor effects on DK tumors, which bind to the antibody but are kinase deficient.

Intratumoral injection of a different anti- Δ EGFR antibody, mAbY10, inhibited the growth of Δ EGFR -expressing B16 melanoma tumors in mouse brains through a Fc/Fc receptor-dependent mechanism (31). In conjunction with this, mAbY10 was shown to mediate antibody-dependent macrophage cytotoxicity *in vitro* with both murine and human effector cells (17), although it had little effect with macrophage infiltration found in our mAb 806-treated tumors raises the question as to whether the antitumor effect of mAb 806 may be accomplished by macrophage-mediated

WO 02/092771

PCT/US02/15185

cytotoxicity. We believe this to be unlikely, because macrophage infiltration also occurred on mAb 806 treatment of U87 MG.DK (kinase-deficient Δ EGFR) tumors, in which it was ineffective in regulating tumor growth.

mAb 806 appears to be selective for Δ EGFR with a weak cross-reactivity with overexpressed wtEGFR. Consistent with the *in vitro* specificity, mAb 806 treatment was very effective in Δ EGFR-over-expressed tumors, whereas it showed a much less robust, but reproducible, growth inhibition for tumors overexpressing wtEGFR. However, the simple interaction between mAb 806 and its target molecules is insufficient to inhibit tumor growth because, although mAb 806 is capable of binding equally well to kinase-deficient Δ EGFR (DK) receptors and Δ EGFR, it is ineffective in affecting DK-expressing tumor growth. The inability of mAb 806 to interact with the low-level of wtEGFR normally present in cells suggests a large therapeutic window for Δ EGFR-overexpressed as well as, to a lesser extent, wtEGFR-overexpressed cancers when compared with normal tissues.

Although the mAb 806 treatment was effective for suppression of intracranial xenografts, it should be noted that the Δ EGFR-tumors eventually grew, and durable remissions were not achieved. This may have resulted from inefficient distribution of antibody in the tumor mass. mAbs in combination with other therapeutic modalities such as toxins, isotopes or drugs, for cancer treatments have been shown to be more effective than antibody alone in many cases (2, 3, 32-34). Chemotherapeutic drugs such as doxorubicin and cisplatin in conjunction with wtEGFR antibodies have also shown enhanced antitumor activity (35, 36). Combination treatments targeted at tumor growth as well as angiogenic development have more effectively inhibited glioblastoma growth than either treatment alone (27). This raises the possibility that mAb 806 in combination with chemotherapeutic drugs or compounds modulating angiogenesis may be even more effective than mAb 806 alone.

REFERENCES

1. Old, L. J. Immunotherapy for cancer. *Sci. Am.*, 275: 102-109, 1996.

2. Weiner, L. M. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 41-50, 1999.
3. Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat. Rev.*, 26: 269-286, 2000.
4. Ashley, D. M., Batra, S. K., and Bigner, D. D. Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors. *J. Neurooncol.*, 35: 259-273, 1997.
5. Fan, Z., and Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67-73, 1998.
6. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and Press, M. F. Studies of the *HER-2/neu* proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (Wash. DC)*, 244: 707-712, 1989.
7. Harari, D., and Yarden, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene*, 19: 6102-6114, 2000.
8. Slivkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 60-70, 1999.
9. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C., Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D., Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, I. C., and Norton, L. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14: 737-744, 1996.
10. Baselga, J. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37: 18-24, 2001.
11. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232, 1995.
12. Mendelsohn, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 3: 2703-2707, 1997.
13. Waksal, H. W. Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer.

Cancer Metastasis Rev., 18: 427-436, 1999.

14. Faillet, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. Neurosurgery (Baltimore), 39: 478-483, 1996.

15. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. J. Neurovirol., 4: 148-158, 1998.

16. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2965-2969, 1992.

17. Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., and Bigner, D. D. Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. Cancer Metastasis Rev., 18: 451-464, 1999.

18. Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. Cancer Res., 53: 3217-3220, 1993.

19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biggel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. Cancer Res., 55: 5536-5539, 1995.

20. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. Br. J. Cancer, 82: 186-194, 2000.

21. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 7727-7731, 1994.

22. Huang, H.-J. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D.,

- Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927-2935, 1997.
23. Mishima, K., Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion *in vivo*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40: 519, 1999.
24. Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. Typhostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.*, 56: 3859-3861, 1996.
25. Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery (Baltimore)*, 45: 1442-1453, 1999.
26. Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5724-5729, 1998.
27. Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8484-8489, 2000.
28. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56: 5079-5086, 1996.
29. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.*, 162 (Suppl. 1): S17-S21, 2001.

30. Halatsch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. F., and Ohnuma, T. Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. *J. Neurosurg.*, 92: 297-305, 2000.
31. Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
32. Trail, P. A., and Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.
33. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finu, R. S., Maneval, D. A., and Slamon, D. J. Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*, 17: 2235-2249, 1998.
34. Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 58: 2823-2831, 1998.
35. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., and Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 85: 1327-1333, 1993.
36. Fan, , Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus *cis*-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.

EXAMPLE 20

MONOCLONAL ANTIBODY 806 INHIBITS THE GROWTH OF TUMOR XENOGRAFTS EXPRESSING EITHER THE DE2-7 OR AMPLIFIED EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) BUT NOT WILD-TYPE EGFR

The following example presents findings by the present inventors that is also set forth in Luwor et al., (2001) Cancer Research, 61:5355-5361. The disclosure of this publication is incorporated herein in its entirety with cross referencing to the Figures herein where appropriate and made a part hereof.

The monoclonal antibody (mAb) 806 was raised against the delta2-7 epidermal growth factor receptor (de2-7 EGFR or EGFRvIII), a truncated version of the EGFR commonly expressed in glioma. Unexpectedly, mAb 806 also bound the EGFR expressed by cells exhibiting amplification of the *EGFR* gene but not to cells or normal tissue expressing the wild-type receptor in the absence of gene amplification. The unique specificity of mAb 806 offers an advantage over current EGFR antibodies, which all display significant binding to the liver and skin in humans. Therefore, we examined the antitumor activity of mAb 806 against human tumor xenografts grown in nude mice. The growth of U87 MG xenografts, a glioma cell line that endogenously expresses $\sim 10^5$ EGFRs in the absence of gene amplification, was not inhibited by mAb 806. In contrast, mAb 806 significantly inhibited the growth of U87 MG xenografts transfected with the de2-7 EGFR in a dose-dependent manner using both preventative and established tumor models. Significantly, U87 MG cells transfected with the wild-type EGFR, which increased expression to $\sim 10^6$ EGFRs/cell and mimics the situation of gene amplification, were also inhibited by mAb 806 when grown as xenografts in nude mice. Xenografts treated with mAb 806 all displayed large areas of necrosis that were absent in control tumors. This reduced xenograft viability was not mediated by receptor down-regulation or clonal selection because levels of antigen expression were similar in control and treated groups. The antitumor effect of mAb 806 was not restricted to U87 MG cells because the antibody inhibited the growth of new and established A431 xenografts, a cell line expressing $>10^6$ EGFRs/cell. This study demonstrates that mAb 806 possesses significant antitumor activity.

The de2-7 EGFR specific mAb 806 was produced after immunization of mice with NR6 mouse fibroblasts expressing the truncated de2-7 EGFR. mAb 806 binds the

WO 02/092771

PCT/US02/15185

U87 MG glioma cell line transfected with the de2-7 EGFR but not the parental U87 MG cell line, which expresses the wt EGFR without gene amplification.³ Similar results were observed *in vivo* with mAb 806 showing specific targeting of de2-7 EGFR expressing U87 MG xenografts but not parental U87 MG tumors.³ Interestingly, mAb 806 was capable of binding an EGFR subset (~10%) on the surface of the A431 cell line, which contains an amplified *EGFR* gene. Therefore, unlike all other de2-7 EGFR-specific antibodies, which recognize the unique peptide junction that is generated by the de2-7 EGFR truncation, mAb 806 binds to an epitope also found in overexpressed wt EGFR. However, it would appear that this epitope is preferentially exposed in the de2-7 EGFR and a small proportion of receptors expressed in cells containing wt *EGFR* gene amplification. Importantly, normal tissues that expresses high levels of endogenous wt EGFR, such as liver and skin, show no significant mAb 806 binding. On the basis of the unique property of the mAb 806 to bind both the de2-7 and amplified wt EGFR but not the native wt EGFR when expressed at normal levels, we decided to examine the efficacy of mAb 806 against several tumor cell lines grown as xenografts in nude mice.

MATERIALS AND METHODS

Cell Lines and Monoclonal Antibodies. The human glioblastoma cell line U87 MG, which endogenously expresses the wt EGFR, and the transfected cell lines U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR, which express the de2-7 EGFR and overexpress the wt EGFR, respectively, have been described previously (16, 23). The epidermoid carcinoma cell line A431 has been described previously (24).

All cell lines were maintained in DMEM (DMEM/F12; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) containing 10% FCS (CSL, Melbourne, Victoria, Australia), 2 mM glutamine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and peni-cillin/ streptomycin (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). In addition, the U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR cell lines were maintained in 400 mg/ml of geneticin (Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Australia). Cell lines were grown at 37°C in

WO 02/092771

PCT/US02/15185

a unidified atmosphere of 5% CO₂. The mAb 806 (IgG2b) was produced after immunization of mice with NR6 mouse fibroblasts expressing the de2-7 EGFR. mAb 806 was selected after rosette assays showed binding to NR6 cells, which overexpressed the de2-7 EGFR (titer of 1:2500). mAb 528, which recognizes both de2-7 and wt EGFR, has been described previously (10) and was produced in the Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Victoria, Australia) using a hybridoma obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD). The DH8.3 mAb, which is specific for the de2-7 EGFR, was kindly provided by Prof. William Gullick (University of Kent and Canterbury, Kent, United Kingdom) (19). The polyclonal antibody sc-03 directed to the COOH-terminal domain of the EGFR was purchased from Santa Cruz Bio-technology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

FACS Analysis of Receptor Expression. Cultured parental and trans-fected U87 MG cell lines were analyzed for wt and de2-7 EGFR expression using the 528, 806, and DH8.3 antibodies. Cells (1×10^6) were incubated with 5 mg/ml of the appropriate antibody or an isotype-matched negative control in PBS containing 1% HSA for 30 min at 4°C. After three washes with PBS/1% HSA, cells were incubated an additional 30 min at 4°C with FITC-coupled goat antimouse antibody (1:100 dilution; Calbiochem, San Diego, CA). After three subsequent washes, cells were analyzed on an Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL) by observing a minimum of 20,000 events and analyzed using EXPO (version 2) for Windows.

Scatchard Analysis. The mAb 806 was labeled with ¹²⁵I (Amrad, Mel-bourne, Victoria, Australia) by the Chloramine T method. All binding assays were performed in 1% HSA/PBS on $1-2 \times 10^6$ live U87 MG, Δ2-7 or A431 cells for 90 min at 4°C with gentle rotation. A set concentration of 10 ng/ml ¹²⁵I-labeled mAb 806 was used in the presence of increasing concentrations of unlabeled antibody. Nonspecific binding was determined in the presence of 10,000-fold excess of unlabeled antibody. After incubation, cells were washed and counted for bound ¹²⁵I-labeled mAb 806

using a COBRA II gamma counter (Packard Instrument Company, Meriden, CT). Scatchard analysis was done after correction for immunoreactivity.

Immunoprecipitation Studies. Cells were labeled for 16 h with 100 mCi/ml of Tran 35 S-Label (ICN Biomedicals, Irvine, CA) in DMEM without methionine/cysteine supplemented with 5% dialyzed FCS. After washing with PBS, cells were placed in lysis buffer (1% Triton X-100, 30 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonylfluoride, 150 nM aprotinin, 1 mM E-64 protease inhibitor, 0.5 mM EDTA, and 1 mM leupeptin, pH 7.4) for 1 h at 4°C. Lysates were clarified by centrifugation for 10 min at 12,000 *g* and then incubated with 5 mg of appropriate antibody for 30 min at 4°C before the addition of protein A-Sepharose. Immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer, mixed with SDS sample buffer, separated by gel electrophoresis using a 7.5% gel that was then dried, and exposed to X-ray film.

Xenograft Models. Consistent with previous reports (23, 25), U87 MG cells transfected with de2-7 EGFR grew more rapidly than parental cells and U87 MG cells transfected with the wt EGFR. Tumor cells (3×10^6) in 100 ml of PBS were inoculated s.c. into both flanks of 4-6-week-old, female nude mice (Animal Research Center, Western Australia, Perth, Australia). Therapeutic efficacy of mAb 806 was investigated in both preventative and established tumor models. In the preventative model, five mice with two xenografts each were treated i.p. with either 0.1 or 1 mg of mAb 806 or vehicle (PBS) starting the day before tumor cell inoculation. Treatment was continued for a total of six doses, three times per week for 2 weeks. In the established model, treatment was started when tumors had reached a mean volume of 65 mm³ (U87 MG.Δ2-7), 84 mm³ (U87 MG), 73 mm³ (U87 MG.wtEGFR), or 201 mm³ (A431 tumors). Tumor volume in mm³ was determined using the formula (length $\times$ width $\times$ 2)/2, where length was the longest axis and width the measurement at right angles to the length (26). Data were expressed as mean tumor volume $\pm$ SE for each treatment group. This research project was approved by the Animal Ethics Committee of the Austin and Repatriation Medical Centre.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Histological Examination of Tumor Xenografts. Xenografts were excised at the times indicated and bisected. One half was fixed in 10% formalin/PBS before being embedded in paraffin. Four- mm sections were then cut and stained with H&E for routine histological examination. The other half was embedded in Tissue Tek OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, CA), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Thin (5- mm) cryostat sections were cut and fixed in ice-cold acetone for 10 min, followed by air drying for an additional 10 min. Sections were blocked in protein blocking reagent (Lipshaw Immunon, Pittsburgh, PA) for 10 min and then incubated with biotinylated primary antibody (1 mg/ml) for 30 min at room temperature. All antibodies were biotinylated using the ECL protein biotinylation module (Amersham, Baulkham Hills, NSW, Australia), as per the manufacturer's instructions. After rinsing with PBS, sections were incubated with a streptavidin- horseradish peroxidase complex for an additional 30 min (Silenus, Melbourne, Victoria, Australia). After a final PBS wash, the sections were exposed to 3-amino-9-ethylcarbazole substrate [0.1 M acetic acid, 0.1 M sodium acetate, 0.02 M 3-amino-9-ethylcarbazole (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)] in the presence of hydrogen peroxide for 30 min. Sections were rinsed with water and counterstained with hematoxylin for 5 min and mounted.

Statistical Analysis. The *in vivo* tumor measurements in mm³ are expressed as the mean $\pm$ SE. Differences between treatment groups at given time points were tested for statistical significance using Student's *t* test.

RESULTS

Binding of Antibodies to Cell Lines. To determine the specificity of mAb 806, its binding to U87 MG, U87 MG.D2-7, and U87 MG.wtEGFR cells was analyzed by FACS. An irrelevant IgG2b (mAb 100-310 directed to the human antigen A33) was included as an isotype control for mAb 806, and the 528 antibody was included because it recognizes both the de2-7 and wt EGFR. Only the 528 antibody was able

to stain the parental U87 MG cell line (**Figure 29**), consistent with previous reports demonstrating that these cells express the wt EGFR (16). mAb 806 had binding levels similar to the control antibody, clearly demonstrating that it is unable to bind the wt EGFR (**Figure 29**). Binding of the isotype control antibody to the U87 MG.D2-7 and U87 MG.wtEGFR cell lines was similar to that observed for the U87 MG cells. mAb 806 stained U87 MG.D2-7 and U87 MG. wtEGFR cells, indicating that mAb 806 specifically recognized the de2-7 EGFR and a subset of the overexpressed EGFR (**Figure 29**). As expected, the 528 antibody stained both the U87 MG.D2-7 and U87 MG.wtEGFR cell lines (**Figure 29**). The intensity of 528 antibody staining on U87 MG.wtEGFR cells was much higher than mAb 806, suggesting that mAb 806 only recognizes a portion of the overexpressed EGFR. The mAb 806 reactivity observed with U87 MG.wtEGFR cells is similar to that obtained with A431 cells, another cell line that over expresses the wt EGFR.³

A Scatchard analysis was performed using U87 MG.D2-7 and A431 cells to determine the relative affinity and binding sites for mAb 806 on each cell line. mAb 806 had an affinity for the de2-7 EGFR receptor of $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and recognized an average (three separate experiments) of 2.4×10^5 binding sites/cell. In contrast, the affinity of mAb 806 for the wt EGFR on A431 cells was only $9.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Interestingly, mAb 806 recognized 2.3×10^5 binding sites on the surface of A431, which is some 10-fold lower than the reported number of EGFR found in these cells. To confirm the number of EGFR on the surface of our A431 cells, we performed a Scatchard analysis using ^{125}I -labeled 528 antibody. As expected, this antibody bound to approximately 2×10^6 sites on the surface of A431 cells. Thus, it appears that mAb 806 only binds a portion of the EGFR receptors on the surface of A431 cells. Importantly, ^{125}I -labeled mAb 806 did not bind to the parental U87 MG cells at all, even when the number of cells was increased to 1×10^7 .

Immunoprecipitations. We further characterized mAb 806 reactivity in the various cell lines by immunoprecipitation after 35 S-labeling using mAb 806, sc-03 (a commercial polyclonal antibody specific for the COOH-terminal domain of the

EGFR) and a IgG2b isotype control. The sc-03 antibody immunoprecipitated three bands from U87 MG.Δ2-7 cells, a doublet corresponding to the two de2-7 EGFR bands observed in these cells and a higher molecular weight band corresponding to the wt EGFR (Figure 30). In contrast, although mAb 806 immunoprecipitated the two de2-7 EGFR bands, the wt EGFR was completely absent (Figure 30). The pattern seen in U87 MG.wtEGFR and A431 cells was essentially identical. The sc-03 antibody immunoprecipitated a single band corresponding to the wt EGFR from both cell lines (Figure 30). The mAb 806 also immunoprecipitated a single band corresponding to the wt EGFR from both U87 MG.wtEGFR and A431 cells (Figure 30). Consistent with the FACS and Scatchard data, the amount of EGFR immunoprecipitated by mAb 806 was substantially less than the total EGFR present on the cell surface. Given that mAb 806 and the sc-03 immunoprecipitated similar amounts of the de2-7 EGFR, this result supports the notion that the mAb 806 antibody only recognizes a portion of the EGFR in cells overexpressing the receptor. Comparisons between mAb 806 and the 528 antibody showed an identical pattern of reactivity (data not shown). An irrelevant IgG2b (an isotype control for mAb 806) did not immunoprecipitate EGFR from any of the cell lines (Figure 30). Using identical conditions, mAb 806 did not immunoprecipitate the EGFR from the parental U87 MG cells (data not shown).

Efficacy of mAb 806 in Preventative Models. mAb 806 was examined for efficacy against U87 MG and U87 MG.Δ2-7 tumors in a preventative xenograft model. Antibody or vehicle was administered i.p. the day before tumor inoculation and was given three times per week for 2 weeks (see "Materials and Methods"). At a dose of 1 mg/injection, mAb 806 had no effect on the growth of parental U87 MG xenografts that express the wt EGFR (Figure 9A). In contrast, mAb 806 inhibited significantly the growth of U87 MG.Δ2-7 xenografts in a dose-dependent manner (Figure 9B). Twenty days after tumor inoculation, when control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1600 \pm 180 \text{ mm}^3$ for the control group, a significantly smaller $500 \pm 95 \text{ mm}^3$ for the 0.1 mg/injection group ($P < 0.0001$) and $200 \pm 42 \text{ mm}^3$ for the 1 mg/injection group ($P < 0.0001$). Treatment groups were sacrificed at day 24, at which

WO 02/092771

PCT/US02/15185

time the mean tumor volumes were $1300 \pm 240 \text{ mm}^3$ for the 0.1 mg treated group and $500 \pm 100 \text{ mm}^3$ for the 1 mg group ($P < 0.005$).

Efficacy of mAb 806 in Established Xenograft Models. Given the efficacy of mAb 806 in the preventative xenograft model, its ability to inhibit the growth of established tumor xenografts was examined. Antibody treatment was as described in the preventative model, except that it commenced when tumors had reached a mean tumor volume of 65 mm^3 (10 days after implantation) for the U87 MG. $\Delta 2-7$ xenografts and 84 mm^3 (19 days after implantation) for the parental U87 MG xenografts. Once again, mAb 806 had no effect on the growth of parental U87 MG xenografts, even at a dose of 1 mg/injection (**Figure 10A**). In contrast, mAb 806 significantly inhibited the growth of U87 MG. $\Delta 2-7$ xenografts in a dose-dependent manner (**Figure 10B**). At day 17, 1 day before control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $900 \pm 200 \text{ mm}^3$ for the control group, $400 \pm 60 \text{ mm}^3$ for the 0.1 mg/injection group ($P < 0.01$), and $220 \pm 60 \text{ mm}^3$ for the 1 mg/injection group ($P < 0.002$). Treatment of U87 MG. $\Delta 2-7$ xenografts with an IgG2b isotype control had no effect on tumor growth (data not shown).

To examine whether the growth inhibition observed with mAb 806 was restricted to cells expressing $\Delta 2-7$ EGFR, its efficacy against the U87 MG.wtEGFR xenografts was also examined in an established model. These cells serve as a model for tumors containing amplification of the *EGFR* gene without $\Delta 2-7$ EGFR expression. mAb 806 treatment commenced when tumors had reached a mean tumor volume of 73 mm^3 (22 days after implantation). mAb 806 significantly inhibited the growth of established U87 MG.wtEGFR xenografts when compared with control tumors treated with vehicle (**Figure 10C**). On the day control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1000 \pm 300 \text{ mm}^3$ for the control group and $500 \pm 80 \text{ mm}^3$ for the group treated with 1 mg/injection ($P < 0.04$).

Histological and Immunohistochemical Analysis of Established

Tumors. To evaluate potential histological differences between mAb 806-treated and control U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR xenografts, formalin-fixed, paraffin-embedded sections were stained with H&E (**Figure 31**). Areas of necrosis were seen in sections from mAb 806-treated U87 MG.Δ2-7 (mAb 806-treated xenografts were collected 24 days after tumor inoculation and vehicle treated xenografts at 18 days), and U87 MG.wtEGFR xenografts (mAb 806 xenografts were collected 42 days after tumor inoculation and vehicle treated xenografts at 37 days; **Figure 31**). This result was consistently observed in a number of tumor xenografts (*n* 5 4 for each cell line). However, sections from U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR xenografts treated with vehicle (*n* 5 5) did not display the same areas of necrosis seen after mAb 806 treatment (**Figure 31**). Vehicle and mAb 806-treated xenografts removed at identical times also showed these differences in tumor necrosis (data not shown). Thus, the increase in necrosis observed was not caused by the longer growth periods used for the mAb 806-treated xenografts. Furthermore, sections from mAb 806-treated U87 MG xenografts were also stained with H&E and did not reveal any areas of necrosis (data not shown), further supporting the hypothesis that mAb 806 binding induces decreased cell viability, resulting in increased necrosis within tumor xenografts.

An immunohistochemical analysis of U87 MG, U87 MG.Δ2-7, and U87 MG.wtEGFR xenograft sections was performed to determine the levels of de2-7 and wtEGFR expression after mAb 806 treatment (**Figure 32**). As expected, the 528 antibody stained all xenografts sections with no obvious decrease in intensity between treated and control tumors (**Figure 32**). Staining of U87 MG sections was undetectable with the mAb 806; however, positive staining of U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR xenograft sections was observed (**Figure 32**). There was no difference in mAb 806 staining intensity between control and treated U87 MG.Δ2-7 and U87 MG.wtEGFR xenografts, suggesting that antibody treatment does not lead to the selection of clonal variants lacking mAb 806 reactivity.

Treatment of A431 Xenografts with mAb 806. To demonstrate that the antitumor effects of mAb 806 were not restricted to U87 MG cells, the antibody was administered to mice containing A431 xenografts. These cells contain an amplified *EGFR* gene and express approximately 2×10^6 receptors/cells. We have previously shown that mAb 806 binds ~10% of these EGFRs and targets A431 xenografts.⁽³⁾ mAb 806 significantly inhibited the growth of A431 xenografts when examined in the preventative xenograft model described previously (**Figure 11A**). At day 13, when control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1400 \pm 150 \text{ mm}^3$ in the vehicle-treated group and $260 \pm 60 \text{ mm}^3$ for the 1 mg/injection treatment group ($P < 0.0001$). In a separate experiment, a dose of 0.1mg of mAb also inhibited significantly ($P < 0.05$) the growth of A431 xenografts in a preventative model (data not shown).

Given the efficacy of mAb 806 in the preventative A431 xenograft model, its ability to inhibit the growth of established tumor xenografts was examined. Antibody treatment was as described in the preventative model, except it was not started until tumors had reached a mean tumor volume of $200 \pm 20 \text{ mm}^3$. mAb 806 significantly inhibited the growth of established A431 xenografts (**Figure 11B**). At day 13, the day control animals were sacrificed, the mean tumor volume was $1100 \pm 100 \text{ mm}^3$ for the control group and $450 \pm 70 \text{ mm}^3$ for the 1 mg/injection group ($P < 0.0001$).

We have shown previously³ that mAb 806 targets both de2-7 EGFR-transfected U87 MG xenografts and A431 xenografts that over express the wt EGFR. mAb 806 did not target parental U87 MG cells, which express $\sim 10^5$ EGFR³ (16). As assessed by FACS, immunohistochemistry, and immunoprecipitation, we now demonstrate that mAb 806

is also able to specifically bind U87 MG.wtEGFR cells, which express $>10^6$ EGFRs/cell. Thus, the previous observed binding of mAb 806 to A431 cells is not the result of some unusual property of these cells but rather appears to be a more general phenomenon related to over expression of the wt EGFR.

(a) We were unable to detect mAb 806 binding to the parental U87 MG cell line, which expresses 1×10^5 wt EGFRs/cell (16), either by FACS, immunoprecipitation, immunohistochemistry, or with iodinated antibody. Indeed, iodinated mAb 806 did not bind to U87 MG cell pellets containing 1×10^7 cells, which based on the Scatchard data using 1×10^6 A431 cells, are conditions that should detect low level antibody binding (*i.e.*, the total number of receptors being similar in both cases).

(b) Scatchard analysis clearly showed that mAb 806 only bound to 10% of the total EGFR on the surface of A431 cells. If mAb 806 simply binds to the wt EGFR with low affinity, then it should have bound to a considerably higher percentage of the receptor.

(c) Comparative immunoprecipitation of the A431 and U87 MG. wtEGFR cell lines with mAb 806 and the sc-03 antibody also supported the hypothesis that only a subset of receptors are recognized by mAb 806. Taken together, these results support the notion that mAb

806 recognizes a EGFR subset on the surface of cells overexpressing the EGFR. We are currently analyzing the EGFR immunoprecipitated by mAb 806 to see if it displays altered biochemical properties related to glycosylation or kinase activity.

The xenograft studies with mAb 806 described here demonstrate dose-dependent inhibition of U87 MG.D2-7 xenograft growth. In contrast, no inhibition of parental U87 MG xenografts was observed, despite the fact that they continue to express the wt EGFR *in vivo*. mAb 806 not only significantly reduced xenograft volume, it also induced significant necrosis within the tumor. As noted above, other de2-7 EGFR-specific mAbs have been generated (20-22), but this is the first report showing the successful therapeutic use of such an antibody *in vivo* against a human de2-7 EGFR-expressing glioma xenograft. A recent report demonstrated that the de2-7 EGFR-specific Y10 mAb had *in vivo* antitumor activity against murine B16 melanoma cells transfected with a murine homologue of the human de2-7 EGFR (33). Y10 mediated *in vitro* cell lysis (>90%) of B16 melanoma cells expressing the de2-7 EGFR in the

WO 02/092771

PCT/US02/15185

absence of complement or effector cells. In contrast to their *in vitro* observations, the *in vivo* Y10 antibody efficacy was completely mediated through Fc function when using B16 melanoma cells grown as xenografts in an immuno-competent model. Thus, the direct effects observed *in vitro* do not seem to be replicated when cells are grown as tumor xenografts.

Overexpression of the EGFR has been reported in a number of different tumors and is observed in most gliomas (4, 14). It has been proposed that the subsequent EGFR over expression mediated by receptor gene amplification may confer a growth advantage by increasing intracellular signaling and cell growth (34). The U87 MG cell line was transfected with the wt EGFR to produce a glioma cell that mimics the process of *EGFR* gene amplification. Treatment of established U87 MG.wtEGFR xenografts with mAb 806 resulted in significant growth inhibition. Thus, mAb 806 also mediates *in vivo* antitumor activity against cells overexpressing the EGFR. Interestingly, mAb 806 inhibition of U87 MG.wtEGFR xenografts was less pronounced than that observed with U87 MG.Δ2-7 tumors. This probably reflects the fact that mAb 806 has a lower affinity for the overexpressed wt EGFR and only binds a small proportion of receptors expressed on the cell surface.(3) However, it should be noted that despite the small effect on U87 MG.wtEGFR xenograft volumes, mAb 806 treatment produced large areas of necrosis within these xenografts. To exclude the possibility that mAb 806 only mediates inhibition of the U87 MG-derived cell lines, we tested its efficacy against A431 xenografts. This squamous cell carcinoma-derived cell line contains significant *EGFR* gene amplification, which is retained both *in vitro* and *in vivo*. Treatment of A431 xenografts with mAb 806 produced significant growth inhibition in both a preventative and established model, indicating the antitumor effects of mAb 806 are not restricted to transfected U87 MG cell lines.

Complete prevention of A431 xenograft growth by antibody treatment has been reported previously. The wt EGFR mAbs 528, 225, and 425 all prevented the formation of A431 xenografts when administered either on the day or 1 day after tumor inoculation (9, 10). The

reason for this difference in efficacy between these wt EGFR anti-bodies and mAb 806 is not known but may be related to the mechanism of cell growth inhibition. The wt EGFR antibodies function by blocking ligand binding to the EGFR, but this is probably not the case with mAb 806 because it only binds a small EGFR subset on the surface of A431 cells. The significant efficacy of mAb 806 against U87 MG cells expressing the ligand-independent de2-7 EGFR further supports the notion that this antibody mediates its antitumor activity by a mechanism not involving ligand blockade. Therefore, we are currently investigating the nonimmunological and immunological mechanisms that contribute to the antitumor effects of mAb 806. Nonimmunological mechanisms may include subtle changes in receptor levels, blockade of signaling, or induction of inappropriate signaling.

Previously, agents such as doxorubicin and cisplatin in conjunction with wt EGFR antibodies have produced enhanced antitumor activity (35, 36). The combination of doxorubicin and mAb 528 resulted in total eradication of established A431 xenografts, whereas treatment with either agent alone caused only temporary *in vivo* growth inhibition (36). Likewise, the combination of cisplatin and either mAb 528 or 225 also led to the eradication of well-established A431 xenografts, which was not observed when treatment with either agent was used (35). Thus, future studies involving the combination of chemotherapeutic agents with mAb 806 are planned using xenograft models.

Maybe the most important advantage of mAb 806 compared with current EGFR antibodies is that it should be possible to directly conjugate cytotoxic agents to mAb 806. This approach is not feasible with current EGFR-specific antibodies because they target the liver and cytotoxic conjugation would almost certainly induce severe toxicity. Conjugation of cytotoxic agents such as drugs

(37) or radioisotopes (38) to antibodies has the potential to improve efficacy and reduce the systemic toxicity of these agents. This study clearly demonstrates that mAb 806 has significant *in vivo* antitumor activity against de2-7 EGFR-positive xenografts and tumors overexpressing the EGFR. The unique specificity of mAb 806 suggests immunotherapeutic potential in targeting a number of tumor types, particularly head and neck tumors and glioma, without the restrictions associated with normal tissue uptake.

REFERENCES

1. Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapies. *Curr. Opin. Immunol.*, *9*: 717-722, 1997.
2. Fan, Z., and Mendelsohn, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, *10*: 67-73, 1998.
3. Garcia de Palezzo, I. E., Adams, C. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, *53*: 3217-3220, 1993.
4. Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, *4*: 148-158, 1998.
5. Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J. Clin. Pathol.*, *52*: 574-580, 1999.
6. Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Tweardy, D. J. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, *90*: 824-832, 1998.
7. Fan, Z., Masui, H., Altus, I., and Mendelsohn, J. Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, *53*: 4322-4328, 1993.

8. Teramoto, T., Oncia, M., Tokunaga, A., and Asano, G. Inhibitory effect of anti-epidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer. *Cancer (Phila.)*, 77: 1639-1645, 1996.
9. Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Stepiewski, Z., and Koprowski, H. Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects. *Cancer Res.*, 47: 3692-3696, 1987.
10. Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 44: 1002-1007, 1984.
11. Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery*, 39: 478-483, 1996.
12. Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., *et al.* Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 97-104, 1991.
13. Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J. Clin. Oncol.*, 18: 904, 2000.
14. Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.*, 8: 1197-1206, 1997.
15. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. Identical splicing of

- aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8602-8606, 1990.
16. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727-7731, 1994.
 17. Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res.*, 60: 3081-3087, 2000.
 18. Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sanchu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186-194, 2000.
 19. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gurn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536-5539, 1995.
 20. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., *et al.* Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.*, 55: 3140-3148, 1995.
 21. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. Specific targeting of a mutant, activated FGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, 63: 537-543, 1995.
 22. Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., and Takahashi, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer*, 73: 1366-1372, 1996.
 23. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Cancer Res., 56: 5079-5086, 1996.

24. Sato, J. D., Ie, A. D., and Kawamoto, T. Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. *Methods Enzymol.*, 146: 63-81, 1987.

25. Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang,

C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., and Caveness, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927-2935, 1997.

26. Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., and Scott, A. M. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3621-3628, 2000.

27. Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., and Kumar, R. Growth

regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor α . *Cancer Res.*, 52: 3335-3339, 1992.

28. Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tomos,

C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., *et al.* Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852. *J. Clin. Oncol.*, 12: 730-739, 1994.

29. Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson,

S., Mellstedt, H., and Boethius, J. Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 157-164, 1997.

30. Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadgarvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., *et al.* Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase II trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22: 225-230, 1992.
31. Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.*, 55: 4375-4382, 1995.
32. Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.*, 57: 1510-1515, 1997.
33. Sampson, J. H., Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
34. Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., and Buick, R. N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 251-257, 1987.
35. Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus *cis*-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.
36. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., Jr., and

Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1327-1333, 1993.

37. Trail, P. A., and Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.

38. DeNardo, S. J., Kroger, L. A., and DeNardo, G. L. A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 563-569, 1999.

EXAMPLE 21

CONSTRUCTION, EXPRESSION AND ANALYSIS OF CHIMERIC 806 ANTIBODY

Chimeric antibodies are a class of molecules in which heavy and light chain variable regions of for instance, a mouse, rat or other species are joined onto human heavy and light chain regions. Chimeric antibodies are produced recombinantly. One advantage of chimeric antibodies is that they can reduce xenoantigenic effects, the inherent immunogenicity of non-human antibodies (for instance, mouse, rat or other species). In addition, recombinantly prepared chimeric antibodies can often be produced in large quantities, particularly when utilizing high level expression vectors.

For high level production, the most widely used mammalian expression system is one which utilizes the gene amplification procedure offered by dehydrofolate reductase deficient ("dhfr-") Chinese hamster ovary cells. The system is well known to the skilled artisan. The system is based upon the dehydrofolate reductase "dhfr" gene, which encodes the DHFR enzyme, which catalyzes conversion of dehydrofolate to tetrahydrofolate. In order to achieve high production, dhfr- CHO cells are transfected with an expression vector containing a functional DHFR gene, together with a gene that encodes a desired protein. In this case, the desired protein is recombinant

WO 02/092771

PCT/US02/15185

antibody heavy chain and/or light chain.

By increasing the amount of the competitive DHFR inhibitor methotrexate (MTX), the recombinant cells develop resistance by amplifying the dhfr gene. In standard cases, the amplification unit employed is much larger than the size of the dhfr gene, and as a result the antibody heavy chain is co-amplified.

When large scale production of the protein, such as the antibody chain, is desired, both the expression level, and the stability of the cells being employed, are critical. In long term culture, recombinant CHO cell populations lose homogeneity with respect to their specific antibody productivity during amplification, even though they derive from a single, parental clone.

Bicistronic expression vectors were prepared for use in recombinant expression of the chimeric antibodies. These bicistronic expression vectors, employ an "internal ribosomal entry site" or "IRES." In these constructs for production of chimeric antiEGFR, the immunoglobulin chains and selectable markers cDNAs are linked via an IRES. IRES are cis-acting elements that recruit the small ribosomal subunits to an internal initiator codon in the mRNA with the help of cellular trans-acting factors. IRES facilitate the expression of two or more proteins from a polycistronic transcription unit in eukaryotic cells. The use of bicistronic expression vectors in which the selectable marker gene is translated in a cap dependent manner, and the gene of interest in an IRES dependent manner has been applied to a variety of

WO 02/092771

PCT/US02/15185

experimental methods. IRES elements have been successfully incorporated into vectors for cellular transformation, production of transgenic animals, recombinant protein production, gene therapy, gene trapping, and gene targeting.

Synopsis of Chimeric Antibody 806 (ch806) Construction

The chimeric 806 antibody was generated by cloning the VH and VL of the 806 antibody from the parental murine hybridoma using standard molecular biology techniques. The VH and VL were then cloned into the pREN mammalian expression vectors, the construction of which are set forth in SEQ ID NO:7 and SEQ ID NO:8, and transfected into CHO (DHFR ^{-/-}ve) cells for amplification and expression. Briefly, following trypsinization 4×10^6 CHO cells were co-transferred with 10 μ g of each of the LC and HC expression vectors using electroporation under standard conditions. Following a 10min rest period at room temperature, the cells were added to 15ml medium (10% fetal calf serum, hypoxanthine/thymidine supplement with additives) and transferred to 15x 10cm cell culture petri dishes. The plates were then placed into the incubator under normal conditions for 2 days. At this point, the addition of gentamycin, 5nM methotrexate, the replacement of fetal calf serum with dialyzed fetal calf serum and the removal of hypoxanthine/thymidine, initiated the selection for clones that were successfully transfected with both the LC and HC from the medium. At day 17 following transfection, individual clones growing under selection were picked and screened for expression of the chimeric 806 antibody. An ELISA was utilized for screening and consisted of coating an ELISA plate with denatured soluble EGF receptor (denatured EGFR is known to allow 806 binding). This assay allows for the screening of production levels by individual clones and also for the functionality of the antibody being screened. All clones were shown to be producing functional ch806 and the best producer was taken and expanded for amplification. To amplify the level of ch806 being produced, the highest producing clone was subjected to reselection under a higher methotrexate concentration (100nM vs 5nM). This was undertaken using the aforementioned procedures.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Clones growing at 100nM MTX were then passed onto the Biological Production Facility, Ludwig Institute, Melbourne, Australia for measurement of production levels, weaning off serum, cell banking. The cell line has been shown to stably produce ~10mg/litre in roller bottles.

The nucleic acid sequence of the pREN ch806 LC neo vector is provided in SEQ ID NO:7. The nucleic acid sequence of the pREN ch806 HC DHFR vector is provided in SEQ ID NO:8.

Figure 33 depicts the vectors pREN-HC and pREN-LC, which employ an IRES. The pREN bicistronic vector system is described and disclosed in copending U.S.S.N. 60/355,838 filed February 13, 2002, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Ch806 was assessed by FACS analysis to demonstrate that the chimeric 806 displays identical binding specificity to that of the murine parental antibody. Analysis was performed using wild type cells (U87 MG parental cells), cells overexpressing the EGF receptor (A431 cells and UA87 wt EGFR cells) and UA87 $\Delta 2-7$ cells (data not shown). Similar binding specificity of Mab806 and ch806 was obtained using cells overexpressing EGFR and cells expressing the de2-7 EGFR. No binding was observed in wild type cells. Scatchard analysis revealed a binding affinity for radiolabeled ch806 of $6.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ using U87MGde2-7 cells (data not shown).

Biodistribution analysis of the ch806 antibody was performed in BALB/c nude mice bearing U87MG-de2-7 xenograft tumors and the results are shown in **Figure 34**. Mice were injected with 5ug of radiolabelled antibody and were sacrificed in groups of four per time point at 8, 24, 48 and 74 hours. Organs were collected, weighed and radioactivity measured in a gamma counter. ^{125}I -labelled ch806 displays reduced targeting to the tumor compared to ^{111}In -labelled ch806, which has high tumor uptake and cumulative tumor retention over the 74 hour time period. At 74 hours, the ^{111}In -labelled antibody displays approximately 30% ID/gram tissue and a tumor to blood

ratio of 4.0 (Figure 35). The ^{111}In -labelled ch806 shows some nonspecific retention in the liver, spleen and kidneys. This is common for the use of this isotope and decreases with time, which supports that this binding is non-specific to ch806 and due to ^{111}In binding.

Chimeric antibody ch806 was assessed for therapeutic efficacy in an established tumor model. 3×10^6 U87MG.Δ2-7 cells in 100ul of PBS were inoculated s.c. into both flanks of 4-6 week old female nude mice (Aminal Research Center, Western Australia, Australia). The mAb806 was included as a positive control. The results are depicted in Figure 36. Treatment was started when tumors had reached a mean volume of 50 mm^3 and consisted of 1 mg of ch806 or mAb806 given i.p. for a total of 5 injections on the days indicated. Tumor volume in mm^3 was determined using the formula $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$, where length was the longest axis and width the measurement at right angles to the length. Data was expressed as mean tumor volume $\pm$ S.E. for each treatment group. The ch806 and mAb806 displayed nearly identical anti-tumor activity against U87MG.Δ2-7 xenografts.

Analysis of Ch806 Immune Effector Function

Materials and Methods

Antibodies and Cell lines:

Murine anti-de2-7 EGFR monoclonal mAb 806, chimeric antibody ch806 (IgG₁) and control isotype matched chimeric anti-G250 monoclonal antibody cG250 were prepared by the Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia. Both complement-dependant cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent cellular- cytotoxicity (ADCC) assays utilised U87MG.de2-7 and A431 cells as target cells. The previously described U87MG.de2-7 cell line is a human astrocytoma cell line infected with a retrovirus containing the de2-7EGFR (Nishikawa, R. et al. (1994) Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 7727-31). Human squamous carcinoma A431 cells were purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). All cell lines were cultured in DMEM/F-12 with Glutamax™ (Life Technologies, Melbourne,

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Australia) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (CSL, Melbourne, Australia), 100 units/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin. To maintain selection for retrovirally transfected U87MG.de2-7 cells, 400 ug/ml G418 was included in the media.

Preparation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) Effector Cells:
PBMCs were isolated from healthy volunteer donor blood. Heparinised whole blood was fractionated by density centrifugation on Ficoll-Hypaque (ICN Biomedical Inc., Ohio, USA). PBMC fractions was collected and washed three times with RPMI⁺ 1640 supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 ug/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, containing 5% heat-inactivated FCS.

Preparation of Target Cells:
CDC and ADCC assays were performed by a modification of a previously published method ((Nelson, D. L. et al. (1991) *In*: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. D. Margulies, E. M. Shevach, and W. Strober (eds.), Current Protocols in Immunology, pp. 7.27.1, New York: Greene Publishing Wiley Interscience). Briefly, 5×10^6 target U87MG.de2-7 and A431 cells were labeled with 50 μ Ci ^{51}Cr (Geneworks, Adelaide, Australia) per 1×10^6 cells and incubated for 2 hr at 37°C. The cells were then washed three time with PBS (0.05M, pH 7.4) and a fourth wash with culture medium. Aliquots (1×10^4 cells/50 ul) of the labeled cells were added to each well of 96-well microtitre plates (NUNC, Roskilde, Denmark).

CDC Assay:

To 50 ul labeled target cells, 50 ul ch806 or isotype control antibody cG250 were added in triplicate over the concentration range 0.00315 – 10 ug/ml, and incubated on ice 5 min. Fifty ul of freshly prepared healthy donor complement (serum) was then added to yield a 1:3 final dilution of the serum. The microtitre plates were incubated for 4 hr at 37° C. Following centrifugation, the released ^{51}Cr in the supernatant was counted (Cobra II automated Gamma Counter, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Percentage specific

WO 02/092771

PCT/US02/15185

lysis was calculated from the experimental ^{51}Cr release, the total (50 μl target cells + 100 μl 10% Tween 20) and spontaneous (50 μl target cells + 100 μl medium) release.

ADCC Assay:

Ch806-mediated ADCC effected by healthy donor PBMCs was measured by two 4-hr ^{51}Cr release assays. In the first assay, labelled target cells were plated with the effector cells in 96-well "U" bottom microplates (NUNC, Roskilde, Denmark) at effector/target (E:T) cell ratios of 50:1. For ADCC activity measurements, 0.00315-10 $\mu\text{g/ml}$ (final concentration) test and control antibodies were added in triplicate to each well. In the second ADCC assay, the ADCC activity of ch806 was compared with the parental murine mAb 806 over a range of Effector: Target cell ratios with the test antibody concentration constant at 1 $\mu\text{g/ml}$. In both assays, microtitre plates were incubated at 37°C for 4 hours, then 50 μl supernatant was harvested from each well and released ^{51}Cr was determined by gamma counting (Cobra II automated Gamma Counter, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Controls included in the assays corrected for spontaneous release (medium alone) and total release (10% Tween20/PBS). Appropriate controls with the same subclass antibody were run in parallel.

The percentage cell lysis (cytotoxicity) was calculated according to the formula:

$$\text{Percentage Cytotoxicity} = \frac{\text{Sample Counts} - \text{Spontaneous Release}}{\text{Total Release} - \text{Spontaneous Release}} \times 100$$

The percent (%) cytotoxicity was plotted versus concentration of antibody ($\mu\text{g/ml}$).

Results

The results of the CDC analyses are presented in **Figure 37**. Minimal CDC activity was observed in the presence of up to 10 $\mu\text{g/ml}$ ch806 with CDC comparable to that observed with isotype control cG250.

Ch806 mediated ADCC on target U87MG.de2-7 and A431 cells at E:T ratio of 50:1 is presented in **Figure 38**. Effective ch806 specific cytotoxicity was displayed against

WO 02/092771

PCT/US02/15185

target U87MG.de2-7 cells, but minimal ADCC was mediated by ch806 on A431 cells. The levels of cytotoxicity achieved reflect the number of ch806 binding sites on the two cell populations. Target U87MG.de2-7 cells express $\sim 1 \times 10^6$ de2-7EGFR which are specifically recognised by ch806, while only a subset of the 1×10^6 wild-type EGFR molecules expressed on A431 cells are recognised by ch806 (see above Examples).

Further ADCC analyses were performed to compare the ADCC mediated by 1 ug/ml ch806 on target U87MG.de2-7 cells with that effected by 1 ug/ml parental murine mAb 806. Results are presented in **Figure 39**. Chimerisation of mAb 806 has effected marked improvement of the ADCC achieved by the parental murine mAb with greater than 30% cytotoxicity effected at E:T ratios 25:1 and 50:1.

The lack of parental murine mAb 806 immune effector function has been markedly improved upon chimerisation. Ch806 mediates good ADCC, but minimal CDC activity.

EXAMPLE 22

GENERATION OF ANTI-IDIOTYPE ANTIBODIES TO CHIMERIC ANTIBODY ch806

To assist the clinical evaluation of mAb806 or ch806, laboratory assays are required to monitor the serum pharmacokinetics of the antibodies and quantitate any immune responses to the mouse-human chimeric antibody. Mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies (anti-ids) were generated and characterised for suitability as ELISA reagents for measuring ch806 in patient sera samples and use as positive controls in human anti-chimeric antibody immune response analyses. These antiidiotype antibodies may also be useful as therapeutic or prophylactic vaccines, generating a natural anti-EGFR antibody response in patients.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Methods for generating anti-idiotypic antibodies are well known in the art (Bhattacharya-Chatterjee, Chatterjee et al. 2001, Uemura et al. 1994, Steffens, Boerman et al. 1997, Safa and Foon 2001, Brown and Ling 1988).

Mouse monoclonal anti-idiotypic antibodies (anti-ids) were, briefly, generated as follows. Splenocytes from mice immunized with ch806 were fused with SP2/0-AG14 plasmacytoma cells and antibody producing hybridomas were selected through ELISA for specific binding to ch806 and competitive binding for antigen (**Figure 40**). Twenty-five hybridomas were initially selected and four, designated LMH-11, -12 -13 and -14, secreted antibodies that demonstrated specific binding to ch806, mAb 806 and were able to neutralise ch806 or mAb 806 antigen binding activity (**Figure 41**). The recognition of the ch806/mAb 806 idiotope or CDR region was demonstrated by lack of cross-reactivity with purified polyclonal human IgG.

In the absence of readily available recombinant antigen dc2-7 EGFR to assist with the determination of ch806 in serum samples, the ability of the novel anti-idiotypic ch806 antibodies to concurrently bind 806 variable regions was exploited in the development of a sensitive, specific ELISA for measuring ch806 in clinical samples (**Figure 42**). Using LMH-12 for capture and Biotinylated -LMH-12 for detection, the validated ELISA demonstrated highly reproducible binding curves for measuring ch806 (2 ug/ml – 1.6 ng/ml) in sera with a 3 ng/ml limit of detection. (n=12; 1-100 ng/ml, Coefficient of Variation < 25%; 100 ng/ml- 5 ug/ml, Coefficient of Variation < 15%). No background binding was evident with the three healthy donor sera tested and negligible binding was observed with isotype control hu3S193. The hybridoma produces high levels of antibody LMH-12, and larger scale production is planned to enable the measurement of ch806 and quantitation of any immune responses in clinical samples. (Brown and Ling 1988)

RESULTS

WO 02/092771

PCT/US02/15185

Mice Immunization and hybridoma clone selection

Immunoreactivity of pre- and post-immunization sera samples indicated the development of high titer mouse anti-ch806 and anti-huIgG mAbs. Twenty-five hybridomas producing antibodies that bound ch806, but not huIgG, were initially selected. The binding characteristics of some of these hybridomas are shown in **Figure 42A** and **42B**. Four of these anti-ch806 hybridomas with high affinity binding (clones 3E3, 5B8, 9D6 and 4D8) were subsequently pursued for clonal expansion from single cells by limiting dilution and designated Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma (LMH) -11, -12, -13, and -14, respectively (**Figure 42**).

Binding and Blocking Activities of Selected Anti-Idiotypic Antibodies

The ability of anti-ch806 antibodies to concurrently bind two ch806 antibodies is a desirable feature for their use as reagents in an ELISA for determining serum ch806 levels. Clonal hybridomas, LMH-11, -12, -13, and -14 demonstrated concurrent binding (data not shown).

After clonal expansion, the hybridoma culture supernatants were examined by ELISA for the ability to neutralise ch806 or mAb 806 antigen binding activity with sEGFR621. Results demonstrated the antagonist activity of anti-idiotypic mAbs LMH-11, -12, -13, and -14 with the blocking in solution of both ch806 and murine mAb 806 binding to plates coated with sEGFR (**Figure 41** for LMH-11, -12, -13).

Following larger scale culture in roller bottles the binding specificity's of the established clonal hybridomas, LMH-11, -12, -13, and -14 were verified by ELISA. LMH-11 through -14 antibodies were identified as isotype IgG1k by mouse monoclonal antibody isotyping kit.

ch806 in Clinical Serum Samples: Pharmacokinetic ELISA Assay Development

To assist with the determination of ch806 in serum samples, the ability of the anti-idiotypic ch806 antibodies to concurrently bind the 806 variable region was exploited

WO 02/092771

PCT/US02/15185

in the development of a sensitive and specific ELISA assay for ch806 in clinical samples. The three purified clones LMH-11, -12, and -13 (Figure 49, B, and C respectively) were compared for their ability to capture and then detect bound ch806 in sera. Results indicated using LMH-12 (10 µg/ml) for capture and biotinylated-LMH-12 for detection yielded the highest sensitivity for ch806 in serum (3 ng/ml) with negligible background binding.

Having established the optimal pharmacokinetic ELISA conditions using 1 µg/ml anti-idiotype LMH-12 and 1 µg/ml biotinylated LMH-12 for capture and detection, respectively, validation of the method was performed. Three separate ELISAs were performed in quadruplicate to measure ch806 in donor serum from three healthy donors or 1% BSA/media with isotype control hu3S193. Results of the validation are presented in **Figure 43** and demonstrate highly reproducible binding curves for measuring ch806 (2 µg/ml – 1.6 ng/ml) in sera with a 3 ng/ml limit of detection. (n=12; 1-100 ng/ml, Coefficient of Variation < 25%; 100 ng/ml- 5 µg/ml, Coefficient of Variation < 15%). No background binding was evident with any of the three sera tested and negligible binding was observed with isotype control hu3S193.

REFERENCES

These should really be incorporated with those at the end of Example 17 and put to the end of all the examples

Brown, G. and N. Ling (1988). *Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume I. A Practical Approach*. D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.

Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotype vaccines for immunotherapy." *Curr Opin Mol Ther* 3(1): 63-9.

Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000). "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." *Growth Factors* 18(1): 11-29

Safa, M. M. and K. A. Foon (2001). "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers." *Semin Oncol* 28(1): 68-92.

Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994). "Internal image anti-idiotypic antibodies related to renal-cell carcinoma- associated antigen G250." *Int J Cancer* 56(4): 609-14.

EXAMPLE 23

ASSESSMENT OF CARBOHYDRATE STRUCTURES AND ANTIBODY RECOGNITION

Experiments were undertaken to further assess the role of carbohydrate structures in the binding and recognition of the EGFR, both amplified and de2-7 EGFR, by the mAb806 antibody.

To determine if carbohydrate structures are directly involved in the mAb 806 epitope, the recombinant sEGFR expressed in CHO cells was treated with PNGase F to remove N-linked glycosylation. Following treatment, the protein was run on SDS-PAGE, transferred to membrane and immunoblotted with mAb 806 (**Figure44**). As expected, the deglycosylated sEGFR ran faster on SDS-PAGE, indicating that the carbohydrates had been successfully removed. The mAb 806 antibody clearly bound the deglycosylated material demonstrating the antibody epitope is peptide in nature and not solely a glycosylation epitope.

Lysates, prepared from cell lines metabolically labelled with ³⁵S, were immunoprecipitated with different antibodies directed to the EGFR (**Figure45**). As expected, the 528 antibody immunoprecipitated 3 bands from U87MG.Δ2-7 cells, an upper band corresponding to the wild type (wt) EGFR and two lower bands corresponding to the de2-7 EGFR. These two de2-7 EGFR bands have been reported previously and are assumed to represent differential glycosylation (Chu et al. (1997) *Biochem. J.* Jun 15;324 (Pt 3):885-861). In contrast, mAb 806 only immunoprecipitated the two de2-7 EGFR bands, with the wt receptor being completely absent even after over-exposure (data not shown). Interestingly, mAb806 showed increased relative reactivity with the lower de2-7 EGFR band but decreased

reactivity with the upper band when compared to the 528 antibody. The SC-03 antibody, a commercial rabbit polyclonal antibody directed to C-terminal domain of the EGFR, immunoprecipitated the three EGFR bands as seen with the 528 antibody although the total amount of receptor immunoprecipitated by this antibody was considerably less. No bands were observed when using an irrelevant IgG2b antibody as a control for mAb 806.

The 528 antibody immunoprecipitated a single band from U87MG.wtEGFR cells corresponding to the wt receptor (**Figure 45**). MAb 806 also immunoprecipitated a single band from these cells, however, this EGFR band clearly migrated faster than the 528 reactive receptor. The SC-03 antibody immunoprecipitated both EGFR reactive bands from U87MG.wtEGFR cells, further confirming that the mAb 806 and 528 recognize different forms of the EGFR in whole cell lysates from these cells.

As observed with U87MG.wtEGFR cells, the 528 antibody immunoprecipitated a single EGFR band from A431 cells (**Figure 45**). The 528 reactive EGFR band is very broad on these low percentage gels (6%) and probably reflects the diversity of receptor glycosylation. A single EGFR band was also seen following immunoprecipitation with mAb 806. While this EGFR band did not migrate considerably faster than the 528 overall broad reactive band, it was located at the leading edge of the broad 528 band in a reproducible fashion. Unlike U87MG. Δ 2-7 cell lysates, the total amount of EGFR immunoprecipitated by mAb 806 from A431 lysates was considerably less than with the 528 antibody, a result consistent with our Scatchard data showing mAb 806 only recognizes a portion of the EGFR on the surface of these cells (see Example 4 above). Immunoprecipitation with SC-03 resulted in a single broad EGFR band as for the 528 antibody. Similar results were obtained with HN5 cells (data not shown). Taken together, this data indicates that mAb 806 preferentially reacts with faster migrating species of the EGFR, which may represent differentially glycosylated forms of the receptor.

In order to determine at what stage of receptor processing mAb 806 reactivity appeared a pulse/chase experiment was conducted. A431 and U87MG.Δ2-7 cells were pulsed for 5 min with ³⁵S methionine/cysteine, then incubated at 37°C for various times before immunoprecipitation with mAb 806 or 528 (**Figure 46**). The immunoprecipitation pattern in A431 cells with the 528 antibody was typical for a conformational dependent antibody specific for the EGFR. A small amount of receptor was immunoprecipitated at 0 min (i.e. after 5 min pulse) with the amount of labelled EGFR increasing at each time point. There was also a concurrent increase in the molecular weight of the receptor with time. In contrast, the mAb 806 reactive EGFR material was present at high levels at 0 min, peaked at 20 min and then reduced at each further time point. Thus, it appears that mAb 806 preferentially recognizes a form of the EGFR found at an early stage of processing.

The antibody reactivity observed in pulse-labelled U87MG.Δ2-7 cells was more complicated. Immunoprecipitation with the 528 antibody at 0 min revealed that a small amount of the lower de2-7 EGFR band was labelled (**Figure 46**). The amount of 528 reactive de2-7 EGFR lower band increased with time, peaking at 60 min and declining slowly at 2 and 4 h. No significant amount of the labelled upper band of de2-7 EGFR was detected until 60 min, after which the level continued to increase until the end of the time course. This clearly indicates that the upper de2-7 EGFR is a more mature form of the receptor. MAb 806 reactivity also varied during the time course study, however mAb 806 preferentially precipitated the lower band of the de2-7 EGFR. Indeed, there were no significant levels of mAb 806 upper band seen until 4 h after labelling.

The above experiments suggest that mAb 806 preferentially reacts with a more immature glycosylation form of the de2-7 and wt EGFR. This possibility was tested by immunoprecipitating the EGFR from different cell lines labelled overnight with ³⁵S methionine/cysteine and then subjecting the resultant precipitates to Endoglycosidase H (Endo H) digestion. This enzyme preferentially removes high mannose type carbohydrates (*i.e.* immature glycosylation) from proteins while leaving

complex carbohydrates (*i.e.* mature glycosylation) intact. Immunoprecipitation and digestion with Endo H of labelled U87MG. Δ 2-7 cell lysates with 528, mAb 806 and SC-03 gave similar results (**Figure 47**). As predicted, the lower Δ 2-7 EGFR band was fully sensitive to Endo H digestion, migrating faster on SDS-PAGE after Endo H digestion, demonstrating that this band represents the high mannose form of the Δ 2-7 EGFR. The upper Δ 2-7 EGFR band was essentially resistant to Endo H digestion, showing only a very slight difference in migration after Endo H digestion, indicating that the majority of the carbohydrate structures are of the complex type. The small but reproducible decrease in the molecular weight of the upper band following enzyme digestion suggests that while the carbohydrates on the upper Δ 2-7 EGFR band are predominantly of the complex type, it does possess some high mannose structures. Interestingly, these cells also express low amounts of endogenous wt EGFR that is clearly visible following 528 immunoprecipitation. There was also a small but noticeable reduction in molecular weight of the wt receptor following Endo H digestion, indicating that it also contains high mannose structures.

The sensitivity of the immunoprecipitated wt EGFR to Endo H digestion was similar in both U87MG.wtEGFR and A431 cells (**Figure 47**). The bulk of the material precipitated by the 528 antibody was resistant to the Endo H enzyme although a small amount of the material was of the high mannose form. Once again there was a small decrease in the molecular weight of the wt EGFR following Endo H digestion suggesting that it does contain some high mannose structures. The results using the SC-03 antibody were similar to the 528 antibody. In contrast, the majority of the EGFR precipitated by mAb 806 was sensitive to Endo H in both U87MG.wtEGFR and A431 cells, confirming that mAb 806 preferentially recognizes the high mannose form of the EGFR. Similar results were obtained with HN-5 cells, wherein the majority of the material precipitated by mAb 806 was sensitive to Endo H digestion, while the majority of the material precipitated by mAb528 and SC-03 was resistant to Endo H digestion (data not shown).

Cell surface iodination of the A431 cellline, was performed with ^{125}I followed by immunoprecipitation with the 806 antibody. The protocol for surface iodination was as follows: The cell lysis, immunoprecipitation, Endo H digestion, SDS PAGE and autoradiography are as described above herein. For labeling, cells were grown in media with 10% FCS, detached with EDTA, washed twice with PBS then resuspended in 400 ul of PBS (approx $2-3 \times 10^6$ cells). To this was added 15 ul of ^{125}I (100 mCi/ml stock), 100 ul bovine lactoperoxidase (1 mg/ml) stock, 10 ul H_2O_2 (0.1% stock) and this was incubated for 5 min. A further 10 ul of H_2O_2 was then added and the incubation continued for a further 3 min. Cells were then washed again 3 times with PBS and lysed in 1% Triton. Cell surface iodination of the A431 cell line with lactoperoxidase, followed by immunoprecipitation with the 806 antibody, showed that, similar to the whole cell lysates described above, the predominant form of the EGFR recognized by 806 bound on the cell surface of A431 cells was sensitive to EndoH digestion (**Figure 48**). This confirms that the form of EGFR bound by 806 on the cell surface of A431 cells is an EndoH sensitive form and thus is the high mannose type.

This invention may be embodied in other forms or carried out in other ways without departing from the spirit or essential characteristics thereof. The present disclosure is therefore to be considered as in all aspects illustrated and not restrictive, the scope of the invention being indicated by the appended Claims, and all changes which come within the meaning and range of equivalency are intended to be embraced therein.

Various references are cited throughout this Specification, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated specific binding member which recognizes an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and not detectable in normal cells.
2. An isolated specific binding member member which recognizes an EGFR epitope wherein the EGFR epitope does not demonstrate any amino acid sequence alterations or substitutions from normal EGFR and which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and not detectable in normal cells.
3. An isolated specific binding member which recognizes an EGFR epitope which does not demonstrate any amino acid sequence alterations or substitutions of normal EGFR and which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and not detectable in normal cells, wherein said epitope is located within the region comprising residues 273-501 of EGFR.
4. An isolated specific binding member which recognizes an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and not detectable in normal cells, wherein the epitope is enhanced or evident upon aberrant expression, wherein said specific binding member is capable of binding the de2-7 EGFR at an epitope distinct from the junctional peptide and which does not bind to EGFR on normal cells in the absence of aberrant expression, and wherein said epitope is located within the region comprising residues 273-501 of EGFR.
5. An isolated specific binding member according to any one or more of claims 1-4 which is fully human, humanized or chimerized.
6. An isolated specific binding member which recognizes an EGFR epitope which does not demonstrate any amino acid sequence alterations or substitutions from normal EGFR and which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells

WO 02/092771

PCT/US02/15185

and not detectable in normal cells, wherein said binding member comprises the polypeptide sequence substantially as set out in either one or both of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4.

7. An isolated specific binding member which recognizes an EGFR epitope which is found in tumorigenic, hyperproliferative or abnormal cells and not detectable in normal cells, wherein the epitope is enhanced or evident upon aberrant expression, wherein said binding member is capable of binding the de2-7 EGFR at an epitope distinct from the junctional peptide and does not bind to EGFR on normal cells in the absence of amplification of the normal wild-type gene, and wherein said binding member comprises the polypeptide sequence substantially as set out in either one or both of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:4.

8. The specific binding member of claims 6 or 7, wherein the polypeptide sequence is as set out in SEQ ID NO:2.

9. The specific binding member of claims 6 or 7, wherein the polypeptide sequence is as set out in SEQ ID NO:4.

10. The specific binding member of claim 8, wherein said binding member comprises a polypeptide binding domain comprising an amino acid sequence substantially as set out as any one or more of residues 26-35A, 49-64 or 93-102 of SEQ ID NO:2.

11. The specific binding member of claim 10, wherein said polypeptide binding domain is substantially as set out as residues 26-35A of SEQ ID NO:2.

12. The specific binding member of claim 10, wherein said polypeptide binding domain is substantially as set out as residues 49-64 of SEQ ID NO:2.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

13. The specific binding member of claim 10, wherein said polypeptide binding domain is substantially as set out as residues 93-102 of SEQ ID NO:2.
14. The specific binding member of claim 9, wherein said antibody comprises a polypeptide binding domain comprising an amino acid sequence substantially as set out as any one or more of residues 24-34, 50-56 or 89-97 of SEQ ID NO:4.
15. The specific binding member of claim 14, wherein said polypeptide binding domain is substantially as set out as residues 24-34 of SEQ ID NO:4.
16. The specific binding member of claim 14, wherein said polypeptide binding domain is substantially as set out as residues 50-56 of SEQ ID NO:4.
17. The specific binding member of claim 14, wherein said polypeptide binding domain is substantially as set out as residues 89-97 of SEQ ID NO:4.
18. An isolated specific binding member of any one of claim 1 to 17 which is an antibody.
19. The isolated specific binding member or antibody according to claims 1-17 or 18, wherein said binding domains are carried by a human antibody framework.
20. The isolated specific binding member or antibody according to claim 19, wherein said human antibody framework is a human IgG1 antibody framework.
21. An antibody according to claim 18, which comprises the polypeptide sequence set out in either one of SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:4.
22. An antibody according to claim 21, which comprises the polypeptide sequence set out in SEQ ID NO:2.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

23. An antibody according to claim 21, which comprises the polypeptide sequence set out in SEQ ID NO:4.
24. A specific binding member or antibody according to any one of claims 1 to 23 in the form of an antibody F(ab')₂, scFv fragment, diabody, triabody or tetrabody.
25. A specific binding member or antibody according to any one of claims 1 to 24 which carries a detectable or functional label.
26. A specific binding member or antibody according to claim 25 wherein said label is a covalently attached drug.
27. A specific binding member or antibody according to claim 25, wherein said label is a radiolabel.
28. A specific binding member or antibody according any one of claims 1 to 24, wherein said binding partner or antibody is pegylated.
29. An isolated nucleic acid which comprises a sequence encoding a specific binding member or antibody as defined in any one of claims 1 to 24.
30. A method of preparing a specific binding member or antibody as defined in any one of claims 1 to 24 which comprises expressing the nucleic acid of claim 29 under conditions to bring about expression of said binding member or antibody, and recovering the binding member or antibody.
31. A specific binding member or antibody according to any one of claims 1 to 28 for use in a method of treatment or diagnosis of the human or animal body.
32. A method of preparing a specific binding member capable of binding a tumor antigen, which method comprises:

WO 02/092771

PCT/US02/15185

- a) providing a starting repertoire of nucleic acids encoding a VH domain which lack a CDR3 encoding region;
- b) combining said repertoire with a donor nucleic acid encoding an amino acid sequence substantially as set out as in any one or more of residues 26 to 35A, 49 to 64 or 93 to 102 of SEQ ID NO:2 such that said donor nucleic acid is inserted into the missing CDR3 region, so as to provide a product repertoire of nucleic acids encoding a VH domain;
- c) expressing the nucleic acids of said product repertoire; and
- d) selecting a specific binding member which has a maximum tumor:blood localization ratio in a test animal of $> 1:1$ and optionally at said ratio, a non-tumor bearing organ to blood ratio of $< 1:1$; and
- e) recovering said binding member or the nucleic acid encoding it.

33. A method of treatment of a tumor in a human patient which comprises administering to said patient an effective amount of a specific binding member or antibody as defined in any one of claims 1 to 28.

34. A kit for the diagnosis of a tumor in which EGFR is aberrantly expressed or EGFR is expressed in the form of a truncated protein, said kit comprising a specific binding member or antibody of any one of claims 1 to 28, optionally with reagents and/or instructions for use.

35. A pharmaceutical composition comprising a specific binding member or antibody as defined in any one of claims 1 to 28, and optionally, a pharmaceutically acceptable vehicle, carrier or diluent.

36. A kit for the treatment of a tumor in a human patient, comprising a pharmaceutical dosage form of the pharmaceutical composition of claim 35, and a separate pharmaceutical dosage form comprising an additional anti-cancer agent selected from the group consisting of chemotherapeutic agents, anti-EGFR antibodies, radioimmunotherapeutic agents, and combinations thereof.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

37. The kit of claim 36, wherein said chemotherapeutic agents are selected from the group consisting of tyrosine kinase inhibitors, phosphorylation cascade inhibitors, post-translational modulators, cell growth or division inhibitors (*e.g.* anti-mitotics), signal transduction inhibitors, and combinations thereof.

38. The kit of claim 37, wherein said tyrosine kinase inhibitors are selected from the group consisting of AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668, and combinations thereof.

39. The kit of claim 36, wherein said anti-EGFR antibodies are selected from the group consisting of the anti-EGFR antibodies 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF, and combinations thereof.

40. A unicellular host transformed with a recombinant DNA molecule comprising a DNA sequence or degenerate variant thereof, which encodes the specific binding member or antibody of any one of claims 1-24, or a fragment thereof, selected from the group consisting of:

- (A) the DNA sequence of FIGURE 13 (SEQ ID NO:1);
- (B) the DNA sequence of FIGURE 15 (SEQ ID NO:3);
- (C) the DNA sequence of FIGURE 13 (SEQ ID NO:1) and the DNA sequence of FIGURE 15 (SEQ ID NO:3);
- (D) the DNA sequence of FIGURE 13 (SEQ ID NO:1) with a constant IgG1 sequence as set out in SEQ ID NO:8 and the DNA sequence of FIGURE 15 (SEQ ID NO:3) with a constant kappa sequence as set out in SEQ ID NO:7;
- (E) DNA sequences that hybridize to any of the foregoing DNA sequences under standard hybridization conditions; and
- (F) DNA sequences that code on expression for an amino acid sequence encoded by any of the foregoing DNA sequences;

WO 02/092771

PCT/US02/15185

wherein said DNA sequence is operatively linked to an expression control sequence..

41. The unicellular host of Claim 40, wherein the unicellular host is selected from the group consisting of *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, yeasts, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, and BMT10 cells, plant cells, insect cells, and human cells in tissue culture.

42. A method for detecting the presence of amplified EGFR, de2-7EGFR or EGFR with high mannose glycosylation wherein said EGFR is measured by:

A. contacting a biological sample from a mammal in which the presence of amplified EGFR, de2-7EGFR or EGFR with high mannose glycosylation is suspected with an antibody capable of specifically binding to said EGFR under conditions that allow binding of said EGFR to said antibody to occur; and

B. detecting whether binding has occurred between said EGFR from said sample and the antibody;

wherein the detection of binding indicates that presence or activity of said EGFR in said sample.

43. A method for detecting cancer in mammals comprising detecting the presence or activity of an EGFR according to the method of Claim 42, wherein detection of the presence of the EGFR indicates the existence of a tumor or cancer in said mammal.

44. A method of preventing and/or treating cancer in mammals, comprising administering to a mammal a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 35 or the kit of any of claims 36 to 39.

45. A method for the treatment of brain-resident cancers that produce aberrantly expressed EGFR in mammals, comprising administering to a mammal a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 35 or the kit of any of claims 36 to 39.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

46. The method of claim 45, wherein said brain-resident cancers are selected from glioblastomas, medulloblastomas, meningiomas, neoplastic astrocytomas and neoplastic arteriovenous malformations.

47. The method of claims 45 and 46, wherein said pharmaceutical composition or said kit is administered systemically.

48. A method for the treatment of malignant neural tumors in mammals, comprising administering to a mammal a therapeutically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 35 or the kit of any of claims 36 to 39.

49. An antibody comprising a variable heavy chain with the polypeptide sequence as set out in SEQ ID NO:2 and a human IgG1 constant region.

50. An antibody comprising a variable light chain with the polypeptide sequence as set out in SEQ ID NO:4 and a human kappa constant region..

51. An antibody comprising a variable heavy chain with the polypeptide sequence as set out in SEQ ID NO:2.

52. An antibody comprising a variable light chain with the polypeptide sequence as set out in SEQ ID NO:4.

53. An antibody, wherein said antibody comprises a polypeptide binding domain comprising an amino acid sequence substantially as set out as any one or more of residues 26-35A, 49-64 or 93-102 of SEQ ID NO:2.

54. An antibody, wherein said antibody comprises a polypeptide binding domain comprising an amino acid sequence substantially as set out as any one or more of residues 24-34, 50-56 or 89-97 of SEQ ID NO:4.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

55. Use of a specific binding member or antibody of any one of claims 1 to 28 for the treatment or prevention of cancer in a mammal.
56. Use of a pharmaceutical composition according to claim 35 or the kit of any of claims 36 to 39, for the treatment or prevention of cancer in a mammal.
57. Use of a specific binding member or antibody of any one of claims 1 to 28 and 49-54 for the preparation of a medicament for the treatment or prevention of cancer in a mammal.
58. Use according to any of one of claims 55 to 57, wherein said cancer is located in or adjacent the brain.
59. Use of a specific binding member or antibody of any one of claims 1 to 28, and 49-54 for the preparation of a medicament for the treatment or prevention of neural tumors in a mammal.
60. The specific binding member or antibody according to claim 25, wherein said radiolabel is any one of ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ or ^{186}Re .
61. A composition of an isolated glycoprotein to which the specific binding member or antibody of any one of claims 1-28 binds, and pharmaceutically acceptable adjuvant for use as a cancer vaccine.

WO 02/092771

PCT/US02/15185

62. A method for detecting cancer in mammals comprising conducting diagnostic imaging, employing the specific binding member or antibody of either of claims 25 or 26.

63. Use according to any one of claims 55 to 59, wherein the procedure for treatment comprises radioimmunotherapy.

64. Use according to any one of claims 55 to 59, wherein the specific binding member or antibody of claims 25, 26 or 60 is administered first, and thereafter a composition comprising a chemotherapeutic agent is administered.

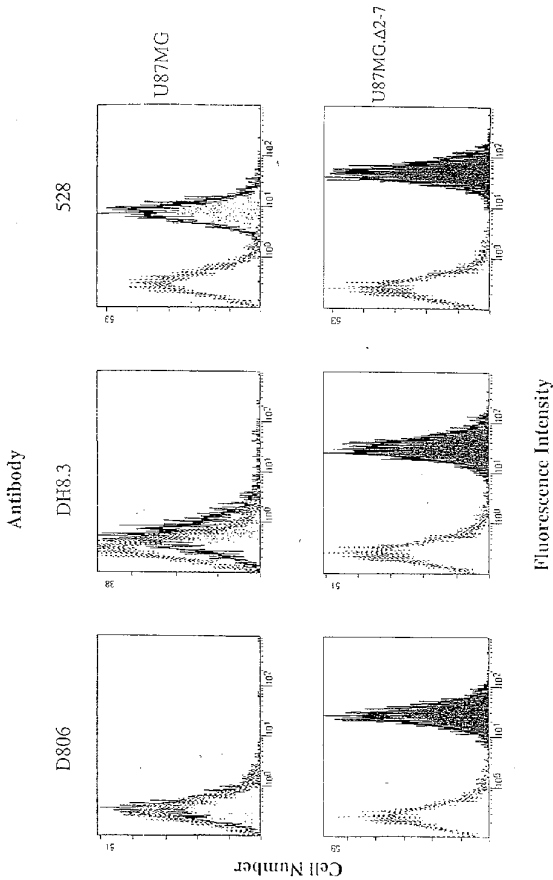
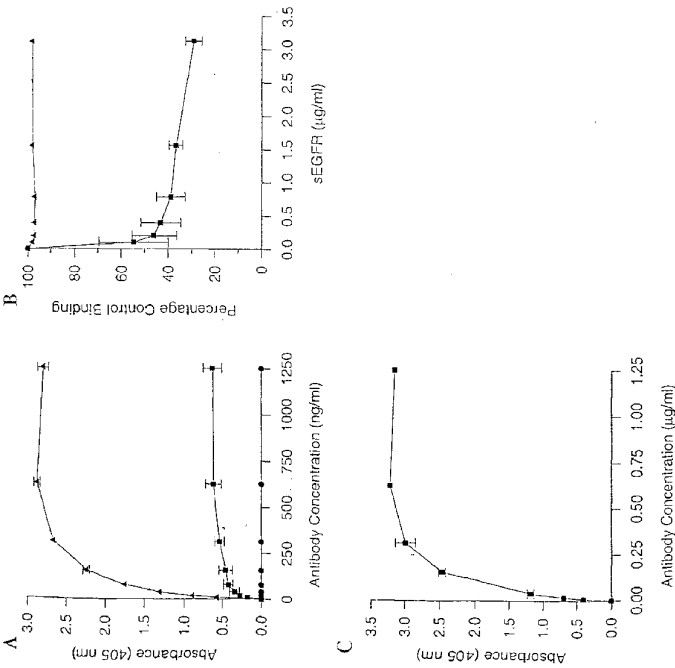


Fig. 1

Fig. 2



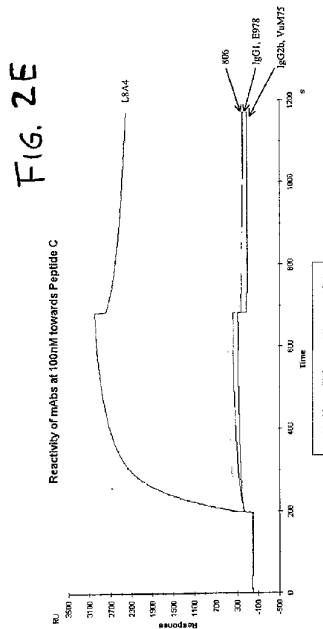
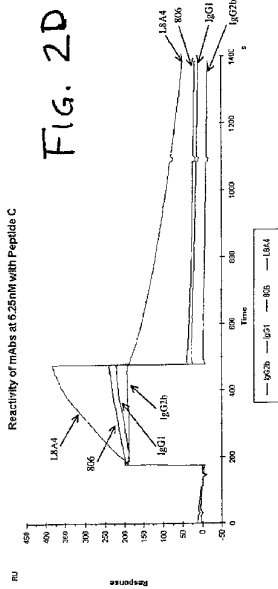


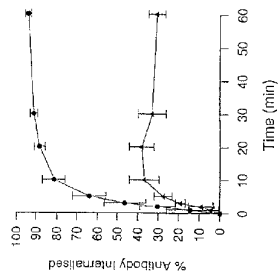
Fig. 3

Fig. 4

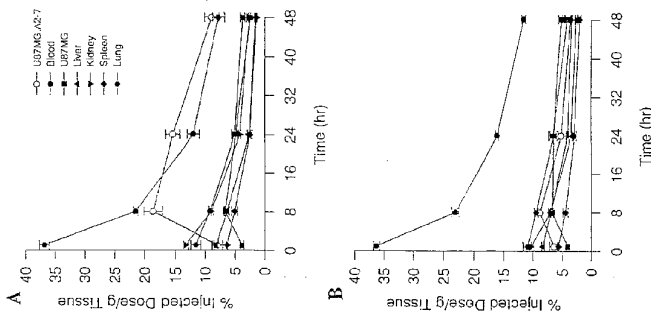


Fig. 5

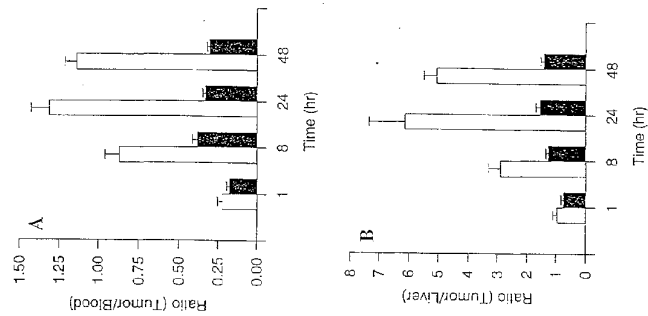


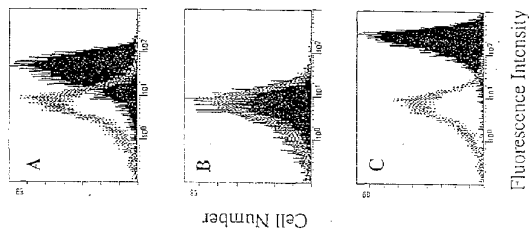
Fig. 6

Fig. 7

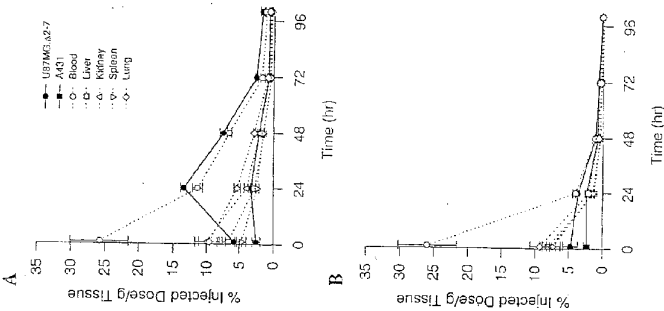
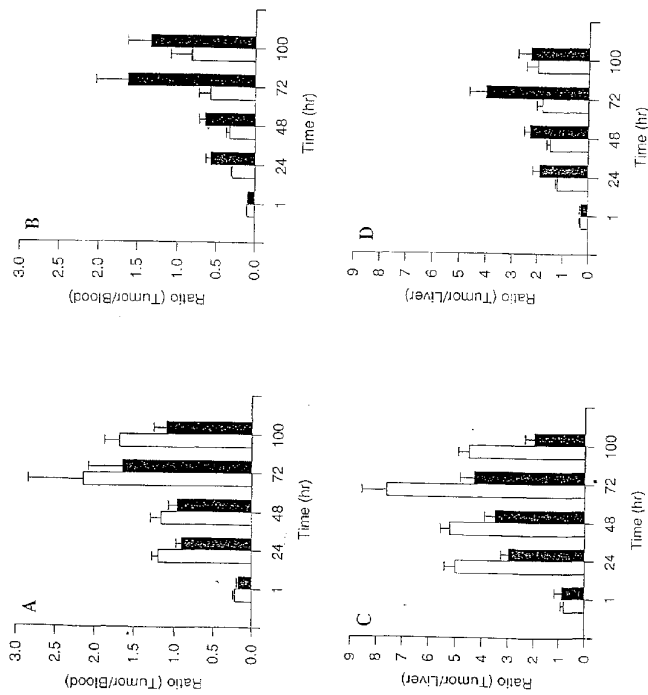


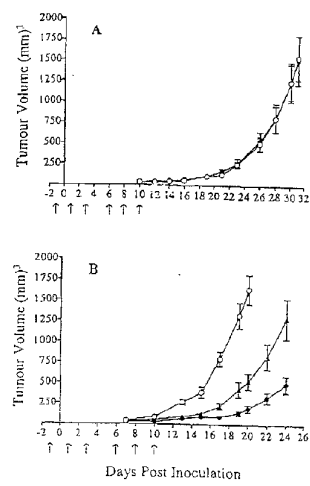
Fig. 8



WO 02/092771

10/49

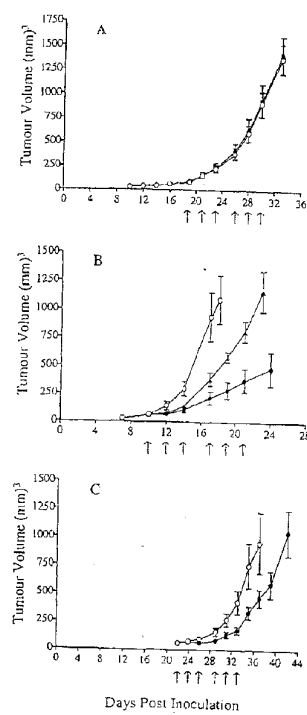
PCT/US02/15185

Fig. 9

WO 02/092771

11/49

PCT/US02/15185

Fig. 10

WO 02/092771

12/49

PCT/US02/15185

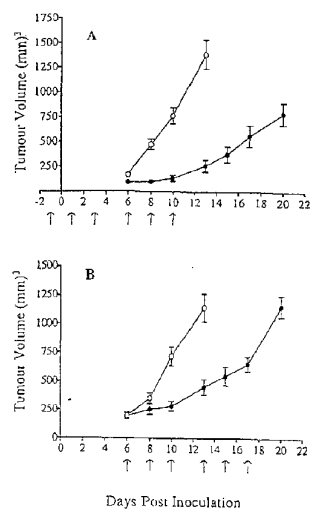
Fig. 11

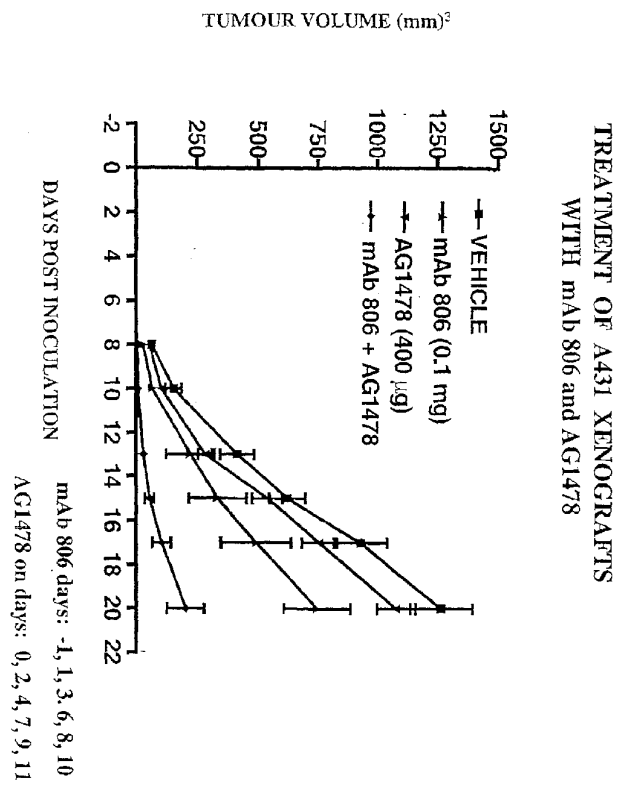
Fig. 12

Fig. 13

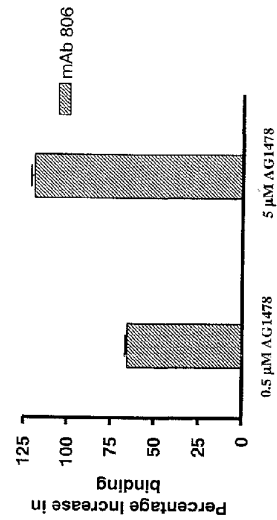


Fig. 14

DNA and Protein Sequence of 806 VH and Signal PeptideA. DNA Sequence

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCTTTCCTGGTGTCTGTCT
GATGTGCAGTTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCT
GTCCCTCACCTGCACCTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCTGGA
ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
TTATAGTGGTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCA
CTCGAGACACATCCAAGAACAATTCTTCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATT
GAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCGGGACGCGGTTTCCTTATT
GGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

Blue highlighted area is signal peptide.

Remaining sequence is 806 VH region.

B. Protein Sequence

MRVLILLWLF[→]AFPGVLS[→]VDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTC
TVTGYIS[→]TSDFAWN[→]WIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
PSLKSRI[→]SITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG
FPYWGGQTLVTVSA

DNA and Protein Sequence of 806 VL and Signal Peptide

ATGGTGTCACACGTCAGTGTCTCTGCACTCTTGTTGCTTGGTTTCCAGGTGCGA
AGATGTGACATCTCTGATGACCCAAATCTCCATTCGACGTGATCTCTGGG
AGACGATGACAGCATATCTTGCCATCTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATA
GGGTGGTTGCAGCAGACACCGAGGGAATCATTTAAAGGCGCTGATCATATCA
GAACCAACTTGGACAGATGAAGTTCCATACAGGTTGACGGCAGTGGAATCTGG
AGCGGATATTCTCTACCATCAGCAGCGTGAATCTGAAGATTTTGCAGACT
ATTACTGTGTACAGTA TGCTCAAGTTCCTGGGAAGCTTGCGGTGAGGCCAACG
CTGGAAATCAACGCT

Remaining sequence is 806 VL region.

19. Protein Sequence

↗ VL

MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTV
ITCHSSQDINSIGWLQQRFGKSLGLIYHGTNLDDVEPSR
FSGSGSGADYSLTISSELESEDFADYYCVQYAQFPWTFGGG
TKLEIKR

Fig. 16

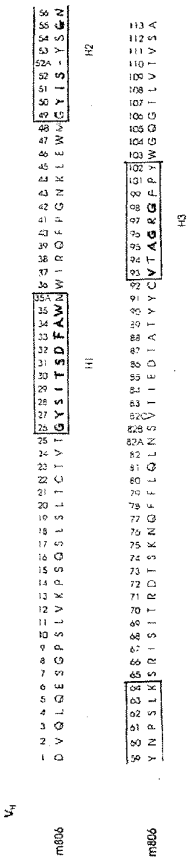
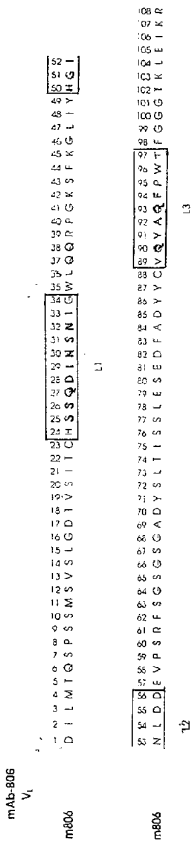


Fig. 17



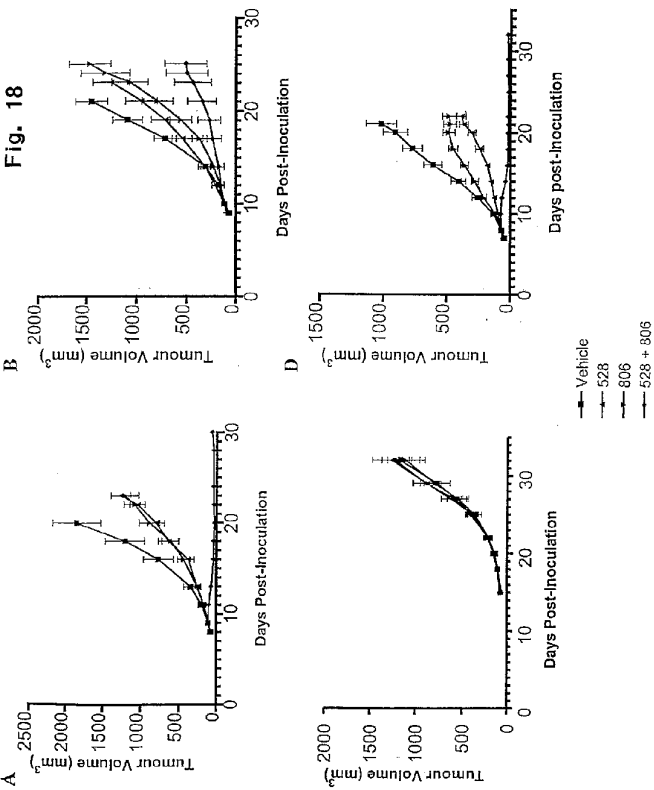


Fig. 19

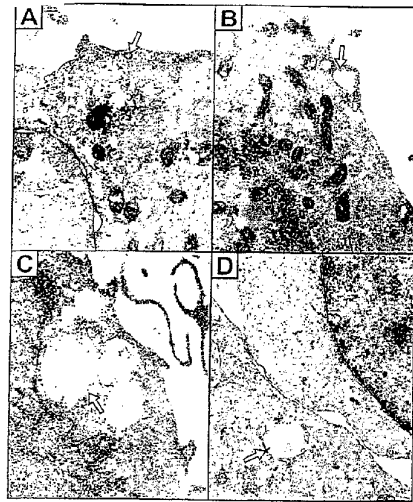
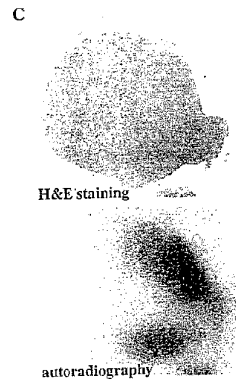


Fig. 20



WO 02/092771

22/49

PCT/US02/15185

Fig. 21

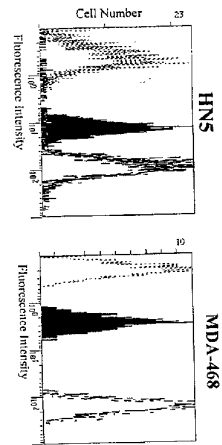


Fig. 22

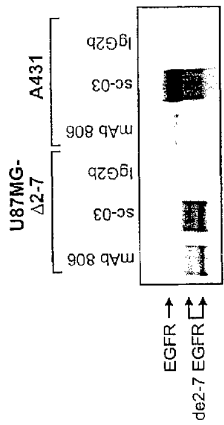
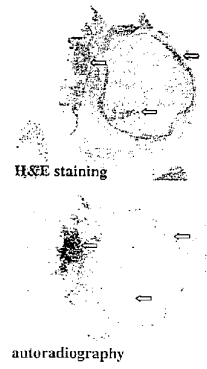


Fig. 23



WO 02/092771

25/49

PCT/US02/15185

Fig. 24

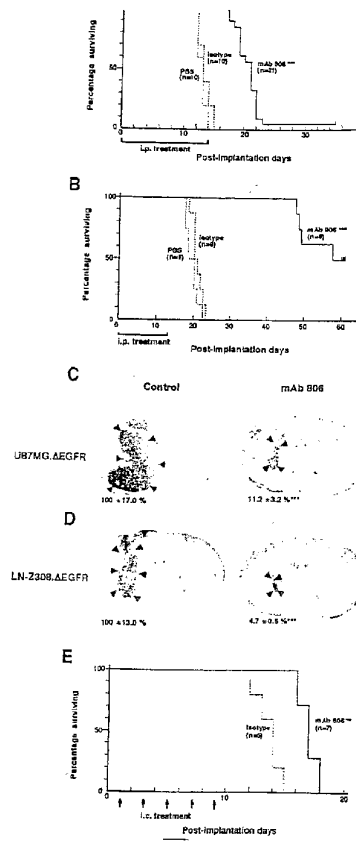


Fig. 25

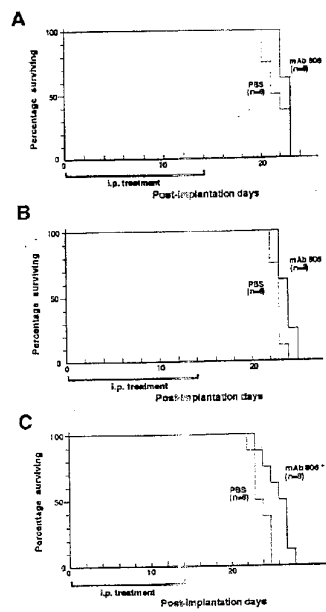


Fig. 26

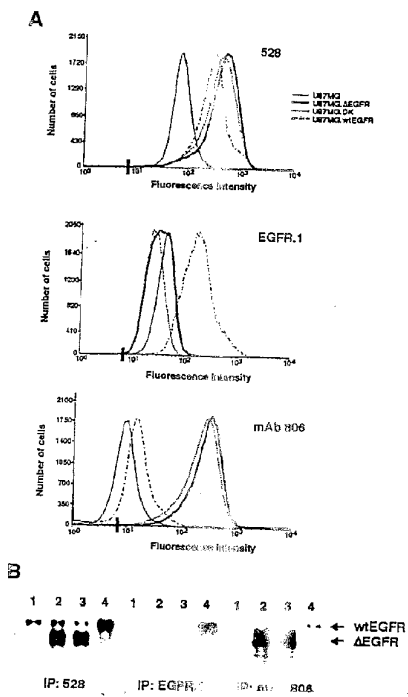
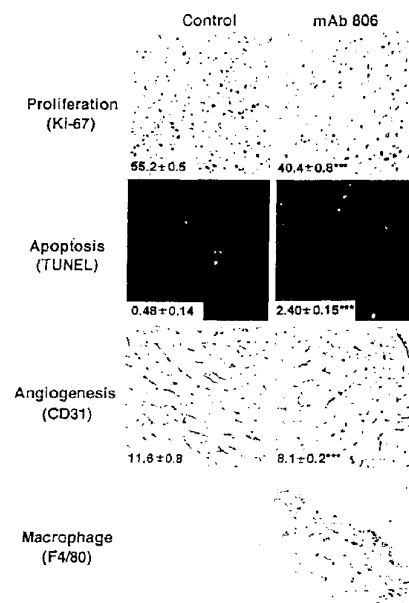


Fig. 27

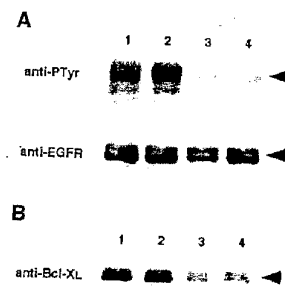


WO 02/092771

29/49

PCT/US02/15185

FIG28

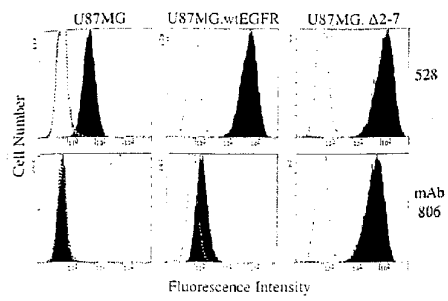


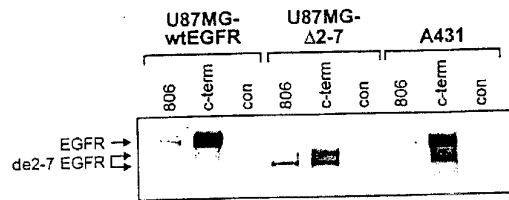
WO 02/092771

30/49

PCT/US02/15185

Fig. 29

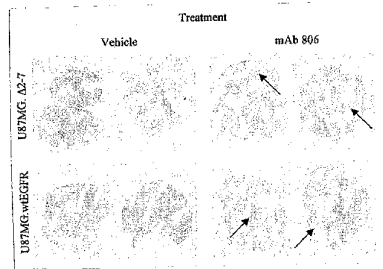




WO 02/092771

32/49

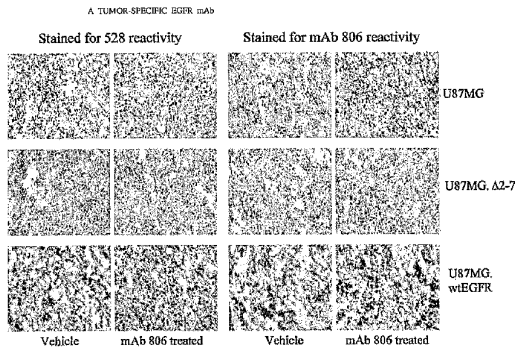
PCT/US02/15185



WO 02/092771

33/49

PCT/US02/15185



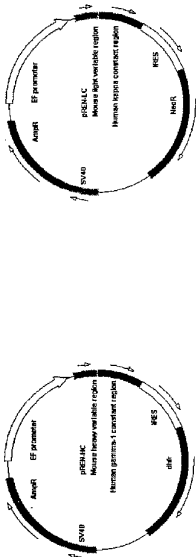


Fig. 33

Fig. 34

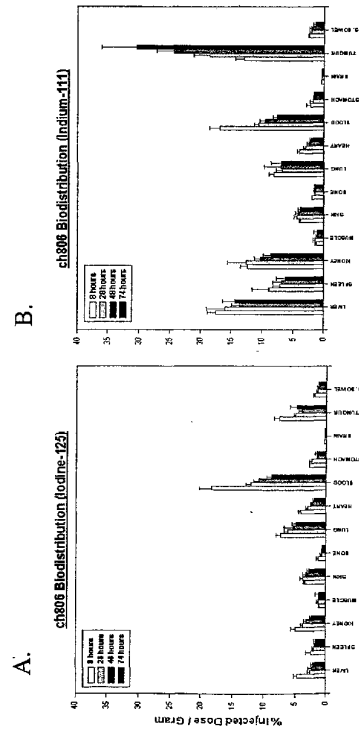


Fig. 35

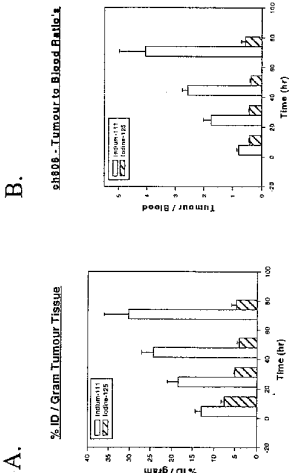


Fig. 36

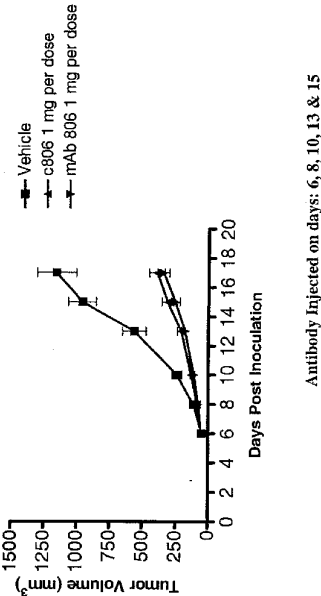


Fig. 37

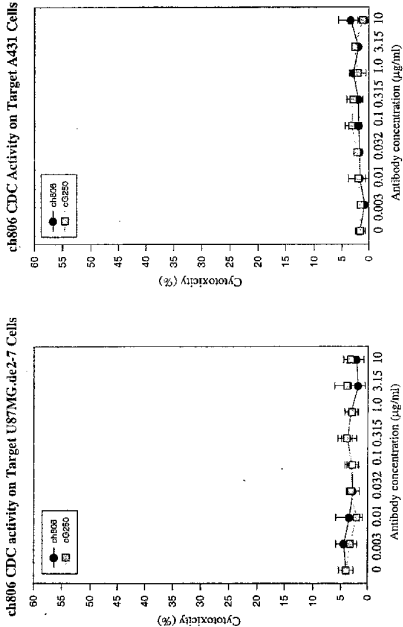
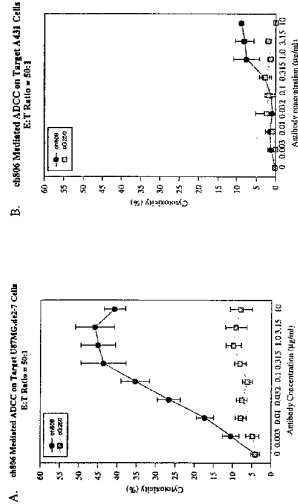


Fig. 38



1 µg/ml ch806 Mediated ADCC on U937G-de2-7 Cells
with different E:T Ratios

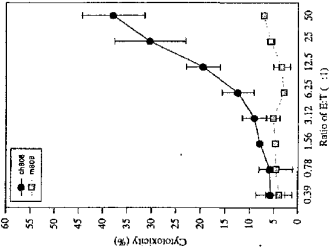


Fig. 39

Figure 1 consists of two graphs, A and B, showing the effect of diazinon on the growth of various algae. The x-axis for both graphs is Diazinon (μ g/l.) on a logarithmic scale from 0.1 to 10000. The y-axis for both graphs is AODM (mg dry wt./l.) on a linear scale from 0.0 to 2.0. Graph A shows growth in AODM (mg dry wt./l.) and Graph B shows growth in AODM (mg dry wt./l.) on a semi-logarithmic scale. Both graphs show a decrease in growth with increasing diazinon concentration. A legend identifies the algae species: CO₂, B₂, B₃, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₉, B₁₀, B₁₁, B₁₂, B₁₃, B₁₄, B₁₅, B₁₆, B₁₇, B₁₈, B₁₉, B₂₀, B₂₁, B₂₂, B₂₃, B₂₄, B₂₅, B₂₆, B₂₇, B₂₈, B₂₉, B₃₀, B₃₁, B₃₂, B₃₃, B₃₄, B₃₅, B₃₆, B₃₇, B₃₈, B₃₉, B₄₀, B₄₁, B₄₂, B₄₃, B₄₄, B₄₅, B₄₆, B₄₇, B₄₈, B₄₉, B₅₀.

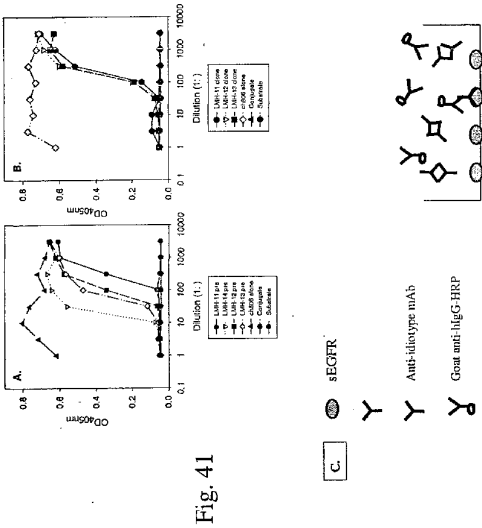


Fig. 41

Fig. 42

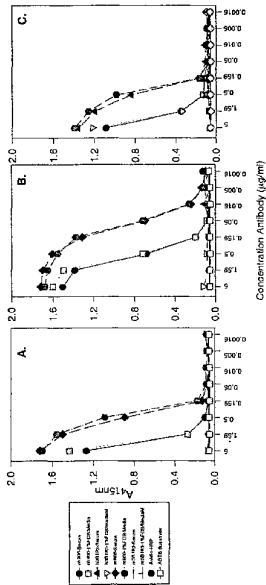


Fig. 43

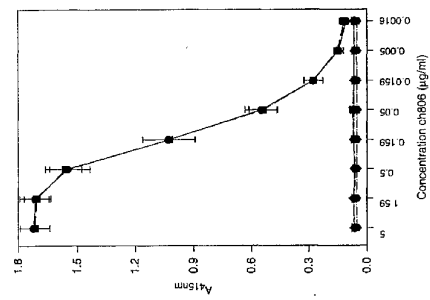


Fig. 44



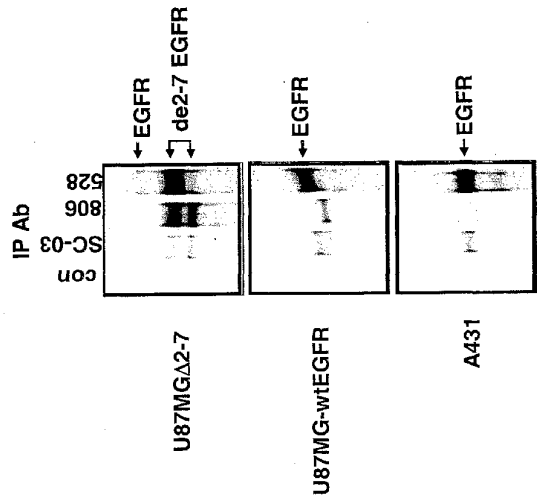
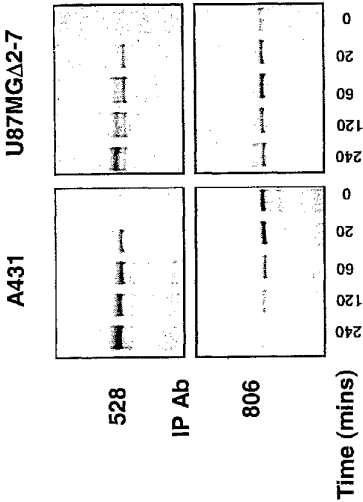


Fig. 45

Fig. 46



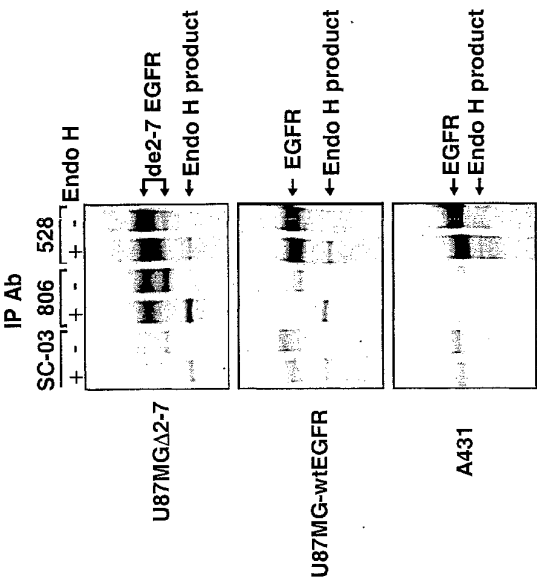
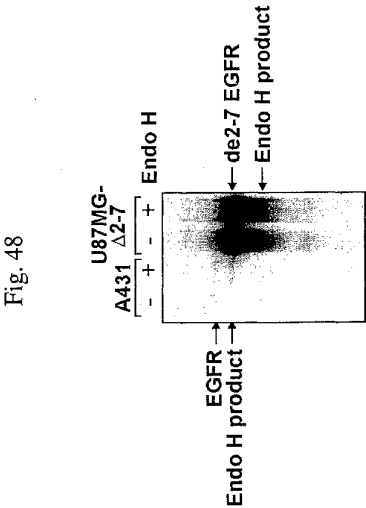


Fig. 47



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 November 2002 (21.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/092771 A3(51) International Patent Classification: A61K 39/395,
C07K 16/00

(21) International Application Number: PCT/US02/15185

(22) International Filing Date: 13 May 2002 (13.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/290,410 11 May 2001 (11.05.2001) US
60/326,019 28 September 2001 (28.09.2001) US
60/342,258 21 December 2001 (21.12.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): LUDWIG
INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US];
605 Third Avenue, New York, NY 10158 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): OLD, Lloyd, J.
[US/US]; 600 West End Avenue, Apt. 6D, New York,
NY 10024 (US). JOHNS, Terrance, Grant [AU/AU]; 13
Dunfield Avenue, Mitcham, VIC 3132 (AU). PANOUSIS,
Con [AU/AU]; 77 Linskin Road, Macleod, VIC 3085
(AU). SCOTT, Andrew, Mark [AU/AU]; 367 Colham
Road, Kew, VIC 3101 (AU). RENNERT, Christoph
[DE/DE]; Ringstr. 8, 66424 Ilomburg/Saar (DE). RIT-
TER, Gerd [DE/US]; 430 East 63rd Street, Apt. 10A, New
York, NY 10021 (US). JUNGBLUTH, Achim [DE/US];
450 East 63rd Street Apt. 9D, New York, NY 10021 (US).
STOCKERT, Elisabeth [AU/US]; 436 East 77th Street,
New York, NY 10002 (US). COLLINS, Peter [IE/GB]; 67
panion Street, Cambridge, CB2 1HL (GB). CAVENEE,Webster, K. [US/US]; 4657 vista de la Tierra, Del Mar, CA
92014 (US). HUANG, Hwei-Jen [US/US]; P.O. Box 247,
Rancho Santa Fe, CA 92067 (US). BURGESS, Anthony,
Wilks [AU/AU]; 32 Range Street, Camberwell, VIC 3124
(AU). NICLE, Edouard, collins [AU/AU]; 9, Odessa St,
St. Kilda, VIC 3124 (AU).(74) Agent: JACKSON, David, A.; Klauber & Jackson, 411
Hackensack Avenue, Hackensack, NJ 07601 (US).(81) Designated States (national): AT, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
— with international search report(88) Date of publication of the international search report:
27 November 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/092771 A3

(54) Title: SPECIFIC BINDING PROTEINS AND USES THEREOF

(57) Abstract: The invention relates to specific binding members, particularly antibodies and active fragments thereof, which recognize an aberrant post-translationally modified, particularly an aberrant glycosylated form of the EGFR. The binding members, particularly antibodies and fragments thereof, of the invention do not bind to EGFR on normal cells in the absence of amplification of the wild-type gene and are capable of binding the de2-7 EGFR at an epitope which is distinct from the junctional peptide. Antibodies of this type are exemplified by the novel antibody 806 whose VII and VL sequences are illustrated as SEQ ID Nos. 2 and 4 and chimeric antibodies thereof as exemplified by ch806.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/15185
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/395; C07K 16/00 US CL : 424/139.1; 530/388.1, 389.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/139.1; 530/388.1, 389.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,401,828 A (VOGELSTEIN et al) 28 March 1995 (28.03.1995), column 2, lines 28-32, column 25, lines 25-68, column 26, lines 1-68, column 27, lines 1-68, column 28, lines 1-68, column 29, lines 1-68, column 30, lines 1-68, column 31, lines 1-29.	1, 5, 42
X	US 5,795,965 A (TSUCHIYA et al) 18 August 1998 (18.08.1998), column 1, lines 60-67, column 2, lines 1-43, column 63, lines 33-54, column 64, lines 33-54.	10, 13, 32, 53
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 03 March 2003 (03.03.2003)	Date of mailing of the international search report 30 APR 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer James Andrew Telephone No. 703-308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/15185
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claim Nos.: 55-59, 63 and 64 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: A "use" is non-statutory.
2.	☐	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☒	Claim Nos.: 18-31, 33-41, 44-48 and 55-64 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☐	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/15185

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
STN, EAST
search terms: EGFR, EGF receptor, antibody

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/32	C 0 7 K 16/32	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 49/02	A
	A 6 1 K 43/00	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

- (72)発明者 オールド, ロイド ジェイ.
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10024, ニュー ヨーク, ウェスト エンド アベニュー 600, アpartment 6ディー
- (72)発明者 ジョンズ, テランス グラント
オーストラリア国 ビクトリア 3132, ミッチャム, ダンフィールド アベニュー 13
- (72)発明者 パヌーシス, コン
オーストラリア国 ビクトリア 3085, マックロード, エルスカイン ロード 77
- (72)発明者 スコット, アンドリュー マーク
オーストラリア国 ビクトリア 3101, ケイイーダブリュー., コザム ロード 367
- (72)発明者 レナー, クリストフ
ドイツ国 ホンブルク/ザール 66424, リンクシュトラッセ 8
- (72)発明者 リッター, ガード
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニュー ヨーク, イースト 63アールディー ストリート 430, アpartment 10エイ
- (72)発明者 ユングブルース, アキム
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニュー ヨーク, イースト 63アールディー ストリート 450, アpartment 9ディー
- (72)発明者 ストッカー, エリザベス
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10002, ニュー ヨーク, イースト 77ティーエイチ ストリート 436
- (72)発明者 コリンズ, ピーター
イギリス国 シービー2 1エイチエル, ケンブリッジ, パントン ストリート 67
- (72)発明者 カヴェニー, ウェブスター ケイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014, デル マー, ビスタ デ ラ ティエラ 4657

- (72)発明者 ホワン, ヘイージェン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067, ランチョ サンタ フェ, ピー. オー.
ボックス 247
- (72)発明者 バーゲス, アンソニー ウィルクス
オーストラリア国 ビクトリア 3124, キャンバーウエル, レンジ ストリート 32
- (72)発明者 ナイス, エドワード コリンズ
オーストラリア国 ビクトリア 3124, セイント キルダ, オデッサ ストリート, 9
- Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA02 HA15
4B064 AG27 CA19 CC24 DA05 DA14
4B065 AA15 AA26 AA41 AA50 AA72 AA88 AA90 AB01 CA25 CA44
CA46
4C084 AA12 AA19 MA02 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA03 AA13 AA14 BB36 EE03 EE05 HH03 KA03 KA29 LL18
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA41 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	特异性结合蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2004531263A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2002589639	申请日	2002-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	路德维格癌症研究所		
[标]发明人	オールドロイドジェイ ジョンステランズグラント パヌーシスコ スコットアンドリュウマーク レナークリストフ リッターガード ユングブルースアキム ストッカートエリザベス コリンズピーター カヴェニーウェブスターケイ ホワンハイジェン バーゲスアンソニーウィルクス ナイスエドワードコリンズ		
发明人	オールド, ロイド ジェイ. ジョンス, テランズ グラント パヌーシス, コン スコット, アンドリュウ マーク レナー, クリストフ リッター, ガード ユングブルース, アキム ストッカート, エリザベス コリンズ, ピーター カヴェニー, ウェブスター ケイ. ホワン, ハイ-ジェン バーゲス, アンソニー ウィルクス ナイス, エドワード コリンズ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K51/00 A61P35/00 C07K16/28 C07K16/32 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/ /53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/2863 A61K39/395 A61K39/39541 A61K45/06 A61K2039/505 C07K2317/34 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/77		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/395.E A61K39/395.T A61K45/00 A61P35/00 C07K16/32 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K49/02.A A61K43/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/CA02 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/ /CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA15 4B065/AA26 4B065/AA41 4B065/AA50 4B065/AA72 4B065/AA88 4B065/AA90 4B065/AB01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA12 4C084/ /AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB36 4C085/EE03 4C085/EE05 4C085/HH03 4C085/KA03 4C085/KA29 4C085/LL18 4H045/ /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		

代理人(译)	夏木森下
优先权	60/290410 2001-05-11 US 60/326019 2001-09-28 US 60/342258 2001-12-21 US
其他公开文献	JP2004531263A5 JP4414142B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明涉及特异性结合成员，特别是抗体及其活性片段，其识别异常的翻译后修饰的，特别是EGFR的异常糖基化形式。本发明的结合成员，特别是其抗体及其片段在没有野生型基因扩增的情况下不与正常细胞上的EGFR结合，并且能够在不同于表位的表位上结合de2-7EGFR。交联肽。这种类型的抗体的例子是新的抗体806，其VH和VL序列如SEQ ID No：2和4所示，其嵌合抗体如ch806所示。

Mab	異種移植片 A187MG _{de2-7EGFR}	異種移植片 A431	異種移植片 U87MG (ネイティブ)
528	ポジティブ	ポジティブ	ポジティブ(集中した染色)
mAb-124	ポジティブ	ポジティブ(主に基底細胞)	-
mAb-806	ポジティブ	ポジティブ(主に基底細胞)	-
mAb-1133	ポジティブ	ポジティブ(主に基底細胞)	-
DH8.3	ポジティブ	-	-